



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«Νέες πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνες με πιθανή
αντι-αγγειογενετική δράση».**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Καμπούκος Σταύρος, Φαρμακοποιός

Αθήνα, Ιούλιος 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΡΑΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΠΟΥΛΗ ΝΙΚΟΛΑΪΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΛΟΥΤΡΑΡΗ ΕΛΕΝΗ

Ε.ΔΙ.Π - Ερευνητικά εργαστήρια «Γ.Π. Λίβανος και Μ. Σίμου», Α' Κλινική Εντατικής Θεραπείας, Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, Ιατρική σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|-----------|
| Περίληψη | 5 |
| Abstract | 6 |
| Μέρος 1^ο- Εισαγωγή | 7 |
| 1.1 Η βιολογία του καρκίνου | 7 |
| 1.1.1 Η ασθένεια που ονομάζεται καρκίνος | 7 |
| 1.1.2 Μοριακή βάση της καρκινογένεσης | 8 |
| 1.1.3 Παράγοντες που προκαλούν καρκινογένεση | 10 |
| 1.1.4 Η φυσιολογία του καρκινικού κυττάρου | 11 |
| 1.1.5 Οι διαφορετικοί τύποι καρκίνου | 16 |
| 1.2 Η θεραπεία του καρκίνου | 17 |
| 1.2.1 Οι πρώτες θεραπευτικές προσεγγίσεις | 17 |
| 1.2.2 Η εξέλιξη της χημειοθεραπείας | 18 |
| 1.3 Αγγειογένεση και καρκίνος | 22 |
| 1.3.1 Η διαδικασία της αγγειογένεσης | 22 |
| 1.3.2 Οπαράγοντας ανάπτυξης VEGF και ο υποδοχέας του | 24 |
| 1.3.3 Ο μηχανισμός της αγγειογένεσης στον καρκίνο | 26 |
| 1.3.4 Αναστολείς του VEGFR ως αντικαρκινικά φάρμακα | 27 |
| 1.4 Στόχος της εργασίας | 32 |
| 1.4.1 Προγενέστερες ερευνητικές μελέτες | 32 |
| 1.4.2 Σχεδιασμός και στόχος της παρούσας εργασίας | 35 |
| Μέρος 2^ο- Συνθετική πορεία, αποτελέσματα βιολογικής αξιολόγησης-Συμπεράσματα | 37 |
| 2.1 Συνθετική πορεία | 37 |
| 2.1.1 Σύνθεση της 5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (10) και του αντιστοιχού 3-ιωδοπαραγώγου 11 | 37 |
| 2.1.2 Σύνθεση των N1-μεθυλοπαραγώγων 17a-c | 38 |
| 2.1.3 Σύνθεση των παραγώγων που φέρουν N1-(4-μεθοξυ)βενζυλομάδα 22a-b | 44 |
| 2.1.4 Επισκόπηση της καταλυτικής σύζευξης Buchwald-Hartwig | 48 |
| 2.2 Αποτελέσματα βιολογικής αξιολόγησης-Συμπεράσματα | 50 |
| 2.2.1 Μελέτη της επίδρασης των νέων παραγώγων στον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων | 50 |
| 2.2.2 Προσδιορισμός IC ₅₀ του παραγώγου VLK 23a | 57 |
| 2.2.3 Ανασκόπηση αποτελεσμάτων βιολογικής αξιολόγησης | 58 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.4 Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι | 60 |
| Μέρος 3^ο- Πειραματικό μέρος | 61 |
| 3.1 Σύνθεση νέων παραγώγων | 61 |
| 3.1.1 Γενικά πειραματικά στοιχεία | 61 |
| 3.1.2 Σύνθεση της 5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (10) και του αντιστοιχου 3-ιωδοπαραγώγου 11 | 61 |
| 3.1.3 Σύνθεση των N1-μεθυλοπαραγώγων 17a-c..... | 64 |
| 3.1.4 Σύνθεση των παραγώγων που φέρουν N1-(4-μεθοξυ)βενζυλομάδα 22a-b | 69 |
| 3.2 Υλικά και μέθοδοι βιολογικής αξιολόγησης | 74 |
| 3.2.1 Αντιδραστήρια, όργανα και αναλώσιμα..... | 74 |
| 3.2.2 Κυτταρικές σειρές και κυτταροκαλλιέργεια | 76 |
| 3.2.3 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων | 78 |
| 3.2.4 Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer | 79 |
| 3.2.5 Προσδιορισμός πολλαπλασιασμού κυττάρων με τη μέθοδο MTT | 81 |
| 3.2.6 Προσδιορισμός IC ₅₀ νέων μορίων..... | 86 |
| Βιβλιογραφία..... | 88 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία έτη, η προσπάθεια για βελτιστοποίηση της θεραπείας του καρκίνου, μίας από τις συνηθέστερες αιτίες θανάτου, έχει συγκεντρώσει το ερευνητικό ενδιαφέρον στην αξιολόγηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ασθένεια, καθώς και στην ανακάλυψη νέων δραστικών και εξειδικευμένων φαρμάκων. Οι πληροφορίες για τους ποικίλους μηχανισμούς καρκινογένεσης που έχουν συλλεγεί μέχρι σήμερα, έχουν οδηγήσει μεταξύ άλλων στην ανάπτυξη αναστολέων της αγγειογενετικής διαδικασίας. Προγενέστερη μελέτη μας, που αποτέλεσε την βάση για τον σχεδιασμό της παρούσας εργασίας, αφορά την αναστολή του κύριου διαμεσολαβητή της αγγειογένεσης, του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα (VEGF). Ανακαλύψαμε νέα παράγωγα πυραζολοπυριδίνης που επηρεάζουν προ-αγγειογόνες λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και την αγγειογένεση σε πειραματόζωα. Το πλέον ενδιαφέρον από αυτά τα παράγωγα αποτέλεσε την ένωση οδηγό της παρούσας εργασίας, στα πλαίσια της οποίας συντέθηκε ικανοποιητικός αριθμός αναλόγων του. Πρόκειται για 1,3,5,7-τετραϋποκατεστημένες πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνες, που η σύνθεσή τους έγινε με τη χρήση της 2-αμινο-4-πικολίνης ως πρώτης ύλης. Αυτή υποβλήθηκε σε διαδοχικές αντιδράσεις νίτρωσης, διαζώτωσης, χλωρίωσης, αναγωγής και θερμικής κύκλωσης και μετατράπηκε προς την 5-χλωροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη. Στην τελευταία έγινε διαδοχική εισαγωγή των επιλεγμένων υποκαταστατών στις θέσεις 1, 3, 7 και 5 του κεντρικού ετεροκυκλικού συστήματος. Ακολούθησε η αξιολόγηση των νέων μορίων, όσον αφορά την ικανότητα τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, ώστε να διερευνηθούν οι σχέσεις δομής-δράσης των παραγώγων αυτής της κατηγορίας.

Λέξεις-κλειδιά: πυραζολοπυριδίνη; σύνθεση; ισοστερή πουρίνης; αναστολείς αγγειογένεσης

ABSTRACT

New pyrazolo[3,4-c]pyridines as potential angiogenesis inhibitors

The need for the improvement of cure of cancer, a disease that cause many deaths worldwide, has emerged during recent years and the scientific research has focused on the estimation and validation of new molecular targets and the discovery of novel, more efficient and targeted drugs. The continuous investigation led to the clarification of many mechanisms involved in carcinogenesis and among them, the development of angiogenesis inhibitors is considered as a very promising research field. In the course of an ongoing research project, we have previously identified a series of substituted pyrazolo[3,4-c]pyridines, which influence crucial pro-angiogenic attributes of endothelial cells and exert antitumor activity in mice. The most promising of the previously reported derivatives was used as lead compound for the design and synthesis of a number of structurally related analogues, reported herein. These compounds are 1,3,5,7-tetrasubstituted pyrazolo[3,4-c]pyridines and their synthesis was effected using 2-amino-4-picoline as starting material. This was subjected in successive nitration, diazotation, chlorination, reduction and thermal cyclization and was converted to 5-chloropyrazolo[3,4-c]pyridine. Upon suitable manipulation of the above mentioned intermediate, the appropriate substituents were inserted in the central heterocyclic scaffold. The target compounds were then evaluated as inhibitors of endothelial cell proliferation, with the aim to extract structure-activity relationships, concerning this class of bioactive derivatives.

Key-words: pyrazolopyridine; synthesis; purine isosteres; angiogenesis inhibitors

ΜΕΡΟΣ 1^ο – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η βιολογία του καρκίνου

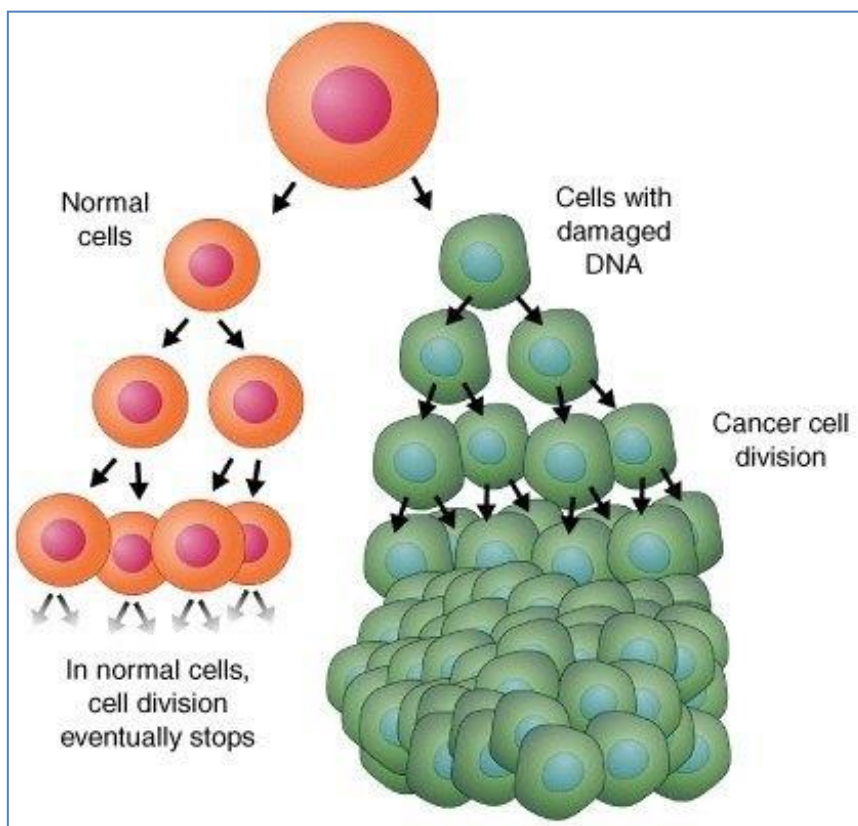
1.1.1 Η ασθένεια που ονομάζεται καρκίνος

Η οργάνωση των πολυκύτταρων οργανισμών βασίζεται στην εξέλιξη μιας εξαιρετικά μεγάλης ποικιλίας ιστών και ανατομικών δομών. Τα κύτταρα διαθέτουν μεγάλη ευελιξία και αυτονομία. Οι περισσότεροι τύποι κυττάρων φέρουν ένα πλήρες γονιδίωμα, που καταγράφει πολύ περισσότερες πληροφορίες από αυτές που θα απαιτηθεί να χρησιμοποιήσουν κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Πολλά από αυτά τα κύτταρα διατηρούν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να διαιρούνται μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του οργανισμού. Αυτή η ικανότητα πολλαπλασιασμού και συμμετοχής στη μορφογένεση των ιστών καθιστά δυνατή τη διατήρηση της λειτουργικότητας των ιστών του ενήλικα οργανισμού. Η διαδικασία συντήρησης μπορεί να περιλαμβάνει την επούλωση τραυμάτων και την αντικατάσταση των κυττάρων που έχουν υποστεί φθορά.^[1]

Ταυτόχρονα όμως, αυτή η ευελιξία και η αυτονομία δύνανται να αποτελέσουν παράγοντα κινδύνου, καθώς μεμονωμένα κύτταρα ενός οργανισμού μπορεί να αποκτήσουν πρόσβαση σε πληροφορίες που σε φυσιολογικές συνθήκες δεν χρειάζονται για την λειτουργία και συντήρηση του ιστού. Επιπλέον, αλληλουχίες του γονιδιώματος τους μπορεί να υποβληθούν σε φθορά με διάφορους μηχανισμούς που μεταβάλλουν τη δομή τους και επομένως τροποποιούν το περιεχόμενο των πληροφοριών. Τα προκύπτοντα μεταλλαγμένα γονίδια είναι δυνατό να εκτρέψουν τα κύτταρα από τη φυσιολογική λειτουργία και να τα υποβάλλουν στην απόκτηση νέων, συχνά ανώμαλων φαινοτύπων. Μεταξύ αυτών των αλλαγών μπορεί να περιλαμβάνεται η απώλεια ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αυτό μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση μεγάλων πληθυσμών κυττάρων που δεν υπακούουν πλέον στους κανόνες που διέπουν την ομοιόσταση των ιστών. Τα κύτταρα που απώλεσαν τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ονομάζονται καρκινικά κύτταρα.^[2]

Ενώ λοιπόν τα φυσιολογικά κύτταρα συνεργάζονται για την κατασκευή και το συντονισμό της λειτουργίας των διαφόρων ιστών, ώστε να καταστεί δυνατή η επιβίωση του πολυκύτταρου οργανισμού, τα καρκινικά κύτταρα έχουν ένα διαφορετικό στόχο: να δημιουργήσουν περισσότερα αντίγραφα των ιδίων. Μετά από μια πληθώρα ιστοπαθολογικών εξετάσεων που διεξήχθησαν κατά το πρώτο μισό του 20ού αιώνα^[3], με λεπτομερή διερεύνηση της οργάνωσης των κυττάρων μέσα σε καρκινικές μάζες απεδείχθη ότι η αρχιτεκτονική της οργάνωσης τους ήταν κατώτερη από αυτή των γειτονικών φυσιολογικών κυττάρων, ενώ φάνηκε ότι οι καρκινικοί όγκοι προκύπτουν από κύτταρα που έχουν χάσει την ικανότητα

συμμετοχής στη δημιουργία ιστών κανονικής μορφής και λειτουργίας. Ο καρκίνος λοιπόν αποτυπώνεται ως ασθένεια δυσλειτουργικών κυττάρων.



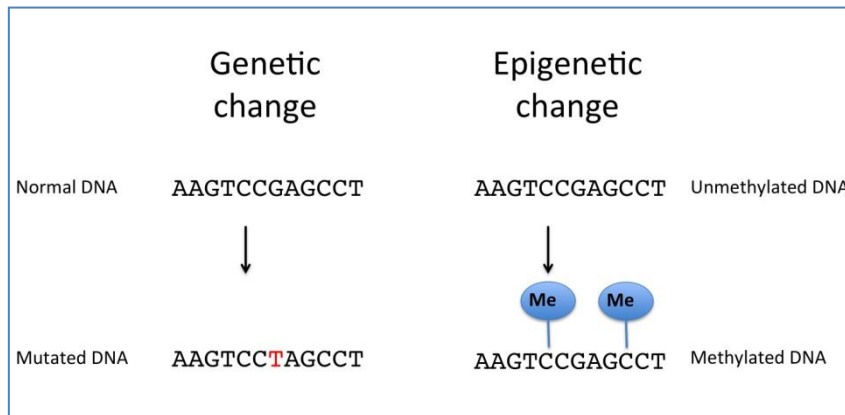
Εικόνα 1.1 Πολλαπλασιασμός φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων

Μεταξύ των δύο άκρων, των πλήρως φυσιολογικών και των εξαιρετικά κακοήθων ιστών, βρίσκεται ένα ευρύ φάσμα ιστών με ενδιάμεση εικόνα. Οι διαφορετικές διαβαθμίσεις της φαινοτυπικής ανωμαλίας αντικατοπτρίζουν τους κυτταρικούς πληθυσμούς που εξελίσσονται σταδιακά προς την απόκτηση πιο επιθετικής συμπεριφοράς.^[4]

1.1.2 Μοριακή βάση της καρκινογένεσης

Ο καρκίνος μπορεί να ξεκινήσει όταν μικρές αλλαγές, που ονομάζονται *μεταλλάξεις*, συμβούν σε μια αλληλουχία DNA. Αυτή η αλλαγή μπορεί να είναι περιορισμένη και να περιλαμβάνει την αλλαγή μίας μόνο βάσης, αλλάζοντας έτσι μία από τις τρεις βάσεις που περιλαμβάνει ένα κωδικόνιο, οδηγώντας στην επιλογή ενός διαφορετικού αμινοξέος που πρόκειται να ενσωματωθεί σε μια πρωτεΐνη, πράγμα που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αποβεί καταστροφικό όσον αφορά τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Άλλες αλλαγές στο DNA μπορεί να επηρεάσουν ένα μεγάλο αριθμό βάσεων, μερικές φορές αφαιρώντας ένα μεγάλο κομμάτι της έλικας που περιέχει αρκετά γονίδια, ή μετατοπίζοντάς το αλλού στο γονιδίωμα προς το

σχηματισμό νέων γονιδίων από την ένωση των μη συνεχόμενων τμημάτων DNA, οδηγώντας στη σύνθεση νέων μη φυσιολογικών πρωτεϊνών. Αυτές οι αλλαγές, ανεξάρτητα από το μέγεθός τους ονομάζονται γενετικές αλλοιώσεις ή μεταλλάξεις.



Εικόνα 1.2 Μεταλλάξη και επιγενετική αλλαγή

Ο τρόπος ανάγνωσης και αντιγραφής του DNA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τρόπο που έχει οργανωθεί και υπερελικωθεί. Στο DNA υπάρχουν 'κλειστές' περιοχές, οι οποίες δεν μπορούν να αντιγραφούν και 'ανοιχτές' περιοχές που το κύτταρο μπορεί να αντιγράψει, να διαβάσει και να χρησιμοποιήσει για την παραγωγή RNA και πρωτεϊνών. Ένας άλλος τρόπος για να αλλάξει ο κυτταρικός προγραμματισμός εκτός από τις μεταλλάξεις, είναι η τροποποίηση της υπερελίκωσης, με την απενεργοποίηση γονιδίων που βρίσκονται σε ανοιχτές περιοχές, ή την ενεργοποίηση άλλων, που βρίσκονται σε κλειστές περιοχές. Οι αλλαγές αυτές ονομάζονται *επιγενετικές*.^[5]

Υπάρχει ένας ελάχιστος αριθμός 'τριών βημάτων- παραβίασης τριών κανόνων' για την ανάπτυξη ενός πλήρως καρκινικού κυττάρου. Το κύτταρο πρέπει αρχικά να προβεί σε κυτταρική διαίρεση μόνο όταν λάβει το κατάλληλο σήμα. Για να 'σπάσει' αυτός ο κανόνας το κύτταρο πρέπει να έχει μόνιμα ενεργοποιημένη τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης. Αυτό γίνεται με την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία κανονικά ενεργοποιούνται μόνο όταν το κύτταρο διεγείρεται από μία ορμόνη ή ένα παράγοντα ανάπτυξης.^[6]

Ο δεύτερος κανόνας ορίζει ότι τα κύτταρα όταν έρχονται αντιμέτωπα με ακατάλληλες συνθήκες αντί να προχωρήσουν στην αντιγραφή του DNA ενεργοποιούν μια διαδικασία αυτοκαταστροφής και καταστροφής των γονιδίων. Για να παρακαμφθεί αυτή η διαδικασία, το κύτταρο πρέπει να απωλέσει τους μηχανισμούς ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης. Αυτές οι δικλείδες ασφαλείας ελέγχονται από δύο κύρια γονίδια, το RB1 (γονίδιο ρετινοβλαστώματος) και το TP53 (που παράγει τον μεταγραφικό παράγοντα p53). Όταν αυτά τα δύο γονίδια απενεργοποιούνται με μετάλλαξη, τα κύτταρα όχι μόνο μπορούν να διαιρεθούν,

αλλά αποφεύγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, επιτρέποντας τη δημιουργία καρκινικού όγκου.

Ο τρίτος κανόνας είναι ότι τα φυσιολογικά κύτταρα διαιρούνται για έναν σταθερό και περιορισμένο αριθμό φορών. Αυτό ελέγχεται από μια εξειδικευμένη δομή στο τέλος κάθε χρωμοσώματος, που ονομάζεται τελομερίδιο. Το τελομερίδιο αποτελείται από μικρές επαναλήψιμες αλληλουχίες DNA, που εκφυλίζονται κάθε φορά που το κύτταρο διαιρείται. Όταν όλες οι αλληλουχίες εξαντληθούν, το κύτταρο δεν μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω. Αντίθετα, στο καρκινικό κύτταρο, η ενεργοποίηση ενός ενζύμου που ονομάζεται τελομεράση επιτρέπει την προσθήκη νέων αλληλουχιών στο τέλος των χρωμοσωμάτων, γεγονός που επιτρέπει στο κύτταρο να διαιρείται συνεχώς. Αυτή η διαδικασία είναι ισοδύναμη με την απόκτηση μιας 'μόνιμης κυτταρικής νεότητας'.^[7]

Σε μοριακό επίπεδο η διαδικασία των τριών βημάτων δεν είναι απλή. Κάθε μία από αυτές τις αλλαγές μπορεί να ανατρέψει τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και να τα οδηγήσει στην καταστροφή μέσω της απόπτωσης, του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Έτσι, το κεντρικό πρόβλημα ενός καρκινικού κυττάρου είναι να συντονίσει πλήρως όλες αυτές τις αλλαγές. Στον συντονισμό αυτό παίζουν σημαντικό ρόλο η γενετική επιδεκτικότητα και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Η γενετική επιδεκτικότητα μπορεί να προσφέρει στα φυσιολογικά κύτταρα κάποιων ανθρώπων μεγαλύτερη αντοχή σε ταχείες γενετικές αλλαγές. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να λειτουργήσουν ως φυσική επιλογή και να επιτρέψουν την επιβίωση μη φυσιολογικών κυττάρων, που φαίνεται να προσαρμόζονται καλύτερα από τα φυσιολογικά σε διαταραγμένες συνθήκες. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο ο καρκίνος θεωρείται μια ασθένεια στην οποία παίζουν σημαντικό ρόλο, τόσο το γενετικό υπόβαθρο και οι μεταλλάξεις του, όσο και οι περιβαλλοντικές επιδράσεις.

1.1.3 Παράγοντες που προκαλούν καρκινογένεση

❖ Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στους παράγοντες αυτούς ανήκει η υπερβολική έκθεση σε καρκινογόνες ενώσεις που μπορεί να μειωθούν με την αλλαγή του τρόπου διαβίωσης, όπως πχ. με διακοπή του καπνίσματος. Κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε:

- *Φυσικούς παράγοντες*(πχ. έκθεση σε υπεριώδη ή ραδιενεργό ακτινοβολία)
- *Χημικούς παράγοντες*(πχ. έκθεση σε βενζόλιο, υψηλή κατανάλωση αιθυλικής αλκοόλης)
- *Βιολογικοί παράγοντες*(έκθεση σε ιούς που επάγουν καρκινογένεση)

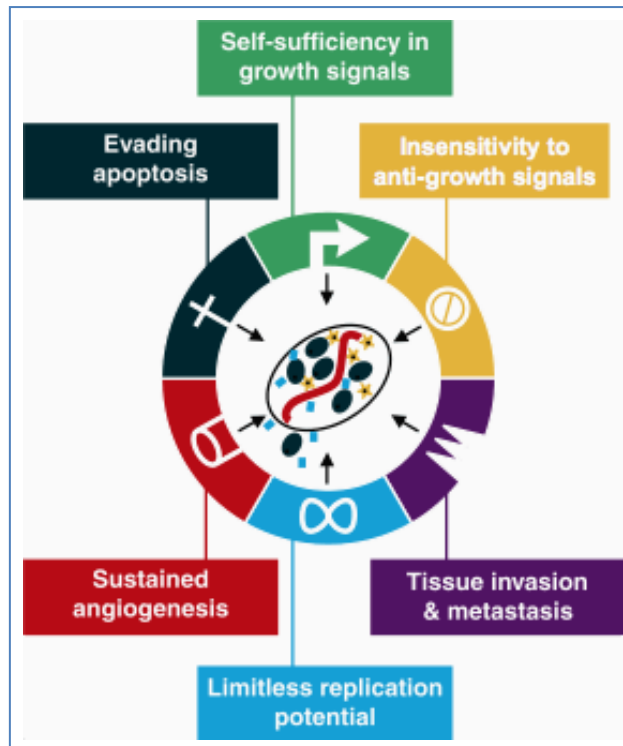
❖ Γενετικοί παράγοντες

Παρόλο που τα περιστατικά καρκινογένεσης παρατηρούνται σποραδικά ανά τον πληθυσμό, έχει παρατηρηθεί ότι πολλές φορές μια πληθώρα περιστατικών εμφανίζονται στα μέλη μιας οικογένειας. Τα αίτια τέτοιων οικογενών νεοπλασματικών ασθενειών παρέμεναν άγνωστα για πολλά χρόνια, έως ότου το 1986 μελέτες σε γονίδια συσχετιζόμενα με καρκίνο απεκάλυψαν τον ρόλο του γονιδίου *Rb1* στο ρετινοβλάστωμα. Ακολούθως προσδιορίστηκαν πολλά γονίδια που ευθύνονται για κληρονομικά νεοπλασματικά σύνδρομα. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA, με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου ή με διαταραχές κατά την μεταγωγή του σήματος.^[8]

1.1.4 Φυσιολογία του καρκινικού κυττάρου

Τα φυσιολογικά κύτταρα όσο εξελίσσονται προσδευτικά προς μία νεοπλασματική κατάσταση αποκτούν μια σειρά από χαρακτηριστικές ιδιότητες. Αυτή η πολυδιάστατη διαδικασία της ογκογένεσης επιτρέπει τη αλλαγή των φυσιολογικών κυττάρων προς ογκογόνα και τελικά κακοήθη κύτταρα. Οι όγκοι δεν είναι απλά απομονωμένες κυτταρικές μάζες κυττάρων ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, αλλά σύνθετοι ιστοί, που αποτελούνται από πολλαπλούς τύπους κυττάρων που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις. Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι τα φυσιολογικά κύτταρα σχηματίζουν ιστό που συνδέεται με τον καρκινικό όγκο, το στρώμα και έτσι έχουν ενεργητικό ρόλο στην ογκογένεση, δεν είναι δηλαδή απλά παθητικά παρευρισκόμενα. Τα στρωματικά κύτταρα επηρεάζουν την ανάπτυξη και την έκφραση των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων που θα αποκτήσουν τα καρκινικά κύτταρα. Η έννοια αυτή συνεχώς εδραιώνεται περαιτέρω και αποκαλύπτει ότι η βιολογία των όγκων δεν μπορεί να γίνει κατανοητή με απλή απαρίθμηση των χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων, αλλά πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη το μικροπεριβάλλον του όγκου για την κατανόηση της ογκογένεσης.

Τα εμπόδια που πρέπει να υπερπηδηθούν για την ανάπτυξη καρκίνου μπορούν να συνοψισθούν ως εξής: τα καρκινικά κύτταρα έχουν ελαττωματικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, που διέπουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ομοιόσταση. Υπάρχουν περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου και πολλοί υποτύποι όγκων σε συγκεκριμένα όργανα. Προτάθηκε λοιπόν από τους Weinberg και Hanahan το 2000 ότι αυτός ο τεράστιος κατάλογος των γονότυπων των καρκινικών κυττάρων είναι απλά μια εκδήλωση 6 βασικών αλλαγών στη φυσιολογία των κυττάρων που συλλογικά συνεισφέρουν στην κακοήθη ανάπτυξη. Κάθε μία από αυτές τις αλλαγές αντιπροσωπεύει τη ρήξη ενός αντικαρκινικού αμυντικού μηχανισμού που φυσιολογικά υπήρχε στα κύτταρα και τους ιστούς.^[9]



Εικόνα 1.4 Οι έξι 'πυλώνες' της καρκινογένεσης

Παρακάτω ακολουθεί μια περιληπτική περιγραφή για καθένα από αυτούς.

❖ **Διατήρηση σηματοδότησης για πολλαπλασιασμό**

Ίσως από τα πιο θεμελιώδη επίκτητα χαρακτηριστικά είναι η διατήρηση της ικανότητας για συνεχή πολλαπλασιασμό. Τα φυσιολογικά κύτταρα χρειάζονται μιτογόνα σήματα ανάπτυξης ώστε να μεταβούν από μια φάση αδράνειας σε μία ενεργή κατάσταση πολλαπλασιασμού. Αυτά τα σήματα μεταδίδονται στο κύτταρο από διαμεμβρανικούς υποδοχείς στους οποίους προσδέονται χαρακτηριστικές κατηγορίες σηματοδοτικών μορίων: παράγοντες ανάπτυξης, συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας και μόρια που προκύπτουν από την προσκόλληση δύο γειτονικών κυττάρων. Όσο γνωρίζουμε, κανένα κύτταρο δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί χωρίς την παρουσία τέτοιων σηματοδοτικών μορίων. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν μια πληθώρα ογκογόνων παραγόντων που δρουν προσομοιάζοντας τη φυσιολογική σηματοδότηση με διάφορους τρόπους.

Το συμπέρασμα είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα παράγουν τα ίδια πολλά από τα σηματοδοτικά μόρια που χρειάζονται, μειώνοντας έτσι την εξάρτησή τους από τη διέγερση από το μικροπεριβάλλον του ιστού. Αυτή η απεξάρτηση από τα εξωγενώς παραγόμενα σήματα διαταράσσει ένα σημαντικό ομοιοστατικό μηχανισμό ο οποίος λειτουργεί για να εξασφαλίσει μία σωστή συμπεριφορά των διαφόρων τύπων κυττάρων μέσα στον ιστό.^[9]

❖ Απευαισθητοποίηση στη σηματοδότηση που αναστέλλει την ανάπτυξη

Μέσα σε έναν φυσιολογικό ιστό, πολλά αντι-πολλαπλασιαστικά σήματα λειτουργούν για να διατηρήσουν την κυτταρική ηρεμία και την ομοιόσταση των ιστών. Αυτά τα σήματα περιλαμβάνουν τόσο διαλυτούς αναστολείς ανάπτυξης όσο και ακινητοποιημένους αναστολείς, ενσωματωμένους στην εξωκυττάρια μήτρα και στις επιφάνειες των γειτονικών κυττάρων. Αυτά τα ανασταλτικά σήματα, λαμβάνονται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας συζευγμένους με κυκλώματα ενδοκυττάριας σηματοδότησης.

Τέτοια αντι-πολλαπλασιαστικά σήματα μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό με δύο διακριτούς μηχανισμούς. Τα κύτταρα υποχρεούνται να εξέλθουν από τον μιτωτικό κύκλο και να εισέλθουν στη φάση αδράνειας (G_0), από την οποία θα ξαναφύγουν μόνο όταν το επιτρέψουν εξωκυττάρια μιτογόνα σήματα. Εναλλακτικά, τα κύτταρα επάγονται ώστε να απολέσουν μόνιμα το μιτογόνο προφίλ τους με το να εισέλθουν σε μετά-μιτωτικές καταστάσεις, οι οποίες σχετίζονται με απόκτηση χαρακτηριστικών ιδιοτήτων διαφοροποίησης.

Τα καρκινικά κύτταρα, αν θέλουν να επιβιώσουν πρέπει να αποφύγουν αυτά τα αντι-πολλαπλασιαστικά σήματα. Αυτό το πετυχαίνουν με αποκλεισμό του σηματοδοτικού μονοπατιού της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, που είναι υπεύθυνη για τη διάδοση των περισσότερων, αν όχι όλων των σημάτων αυτού του είδους.^[9]

❖ Αποφυγή της διαδικασίας της απόπτωσης

Η ικανότητα των πληθυσμών των καρκινικών κυττάρων να αυξηθούν σε αριθμό προσδιορίζεται όχι μόνο από τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων αλλά και από τον ρυθμό κυτταρικής φθοράς. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος-απόπτωση - αποτελεί μια σημαντική πηγή αυτής της φθοράς. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις από μοντέλα πειραματόζων, από κυτταροκαλλιέργειες αλλά και από περιγραφικές αναλύσεις βιοψιών, ότι η απόκτηση αντίστασης στην απόπτωση είναι ένα χαρακτηριστικό των περισσότερων και ίσως όλων των τύπων καρκίνου.^[9]

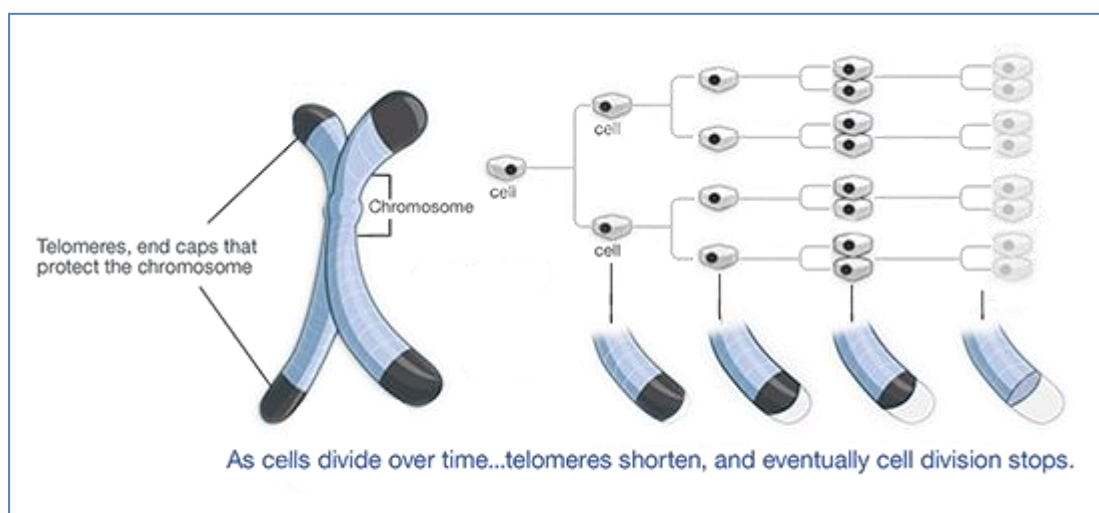
❖ Ανεξάντλητο προφίλ πολλαπλασιασμού

Τα τρία χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν παραπάνω—η αυτονομία σήματος ανάπτυξης, η έλλειψη ευαισθησίας στα σήματα καταστολής του πολλαπλασιασμού και η αντοχή στην απόπτωση - όλα οδηγούν σε αποσύνδεση του προγράμματος ανάπτυξης ενός κυττάρου από σήματα στο περιβάλλον του. Θεωρητικά, το προκύπτον προφίλ του ρυθμού πολλαπλασιασμού θα έπρεπε να αρκεί για να καταστεί δυνατή η δημιουργία των τεράστιων κυτταρικών πληθυσμών που συνιστούν μακροσκοπικούς όγκους. Ωστόσο, η έρευνα που έχει διεξαχθεί τα τελευταία 30 χρόνια δείχνει ότι αυτή η αποκτούμενη αυτονομία του

καρκινικού κυττάρου από το περιβάλλον του, από μόνη της, δεν εξασφαλίζει την εκτεταμένη ανάπτυξη όγκου. Πολλοί, ίσως και όλοι οι τύποι κυττάρων των θηλαστικών, φέρουν ένα εγγενές αυτόνομο πρόγραμμα που περιορίζει τον πολλαπλασιασμό τους. Αυτό το πρόγραμμα φαίνεται ότι λειτουργεί ανεξάρτητα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που περιγράφηκαν παραπάνω. Πρέπει λοιπόν και το σύστημα αυτό να διαταραχθεί για να μπορέσει ένας κλώνος κυττάρων να επεκταθεί σε μέγεθος που να αποτελέσει ένα μακροσκοπικό, απειλητικό για τη ζωή όγκο.

Ο μηχανισμός αυτός, όπως έχει αναφερθεί και πιο πάνω, είναι η απώλεια ενός αριθμού ζευγών βάσεων από τα άκρα του χρωμοσώματος, το τελομερίδιο, μετά από κάθε επιτυχή αντιγραφή του. Η προοδευτική διάβρωση των τελομεριδίων διαμέσου διαδοχικών κύκλων αναδιπλασιασμού τελικά αναγκάζει τα φυσιολογικά κύτταρα να χάσουν την ικανότητά τους να προστατεύουν τα άκρα του χρωμοσωμικού DNA. Τα μη προστατευμένα χρωμοσωμικά άκρα συμμετέχουν σε συγχρονισμένες χρωμοσωμικές συντήξεις, αποδίδοντας την καρυοτυπική ασυμφωνία και οδηγούν, σχεδόν αναπόφευκτα, στον θάνατο του επηρεαζόμενου κυττάρου.

Η συντήρηση του τελομεριδίου είναι εμφανής σε όλους σχεδόν τους τύπους καρκινικών κυττάρων. Το 85-90% αυτών επιτυγχάνεται με την αύξηση της έκφρασης του ενζύμου τελομεράσης, το οποίο προσθέτει επαναλήψεις εξανουκλεοτιδίων στα άκρα του DNA.^[9]



Εικόνα 1.5 Η δομή του τελομεριδίου και η λειτουργία του

❖ Επαγωγή της αγγειογένεσης

Το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται από το αγγειακό σύστημα είναι κρίσιμα για τη λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων, υποχρεώνοντας ουσιαστικά όλα τα κύτταρα σε έναν ιστό να παραμείνουν εντός 100 μm από το πιο

κοντινό τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο. Κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης, αυτή η εγγύτητα εξασφαλίζεται από τη συντονισμένη ανάπτυξη των αγγείων και του παρεγχύματος. Μόλις σχηματιστεί ένας ιστός, η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων - η διαδικασία που ονομάζεται αγγειογένεση - είναι παροδική και προσεκτικά ρυθμισμένη. Λόγω αυτής της άμεσης εξάρτησης από τα κοντινά τριχοειδή αγγεία, φαίνεται εύλογο το γεγονός ότι τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα μέσα σε έναν ιστό θα πρέπει να έχουν μια εγγενή ικανότητα να προάγουν την ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων. Αυτό όμως που συμβαίνει στην πραγματικότητα είναι το αντίθετο. Τα κύτταρα εντός ανώμαλων πολλαπλασιαστικών αλλοιώσεων αρχικά στερούνται την αγγειογόνο ικανότητα, γεγονός που περιορίζει την δυνατότητα τους για επέκταση. Προκειμένου να αυξηθούν σε μέγεθος, οι αρχικές νεοπλασίες πρέπει να προάγουν την αγγειογένεση. Ο τρόπος με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα το επιτυγχάνουν αυτό θα αναλυθεί με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στη συνέχεια της εργασίας.^[9]

❖ Μετάσταση

Αργά ή γρήγορα, κατά την ανάπτυξη των περισσότερων τύπων καρκίνου του ανθρώπου, οι πρωτογενείς μάζες όγκων δημιουργούν κύτταρα που ξεκινούν και εισβάλλουν στους παρακείμενους ιστούς και από εκεί ταξιδεύουν, μέσω αιμοφόρων αγγείων ή λεμφαγγείων, σε απομακρυσμένες περιοχές όπου μπορούν να κατορθώσουν να ιδρύσουν νέες αποικίες καρκινικών κυττάρων. Αυτές οι μακρινές αποικίες, οι λεγόμενες μεταστάσεις, είναι η αιτία του 90% των θανάτων στον άνθρωπο από καρκίνο. Η ικανότητα εισβολής σε γειτονικούς ιστούς και μετάστασης επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να ξεφύγουν από την πρωτογενή μάζα του όγκου και να αποικίσουν σε ένα νέο έδαφος στο σώμα όπου, τουλάχιστον αρχικά, τα θρεπτικά συστατικά και ο χώρος δεν θα τα περιορίζουν. Οι νεοσχηματισμένες μεταστάσεις εμφανίζονται ως αμάλγαμα καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων που υποστηρίζονται από τον ιστό ξενιστή. Όπως και ο σχηματισμός της πρωταρχικής μάζας όγκου, η επιτυχής εισβολή και η μετάσταση εξαρτώνται από όλες τις άλλες πέντε ικανότητες που έχουν αποκτηθεί και αναφέρθηκαν παραπάνω.

Η διείσδυση και η μετάσταση είναι εξαιρετικά πολύπλοκες διαδικασίες, όσον αφορά το γενετικό και βιοχημικό τους υπόβαθρο. Σε μηχανιστικό επίπεδο, είναι στενά συγγενείς διαδικασίες, γεγονός που δικαιολογεί τη συσχέτισή μεταξύ τους ως μια γενική ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων. Και οι δύο χρησιμοποιούν παρόμοιες διαδικασίες, που περιλαμβάνουν αλλαγές στη φυσική σύζευξη των κυττάρων στο μικροπεριβάλλον τους και την ενεργοποίηση εξωκυττάρων πρωτεασών.^[9]

❖ Νέες προσεγγίσεις

Εκτός από αυτά τα έξι προαναφερθέντα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, έρχονται να προστεθούν και κάποιες ακόμα ιδιότητες που φαίνονται να είναι

λειτουργικά πολύ σημαντικές για την ανάπτυξη του καρκίνου και συνεπώς μπορούν να προστεθούν στον κατάλογο των βασικών χαρακτηριστικών. Δύο από αυτές είναι ιδιαίτερα επιτακτικές. Η πρώτη αφορά το μεγάλο επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού της κυτταρικής ενέργειας προκειμένου να υποστηριχθεί η συνεχής ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, αντικαθιστώντας το μεταβολικό προφίλ που υπάρχει στους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς και τροφοδοτεί τις φυσιολογικές λειτουργίες των σχετικών κυττάρων. Η δεύτερη περιλαμβάνει την αποφυγή επιθέσεων των καρκινικών κυττάρων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτή η δυνατότητα υπογραμμίζει τη διττή φύση του ρόλου του ανοσοποιητικού συστήματος που ανταγωνίζεται αλλά ταυτόχρονα ενισχύει την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου. Και οι δύο αυτές ικανότητες αποδεικνύεται ότι διευκολύνουν την ανάπτυξη και εξέλιξη πολλών μορφών καρκίνου του ανθρώπου και συνεπώς μπορεί να θεωρηθούν ως αναδυόμενα χαρακτηριστικά της καρκινογένεσης.^[10]

1.1.5 Οι διαφορετικοί τύποι καρκίνου

Οι διάφοροι τύποι καρκίνου μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με δύο τρόπους: από τον τύπο του ιστού στο οποίο παρατηρείται η ογκογένεση ή από το σημείο στο ανθρώπινο σώμα που πρωτοεμφανίστηκε. Από μια ιστολογική σκοπιά υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι καρκίνου, που μπορούν να ομαδοποιηθούν σε έξι μεγάλες κατηγορίες^[11]:

- Καρκινώματα
- Σαρκώματα
- Μυελώματα
- Λευχαιμία
- Λεμφώματα
- Ανάμικτοι τύποι καρκίνου

1.2 Θεραπεία του καρκίνου

1.2.1 Οι πρώτες θεραπευτικές προσεγγίσεις

Ο καρκίνος αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα υγείας στις ανεπτυγμένες χώρες, όπου αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου, καθώς συνδέεται κυρίως με τη γήρανση του πληθυσμού και τον νέο τρόπο ζωής. Η πρόωρη διάγνωση, η καθολική πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη και οι εξελίξεις στις θεραπείες έχουν συμβάλει στη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών.

Η πρώτη και πιο παλιά προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου είναι η χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Μετά την εισαγωγή της γενικής αναισθησίας το 1846, οι χειρουργοί Bilroth, Handley και Halsted επιχείρησαν πρώτοι την αφαίρεση ολόκληρου του όγκου, καθώς και ορισμένων γειτονικών λεμφαδένων. Αργότερα όμως, ο χειρουργός Paget ανακάλυψε ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εξαπλωθούν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και να δημιουργήσουν νέο όγκο, σε ιστό που εντοπίζεται μακριά από το σημείο εμφάνισης του πρωτογενούς όγκου (μετάσταση). Οι απεικονιστικές τεχνικές που άρχισαν να εφαρμόζονται από τις αρχές της δεκαετίας του 1970, όπως ο υπερηχογράφος, η υπολογιστική τομογραφία (CT), η μαγνητική τομογραφία και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) έχουν αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό τα διερευνητικά χειρουργεία, ενώ σήμερα είναι δυνατή η απομάκρυνση όγκων του παχέος εντέρου, του οισοφάγου και της ουροδόχου κύστης μέσω σωλήνων, με τη χρήση μικροσκοπικής βιντεοκάμερας και ενδοσκοπικών μικροεπεμβάσεων. Επίσης, εφαρμόζονται και λιγότερο επεμβατικοί τρόποι καταστροφής των όγκων, όπως ο τοπικός ψεκασμός υγρού αζώτου προς καταστροφή των καρκινικών κυττάρων (κρυοχειρουργική) και ακτινοβολίας λέιζερ για την αποκοπή μικρών όγκων τραχήλου, λάρυγγα, ήπατος, ορθού, δέρματος και άλλων οργάνων. Από τις αρχές του 20ου αιώνα χρησιμοποιείται και η ακτινοθεραπεία, με σκοπό τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων, όπως και η ενδο-λειτουργική ακτινοθεραπεία, όταν ο καρκινικός όγκος έχει απομακρυνθεί χειρουργικά και ακολουθεί ακτινοβολήση των παρακείμενων ιστών, για θεραπευτικούς, ή και προληπτικούς λόγους.

Η χειρουργική και η ακτινοθεραπεία κυριάρχησαν στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου μέχρι και τη δεκαετία του 1960, ώσπου έγινε σαφές ότι τα ποσοστά θεραπείας, ακόμα και μετά την εισαγωγή ριζικών τοπικών θεραπειών, είχαν σταθεροποιηθεί περίπου στο 33%, κυρίως λόγω της παρουσίας των υποτιμημένων έως τότε μεταστάσεων. Τα στοιχεία όμως έδειξαν ότι μόνο ο συνδυασμός των προαναφερθέντων τεχνικών με χημειοθεραπεία θα μπορούσε να θεραπεύσει ασθενείς που έπασχαν από προχωρημένο καρκίνο, διαφόρων τύπων. Εφαρμόστηκαν κατάλληλα φάρμακα, σε συνδυασμό με χειρουργική επέμβαση

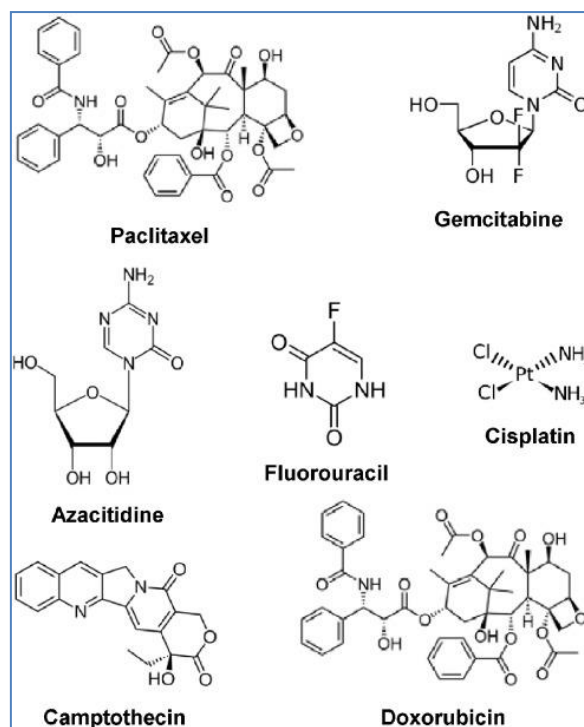
και/ή με θεραπείες ακτινοβολίας, για την αντιμετώπιση των πιθανών μεταστάσεων, αρχικά σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, και σταδιακά αναπτύχθηκε η χημειοθεραπεία ως βασική θεραπευτική προσέγγιση. Η κατά περίπτωση συνδυασμένη χρήση των τριών δυνατών θεραπευτικών παρεμβάσεων, χειρουργικής αφαίρεσης, ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας έγινε συνήθης κλινική πρακτική, με σκοπό την μεγιστοποίηση του αντικαρκινικού αποτελέσματος και την ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση της τοξικότητας στους φυσιολογικούς ιστούς.^[12]



Εικόνα 1.6 Συνδυαστική θεραπευτική προσέγγιση κατά του καρκίνου

1.2.2 Η εξέλιξη της χημειοθεραπείας

Τα παλαιότερα αντικαρκινικά φάρμακα είναι σχεδόν στο σύνολό τους κυτταροτοξικοί παράγοντες. Τα περισσότερα από αυτά αναγνωρίζουν ως κυτταρικό στόχο το DNA και αναστέλλουν με διάφορους τρόπους τη σύνθεση και λειτουργία του, ή επεμβαίνουν στην κυτταρική διαίρεση, δρώντας π.χ. ως αναστολείς της λειτουργίας των τοποϊσομερασών, ή των μικροσωληνίσκων. Τα φάρμακα αυτά, πχ. οι αλκυλιωτικοί παράγοντες *cyclophosphamide* και *ifosphamide* είναι αποτελεσματικά και αποτελούν μέχρι σήμερα τη βάση των αντικαρκινικών θεραπευτικών σχημάτων. Εμφανίζουν όμως σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, λόγω της κυτταροτοξικότητάς τους, που εκδηλώνεται αδιακρίτως, έναντι όλων των ταχέως αναπαραγόμενων κυττάρων. Κύριες κατηγορίες κυτταροτοξικών φαρμάκων εκτός των αλκυλιωτικών παραγόντων είναι οι αντιμεταβολίτες, τα σύμπλοκα πλατίνας, οι νιτροζουρίες, οι αναστολείς μικροσωληνίσκων και τοποϊσομερασών και ορισμένα φυσικά προϊόντα (Εικόνα 1.7).^[13]



Εικόνα 1.7 Παλαιότερα αντικαρκινικά φάρμακα

Στα χρόνια που ακολούθησαν ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων βασίστηκε στην αυξανόμενη κατανόηση της κυτταρικής λειτουργίας, κυρίως σε ότι αφορά τον ρόλο των σηματοδοτικών μονοπατιών και τη σχέση της γονιδιακής έκφρασης με την καρκινογένεση. Τα νέα αντικαρκινικά φάρμακα είναι λιγότερο τοξικά και πιο στοχευμένα και ανοίγουν το δρόμο για την ανάπτυξη μεθόδων πιο εξατομικευμένης θεραπείας. Η ανακάλυψή τους βασίστηκε στην ραγδαία πρόοδο των βιολογικών επιστημών, που επέτρεψε την ανακάλυψη και αξιολόγηση πληθώρας νέων μοριακών στόχων. Η αποτελεσματικότητα αυτών των φαρμάκων έχει ήδη δοκιμασθεί στην κλινική πράξη, καθώς η έγκριση χημικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους αλλά και αντισωμάτων, με πρώτο το *trastuzumab* το 1998. Πρόκειται για ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα, που επέδειξε θεραπευτική δράση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζουν την ογκοπρωτεΐνη ERBB2/HER2, υπογραμμίζοντας την σημασία της θεραπείας που βασίζεται σε συγκεκριμένο μοριακό δείκτη. Ακολούθησε η έγκριση του *imatinib*, που δρα ως ισχυρός, αλλά όχι και αποκλειστικός αναστολέας της ογκογενούς υβριδικής κινάσης τυροσίνης BCR-ABL. Στη συνέχεια ακολούθησε η ανάπτυξη πολλών συνθετικών παραγώγων και μονοκλωνικών αντισωμάτων που βρήκαν κλινική εφαρμογή σε διάφορες μορφές καρκίνου.

Ένας πολύ σημαντικός στόχος των νέων αντικαρκινικών φαρμάκων είναι επίσης η αναστολή της αγγειογένεσης, που όχι μόνο συνδέεται, αλλά αποτελεί έναν από τους 'πυλώνες' της καρκινογένεσης. Το *bevacizumab* είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται με τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τις λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων, που συγκροτούν τα αγγεία και διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην αγγειογένεση. Αναλυτικότερη αναφορά για τη διαδικασία της αγγειογένεσης και τη σημασία της στην καρκινογένεση θα γίνει στο επόμενο κεφάλαιο.^[15]

Η επιτακτική ανάγκη για βελτίωση της επιβίωσης και της ποιότητας ζωής των ασθενών, η συνεχής αναβάθμιση των γνώσεων μας σχετικά με τη φυσιολογία του καρκίνου, αλλά και η ανακάλυψη νέων τεχνολογιών, έχουν προσθέσει καινούργιες δυνατότητες και προσεγγίσεις που μπορούν δυνητικά να εφαρμοσθούν στην αντικαρκινική θεραπεία. Ορισμένες από τις πλέον πρόσφατες προσεγγίσεις παρουσιάζονται ενδεικτικά στην Εικόνα 1.9.



Εικόνα 1.9 Νέες κατευθύνσεις αντικαρκινικής θεραπείας

❖ Φάρμακα που σχετίζονται με τη δράση των *microRNAs*

Τα *microRNAs* (miRNAs) είναι μικρά μη κωδικοποιούμενα RNA που έχουν μήκος περίπου 20-25 νουκλεοτιδίων. Ρυθμίζουν την έκφραση πολλαπλών γονιδίων-στόχων μέσω υβριδισμού μιας ειδικής αλληλουχίας στην 3'-αμετάφραστη περιοχή

(UTR) αγγελιοφόρων RNAs. Αυτά τα microRNA παρεμποδίζουν τη μετάφραση, ή μπορούν να προκαλέσουν άμεση απενεργοποίηση των RNA αγγελιοφόρων-στόχων τους. Τα miRNAs δεν απαιτούν τέλεια συμπληρωματικότητα για την αναγνώριση στόχου, και έτσι ένα ενιαίο miRNA είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση των πολλαπλών αγγελιοφόρων RNAs. Τα miRNAs παίζουν αναπόσπαστο ρόλο σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, όπως η ανοσολογική διαμόρφωση, ο μεταβολικός έλεγχος, η νευρωνική ανάπτυξη, ο κυτταρικός κύκλος, η διαφοροποίηση των μυών και η διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων. Τα περισσότερα miRNAs διατηρούνται σε πολλά είδη ζώων, υποδεικνύοντας την εξελικτική σημασία αυτών των μορίων ως διαμορφωτών κρίσιμων βιολογικών οδών και διεργασιών.

Έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση πολλών miRNAs μεταβάλλεται σε διάφορες ασθένειες. Ορισμένα miRNAs υπερεκφράζονται, ενώ άλλα υποεκφράζονται σε μια συγκεκριμένη ασθένεια και το γεγονός αυτό χαρακτηρίζει την ασθένεια. Σε μια μελέτη 540 δειγμάτων όγκων διαφόρων τύπων καρκίνου, φάνηκε ότι η συγκέντρωση 15 miRNAs βρέθηκε αυξημένη, ενώ αντίστοιχα η συγκέντρωση 12 miRNAs βρέθηκε μειωμένη, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Από τη μελέτη αυτή συμπεραίνεται ότι αυτές οι αλληλουχίες miRNA είχαν επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη και την απόπτωση και η αναστολή τους πιθανώς θα έχει αντικαρκινικό αποτέλεσμα.^[16]

❖ Καρκινικά βλαστοκύτταρα

Τα καρκινικά βλαστοκύτταρα είναι σπάνια, αθάνατα κύτταρα, που βρίσκονται μέσα σε έναν όγκο και μπορούν να ανανεωθούν μόνα τους, αφού διαιρούμενα δημιουργούν πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων, που αποτελούν τον όγκο. Τέτοια κύτταρα, που έχουν βρεθεί σε διάφορους τύπους ανθρώπινων όγκων, μπορεί να χρησιμεύσουν ως ελκυστικοί στόχοι για τη θεραπεία του καρκίνου.^[17]

❖ Ενεργοποίηση ανοσοποιητικού συστήματος

Γνωρίζουμε ότι οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία του καρκίνου. Ωστόσο, η συμβατική και η χημειοθεραπεία μέγιστης ανεκτής δόσης συσχετίζονται συχνά με κίνδυνο ανοσοκαταστολής, μέσω της επαγωγής και της πρόσληψης ανοσοκατασταλτικών κυττάρων. Επομένως, ορισμένοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες με ανοσοδιεγερτικά αποτελέσματα, όπως η επαγωγή του ανοσογονικού θανάτου καρκινικών κυττάρων και η αναστολή των ανοσοκατασταλτικών κυττάρων, μπορεί να είναι χρήσιμοι. Ο συνδυασμός χημειοθεραπείας και ανοσοθεραπείας είναι μια πολλά υποσχόμενη νέα μέθοδος για τη θεραπεία του καρκίνου.^[18]

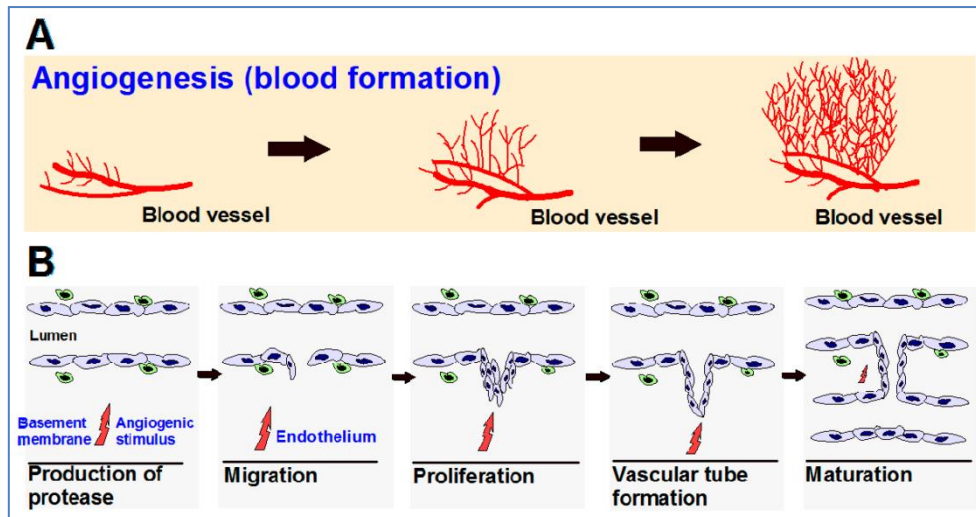
1.3 Αγγειογένεση και καρκίνος

1.3.1 Η διαδικασία της αγγειογένεσης

Τα θρεπτικά συστατικά και η παροχή οξυγόνου καθώς και αφαίρεση μεταβολικών αποβλήτων διακινούνται μέσα σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αγγείων. Τα αιμοφόρα αγγεία οργανώνονται σε αρτηρίες, φλέβες και τριχοειδή αγγεία με διαφορετικές μορφολογικές δομές το καθένα που ανταποκρίνονται στις λειτουργίες τους στο σώμα. Το εσωτερικό τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) που σχηματίζουν μία μονοστιβάδα με λεία επιφάνεια, συνδεδεμένη με διασταυρούμενα μόρια όπως η αγγειακή ενδοθηλιακή καντερίνη (*VE-cadherin*). Αυτά τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι συνδεδεμένα σε μία βασική μεμβράνη και περιβάλλονται από κύτταρα του τοιχώματος, που συμμετέχουν στη διατήρηση της συνοχής μεταξύ των ιδίων και της βασικής μεμβράνης, καθώς και στον περιορισμό της αγγειακής υπερδιαπερατότητας και της αγγειακής διαρροής.

Η αγγειογένεση είναι μια φυσιολογική και πολύπλοκη διαδικασία που ελέγχεται φυσιολογικά από ενδογενώς παραγόμενες ουσίες. Τα ενδογενή τοπικά ή συστημικά χημικά σήματα συντονίζουν τις λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων και τα κύτταρα των λείων μυών για την αποκατάσταση των κατεστραμμένων αιμοφόρων αγγείων. Η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων πραγματοποιείται από τα προϋπάρχοντα κύτταρα, ώστε μέσω μιας «εκβλάστησης» των ενδοθηλιακών κυττάρων διευρύνεται το αγγειακό δέντρο. Τα στάδια προς την αγγειογένεση περιλαμβάνουν την παραγωγή πρωτεΐνης, τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους, το σχηματισμό αγγειακού σωλήνα, την αναστόμωση των νεοσχηματιζόμενων σωλήνων, τη σύνθεση μιας νέας βασικής μεμβράνης και την ενσωμάτωση περικυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων.^[19]

Μετά την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από αγγειογόνα ερεθίσματα, παράγονται πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία αποδομούν την περιβάλλουσα εξωκυτταρική μήτρα (ECM) και τη βασική μεμβράνη. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν στην περιαγγειακή περιοχή, σχηματίζοντας «πρωτογενείς βλαστούς». Αυτοί οι βλαστοί οδηγούν στον σχηματισμό τριχοειδών βρόχων, που ακολουθούνται από τη σύνθεση νέας βασικής μεμβράνης και την ωρίμανση του αιμοφόρου αγγείου σε πλήρη 'σωληνοειδή' δομή, μέσω της οποίας μπορεί να ρέει το αίμα.



Εικόνα 1.10 (Α) Η αγγειογένεση αποτελεί σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα, (Β) στάδια αγγειογένεσης

Οι διεργασίες της φυσιολογικής αγγειογένεσης είναι ζωτικής σημασίας κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, την επούλωση πληγών και τον σχηματισμό μιας δομής για βελτιωμένη αγγείωση των διαφόρων οργάνων. Ωστόσο, οι ασυνήθιστα επιταχυνόμενες διαδικασίες αγγειογένεσης, ή η παθολογική αγγειογένεση, σχετίζονται με διάφορες διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της οφθαλμικής νεοαγγείωσης, η οποία οδηγεί σε απώλεια της όρασης. Η αγγειογένεση είναι σημαντική για την ανάπτυξη των συμπαγών καρκινικών όγκων.^[20]

Κατά την ανάπτυξη, την επούλωση ιστών, αλλά και σε συνθήκες ασθένειας η αγγειογένεση περιλαμβάνει την εκβλάστηση, τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτές οι διαδικασίες ρυθμίζονται από πολλούς αυξητικούς παράγοντες, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (bFGF, FGF2), η αγγειογενίνη, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), ο προερχόμενος από τα αιμοπετάλια ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο παράγοντας ανάπτυξης του πλακούντα, η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) και ο αυξητικός επιδερμικός παράγοντας (EGFR). Εκτός όμως από τα χημικά σήματα που προκαλούν σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων, υπάρχει και ένας άλλος τύπος ανασταλτικών χημικών σημάτων, που αναστέλλουν την αγγειογένεση. Είναι λοιπόν πολύ σημαντικό να διατηρηθεί μια ισορροπία μεταξύ ενεργοποιητών και αναστολέων, ώστε να μη διαταραχθεί η φυσιολογική αγγειακή ομοιόσταση.^[20]

1.3.2 Ο παράγοντας ανάπτυξης VEGF και ο υποδοχέας του

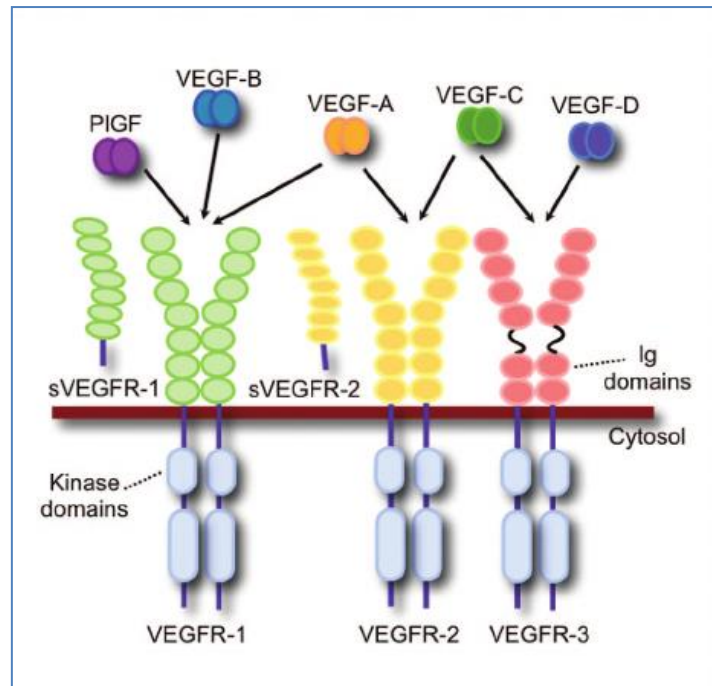
Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας παράγοντας (VEGF) και ο υποδοχέας του (VEGFR) παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη φυσιολογική, όσο και στην παθολογική αγγειογένεση, που λαμβάνει χώρα στους καρκινικούς ιστούς. Η οικογένεια VEGF αποτελείται από πέντε δομικά συγγενείς παράγοντες: τον VEGF-A (τον πρωτότυπο, που συναντάται και ως VEGFA-165), τον VEGF-B, τον VEGF-C, τον VEGF-D και τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα (PlGF). Τα μέλη της οικογένειας VEGF είναι ομοδιμερή πολυπεπτίδια, αν και έχουν περιγραφεί και φυσικώς απαντώμενα ετεροδιμερή πεπτίδια του VEGF-A και του PlGF. Μεταξύ αυτών, ο VEGF-A και οι υποδοχείς του VEGFR-1 και VEGFR-2 παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στη φυσιολογική και την παθολογική αγγειογένεση, συμπεριλαμβανομένης και της αγγειογένεσης του όγκου. Αντίθετα, οι VEGF-C / D και ο υποδοχέας τους VEGFR-3 ρυθμίζουν την αγγειογένεση κατά την πρώιμη εμβρυογένεση και λειτουργούν ως κρίσιμοι ρυθμιστές της λεμφαγγειογένεσης.^[21]

➤ VEGF-A

Έχει βρεθεί ότι ο ανθρώπινος παράγοντας VEGF-A περιέχει υποτύπους, όπως πεπτίδια των 121, 165, 189 και 206 αμινοξέων. Με την εξαίρεση του VEGF-A₁₂₁, τα υπόλοιπα πεπτίδια διαθέτουν μια βασική περιοχή κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο. Η βασική περιοχή του VEGF-A₁₆₅ επιδεικνύει ασθενή συγγένεια πρόσδεσης όξινων υποστρωμάτων, όπως είναι π.χ. η θειική ηπαρίνη. Αντίθετα, η βασική περιοχή του VEGF-A₁₈₉ διαθέτει ισχυρή συγγένεια πρόσδεσης της ηπαρίνης και έτσι τα περισσότερα από τα μόρια VEGF-A₁₈₉ εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια ή στην εξωκυτταρική μήτρα.^[21]

➤ VEGFRs

Οι VEGFRs είναι τυπικοί υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (TKRs) που φέρουν μία εξωκυττάρια περιοχή (με 7 περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες) για τη δέσμευση του προσδέτη, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική περιοχή, που περιλαμβάνει την περιοχή κινάσης τυροσίνης. Ο VEGFR-2 είναι ο κύριος υποδοχέας VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτός είναι απαραίτητος για την λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, τόσο κατά την ανάπτυξη του οργανισμού, όσο και στην ενηλικίωση. Ο VEGF-A προσδέεται στις εξωκυττάρια περιοχές 2 και 3 του VEGFR-2, αλλά με 10 φορές χαμηλότερη συγγένεια, σε σχέση με τη συγγένεια που εμφανίζει για τον VEGFR-1.^[21] Παρολαυτά η ενεργοποίηση του VEGFR-2 έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικότερο ρόλο στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων.

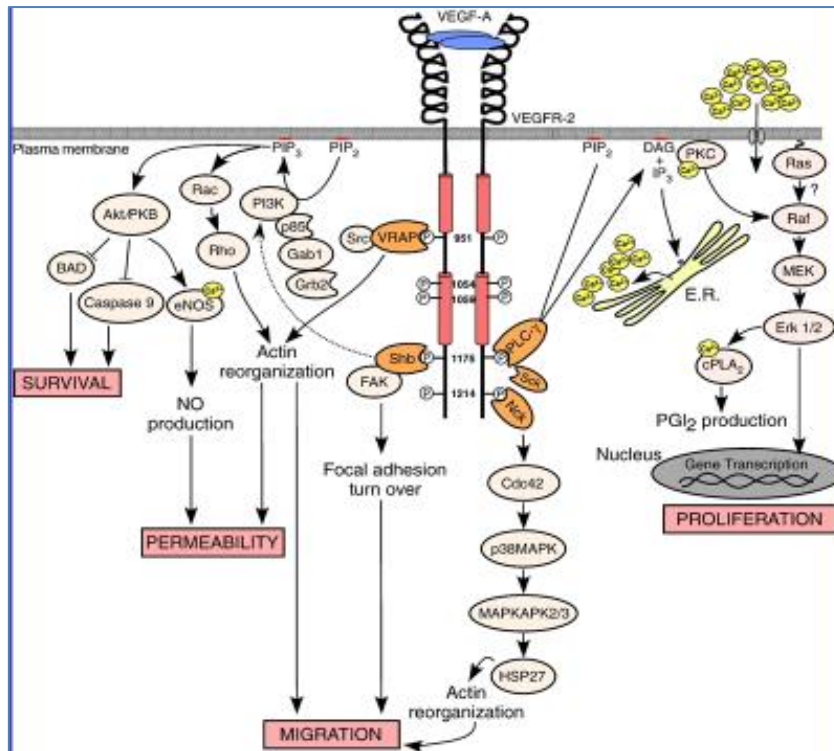


Εικόνα 1.11 Δομή των VEGFRs

➤ Σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGFR-2

Η σύνδεση του VEGF-A στον VEGFR-2 προάγει τον διμερισμό του υποδοχέα, ο οποίος σταθεροποιείται περαιτέρω με ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις χαμηλής συγγένειας, που αναπτύσσονται στις εξωκυτταρικές περιοχές του υποδοχέα, που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες. Κατ' αυτόν τον τρόπο επάγεται στην ενδοκυτταρική περιοχή της πρωτεΐνης μια trans-αυτοφωσφορυλίωση του υπολοίπου τυροσίνης. Σημαντικές θέσεις φωσφορυλίωσης αποτελούν τα τυροσινικά υπόλοιπα Y-951, που εντοπίζεται στον βρόγχο ενεργοποίησης της κινάσης, τα Y-1054 και Y-1059 που βρίσκονται εντός του ενεργού κέντρου της κινάσης, καθώς επίσης και τα Y-1175 και Y-1214, που βρίσκονται στο ρυθμιστικό καρβοξυτελικό άκρο.

Η πρόσδεση του VEGF στον υποδοχέα VEGFR-2 ενεργοποιεί μια πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών στο εσωτερικό του κυττάρου που συλλογικά επάγουν διαδικασίες όπως η επιβίωση, η διαπερατότητα, η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων.^[22]

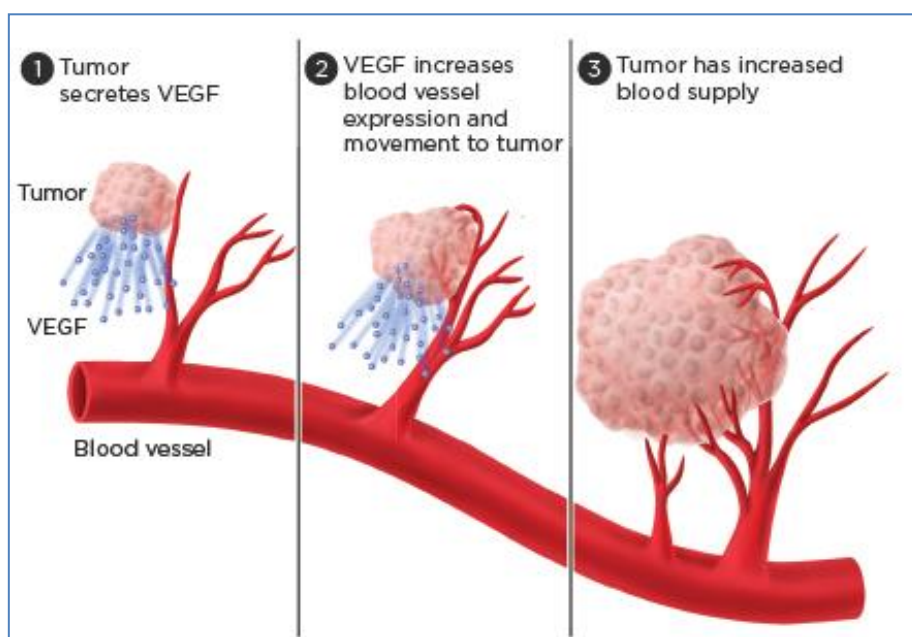


Εικόνα 1.12 Σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGFR-2

1.3.3 Ο μηχανισμός της αγγειογένεσης στον καρκίνο

Στα υγιή κύτταρα ο βασικός μηχανισμός ρύθμισης της αγγειογένεσης ενεργοποιείται από τη μείωση της τάσης οξυγόνου. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών διαθέτουν μηχανισμούς προσδιορισμού της τάσης οξυγόνου, με συμμετοχή των ευαίσθητων σε οξυγόνο NADPH οξειδασών, της συνθετάσης του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (eNOS), και της αιμοοξυγενάσης. Ο καρκινικός ιστός προκειμένου να αναπτυχθεί και να μεταναστεύσει, χρειάζεται, εκτός των άλλων, οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, που του παρέχονται από τα αιμοφόρα αγγεία. Η παρουσία και η αφθονία του οξυγόνου συσχετίζεται με τον μεταβολισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και το οξυγόνο καταναλώνεται είτε για το σχηματισμό βλαστών in-vitro, είτε για το σχηματισμό αγγειακών δικτύων in-vivo. Η παρουσία οξυγόνου παίζει τόσο κομβικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη των υγιών, αλλά και των καρκινικών κυττάρων, ώστε καρκινικά κύτταρα στα οποία αναπτύχθηκε υποξία να μην μπορούν να διαιρεθούν. Σε αναπτυσσόμενους καρκίνους, τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν έντονη δραστικότητα, λόγω της απελευθέρωσης πολλών ενώσεων, όπως είναι ο EGF, οιστρογόνα, βασικοί και όξινοι FGF, IL-8, προσταγλανδίνες E1 και E2, ο TNF-α και ο VEGF, που μπορούν να ενεργοποιήσουν την ανάπτυξη και την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, όταν μειωθεί η παραγωγή αντι-αγγειογόνων παραγόντων. Οι παράγοντες VEGF και bFGF θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικοί για την καρκινική αγγειογένεση, χωρίς όμως

να υποτιμώνται και οι υπόλοιποι προ-αγγειογενετικοί παράγοντες. Αυτός ο πλεονασμός στο σύστημα της αγγειογένεσης μπορεί να εξηγήσει την παρατηρούμενη μη βέλτιστη αποτελεσματικότητα διαφόρων φαρμακολογικών αναστολέων ενός μεμονωμένου ενδογενούς αγγειογενετικού παράγοντα. Επομένως, η αγγειογένεση αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της επιβίωσης του καρκινικού όγκου, καθώς με τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων διασφαλίζεται η επαρκής οξυγόνωση του και η μεταβολική του επάρκεια.^[23]



Εικόνα 1.13 Η διαδικασία της αγγειογένεσης στον καρκίνο: (1) Τα υποξικά καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες ανάπτυξης (2) Οι παράγοντες αυτοί αυξάνουν την αγγειογένεση στο περιβάλλον του όγκου (3) Ο καρκινικός όγκος τροφοδοτείται με τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά

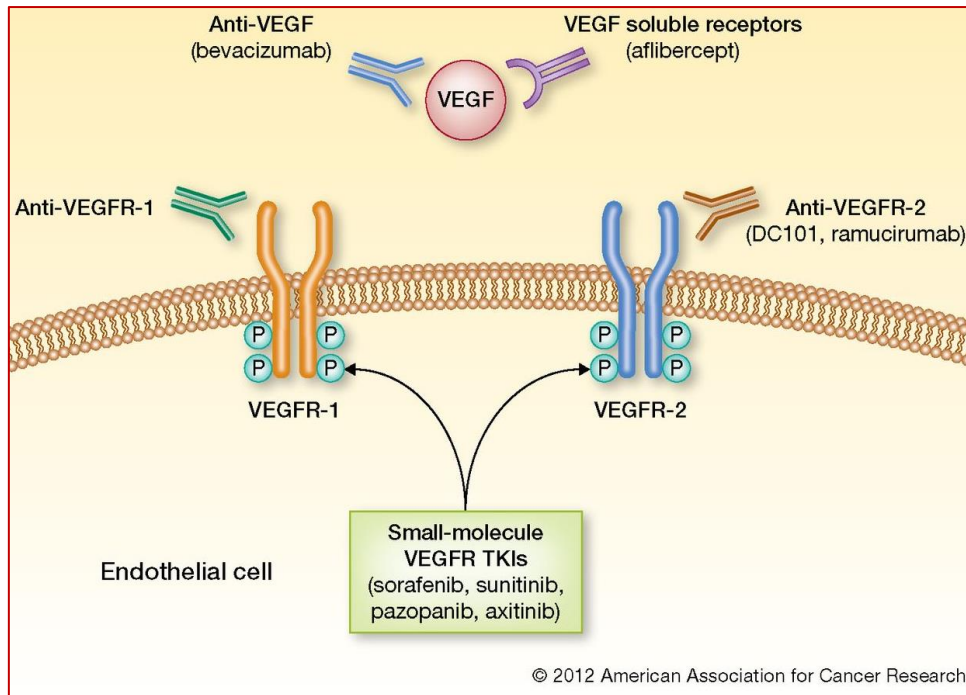
1.3.4 Αναστολείς του VEGFR ως αντικαρκινικά φάρμακα

Καθώς στη δεκαετία του '80 ο VEGF ταυτοποιήθηκε ως σημαντικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων, ήταν επόμενο να αποτελέσει δυνητικό στόχο για την αναστολή της αγγείωσης των συμπαγών καρκινικών όγκων. Ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων όγκων ανθρώπινης προέλευσης, ειδικά καρκινωμάτων, βρέθηκε ότι εκφράζει υψηλά επίπεδα του αυξητικού παράγοντα VEGF. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση η παρουσία του VEGF στα καρκινικά κύτταρα σχετίζεται άμεσα με την διέγερση της ανάπτυξης τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων και τον πολλαπλασιασμό του καρκινικού ενδοθηλίου με παρακρινή τρόπο, για να επιταχυνθεί η ανάπτυξη του όγκου μέσω της αυξημένης παροχής αίματος.

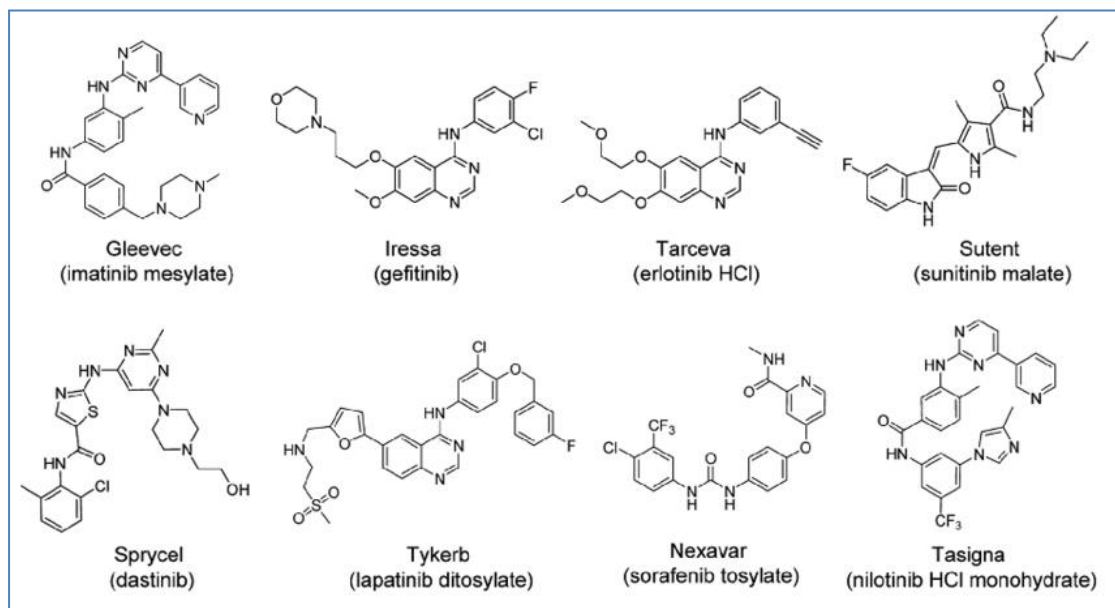
Οι ισομορφές του VEGF και κυρίως οι υποδοχείς τους (VEGFRs) αποτελούν ελκυστικούς στόχους για αναστολή της αγγειογένεσης. Από όλες τις ισομορφές του υποδοχέα του VEGF, ο VEGFR-2 στον οποίο συνδέεται ο VEGF-A, είναι μείζονος σημασίας για την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Λειτουργεί ως κινάση που εμπλέκεται σε όλες τις πολλαπλές αγγειογενετικές διεργασίες και είναι σημαντικός μεταγωγέας μηνύματος στην φυσιολογική και την παθολογική αγγειογένεση. Ο VEGFR-2 εμπλέκεται στη ρύθμιση της αγγειακή διαπερατότητας, του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, της μετανάστευσης και της επιβίωσης τους, γεγονός που τον καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέροντα φαρμακευτικό στόχο. Τα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, που έπονται και οι εμπλεκόμενες πρωτεϊνικές κινάσες, συμπεριλαμβανομένων των PI3K, p38MAPK, FAK, Src, και Akt, είναι συνήθως υπερ-ενεργοποιημένες σε αρκετούς όγκους. Ο ίδιος ο VEGFR-2 υπερεκφράζεται σε αρκετές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων των ωοθηκών και του θυρεοειδούς, σε μελανώματα και μυελοβλαστώματα. Επιπλέον, η ένταση του σήματος του VEGFR-2 αυξάνεται σημαντικά σε αγγεία που σχετίζονται με κακοήθειες του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και του μαστού, συγκρινόμενη με αυτή που παρατηρείται σε γειτονικούς, μη καρκινικούς ιστούς.^[24]

Ο βασικός στόχος των αναστολέων σηματοδότησης του VEGF είναι η αναστολή σχηματισμού αγγείων τροφοδότησης των καρκινικών κυττάρων, αλλά μπορεί να συνυπάρχουν και διάφοροι παράλληλοι μηχανισμοί δράσης. Τα φάρμακα που αναστέλλουν την μεταγωγή σήματος που ξεκινά από τον VEGF/VEGFR, χορηγούνται συνήθως σε συνδυασμό με κλασική χημειοθεραπεία και ωφελούν ασθενείς με κακοήθειες σε προχωρημένο στάδιο. Με τη μείωση της έκφρασης του VEGF ή των VEGFRs, με την παρεμπόδιση της οδού μεταγωγής σήματος ή με την εξάντληση του VEGF σε όγκους, οι αναστολείς αυτοί περιορίζουν την διαδικασία της αγγειογένεσης του όγκου και την παροχή αίματος, επιβραδύνοντας την ανάπτυξη του όγκου και την μετάσταση.

Σε ό, τι αφορά την ογκολογία, υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες εγκεκριμένων φαρμάκων που στοχεύουν το μονοπάτι VEGF. Τα μονοκλωνικά αντισώματα χωρίζονται σε αυτά που δεσμεύουν τον VEGF στην κυκλοφορία του αίματος (π.χ. bevacizumab) και σε αυτά που δεσμεύονται στην εξωκυτταρική περιοχή του VEGFR-2 (ramucirumab). Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων τυροσίνης (TKI), συμπεριλαμβανομένων των sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, regorafenib, nintedanib, cabozantinib και vatalanib, δρουν ενδοκυτταρικά για να εμποδίσουν τη λειτουργία σηματοδότησης του VEGFR-2. Ένας τέταρτος τύπος φαρμάκου, το aflibercept, αν και χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά, είναι παράγοντας που μοιάζει με αντίσωμα, ο οποίος λειτουργεί σαν παγίδα και δεσμεύεται ισχυρά στον αυξητικό παράγοντα VEGF, αλλά και στον παράγοντα ανάπτυξης του πλακούντα.^[25]



Εικόνα 1.14 Σημεία δράσης των υπάρχοντων φαρμάκων στον σύστημα VEGF/VEGFR



Εικόνα 1.15 Αναστολείς κινάσης τυροσίνης

Τα ανωτέρω φάρμακα εφαρμοζόμενα κλινικά βελτίωσαν την επιβίωση και κυρίως την ποιότητα ζωής των ασθενών που πάσχουν από διάφορους στερεούς όγκους. Παρόλ' αυτά, η αποτελεσματικότητά τους δεν κρίνεται επαρκής και επιδέχεται βελτίωσης. Ένας από τους πιο σημαντικούς λόγους που μειώνει την αποτελεσματικότητά τους είναι η ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία από τα καρκινικά κύτταρα. Έχει προταθεί ένας μεγάλος αριθμός μηχανισμών για την εξήγηση των περιπτώσεων ενδογενούς ή επίκτητης αντίστασης στις αντι-

αγγειογενετικές θεραπείες, που λειτουργούν πρωτίστως ή αποκλειστικά με την αναστολή της οδού του VEGF. Η επικρατούσα θεωρία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των αντισταθμιστικών ή αντιρροπιστικών μηχανισμών της αγγειογένεσης, στη βάση μιας λογικής που προσομοιάζει τους μηχανισμούς ανάπτυξης επίκτητης αντοχής από άλλους τύπους φαρμάκων. Η αναστολή της προ-αγγειογενετικής λειτουργίας του VEGF δημιουργεί εξελικτικές πιέσεις που προκαλούν την ενεργοποίηση μιας άλλης εναλλακτικής, αλλά 'σιωπηρής' προηγουμένως προαγγειογενετικής οδού. Για παράδειγμα, η συνεχής και αποτελεσματική αναστολή της λειτουργίας του VEGF, πιθανώς θα οδηγήσει σε σημαντική καταστολή της αγγείωσης του όγκου, της ροής αίματος και της διάχυσης και ακολούθως σε αυξημένη υποξία. Αυτή η φυσιολογική μεταβολή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την ενεργοποίηση μιας ή περισσότερων εναλλακτικών αντισταθμιστικών προ-αγγειογενετικών οδών π.χ., αύξηση του επαγόμενου από υποξία παράγοντα 1a (HIF-1a). Αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας είναι γνωστός ότι ρυθμίζει πολλά διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν προ-αγγειογενετικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου του βασικού αυξητικού παράγοντα ινοβλάστη (bFGF), της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) ή άλλων φλεγμονωδών κυτοκινών και της αγγειοποιητίνης 2 (ANG-2). Η ανάπτυξη αυτής της επίκτητης αντίστασης επιβεβαιώθηκε από προκλινικές μελέτες και υποδεικνύει ότι μία στρατηγική για την παράταση της αποτελεσματικότητας της αναστολής της οδού του VEGF θα ήταν η ταυτόχρονη ή διαδοχική αναστολή μιας εμπλεκόμενης οδού παράκαμψης, ώστε να μην είναι δυνατόν να ενεργοποιηθεί. Πράγματι, τα συνδυαστικά σχήματα αναστολέων της αγγειογένεσης με φάρμακα που στοχεύουν τον bFGF, την ANG-2 ή την IL-8 έχουν αποδειχθεί επιτυχή, σε ότι αφορά την παράταση της αντικαρκινικής δράσης και της μεταγωγής σήματος του VEGF. Ένας δεύτερος μηχανισμός που θα μπορούσε να εξηγήσει την ανάπτυξη πολλών περιπτώσεων ενδογενούς ή/και επίκτητης αντοχής στα αντι-αγγειογενετικά φάρμακα που στοχεύουν τον VEGF, σχετίζεται με τη φύση και την ετερογένεια του αγγειακού συστήματος του όγκου. Υπάρχουν ενδείξεις σχετικά με την παρουσία διαφόρων υποτύπων αιμοφόρων αγγείων εντός των όγκων, μερικοί από τους οποίους εξαρτώνται από τον VEGF, ενώ άλλοι όχι. Επομένως, όγκοι που αιματώνονται με αιμοφόρα αγγεία που δεν εξαρτώνται από τον VEGF θα ανταποκριθούν ελάχιστα ή καθόλου στη θεραπεία με φάρμακα που στοχεύουν στην αναστολή της μεταγωγής σήματος από τον VEGF. Επιπλέον, η χορήγηση αντιαγγειογενετικής θεραπείας είναι πιθανόν να οδηγήσει σταδιακά στη μετάπτωση όγκων που διαθέτουν κυρίως αγγεία εξαρτώμενα από τον VEGF σε όγκους που αιματώνονται με υποτύπους αγγείων ανεξάρτητους από τη λειτουργία του VEGF.^[26]

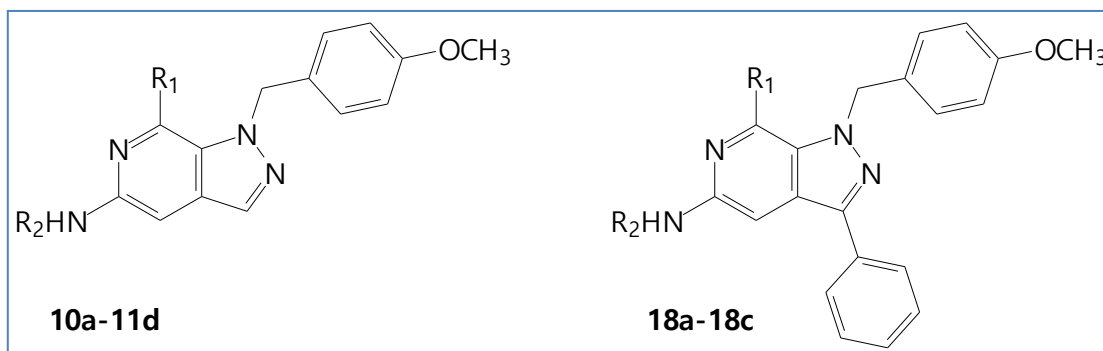
Για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω, παρόλο που η αναστολή της μεταγωγής σήματος του VEGFR αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση κατά του καρκίνου, χρειάζονται περισσότερες μελέτες ώστε να

αντιμετωπισθούν οι παραπάνω περιορισμοί και να βρεθούν νέα θεραπευτικά σχήματα, με νέα ή με τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα, με στόχο την περαιτέρω βελτίωση της ποιότητας ζωής των καρκινοπαθών.

1.4 Στόχος της εργασίας

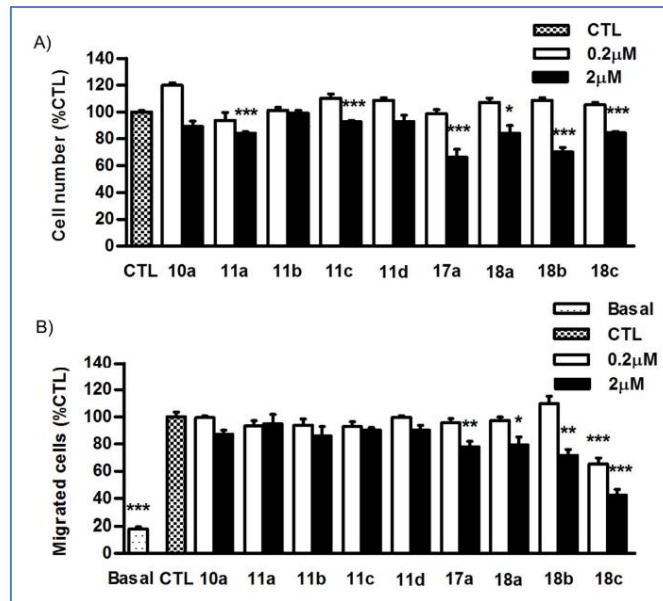
1.4.1 Προγενέστερες ερευνητικές μελέτες

Η παρούσα εργασία βασίστηκε κατά κύριο λόγο στα αποτελέσματα μιας προγενέστερης μελέτης^[27], που είχε ως αντικείμενο τη σύνθεση και τη βιολογική αξιολόγηση νέων αναλόγων πουρίνης, ως πιθανών αναστολέων της αγγειογένεσης. Σε αυτή τη μελέτη εξετάστηκε η επίδραση κατάλληλα υποκατεστημένων παραγώγων πυραζολοπυριδίνης στις βασικές προ-αγγειογενετικές λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων, απουσία, ή παρουσία του παράγοντα VEGF. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν in-vitro πειράματα, ενώ στη συνέχεια εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα αυτών των ενώσεων in-vivo, κυρίως σε ότι αφορά την αναστολή της καρκινικής αγγειογένεσης και της ανάπτυξης των όγκων σε νεοπλασματικό μοντέλο ποντικού. Τα παράγωγα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτά που στην 3-θέση του δακτυλίου της πυραζολοπυριδίνης φέρουν φαινύλιο και αυτά που δεν φέρουν.



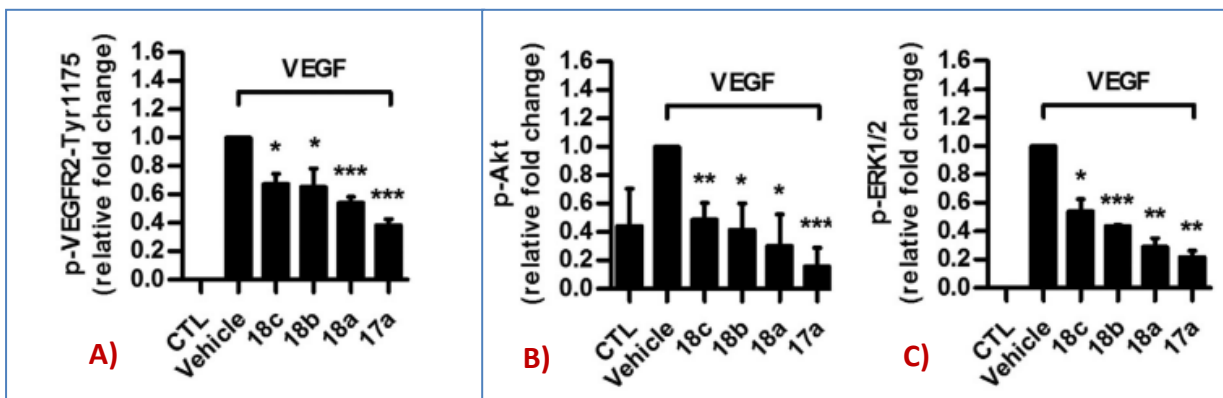
Εικόνα 1.16 Δομικές κατηγορίες των νέων παραγόντων πυραζολοπυριδίνης

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση τους στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, σε δύο αντιπροσωπευτικές συγκεντρώσεις (0,2 και 2 μM), κάτω από μη επαγόμενες συνθήκες (δηλαδή σε καλλιεργητικό υλικό με μικρή περιεκτικότητα βόειου ορού (2.5%))^[27]. Από τις ενώσεις που εξετάστηκαν μόνο τα 3-φαινυλοϋποκατεστημένα παράγωγα **17a** και **18a-c** βρέθηκε ότι αναστέλλουν σημαντικά την ενδοθηλιακή ανάπτυξη και τη μετανάστευση, υποδεικνύοντας ότι η υποκατάσταση της 3-φαινυλομάδας είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της αντιαγγειογενετικής δράσης.



Εικόνα 1.17 Επίδραση των παραγώγων (A) στον πολλαπλασιασμό και (B) στη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων

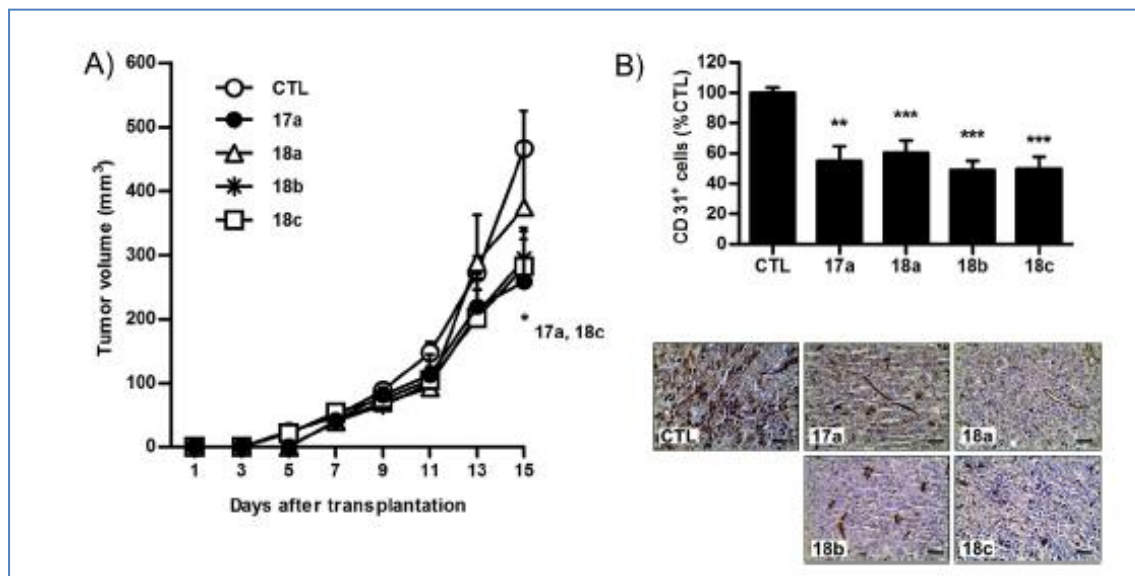
Η αντιαγγειογενετική δράση των ενώσεων αυτών εκτιμήθηκε σε περαιτέρω, πιο εξειδικευμένα πειράματα παρουσία του VEGF. Συγκεκριμένα, στο επίπεδο αναστολής της κυτταρικής μεταγωγής σήματος, οι επιλεγμένοι αναστολείς μείωσαν το επίπεδο φωσφορυλίωσης του VEGFR-2 στην Tyr-1175 και επίσης βρέθηκε ότι μείωσαν τη φωσφορυλίωση των κινασών που έπονται στη μεταγωγή του σήματος, όπως η AKT και οι ERK1/2.



Εικόνα 1.18 Επίδραση των παραγώγων πυραζολοπυριδίνης (A) στη φωσφορυλίωση της Tyr-1175 του VEGFR-2 (B) στη φωσφορυλίωση της κινάσης AKT και (C) στη φωσφορυλίωση των κινασών ERK1/2

Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι τα παράγωγα **17a** και **18b-c** προκαλούν σημαντική παρεμπόδιση της ανάπτυξης του καρκίνου του πνεύμονα κατά Lewis (LLC) in-vivo

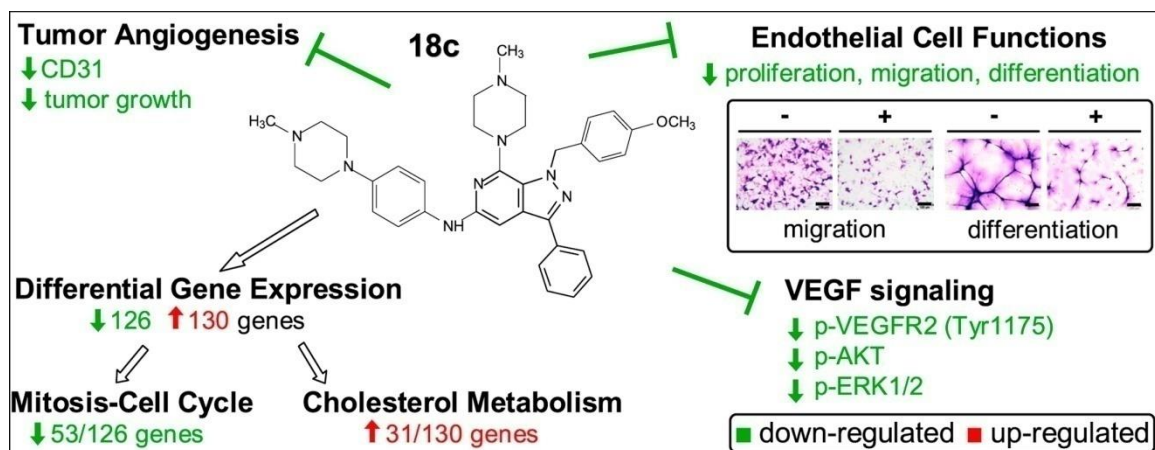
και μειώνουν σημαντικά την πυκνότητα των τριχοειδών αγγείων του όγκου, χωρίς προφανείς παρενέργειες.^[27]



Εικόνα 1.19 (A) Εκτίμηση μεγέθους του καρκινικού όγκου μετά τη μεταμόσχευση (B) πυκνότητα τριχοειδών αγγείων του όγκου προσδιοριζόμενη με ανοσο-ιστοχημία και αντιπροσωπευτικές μικροφωτογραφίες

Τέλος η ανάλυση μικροσυστοιχειών του γονιδιώματος των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία είχαν υποβληθεί στην επίδραση αυτών των ενώσεων, ταυτοποίησε ένα κοινό στοχευμένο σύνολο γονιδίων που υπο-εκφράζονται, τα οποία σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση και τη μίτωση, ενώ βρέθηκε ότι το **18c** είναι το δραστικότερο παράγωγο, όσον αφορά την αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης.

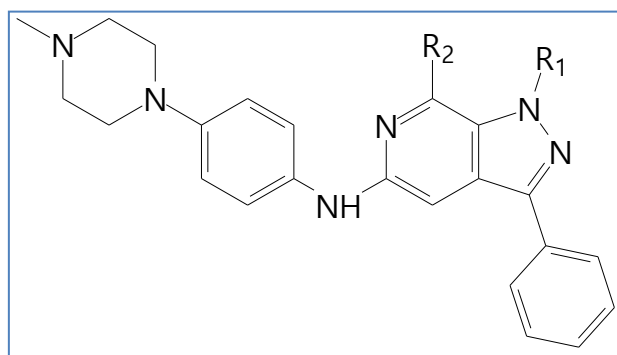
Συνολικά, από τη μελέτη αυτή^[27] προέκυψαν δεδομένα για δράση σε προκλινικό επίπεδο, αλλά και στοιχεία σχετικά με αντι-αγγειογενετικό μηχανισμό δράσης νέων πυραζολοπυριδινών. Το παράγωγο **18c** ταυτοποιήθηκε ως το δραστικότερο και πλέον ενδιαφέρον σε όλα τα επίπεδα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.20 και θεωρούμε ότι μπορεί να χρησιμεύσει ως ένωση-οδηγός (**Ένωση οδηγός 1**) για την περαιτέρω εξαγωγή σχέσεων δομής-δράσης και βελτιστοποίηση της δραστικότητας αυτής της κατηγορίας ενώσεων.



Εικόνα 1.20 Χημικός τύπος και βιολογικές δράσεις της ένωσης οδηγού I^[27]

1.4.2 Σχεδιασμός και στόχος της παρούσας εργασίας

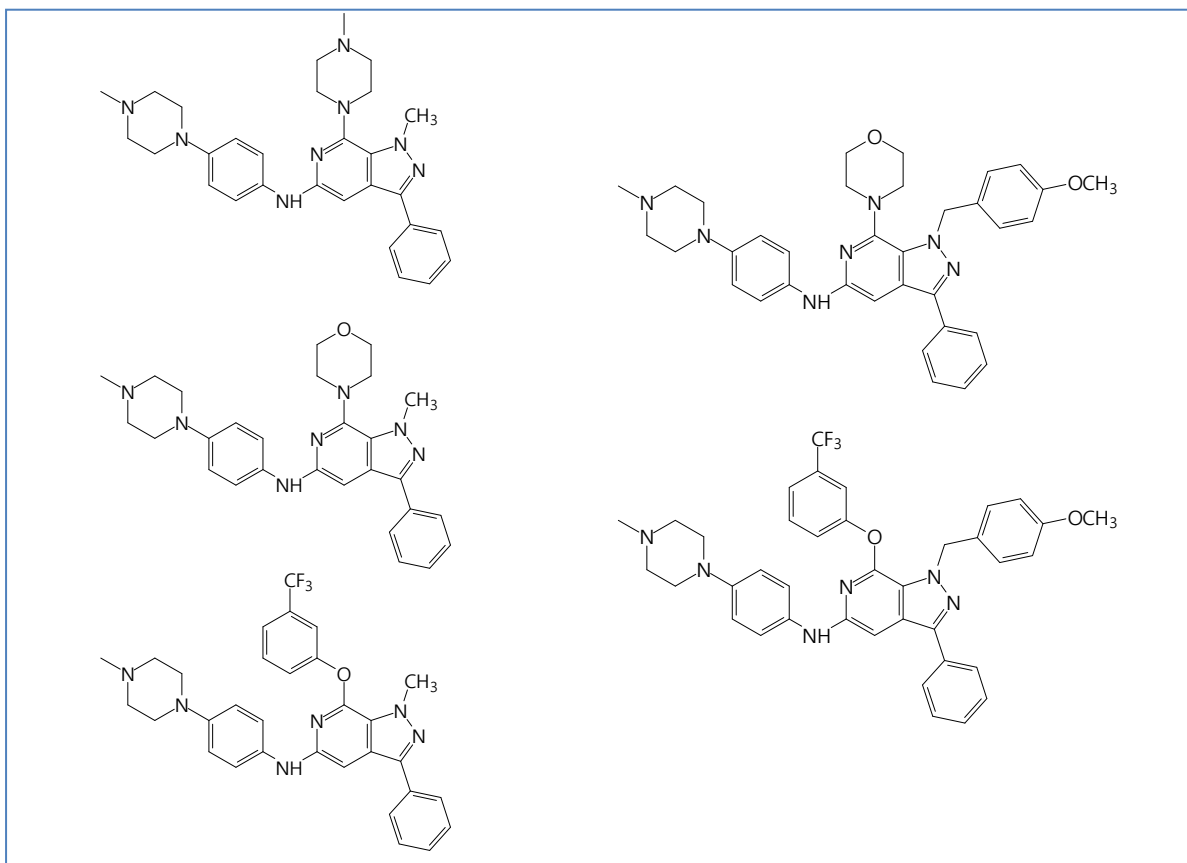
Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας εντάσσεται σε μία προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης του μηχανισμού δράσης της ένωσης οδηγού I και μελέτης των σχέσεων δομής-δράσης της συγκεκριμένης κατηγορίας παραγώγων. Σε αυτά τα πλαίσια πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και μελέτη της βιολογικής δράσης νέων δομικών αναλόγων της ένωσης-οδηγού. Στη βάση των αποτελεσμάτων της προηγούμενης εργασίας^[27], η παρουσία του 3-φαινυλοϋποκαταστάτη κρίθηκε απαραίτητη για την εκδήλωση αντι-αγγειογενετικής δραστηριότητας. Επίσης, θεωρήθηκε απαραίτητη η διατήρηση του 5-υποκαταστάτη του ένωσης οδηγού I, καθώς η παρουσία της 4-μεθυλοπιπεραζινο-4-ανιλίνης βρέθηκε ότι επηρεάζει σημαντικά την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται την κυτταρική διαίρεση και τη μίτωση.



Εικόνα 1.21 Γενικός χημικός τύπος των ενώσεων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία

Αντιθέτως, μεταβλήθηκε ο υποκαταστάτης της 7-θέσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου και η 4-μεθυλοπιπεραζίνη που υπάρχει στην ένωση οδηγό I αντικαταστάθηκε από μορφολίνη και από φαινυλοξυ-ομάδα, για την εξαγωγή

σχέσεων δομής-δράσης. Παρασκευάσθηκε επίσης μια άλλη σειρά ενώσεων, που φέρει ανάλογο μοτίβο υποκαταστάσεων, αλλά στην 1-θέση του ετεροκυκλικού δακτυλίου φέρει μεθυλομάδα, αντί της 4-μεθοξυβενζυλομάδας της ένωσης οδηγού I. Στην Εικόνα 1.22 παρουσιάζονται οι δομές των νέων μορίων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 1.22 Χημικοί τύποι νέων παραγώγων

Ακολούθησε η βιολογική αξιολόγηση των νεοσυντιθέμενων ουσιών με στόχο τη διερεύνηση της ικανότητας τους να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών ενδοθηλιακών κυττάρων, σε μη επαγόμενες συνθήκες.

Στο 2^ο μέρος της εργασίας παρουσιάζεται η συνθετική πορεία των νέων αυτών παραγώγων, τα αποτελέσματα της βιολογικής αξιολόγησης και τα συμπεράσματα, ενώ στο 3^ο μέρος παρουσιάζεται η πειραματική πορεία της σύνθεσης καθώς και τα υλικά και μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη βιολογική αξιολόγηση.

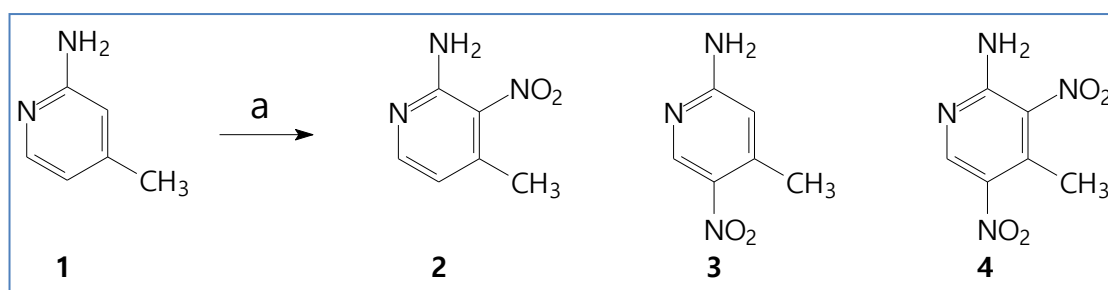
ΜΕΡΟΣ 2^ο

ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ, ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

2.1 Συνθετική πορεία

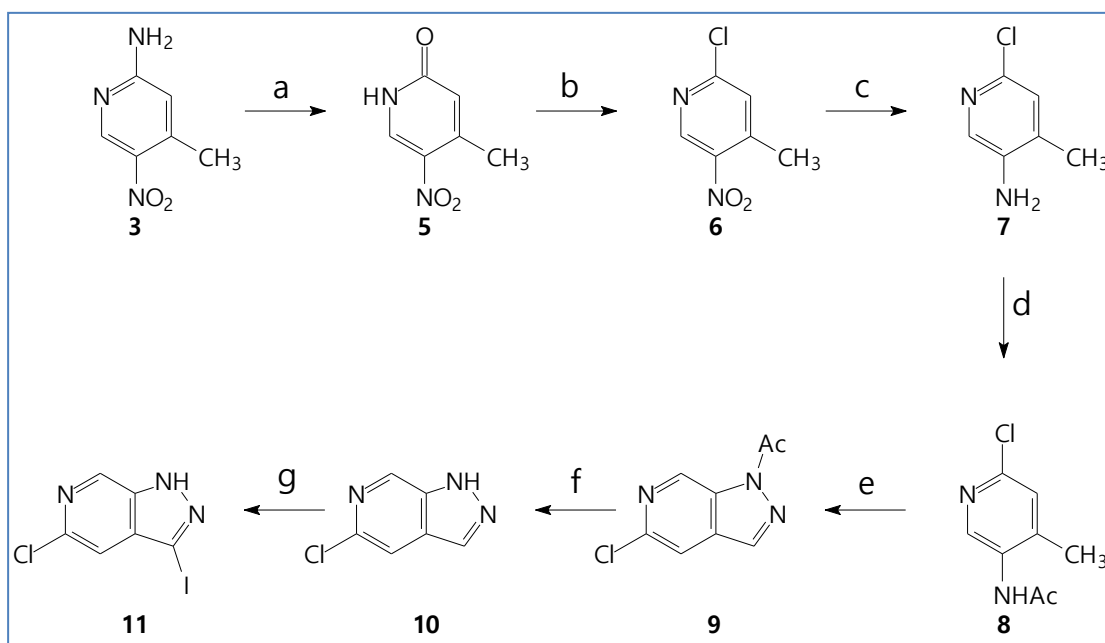
2.1.1 Σύνθεση της 5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (**10**) και του αντίστοιχου 3-ιωδο παραγώγου **11**

Για τη σύνθεση της πυραζολοπυριδίνης **10** χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η 2-αμινο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**3**), η οποία συντέθηκε με νίτρωση της 2-αμινο-4-μεθυλοπυριδίνης (**1**) (Σχήμα 2.1). Από την αντίδραση αυτή λήφθηκε μίγμα των τριών δυνατών νιτροπαραγώγων, τα οποία διαχωρίστηκαν αρχικά μέσω κατεργασίας με θερμό διχλωρομεθάνιο, όπου διαλύεται το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγώγου **3**, ενώ στη συνέχεια ο πλήρης διαχωρισμός των τριών ισομερών έγινε χρωματογραφικά και η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων ¹H-NMR.



Σχήμα 2.1 Αντιδραστήρια και συνθήκες: a: H₂SO₄ / HNO₃, 60 °C, 2h

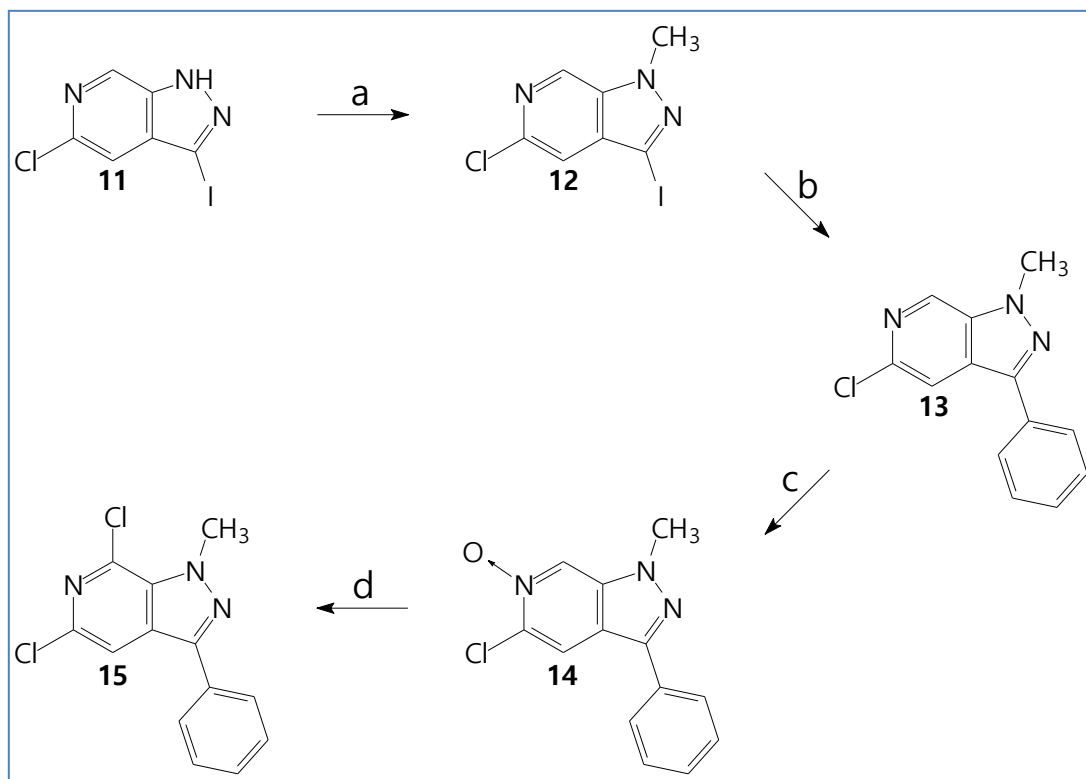
Επίδραση νιτρώδους νατρίου στη 2-αμινο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**3**) οδήγησε στην πυριδινόνη (**5**) (Σχήμα 2.2), η οποία αντέδρασε με οξυχλωριούχο φώσφορο και παρελήφθη η 2-χλωρο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**6**). Κατόπιν, έγινε αναγωγή της νιτρομάδας με διχλωριούχο κασίτερο και ακετυλίωση του σχηματιζόμενου αμινοπαραγώγου **7** με οξικό ανυδρίτη, οπότε παρελήφθη το ακεταμίδιο **8**. Ακολούθησε αντίδραση διαζώτωσης και ενδομοριακής κύκλωσης του ακεταμιδίου, που οδήγησε στη λήψη της 1-ακετυλο-5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης. Το παράγωγο **9** με επίδραση αέριας αμμωνίας αποπροστατεύεται και σχηματίζεται η 5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (**10**), η οποία αντέδρασε με N-ιωδοσουλφοναμίδια, οπότε και παρελήφθη το ιωδοπαραίγωγο **11**.^[27]



Σχήμα 2.2 Αντιδραστήρια και συνθήκες: **a**: NaNO₂/ H₂SO₄ , 10 °C, 2h **b**: POCl₃ , 110 °C, 3h **c**: SnCl₂/ HCl 50 °C, 15min **d**: Ac₂O/ CH₂Cl₂ ,12h **e**: CH₃COOK, Ac₂O, toluene dry, isoamyl nitrite, (Ar), 12h **f**: NH₃ (g), MeOH, 5min **g**: NIS, anhydrous MeOH, (Ar), 3h.

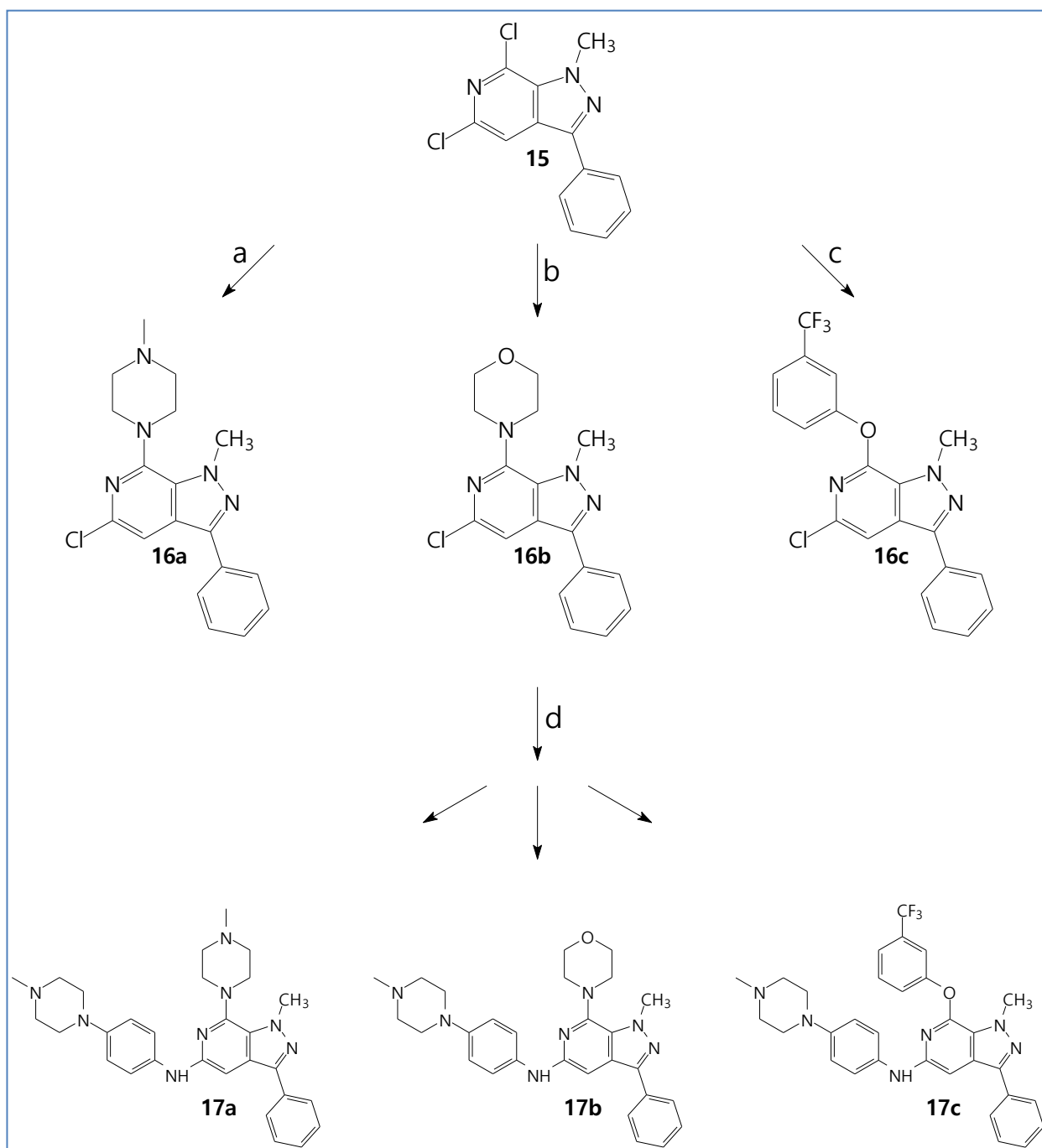
2.1.2 Σύνθεση των *N*1-μεθυλοπαραγώγων 17a-c

Το παράγωγο **11** μεθυλιώθηκε με επίδραση μεθυλοϊωδιδίου και σχηματίστηκε το 1-μεθυλοπαραγόγω **12** (Σχήμα 2.3), το οποίο με αντίδραση σύζευξης τύπου Suzuki οδήγησε στην 5-χλωρο-1-μεθυλο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**13**). Κατόπιν, από το παράγωγο **13** μετά από επίδραση 3-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος παρελήφθη το αντίστοιχο *N*-οξύδιο **14**, το οποίο αντέδρασε με οξυχλωριούχο φώσφορο προς σχηματισμό του διχλωροπαραγώγου **15**.



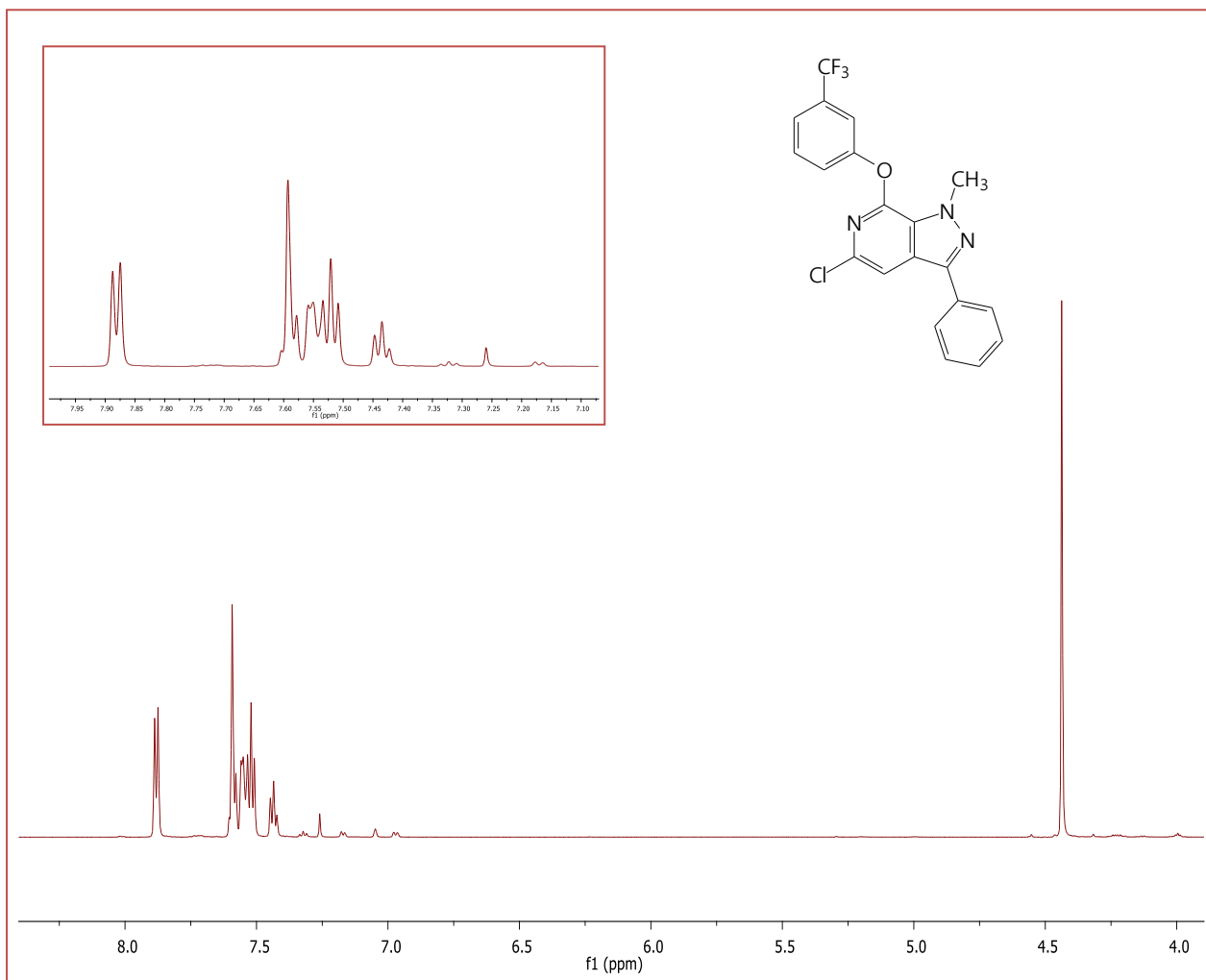
Σχήμα 2.3 Αντιδραστήρια και συνθήκες: **a**: CH_3I , KOH , Acetone, $0\text{ }^\circ\text{C}$, (Ar), 12h **b**: phenylboronic acid, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, NaHCO_3 , toluene/ EtOH, $100\text{ }^\circ\text{C}$, (Ar), 30h **c**: 3-chloroperbenzoic acid, CH_2Cl_2 , 48h **d**: POCl_3 , anhydrous THF, 12h.

Το διχλωροπαράγωγο **15** μετά από πυρηνόφιλη προσβολή στην 7 θέση από 4-μεθυλοπιπεραζίνη, μορφολίνη και μ-τριφθορομεθυλοφαινόλη παρουσία βάσης, έδωσε τα παράγωγα **16a**, **16b** και **16c** αντίστοιχα (Σχήμα 2.4). Τέλος, τα προηγούμενα παράγωγα μετά από αντίδραση καταλυτικής σύζευξης τύπου Buchwald–Hartwig, με κατάλληλα υποκατεστημένα ανιλίνη, έδωσαν τα τελικά παράγωγα **17a-c**.



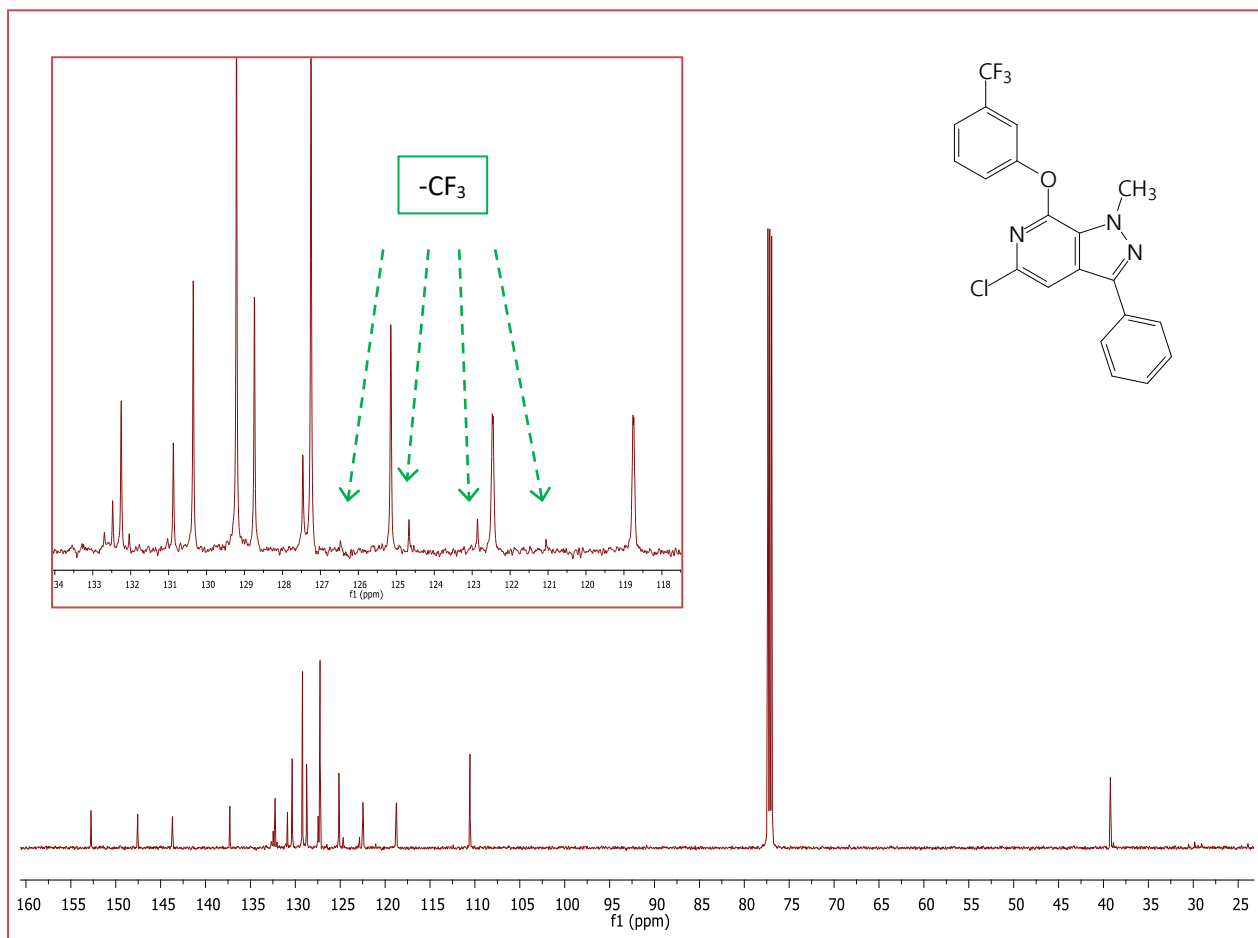
Σχήμα 2.4 Αντιδραστήρια και συνθήκες: **a:** 4-methylpiperazine, 160 °C, (Ar), 20 min
b: morpholine, 130 °C, (Ar), 40 min **c:** 3-trifluoromethylphenol, K₂CO₃, DMSO, 150 °C
 2h 30min **d:** N-methyl-N'-(4-aminophenyl)-piperazine, CsCO₃, X-Phos, Pd(dba)₂,
 anhydrous Toluene, 135 °C, 18h.

Στις εικόνες 2.1-2.3 απεικονίζονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των παραγώγων **16c** και **17c** αλλά και το φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του **16c**.



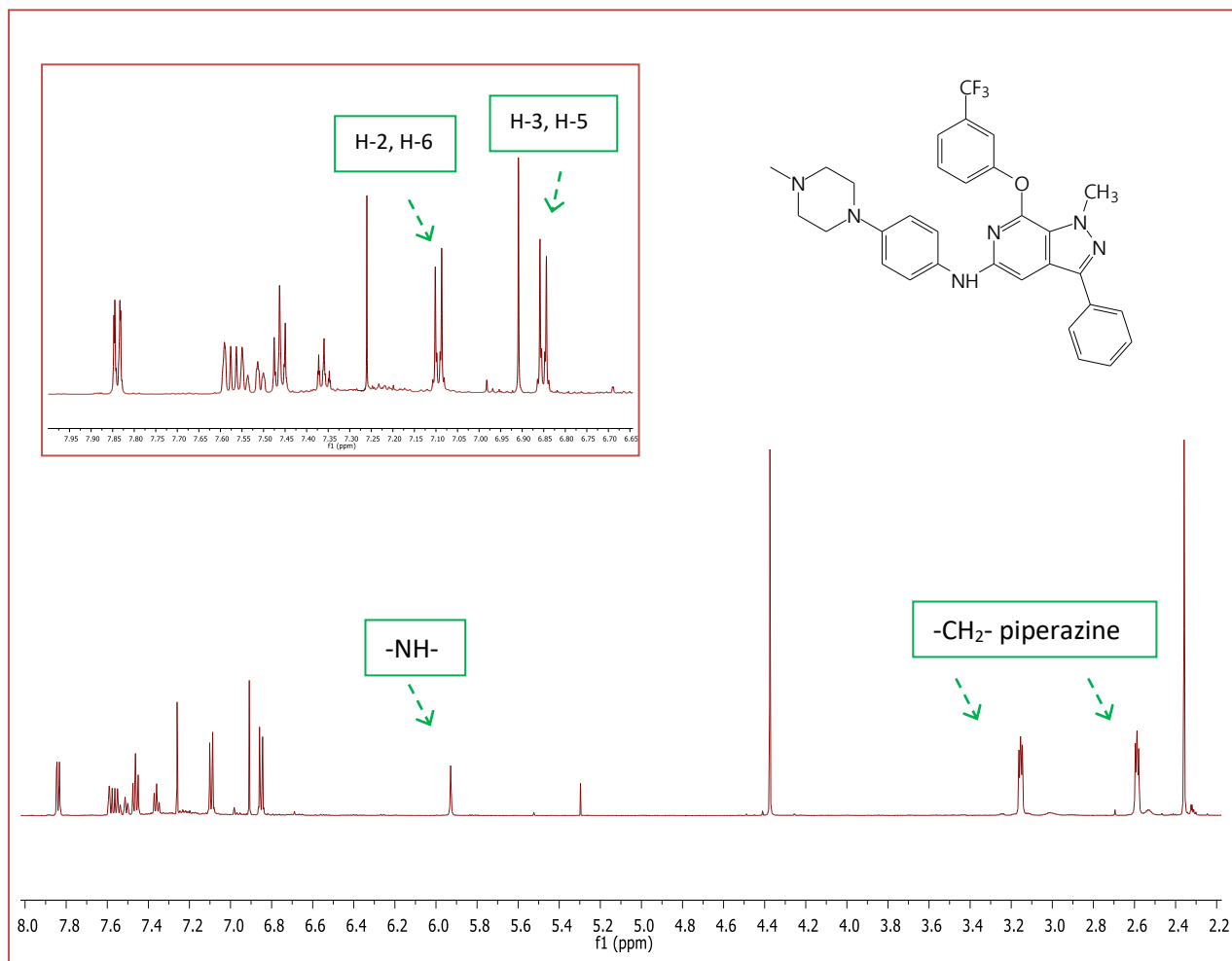
Εικόνα 2.1: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **16c**

Στην εικόνα 2.1 βλέπουμε το φάσμα πρωτονίου του **16c**. Στην αλειφατική περιοχή συντονίζονται τα υδρογόνα του μεθυλίου ενώ στην αρωματική περιοχή παρατηρούμε εκτός από τις κορυφές που αντιστοιχούν στα υδρογόνα του φαινυλίου, κορυφές που προέρχονται από τα υδρογόνα του πυρήνα της φαινόλης.



Εικόνα 2.2: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του παραγώγου **16c**

Στην εικόνα 2.2 παρατηρούμε το φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του παραγώγου **16c**. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιοχή από 122 έως 127 ppm καθώς εκεί παρατηρούμε ότι εμφανίζεται η τετραπλή κορυφή του άνθρακα της ομάδας $-\text{CF}_3$ (1:2:2:1) με $J=272\text{ Hz}$. Η κορυφή του συγκεκριμένου άνθρακα σχάζεται εξαιτίας της σύνδεσής του με τρία άτομα φθορίου ($J1$), αφού το ισότοπο ^{19}F βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στη φύση.

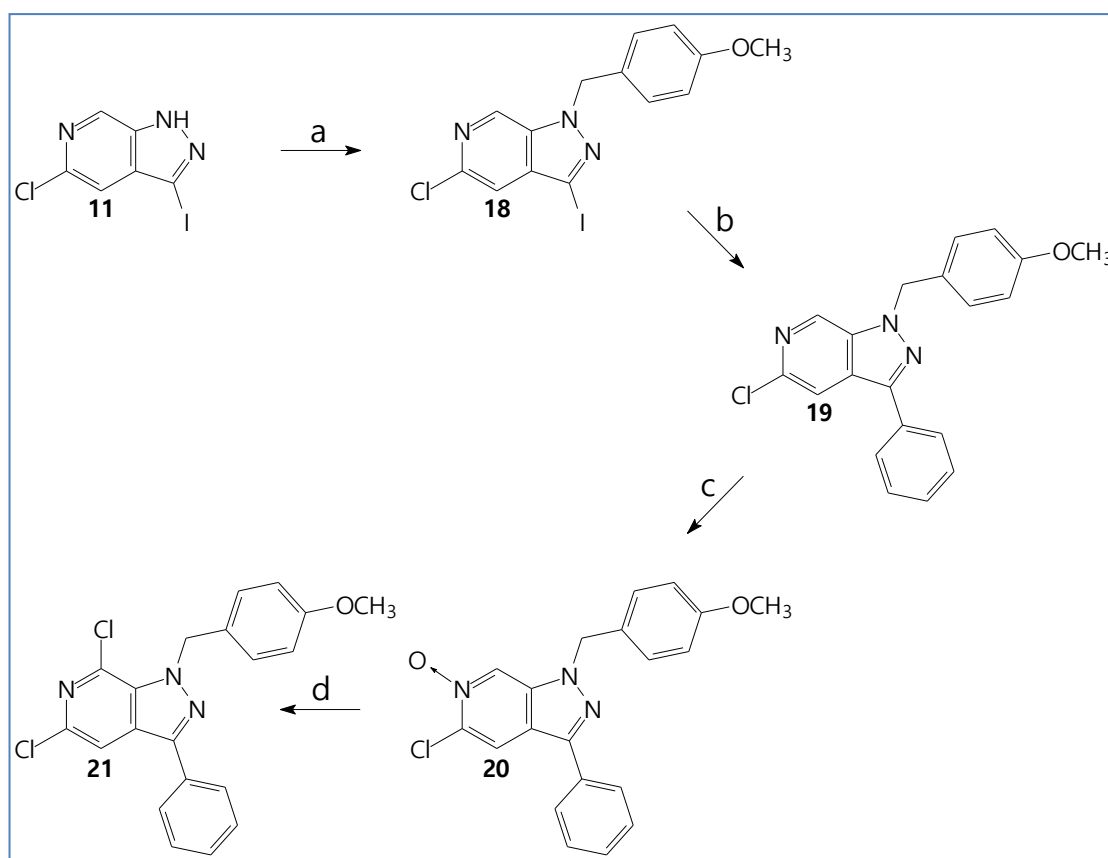


Εικόνα 2.3: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **17c**

Στην εικόνα 2.3 παρουσιάζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **17c**. Στην αλειφατική περιοχή συντονίζονται η N1-μεθυλομάδα και η πιπεραζινική μεθυλομάδα, καθώς και τα ισοδύναμα H-2, H-4 και H-3, H-5 της ομάδας αυτής. Επίσης, είναι εμφανείς οι απορροφήσεις του ευκίνητου $-\text{NH}-$ περίπου στα 6ppm και των 2 διπλών κορυφών που αντιστοιχούν στα π-βενζολικά-H.

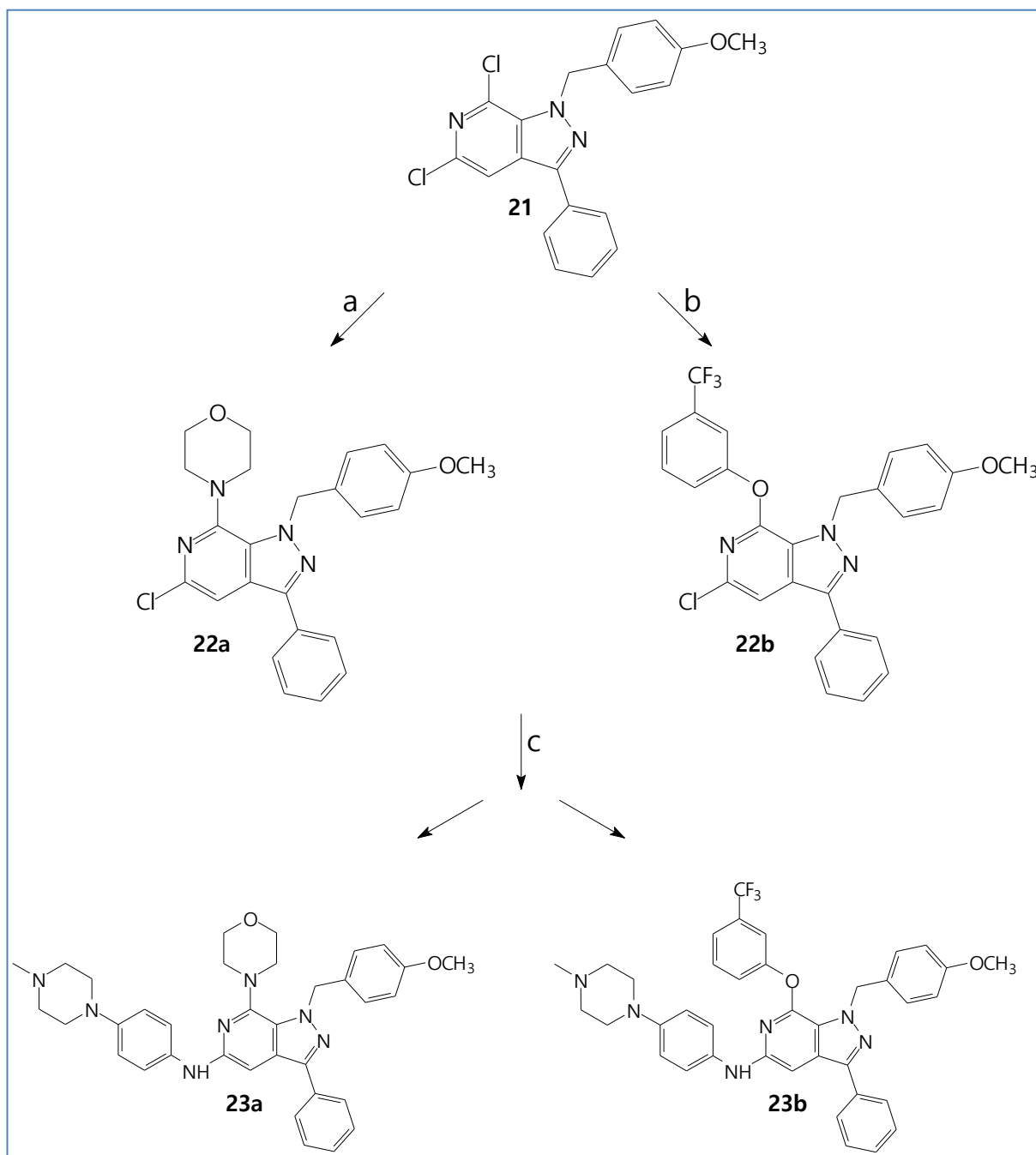
2.1.3 Σύνθεση των παραγώγων που φέρουν N1-(4-μεθοξυβενζυλ) ομάδα 23a-23b

Για τη σύνθεση των παραγώγων αυτών, το ιωδοπαραίγωγο **11** αντέδρασε με 4-μεθοξυβενζυλοχλωρίδιο και σχηματίστηκε το αντίστοιχο 1-(4-μεθοξυβενζυλο)παραίγωγο **18** (Σχήμα 2.5), το οποίο με καταλυτική αντίδραση σύζευξης τύπου Suzuki οδήγησε στην 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**19**). Στη συνέχεια, από το παραίγωγο **19** μετά από επίδραση 3-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος παρελήφθη το αντίστοιχο *N*-οξείδιο **20**, το οποίο αντέδρασε με οξυχλωριούχο φώσφορο προς σχηματισμό του διχλωροπαραίγωγου **21**.^[27]



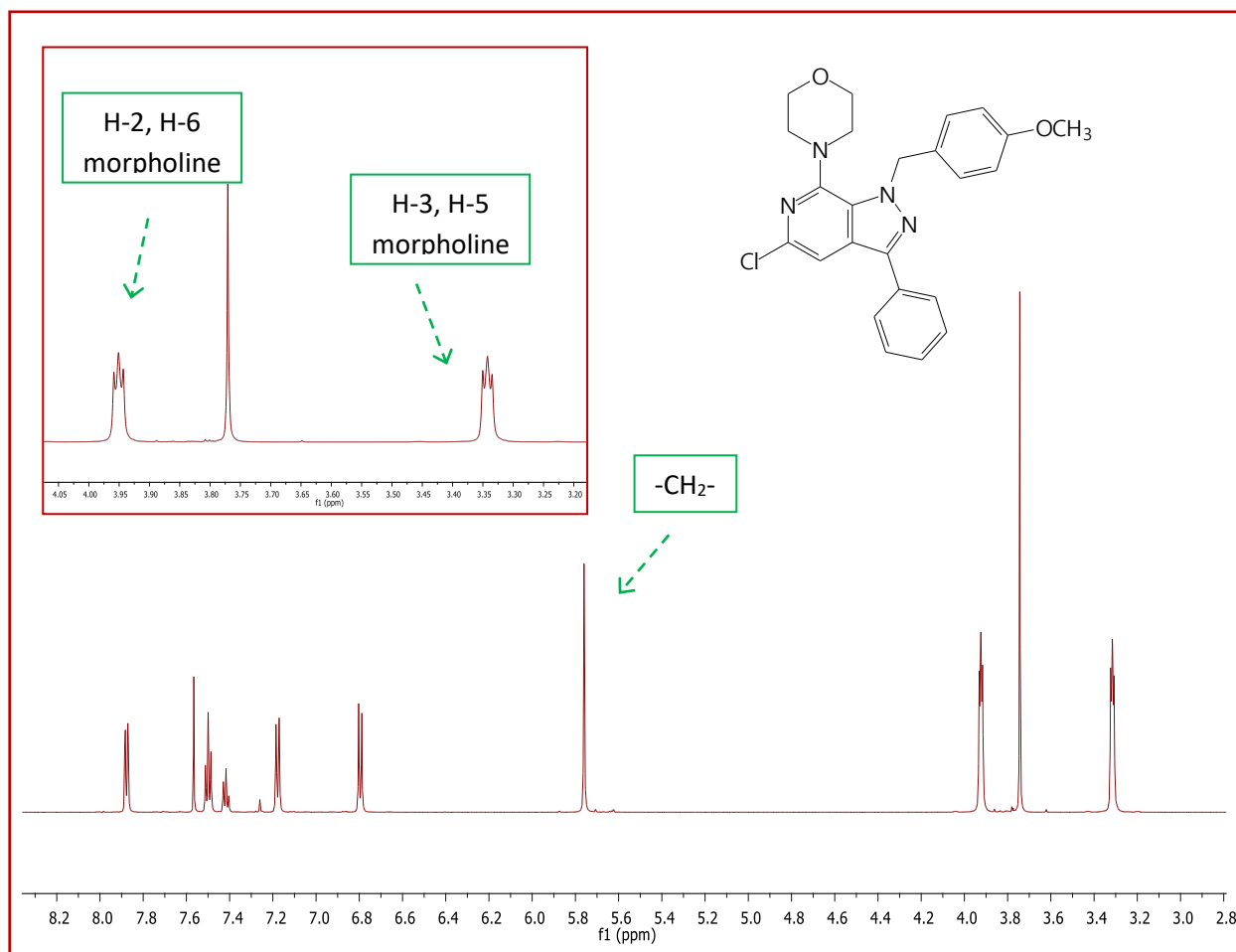
Σχήμα 2.5 Αντιδραστήρια και συνθήκες: **a**: 4-methoxy-benzylchloride, NaH, anhydrous DMF, 0 °C, (Ar), 2h **b**: phenylboronic acid, Pd(PPh₃)₄, NaHCO₃, toluene/EtOH, 100 °C, (Ar), 15h **c**: 3-chloroperbenzoic acid, CH₂Cl₂, 48h **d**: POCl₃, anhydrous THF, 12h.

Στο διχλωροπαραίγωγο **21** πραγματοποιήθηκε πυρηνόφιλη προσβολή στην 7 θέση απο μορφολίνη και μ-τριφθορομεθυλοφαινόλη παρουσία βάσης και προέκυψαν τα παραίγωγα **22a**, **22b** αντίστοιχα (Σχήμα 2.6). Τα παραίγωγα αυτά μετά από αντίδραση καταλυτικής σύζευξης τύπου Buchwald–Hartwig, με την κατάλληλη ανιλίνη, έδωσαν τα αντίστοιχα υποκατεστημένα παραίγωγα **23a** και **23b**.



Σχήμα 2.6 Αντιδραστήρια και συνθήκες: **a**: morpholine, 130 °C, (Ar), 1h **b**: 3-hydroxybenzotrifluoride, K₂CO₃, DMSO, 150 °C 2h 30min **c**: N-methyl-N'-(4-aminophenyl)-piperazine, CsCO₃, X-Phos, Pd(dba)₂, anhydrous Toluene, 135 °C, 18h.

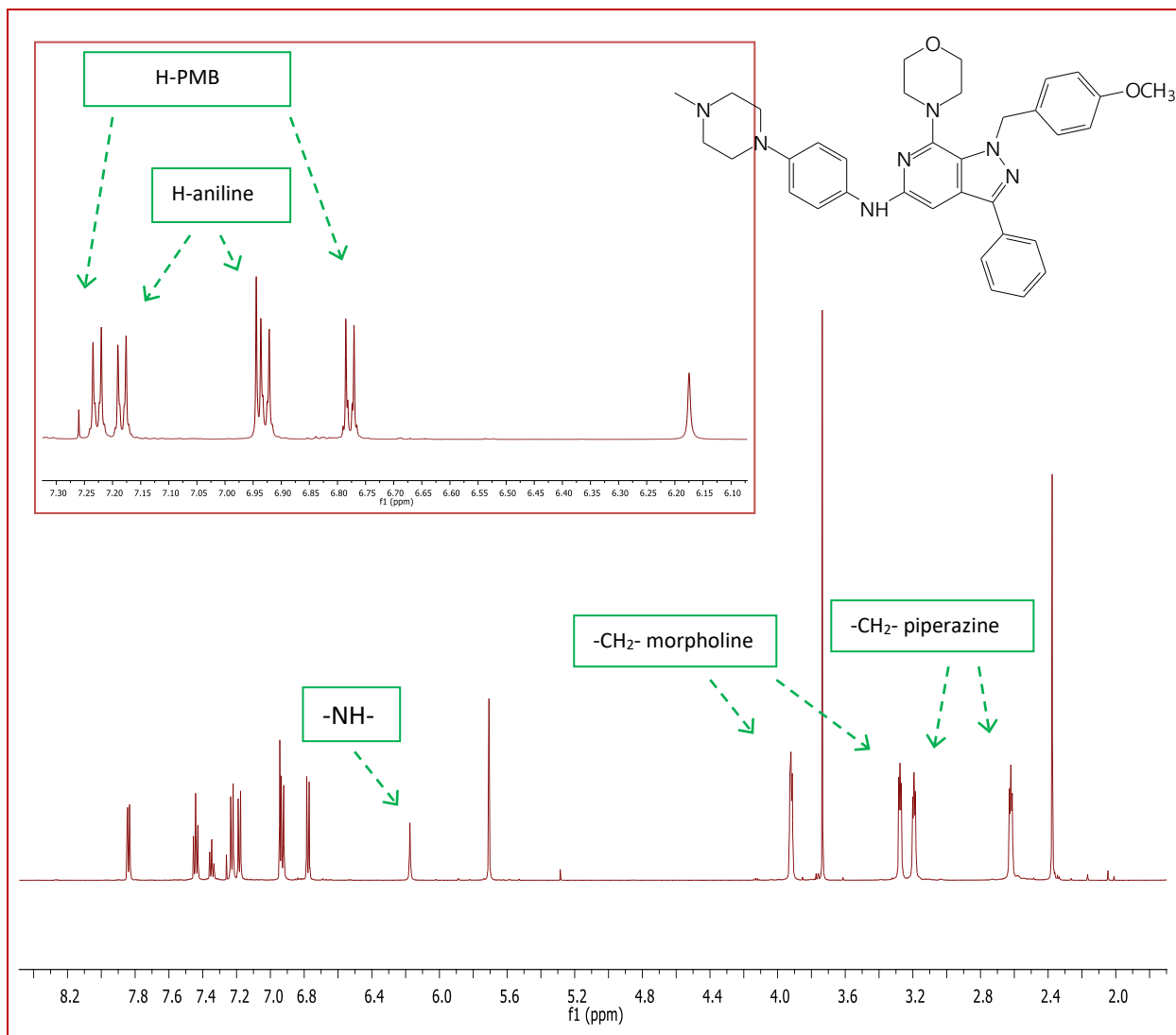
Στην εικόνα 2.4 απεικονίζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **22a**.



Εικόνα 2.4: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **22a**

Παρατηρούνται οι χημικές μετατοπίσεις των ισοδύναμων μορφολινικών υδρογόνων H-2, H-6 και H-3, H-5.

Στην εικόνα 2.5 απεικονίζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **22b**.



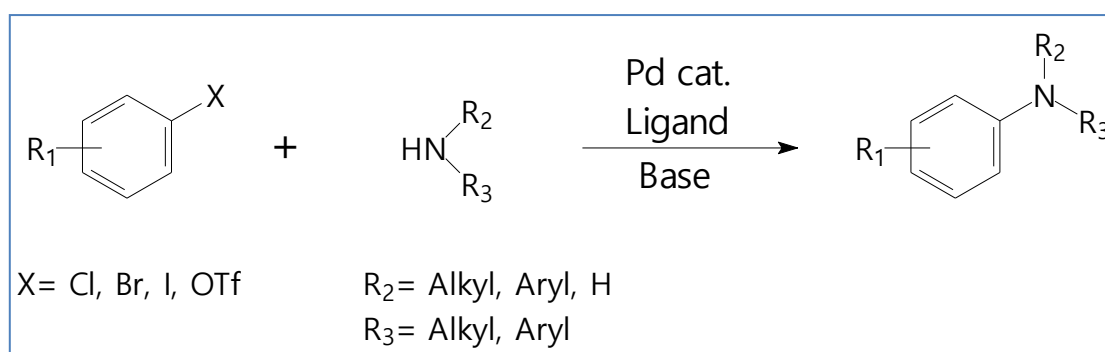
Εικόνα 2.5: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **23a**

Στην εικόνα 2.5 παρουσιάζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **23a**. Στην αλειφατική περιοχή συντονίζονται τα υδρογόνα του μεθοξυλίου, της μορφολίνης του μεθυλίου της μεθυλοπιπεραζίνης, καθώς και τα ισοδύναμα H-2, H-4 και H-3, H-5 αυτής της ομάδας. Επίσης, παρατηρούνται το ευκίνητο -NH- περίπου στα 6ppm και οι δύο διπλές κορυφές του 5-φαινολικού πυρήνα που διακρίνονται από τις αντίστοιχες διπλές κορυφές της 4-μεθοξυβενζυλομάδας.

2.1.4 Επισκόπηση της καταλυτικής σύζευξης Buchwald - Hartwig

Στη συνέχεια γίνεται μια επισκόπηση της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των τελικών επιθυμητών προϊόντων **17a-c** και **23a-b**.

Η αμίνωση Buchwald – Hartwig^[28] είναι μια αντίδραση που εφαρμόζεται στη συνθετική οργανική χημεία για το σχηματισμό δεσμών C – N μέσω διασταυρούμενης σύζευξης αμινών και αρυλαλογονιδίων με τη διαμεσολάβηση καταλύτη παλλαδίου συνδεδεμένο με ένα πρόσδεμα (συνήθως φωσφίνη) παρουσία ισχυρής βάσης.

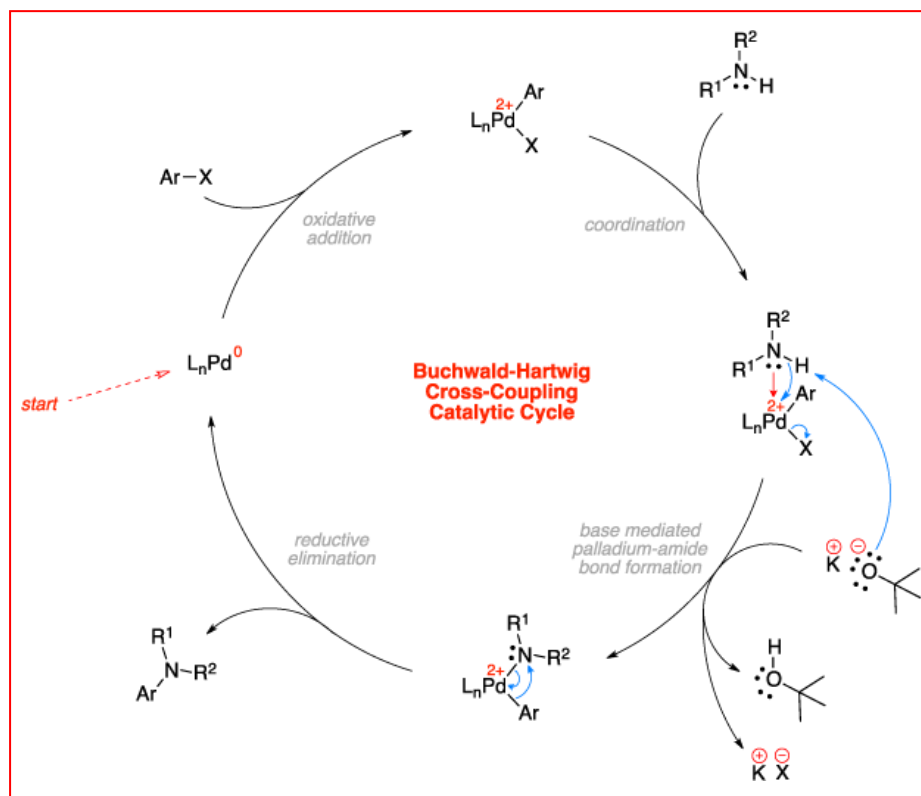


Σχήμα 2.7 Διασταυρούμενη σύζευξη Buchwald - Hartwig

Παρόλο που τέτοιες συζεύξεις άνθρακα – αζώτου έχουν περιγραφεί ήδη από το 1983, ήταν οι Stephen L. Buchwald και John F. Hartwig οι οποίοι με πληθώρα εργασιών μεταξύ 1994-2000 ανέδειξαν την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης δημιουργίας δεσμού άνθρακα – αζώτου, έναντι των ανεπαρκών έως τότε μεθόδων (αναγωγικήςαμίνωσης, πυρηνόφιλης υποκατάστασης κλπ.).

Κατά τη διάρκεια της προόδου και βελτιστοποίησης της αντίδρασης, έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί νέες γενιές καταλυτών διαφορετικής εμβέλειας όσον αφορά τα υποστρώματα σύζευξης, επιτρέποντας το συνδυασμό μεγάλου αριθμού αμινών με ποικιλία αρυλαλογονιδίων. Έτσι, εξαιτίας της σημασίας των παραγώγων που περιλαμβάνουν δεσμό αρωματικού άνθρακα με άζωτο στη φαρμακευτική, η συγκεκριμένη αντίδραση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς, βρίσκοντας εφαρμογή στην ολική σύνθεση αρκετών φυσικών προϊόντων αλλά και αρκετών φαρμάκων σε βιομηχανική κλίμακα.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται αναλυτικά ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η καταλυτική σύζευξη Buchwald-Hartwig.



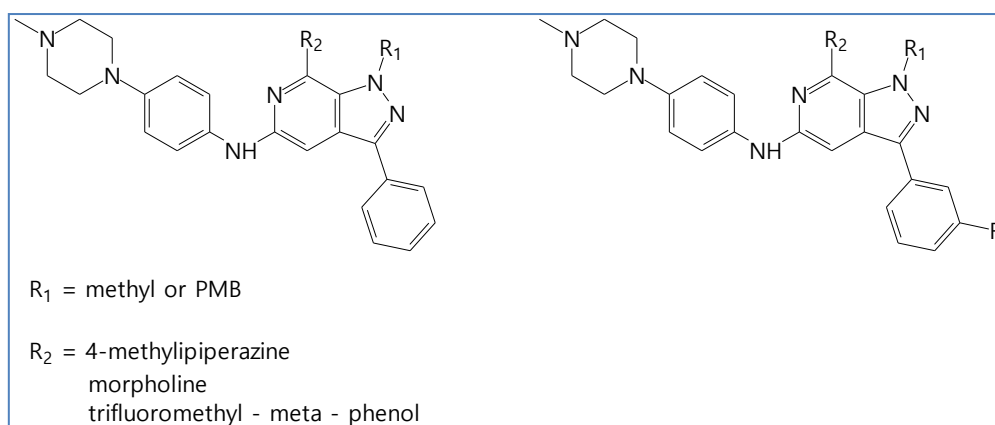
Εικόνα 2.6: Καταλυτικός κύκλος της αντίδρασης Buchwald - Hartwig

Ο καταλυτικός κύκλος ξεκινά με την σύνδεση του προσδέματος (X-φρος) πάνω στον καταλύτη παλλαδίου (Pd-dba) οπότε και σχηματίζεται το σύμπλοκο L_nPd^0 . Στη συνέχεια ακολουθεί οξειδωτική προσθήκη του συμπλόκου παλλαδίου στο αρυλαλογονίδιο Ar-X. Έπειτα η αμινομάδα (R_2NH , RNH_2) προσεγγίζει με κατάλληλη διεύθυνση το σύμπλοκο της οξειδωτικής προσθήκης. Σε επόμενο στάδιο αποσπάται το όξινο πρωτόνιο του συμπλόκου από μια βάση ($tBuOK$, $CsCO_3$) μαζί με το αλογόνο ενώ ταυτόχρονα σχηματίζεται δεσμός ανάμεσα στα άτομα παλλαδίου και αζώτου. Τέλος, σε ένα στάδιο αναγωγικής απόσπασης, σχηματίζεται ο δεσμός μεταξύ άνθρακα και αζώτου, οπότε και αποσπάται το επιθυμητό παράγωγο ανιλίνης ($Ar-NR_2$, $Ar-NHR$) από τον καταλύτη ενώ ταυτόχρονα αναγεννάται το σύμπλοκο προσδέματος-καταλύτη (L_nPd^0).

2.2 Αποτελέσματα βιολογικής αξιολόγησης - Συμπεράσματα

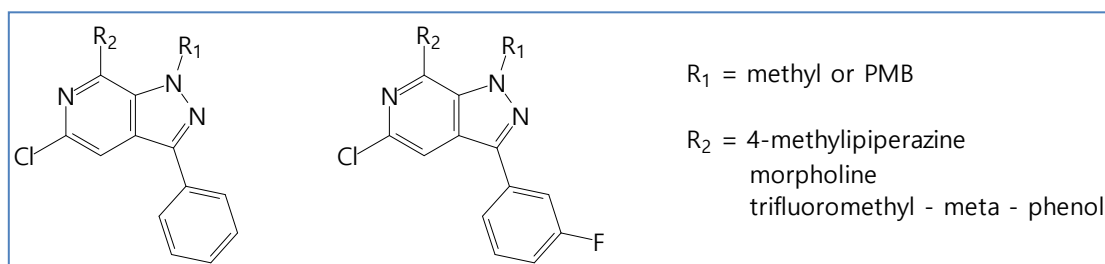
2.2.1 Μελέτη της επίδρασης των νέων παραγώγων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων.

Τα μόρια που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία ανήκουν σε δύο δομικές κατηγορίες: σε αυτά που περιγράφηκε η σύνθεση τους στο κεφάλαιο 2.1 και φέρουν 3-φαινυλοϋποκαταστάτη επί της πυραζολοπυριδίνης και στα ανάλογα παράγωγα που φέρουν 3-φθοροφαινυλοϋποκαταστάτη (Εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.7 Δομικές κατηγορίες των προς εξέταση μορίων

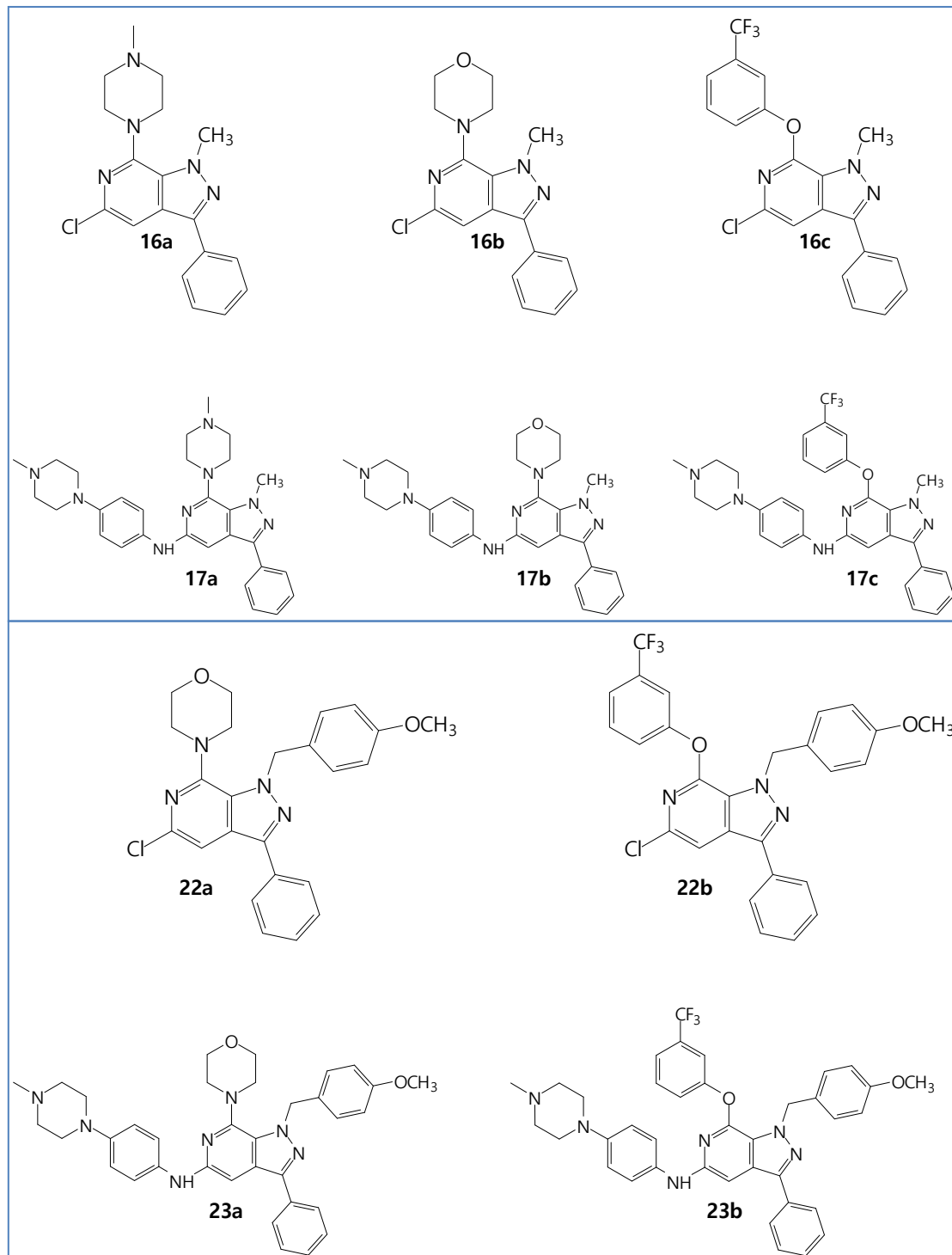
Επίσης θεωρήθηκε σημαντικό, να εξεταστούν και τα 5-χλωροπαράγωγα της Εικόνας 2.8, τα οποία αποτελούν πρόδρομα μόρια που προήλθαν από τις συνθετικές πορείες, καθώς στην προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας, τα αντίστοιχα χλωροπαράγωγα είχαν επιδείξει σημαντική αντι-πολλαπλασιαστική δράση και χαμηλές τιμές IC_{50} .



Εικόνα 2.8 Δομικές κατηγορίες των πρόδρομων 5-χλωροπαράγωγων

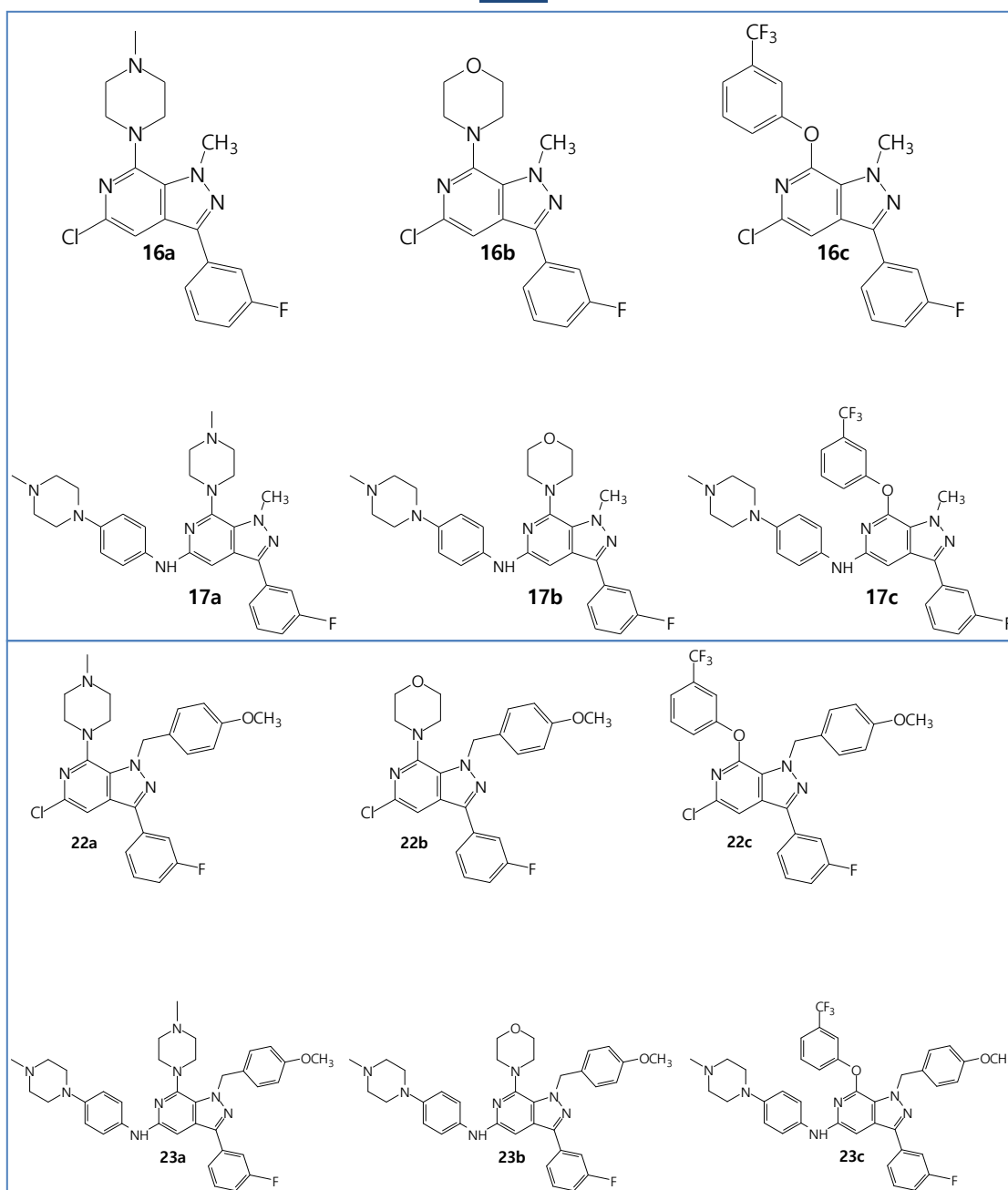
Συνολικά δηλαδή εξετάστηκαν 22 συνθετικές ενώσεις, 10 από τις οποίες φέρουν φαινύλιο στην 3-θέση (Εικόνα 2.9) και 12 που φέρουν την 3-φθοροφαινυλομάδα(Εικόνα 2.10).

STK



Εικόνα 2.9 Μόρια προς εξέταση με υποκατάσταση φαινυλίου στην 3-θέση (κωδικό όνομα STK)

VLK



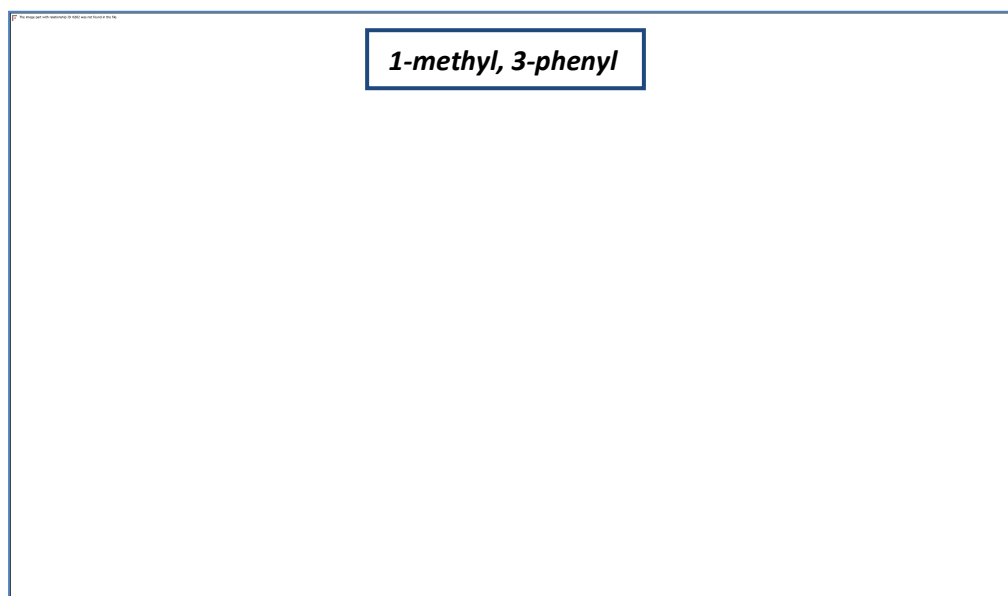
Εικόνα 2.10 Μόρια προς εξέταση με υποκατάσταση 3-φθοροφαινυλίου στην 3-θέση (κωδικό όνομα **VLK**)

Τα παράγωγα διαλύθηκαν σε καθαρό DMSO με συνεχή ανάδευση σε vortex mixer. Αρχικά, παρασκευάστηκαν stock solutions των πειραματικών ουσιών σε 100% DMSO αρχικής συγκέντρωσης 10mM, τα οποία διατηρήθηκαν στους -20°C. Έπειτα, οι ουσίες αραιώθηκαν περαιτέρω σε θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας στις κατάλληλες τελικές συγκεντρώσεις. Η τελική περιεκτικότητα σε DMSO ήταν 0,1% v/v.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, που έγινε με τη μέθοδο MTT^{[29],[30]} στις καλλιέργειες που εκτέθηκαν στις υπό εξέταση ουσίες, εκφράστηκαν ως επί τοις εκατό (%) του αριθμού κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα, δηλαδή της ομάδας των κυττάρων που επώαστηκαν με 0,1% DMSO. Επομένως, έπρεπε αρχικά τα εν λόγω αποτελέσματα, δηλαδή οι τιμές απορρόφησης που έχουν καταγράψει σε κάθε εξεταζόμενο δείγμα να μετατραπούν στον αντίστοιχο αριθμό κυττάρων και έπειτα να εκφραστούν ως επί τοις εκατό (%) αναλογία του αριθμού κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα. Η μετατροπή αυτή έγινε με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η δημιουργία της οποίας περιγράφεται σε επόμενο κεφάλαιο.

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 2.11-2.15) παρατίθενται οι επιδράσεις των νέων μορίων, ως ποσοστό του κυτταρικού αριθμού συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν κατηγοριοποιηθεί σε γραφήματα με βάση τη χημική δομή των εν λόγω μορίων. Επίσης, παρουσιάζονται τα αντίστοιχα ραβδογράμματα με τετμημένη τις προς εξέταση ουσίες και τεταγμένη το επί τοις % του αριθμού κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα. Να σημειωθεί ότι ο έλεγχος της ικανότητας τους να επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε στις δύο αντιπροσωπευτικές συγκεντρώσεις 0.2 και 2 μΜ.

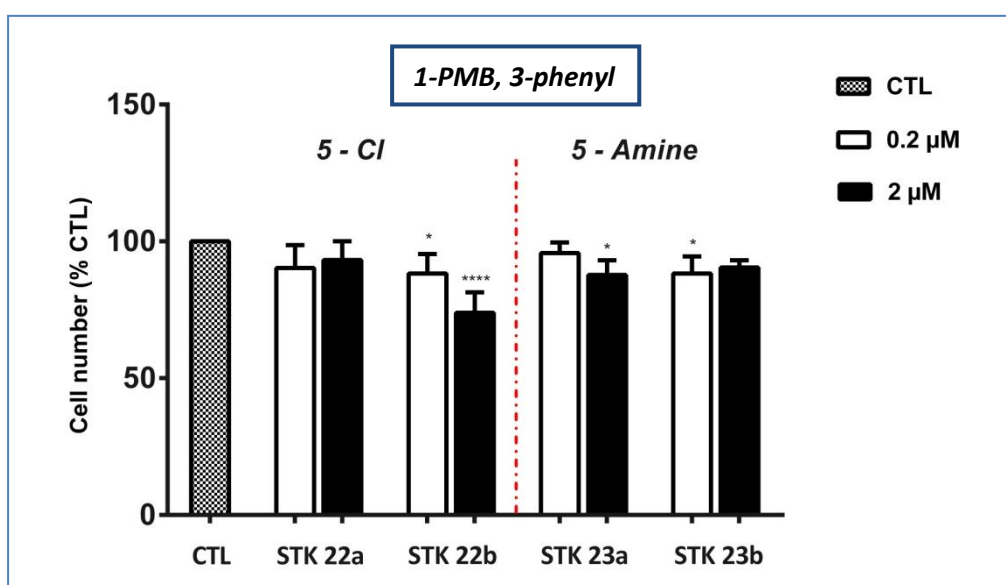
Στην *Εικόνα 2.11* φαίνεται η επίδραση των 1-μεθυλο-3-φαινυλοϋποκατεστημένων παραγώγων στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.



Εικόνα 2.11 Επίδραση των STK16a-16c και STK17a-17c στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EAhy926 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις ουσίες για 48 ώρες πριν εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM.

Αυτό που αξίζει να σημειωθεί από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι από τη συγκεκριμένη κατηγορία χημικών ενώσεων, τη σημαντικότερη αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού έδειξαν τα μόρια **16b** και **17b**. Αμφότερα φέρουν 7-μορφολινομάδα. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτη είναι η μείωση που έδειξε το παράγωγο **16b**, το οποίο αποτελεί το πρόδρομο 5-χλωροπαράγωγο του **17b**, δράση που εμφανίστηκε από τα 0.2 μM . Αντίθετα, τα παράγωγα **16a**, **16c** αλλά και **17a** δεν έδειξαν σημαντική μείωση στον αριθμό κυττάρων. Τέλος, το **17c** φαίνεται ότι προκαλεί μια μικρή μεταβολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων.

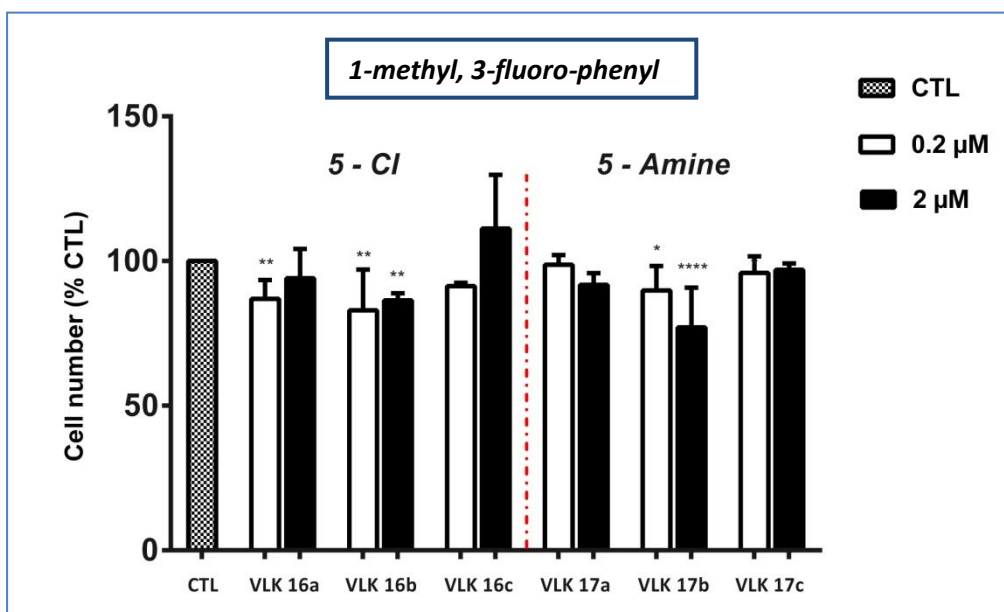
Στην *Εικόνα 2.12* απεικονίζεται η επίδραση των 3-φαινυλο-1-(4-μεθοξυβενζυλο) παραγώγων στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων.



Εικόνα 2.12 Επίδραση των STK22a-22bc και STK 23a-23b στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EAHy926 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις ουσίες για 48 ώρες πριν εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι το μόνο παράγωγο που προκαλεί αισθητή αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τις 1-βενζυλοϋποκατεστημένες ενώσεις είναι το **22b**, το οποίο φέρει επιπλέον 7-(3-τριφθορομεθυλο)φαινυλοξυμάδα. Αντιθέτως τα 7-μορφολινοπαράγωγα **22a** και **23a** δεν έδειξαν σημαντική δράση.

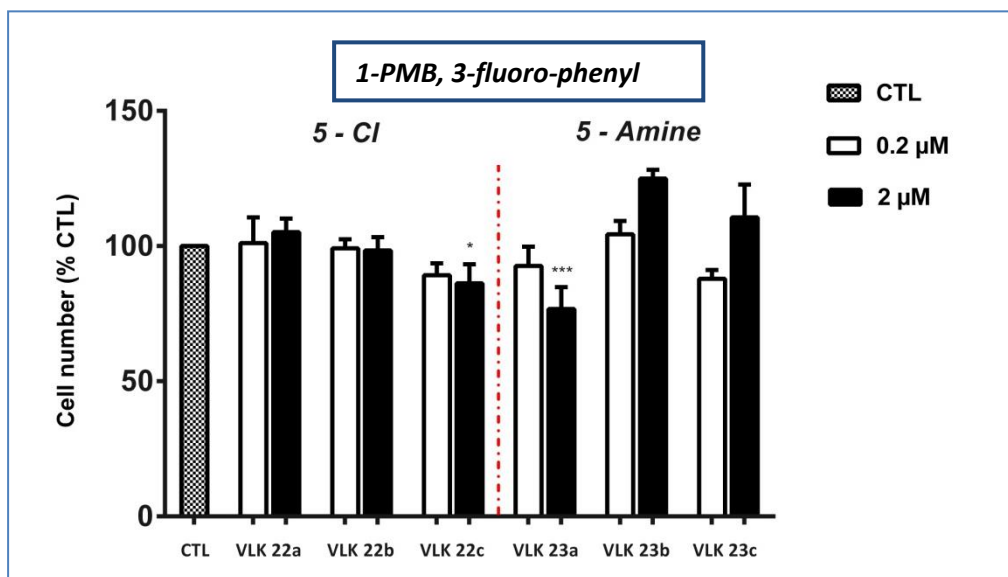
Στην *Εικόνα 2.13* παρουσιάζεται η επίδραση των ουσιών που φέρουν 3-φθοροφαινυλομάδα και 1-μεθυλομάδα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.



Εικόνα 2.13 Επίδραση των VLK 16a-16c και VLK 17a-17c στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EAHy926 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις ουσίες για 48 ώρες πριν εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει, ότι το προϊόν που έχει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα όσον αφορά την ικανότητα να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, είναι το **17b**. Είναι το μόνο δηλαδή από αυτήν την κατηγορία παραγώγων, που φέρουν ως υποκαταστάτη 1-μεθύλιο και συγχρόνως την 3-φθοροφαινυλομάδα στην 3-θέση του δακτυλίου, που επηρεάζει σε ικανοποιητικό βαθμό τον αριθμό των κυττάρων.

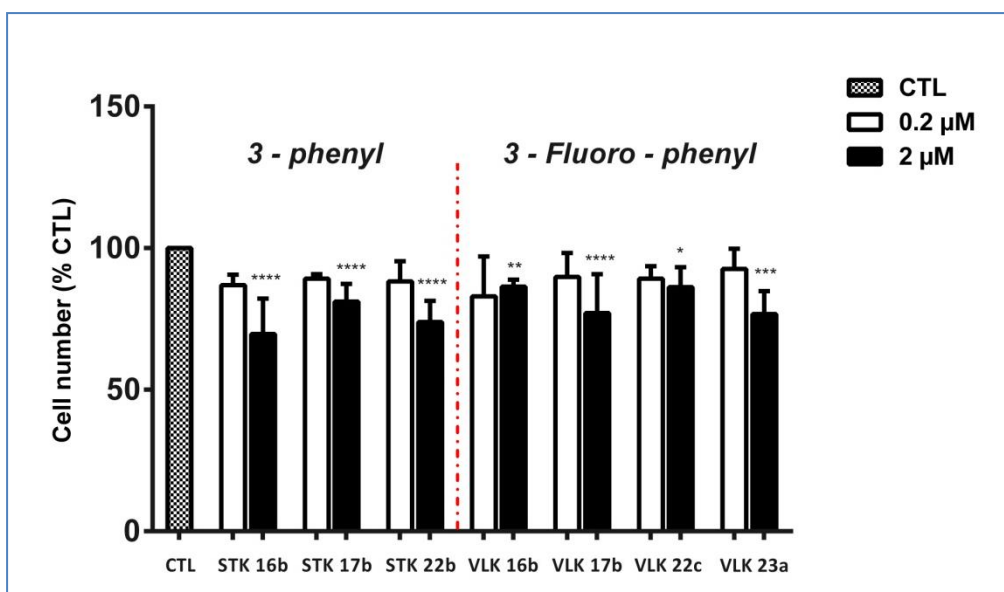
Τέλος, στην *Εικόνα 2.14* παρουσιάζεται η επίδραση των παραγώγων που στην 3-θέση φέρουν την 3-φθοροφαινυλομάδα και στην 1-θέση 4-μεθοξυβενζυλομάδα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.



Εικόνα 2.14 Επίδραση των VLK22a-22c και VLK23a-23c στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EAHy926 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις ουσίες για 48 ώρες πριν εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$ σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM.

Παρατηρώντας τα παραπάνω αποτελέσματα, αυτό που μπορούμε να διακρίνουμε είναι ότι το παράγωγο με την μεγαλύτερη αντι-πολλαπλασιαστική δράση από την συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων είναι το **23a**, που φέρει 1-(4-μεθοξυβενζυλ)ομάδα και 7-(4-μεθυλοπιπεραζινικό) υποκαταστάτη. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε άμεση συμφωνία με την προγενέστερη μελέτη, καθώς η μόνη δομική διαφορά του **23a** από την ένωση οδηγό **1** είναι το άτομο φθορίου στο 3-φαινύλιο. Μέτρια δράση δείχνει επίσης και το αιθερικό παράγωγο **22c**. Αξίζει να σημειωθεί ότι το δομικό του ανάλογο **22b** της σειράς ενώσεων με κωδικό STK, είχε παρουσιάσει επίσης δράση, αν και μεγαλύτερη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Έτσι, στο παρακάτω συγκεντρωτικό γράφημα (Εικόνα 2.15) παρουσιάζονται ταυτόχρονα τα πλέον αξιολογικά παράγωγα των παραπάνω κατηγοριών, σχετικά με την ικανότητα τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



Εικόνα 2.15 Επίδραση των πιο δραστικών παραγώγων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των EAHy926 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα προϊόντα για 48 ώρες πριν εκτιμηθεί ο κυτταρικός αριθμός. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SEM.

2.2.2 Προσδιορισμός IC_{50} του παραγώγου VLK 23a

Γνωρίζοντας πλέον τα επτά παράγωγα τα οποία παρουσίασαν τη υψηλότερη δραστικότητα όσον αφορά την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, επιλέχθηκε να προσδιοριστεί η τιμή $IC_{50}^{[31]}$ του παραγώγου **VLK 23a**. Το παράγωγο αυτό επιλέχθηκε ώστε να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε ποσοτικά την επίδραση που θα είχε στην δραστικότητα η εισαγωγή ενός ατόμου φθορίου στο φαινύλιο της 3-θέσης του ετεροκυκλικού συστήματος. Έτσι γνωρίζοντας ήδη την τιμή της συγκέντρωσης της IC_{50} της ένωσης οδηγού 1, θα καταστεί δυνατή η σύγκριση των δύο αυτών παραγώγων.

Η διαδικασία προσδιορισμού της τιμής IC_{50} που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, το εύρος συγκεντρώσεων του μορίου που προστέθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι 0.1-5 μ M.

Στον **Πίνακα 2.1** παρουσιάζεται η τιμή IC₅₀ του παραγώγου VLK 23a καθώς και της ένωσης οδηγού I.

Πίνακας 2.1 IC₅₀ της ένωσης οδηγού I και του VLK 23a

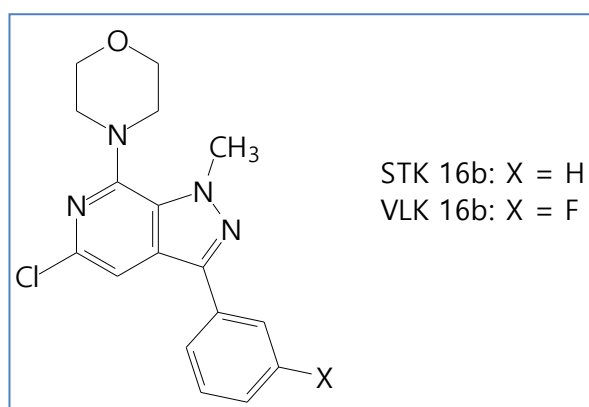
| Ουσίες | IC ₅₀ (μM) | SEM |
|----------------|--------------------------|-------|
| Ένωση οδηγός I | 7.2 | ± 2.4 |
| VLK 23a | 3.2 | ± 0.9 |

Όπως φαίνεται λοιπόν από τα αποτελέσματα, με την αντικατάσταση ενός ατόμου υδρογόνου στο φαινύλιο της 3-θέσης από ένα άτομο φθορίου αναστέλλεται σε σημαντικό βαθμό κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

2.2.3 Ανασκόπηση αποτελεσμάτων βιολογικής αξιολόγησης

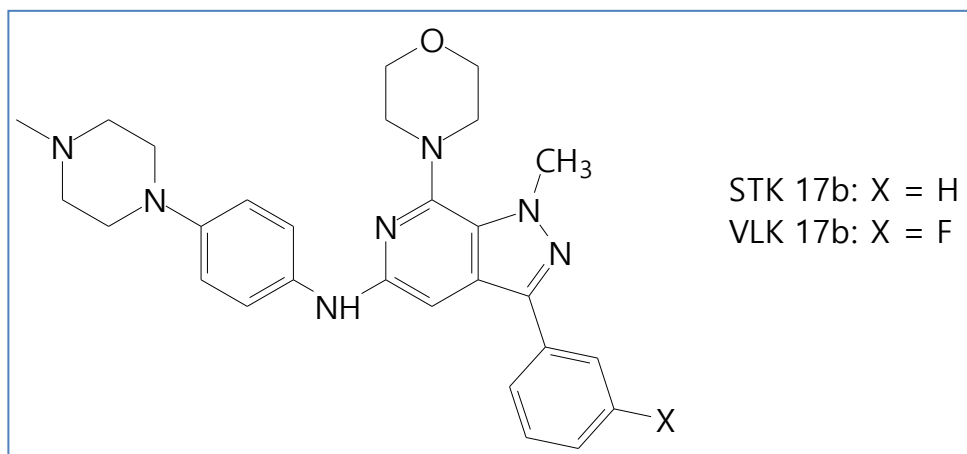
Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων, μπορεί κανείς να καταλήξει στα εξής συμπεράσματα όσον αφορά στην επίδραση των εξεταζόμενων συνθετικών ουσιών στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων:

- Τα 1-μεθυλο-5-χλωρο-7-μορφολινοπαράγωγα (STK 16b και VLK 16b), είτε διαθέτουν φαινύλιο είτε 3-φθοροφαινύλιο στην 3-θέση του δακτυλίου, φαίνεται ότι αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σημαντικότερη επίδραση έδειξαν αυτά με την φαινυλομάδα (STK 16b, *Εικόνα 2.16*).



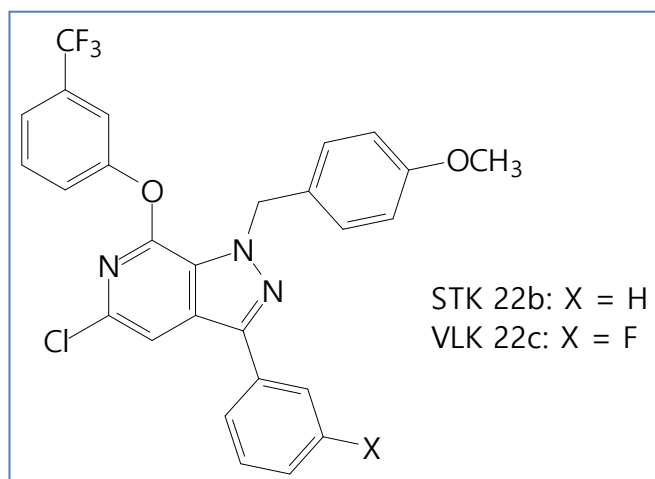
Εικόνα 2.16 Δομή των 5-χλωρο-7-μορφολινο παραγώγων

- Επίσης, τα 1-μεθυλο-5-αμινο-7-μορφολινοπαράγωγα (STK 17b και VLK 17b), είτε διαθέτουν φαινύλιο είτε 3-φθοροφαινύλιο στην 3-θέση του δακτυλίου, φαίνεται ότι έχουν και αυτά επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στα συγκεκριμένα παράγωγα, δραστικότερο ήταν αυτό που στην 3-θέση του δακτυλίου έχει τη 3-φθοροφαινυλοϋποκατάσταση (VLK 17b, *Εικόνα 2.17*).



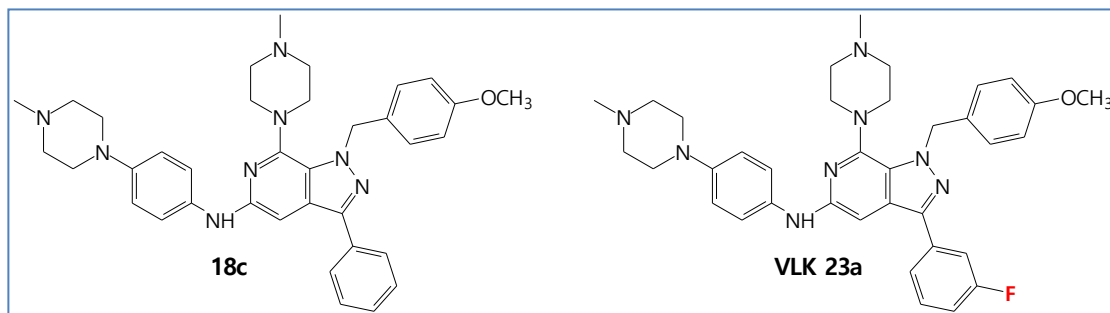
Εικόνα 2.17 Ο χημικός τύπος των 5-αμινο-7-μορφολινο παραγώγων

- Σημαντική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων έδειξαν και τα 5-χλωρο-7-αιθερικά παράγωγα και από τις δύο δομικές κατηγορίες (STK 22b και VLK 22c). Ισχυρότερη μεταξύ αυτών των δύο φαίνεται να είναι η επίδραση που ασκεί το 3-φαινυλοπαράγωγο (STK 22b, *Εικόνα 2.18*)



Εικόνα 2.18 Ο χημικός τύπος των 5-αμινο-7-τριφθορο-μετα-φαινολο παραγώγων

- Τέλος το παράγωγο που έδειξε τη μεγαλύτερη δραστικότητα από αυτά που στην 3-θέση φέρουν την 3-φθοροφαινυλομάδα, είναι το VLK 23a. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το αποτέλεσμα αυτό συνάδει και με την προηγούμενη μελέτη καθώς η ένωση οδηγός 1, η οποία είχε εμφανίσει σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αποτελεί χημικό ισοστερές του VLK 23a.



Εικόνα 2.19 Οι χημικοί τύποι της ένωσης οδηγού 1 και της ανάλογης της VLK 23a, που προέκυψε με αντικατάσταση ενός ατόμου υδρογόνου του φαινυλίου της 3-θέσης του δακτυλίου από άτομο φθορίου.

2.2.4 Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν συνολικά 12 νέα παράγωγα πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης. Σε 10 από αυτά, αλλά και σε άλλα 12 παράγωγα, ανάλογα των πρώτων που φέρουν όμως 3-(3-φθοροφαινυλο)ομάδα, εξετάστηκε η ικανότητα τους να επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, που αποτελούν κύριους παράγοντες στην αγγειογένεση. Από τη δοκιμασία αυτή αναδείχθηκαν 7 παράγωγα που φαίνεται ότι επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ικανοποιητικό βαθμό, και σε ένα από αυτά, στο VLK 23a, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης IC₅₀, ώστε να γίνει μια αρχική σύγκριση της δραστικότητάς του και του ομόλογου του από προηγούμενη μελέτη που δεν φέρει υποκατάσταση φθορίου. Όπως παρουσιάστηκε νωρίτερα, η εισαγωγή ενός ατόμου φθορίου στο φαινύλιο της 3-θέσης του δακτυλίου φαίνεται ότι έχει θετική επίδραση στην ικανότητα του μορίου να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Τα συγκεκριμένα πειράματα αποτελούν μια αρχική προσέγγιση, όσον αφορά στη μελέτη της βιολογικής δράσης των παραγώγων αυτών. Κρίνεται αναγκαία η πραγματοποίηση επιπλέον, πιο λεπτομερών και πιο διεξοδικών πειραμάτων ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός με τον οποίο τα μόρια αυτά ασκούν την ανασταλτική τους δράση επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

ΜΕΡΟΣ 3^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Σύνθεση νέων παραγώγων

3.1.1 Γενικά πειραματικά στοιχεία

Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Silicagel 60 AC.C (SDS 35-70 μm). Η παρακολούθηση της εξέλιξης των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες Silicagel 60F254. Για τη λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος BrukerAvance DRX 400 στα 400 MHz και BrukerAvance III600 στα 600 MHz, ενώ για τη λήψη φασμάτων $^{13}\text{C-NMR}$ και φασμάτων δύο διαστάσεων HMBC-NMR, HSQC-NMR και NOESY-NMR χρησιμοποιήθηκαν φασματογράφοι Bruker AC200 στα 50 MHz και BrukerAvance III 600 στα 151MHz. Ως διαλύτες για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6). Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Buchi και δεν είναι διορθωμένα.

3.1.2 Σύνθεση της 5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (10) και του αντίστοιχου 3-ιωδο παραγώγου 11

4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (3)

Η 2-αμινο-4-μεθυλοπυριδίνη (**1**) (15 g, 140 mmol) διαλύεται σε πυκνό θειικό οξύ (72 ml) υπό ψύξη. Στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην υπό ψύξη το μίγμα θειικού-νιτρικού οξέος (10.50 ml από το κάθε οξύ) και το διάλυμα θερμαίνεται στους 60 °C για 20 ώρες. Ακολουθεί επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου, απόχυση του μίγματος σε πάγο και εξουδετέρωση με διάλυμα αμμωνίας 25% μέχρι pH 7-8. Κατόπιν, το μίγμα διηθείται υπό κενό για απαλλαγή από τα αμμωνιακά άλατα των οξέων που σχηματίστηκαν κατά την εξουδετέρωση και το μίγμα των δύο ισομερών κατεργάζεται με θερμό διχλωρομεθάνιο, το οποίο διαλύει το 3-νιτροπαραγώγο **2**, ενώ παραμένει αδιάλυτο το επιθυμητό 5-νιτρο-παραγώγο **3**. Με διήθηση υπό κενό παραλαμβάνονται το ισομερές **3** (52% και 7% του 3,5-δινιτροπαραγώγου **4**) και το παράγωγο **2** (25%).

4-Μεθυλο-3-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (2): Σ.τ.: 134-136 °C (EtOAc).^[32]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.52 (s, 3H, -CH₃), 6.27 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 6.58 (d, 1H, H-5, *J*=4.9 Hz), 8.07 (d, 1H, H-6, *J*=4.9 Hz).

4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (3): Σ.τ.: 220 °C (EtOAc).^[32]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.58 (s, 3H, -CH₃), 5.10 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 6.29 (s, 1H, H-3), 8.90 (s, 1H, H-6).

3,5-Δινιτρο-4-μεθυλοπυριδιν-2-αμίνη (4): Σ.τ.: 170-171 °C (EtOAc).^[33]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.65 (s, 3H, -CH₃), 6.21 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 8.90 (s, 1H, H-6).

4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2(1H)-όνη (5)

Σε διάλυμα της νιτροπυριδίνης **3** (5 g, 32.68 mmol) εντός θεικού οξέος (96%, 8.60 ml) και νερού (86 ml) προστίθεται στάγδην με σταγονομετρική χοάνη και υπό ψύξη κορεσμένο διάλυμα νιτρώδους νατρίου (5 g, 72.46 mmol σε 7 ml νερό). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά μέχρι το σημείο βρασμού, ώστε να απομακρυνθούν οι νιτρώδεις ατμοί. Στη συνέχεια, το μίγμα, αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο, οπότε καθιζάνει το στερεό προϊόν **5**, το οποίο διηθείται, εκπλένεται και ξηραίνεται υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου (4.71 g, 94%). Σ.τ.: 189-190 °C (EtOH).^[34]

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.42 (s, 3H, -CH₃), 6.31 (s, 1H, H-3), 8.56 (s, 1H, H-6), 12.50 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

2-Χλωρο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (6)

Διάλυμα της πυριδινόνης **5** (7.35 g, 47.72 mmol) εντός οξυχλωριούχου φωσφόρου (23.50 ml) θερμαίνεται στους 110 °C για 3 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό κενό μέχρι πλήρους εκδίωξης του οξυχλωριούχου φωσφόρου, προσθήκη μικρής ποσότητας πάγου και διήθηση υπό κενό του στερεού προϊόντος **6** (8.13 g, 99%). Σ.τ.: 40-41 °C (petroleum ether).^[35]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.65 (s, 3H, -CH₃), 7.35 (s, 1H, H-3), 8.98 (s, 1H, H-6).

6-Χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-3-αμίνη (7)

Το χλωροπαράγωγο **6** (5.70 g, 33.04 mmol) διαλύεται υπό ψύξη εντός πυκνού υδροχλωρικού οξέος (36%, 85 ml), κατόπιν προστίθεται σε δόσεις διχλωριούχος κασσίτερος (25.60 g, 135.02 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 50 °C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο της φιάλης, αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο και ακολουθεί εξουδετέρωση υπό ψύξη με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 40% μέχρι pH 11. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, έκπλυση με νερό, ξήρανση (Na₂SO₄), συμπύκνωση της οργανικής φάσης και παραλαβή του προϊόντος **7** (4.61 g, 98%). Σ.τ.: 69-71 °C (Et₂O).^[36]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.09 (s, 3H, -CH₃), 3.84 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 6.93 (s, 1H, H-3), 7.71 (s, 1H, H-6).

N-(2-Χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-5-υλ)ακεταμίδιο (8)

Σε διάλυμα της αμίνης **7** (4.60 g, 32.28 mmol) εντός διχλωρομεθανίου (50 ml) προστίθεται οξικός ανυδρίτης (4.60 ml) στάγδην και υπό ψύξη και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώνεται και στο υπόλειμμα προστίθεται αιθέρας και σχηματίζεται το στερεό προϊόν **8**, το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό (5.70 g, 96%). Σ.τ.: 155-156 °C (EtOAc).^[36]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.20 (s, 3H, -COCH₃), 2.24 (s, 3H, -CH₃), 7.17 (s, 1H, H-3), 7.37 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-), 8.54 (s, 1H, H-6).

1-Ακετυλο-5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (9)

Σε διάλυμα του ακεταμιδίου **8** (3.29 g, 17.83 mmol) εντός άνυδρου τολουολίου (100 ml) προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό αργό, οξικό κάλιο (2.64 g, 26.84 mmol) και οξικός ανυδρίτης (2.1 ml, 21.55 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C. Στη θερμοκρασία αυτή προστίθεται το νιτρώδες ισοαμύλιο (8.23 ml, 61.45 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται για 12 ώρες. Ακολουθεί επαναφορά του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, διήθηση υπό κενό (για απομάκρυνση του οξικού καλίου) και συμπύκνωση του διηθήματος. Το υπόλειμμα **9** χρησιμοποιείται απευθείας, χωρίς περαιτέρω κατεργασία, για την επόμενη αντίδραση. Σ.τ.: 132-133 °C (EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.79 (s, 3H, -COCH₃), 7.67 (s, 1H, H-4), 8.15 (s, 1H, H-3), 9.52 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 22.6, 114.9, 133.8, 134.7, 137.9, 138.0, 144.7, 170.4.

5-Χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (10)

Σε διάλυμα του παραγώγου **9** (7.51 g, 0.04 mmol) εντός άνυδρης μεθανόλης (200 ml) διαβιβάζεται υπό ψύξη αέρια αμμωνία για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το μίγμα επανέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου και αφήνεται σε ηρεμία για 2 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση του κορεσμένου μίγματος και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2 έως 5-5 και λαμβάνεται το παράγωγο **10** (2.44 g, 42 %). Σ.τ.: 185 °C (Toluene).^[37]

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.86 (s, 1H, H-4), 8.20 (s, 1H, H-3), 8.88 (s, 1H, H-7), 13.83 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 114.2, 129.3, 132.8, 134.7, 136.4, 139.15.

5-Χλωρο-3-ιωδο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (11)

Σε διάλυμα της χλωροπυριδίνης **10** (11 g, 71.80 mmol) εντός άνυδρης μεθανόλης (100 ml) προστίθεται υπό ατμόσφαιρα αργού *N*-ιωδοσουκινιμίδιο (21 g, 93.33 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες. Ακολούθως ο διαλύτης συμπυκνώνεται υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με υδατικό διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου 5%. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 6-4 έως 5-5, οπότε λαμβάνεται το ιωδοπαραίγωγο **11** (17.2 g, 86 %). Λευκό στερεό. Σ.τ. 223 - 225 °C (EtOAc).^[38]

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 14.23 (brs, 1H, D₂O exch, NH), 8.87 (s, 1H, H-7), 7.52 (s, 1H, H-4). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 92.1 (C-3), 113.8 (C-4), 133.6 (C-3a), 135.2 (C-7), 136.9 (C-7a), 139.9 (C-5).

3.1.3 Σύνθεση των *N*1-μεθυλοπαραγώγων 17a-c

5-Χλωρο-3-ιωδο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (12)

Σε διάλυμα του παραγώγου **11** (1.83 g, 6.55 mmol) σε ακετόνη (50 ml) στους 0 °C και υπό αργό προστίθεται υδροξείδιο του καλίου (550 mg, 9.82 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται στους 0 °C για 30 λεπτά και έπειτα προστίθεται μεθυλοϊωδίδιο (0.45 ml, 7.20 mmol). Ακολουθεί ανάδευση για 5 λεπτά στους 0 °C και στη συνέχεια το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα

συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα εκπλένεται με νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na₂SO₄) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9.5-0.5 και λαμβάνεται το παράγωγο **12** (1.20 g, 62.4%). Σ.τ.: 144 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.18 (s, 3H, -CH₃), 7.33 (s, 1H, H-4), 8.64 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 36.99, 88.31, 114.56, 133.11, 135.09, 136.85, 141.43. ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₇H₆N₃Cl+ [M+H]⁺: 293.9289 Ευρεθέν: 293.9276

5-Χλωρο-1-μεθυλο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (13)

Σε διάλυμα του παραγώγου **12** (350 mg, 1.19 mmol) σε μίγμα τολουολίου/αιθανόλης (30ml/4.3ml) προστίθεται φαινυλοβορονικό οξύ (161 mg, 1.32 mmol), τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)παλλάδιο(0) (70 mg, 0.06 mmol) και όξινο ανθρακικό νάτριο (302 mg σε 1.39 ml H₂O) και το μίγμα θερμαίνεται υπό αργό στους 100 °C για 30 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα εκπλένεται με νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na₂SO₄) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9.8-0.2 και λαμβάνεται το παράγωγο **13** (266 mg, 91%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 141 °C (CH₂Cl₂-Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.23 (s, 3H, -CH₃), 7.44 (t, 1H, H-4', J=7.5 Hz), 7.52 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.6 Hz), 7.90 (s, 1H, H-4), 7.91 (d, 2H, H-2', H-6', J=5.2 Hz) 8.75 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 36.30, 114.42, 126.86, 127.85, 128.55, 129.03, 131.93, 132.97, 137.24, 141.12, 142.80. ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₃H₁₁N₃Cl+ [M+H]⁺: 244.0636 Ευρεθέν: 244.0642

N-Οξειδίο της 5-χλωρο-1-μεθυλο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (14)

Σε διάλυμα του παραγώγου **13** (260 mg, 1.06 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (7 ml) προστίθεται 3-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ (70% σε νερό) (615 mg, 3.56 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 7-3 έως 2-8 και λαμβάνεται το παράγωγο **14** (180 mg, 65%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 219-220 °C (EtOAc-Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.07 (s, 3H, -CH₃), 7.43 (t, 1H, H-4', J=7.1 Hz), 7.50 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.3 Hz), 7.80 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.3 Hz), 8.01 (s, 1H, H-4), 8.80 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 36.47 (-CH₃), 117.47 (C-4), 118.51 (C-

3a), 123.00 (C-7), 127.16 (C-2', C-6'), 129.21 (C-4'), 129.30 (C-3', C-5'), 131.33 (C-1'), 136.23 (C-5), 137.51 (C-7a), 144.19 (C-3). ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₃H₁₁ON₃Cl⁺ [M+H]⁺: 260.0591 Ευρεθέν: [M+Na]⁺: 282.0432

5,7-Διχλωρο-1-μεθυλο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (15)

Σε διάλυμα του παραγώγου **14** (160 mg, 0.62 mmol) εντός άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (4.5 ml) προστίθεται οξυχλωριούχος φώσφορος (0.3ml, 3.18 mmol) στάγδην και υπό ψύξη και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Το μίγμα αποχύνεται σε νερό και ακολουθεί αλκαλοποίηση με ανθρακικό νάτριο μέχρι pH=10-11. Στη συνέχεια, το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση ξηραίνεται (Na₂SO₄), συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το παράγωγο **15** (160 mg, 94%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 134-135 °C (CH₂Cl₂-Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.42 (s, 3H, -CH₃), 7.41 (t, 1H, H-4', J=7.3 Hz), 7.48 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.4 Hz), 7.74 (s, 1H, H-4), 7.78 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.4 Hz). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 39.37 (-CH₃), 114.43 (C-4), 127.39 (C-2', C-6'), 129.07 (C-4'), 129.30 (C-3', C-5'), 130.59 (C-3a), 131.65 (C-1'), 133.09 (C-5), 134.49 (C-7a), 139.13 (C-7), 143.57 (C-3). ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₃H₁₀N₃Cl₂⁺ [M+H]⁺: 278.0246 Ευρεθέν: [M+Na]⁺: 300.0095

5-Χλωρο-1-μεθυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (16a)

Διάλυμα του παραγώγου **15** (80 mg, 0.286 mmol) εντός N-μεθυλοπιπεραζίνης (0.32 ml, 2.86 mmol) θερμαίνεται στους 160 °C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και η οργανική φάση ξηραίνεται (Na₂SO₄), συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το παράγωγο **16a** (90 mg, 92%). Ανοιχτόχρωμο καφέ στερεό. Σ.τ.: 110-114 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.33 (s, 3H, -CH₃ piperazine), 2.61 (brs, 4H, H-3'', H-5''), 3.31 (brs, 4H, H-2'', H-6''), 4.24 (s, 3H, -CH₃ pyrazole), 7.34 (t, 1H, H-4', J=6.9 Hz), 7.40-7.44 (m, 3H, H-4, H-3', H-5'), 7.78 (d, 2H, H-2', H-6', J=8.2 Hz). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 38.45 (-CH₃ pyrazole), 46.31 (-CH₃ piperazine), 50.87 (C-2'', C-6''), 54.76 (C-3'', C-5''), 109.17 (C-4), 127.29 (C-2', C-6'), 128.57 (C-4'), 129.12 (C-3', C-5'), 129.95 (C-3a), 131.46 (C-1'), 132.46 (C-7a), 139.02 (C-5), 144.09 (C-3), 149.17 (C-7). ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₈H₂₁ClN₅⁺ [M+H]⁺: 342.148548 Ευρεθέν: [M+H]⁺: 342.1489

5-Χλωρο-1-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (16b)

Διάλυμα του παραγώγου **15** (50 mg, 0.179 mmol) εντός μορφολίνης (0.6 ml, 6.97 mmol) θερμαίνεται στους 130 °C για 40 λεπτά. Στη συνέχεια το μίγμα συμπυκνώνεται και στο υπόλειμμα γίνεται καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση κυκλοεξάνιο – οξικό αιθυλεστέρα 5-5 και λαμβάνεται το παράγωγο **16b** (50 mg, 85%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 160-161 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.32 (brs, 4H, H-3'', H-5''), 3.93 (brs, 4H, H-2'', H-6''), 4.31 (s, 3H, -CH₃ pyrazole), 7.40 (t, 1H, H-4', J=7.4 Hz), 7.47-7.50 (m, 3H, H-4, H-3', H-5'), 7.83 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.25 Hz). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 39.30 (-CH₃ pyrazole), 50.72 (C-3'', C-5''), 66.20 (C-2'', C-6''), 108.89 (C-4), 126.75 (C-2', C-6'), 128.14 (C-4'), 128.65 (C-3', C-5'), 129.24 (C-7a), 131.03 (C-3a), 133.65 (C-1'), 138.70 (C-5), 143.89 (C-3), 149.07 (C-7). ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₇H₁₈ClN₄O⁺ [M+H]⁺: 329.116914 Ευρεθέν: [M+H]⁺: 329.1174

5-Χλωρο-1-μεθυλο-7-(3-τριφθορομεθυλοφαινυλοξυ)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (16c)

Σε διάλυμα της 3-τριφθορομεθυλοφαινόλης (124 mg, 0.763 mmol) εντός άνυδρου διμεθυλοσουλφοξειδίου (3 ml) στους 0 °C και υπό αργό προστίθεται ανθρακικό κάλιο (43 mg, 0.305 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται το παράγωγο **15** και το τελικό μίγμα θερμαίνεται στους 150 °C για 2 ώρες και 30 λεπτά. Κατόπιν το μίγμα εκπλένεται με νερό και εκχυλίζεται με χλωροφόρμιο. Η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλένεται εκ νέου με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (διάλυμα Brine), ξηραίνεται (Na₂SO₄) και συμπυκνώνεται. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση κυκλοεξάνιο – οξικό αιθυλεστέρα 95-15 έως 90-10 και λαμβάνεται το παράγωγο **16c** (85 mg, 69%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 129-131 °C (Et₂O-pentane).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.42 (s, 3H, -CH₃ pyrazole), 7.43 (t, 1H, H-4', J=7.4 Hz), 7.52 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.6 Hz), 7.54-7.62 (m, 5H, H-4, H-2'', H-4'', H-5'', H-6''), 7.88 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.6 Hz). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 39.23 (-CH₃ pyrazole), 110.55 (C-4), 118.75 (C-2''), 121.05, 122.86, 124.86, 126.47 (-CF₃), 122.46 (C-4''), 125.14 (C-6''), 127.25 (C-2', C-6'), 127.47 (C-3a), 128.75 (C-4'), 129.21 (C-3', C-5'), 130.35 (C-5''), 130.88 (C-7a), 132.04, 132.26, 132.48, 132.70 (C-3''), 132.25 (C-1'), 137.29 (C-5), 143.68 (C-3), 147.56 (C-7), 152.76 (C-1''). ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₀H₁₄ClF₃N₃O⁺ [M+H]⁺: 404.077749 Ευρεθέν: [M+H]⁺: 404.0784

1-μεθυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-N-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)φαινυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-αμίνη (17a)

Σε διάλυμα του παραγώγου **16a** (40mg, 0.117 mmol) εντός άνυδρου τολουολίου (6ml) και υπό αργό προστίθεται η N-μεθυλο-N'(4-αμινο-φαινυλο)-πιπεραζίνη (25mg, 0.129 mmol), το ανθρακικό καίσιο (190mg, 0.585mmol), το 2-δικυκλοεξυλοφωσφίνο-2',4',6'-τρισοπροπυλοδιφαινύλιο (Χρηος, 2.77mg, 0.0058 mmol) και το δις(διβενζυλιδενοακετονο)παλλάδιο (Pd(dba)₂, 3.34 mg, 0.0058 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 135 °C για 18 ώρες. Κατόπιν, το μίγμα φέρεται σε νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται (Na₂SO₄) και συμπυκνώνεται. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη 95-15 έως 80-20 και λαμβάνεται το παράγωγο **17a** (37 mg, 65%). Καστανέρυθρο έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.42 (s, 3H, -CH₃ piperazine), 2.44 (s, 3H, -CH₃ piperazine), 2.67-2.78 (m, 8H, -CH₂- piperazine), 3.20 (m, 4H, -CH₂- piperazine), 3.3 (brs, 4H, -CH₂- piperazine), 4.26 (s, 3H, -CH₃ pyrazole), 6.13 (brs, 1H, D₂O exch, NH), 6.93-6.95 (m, 3H, H-4, H-3'', H-5''), 7.23 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=8.8 Hz), 7.34 (t, 1H, H-4', J=7.4 Hz), 7.44 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.7 Hz), 7.81 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.4 Hz). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 38.22 (-CH₃ pyrazole), 45.91 (-CH₃ piperazine), 46.16 (-CH₃ piperazine), 49.82 (C-2, C-6 piperazine), 50.60 (C-2, C-6 piperazine), 54.86 (C-3, C-5 piperazine), 55.15 (C-3, C-5 piperazine), 89.31 (C-4), 117.80 (C-3'', C-5''), 121.21 (C-2'', C-6''), 127.05 (C-2', C-6'), 127.84 (C-4'), 128.46 (C-7a), 128.98 (C-3', C-5'), 130.71 (C-3a), 133.54 (C-1'), 135.30 (C-1''), 143.12 (C-3), 146.63 (C-4''), 148.55 (C-7), 148.95 (C-5). ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₉H₃₇N₈⁺ [M+H]⁺: 497.314118 Ευρεθέν: [M+H]⁺: 497.3146

1-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλο)-N-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)φαινυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-αμίνη (17b)

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφηκε για το παράγωγο **17a**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη 10-0.2 έως 90-10 και λαμβάνεται το παράγωγο **17b** (50 mg, 68%). Καστανέρυθρο έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.36 (s, 3H, -CH₃ piperazine), 2.60 (brs, 4H, H-3, H-5 piperazine), 3.18 (brs, 4H, H-2, H-4 piperazine), 3.31 (brs, 4H, H-3, H-5 morpholine), 3.94 (brs, 4H, H-2, H-6 morpholine), 4.27 (s, 3H, -CH₃ pyrazole), 6.15 (brs, 1H, D₂O exch, NH), 6.91-6.94 (m, 3H, H-4, H-3'', H-5''), 7.22 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=8.8 Hz), 7.34 (t, 1H, H-4', J=7.4 Hz), 7.44 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.7 Hz), 7.82 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.4 Hz). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 38.07 (-CH₃ pyrazole), 46.08 (-CH₃ piperazine), 49.87 (C-2, C-6 piperazine), 51.36 (C-3, C-5 morpholine), 55.21 (C-3, C-5

149.00 (C-5). ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₈H₃₄N₇O⁺ [M+H]⁺: 484.282483 Ευρεθέν: [M+H]⁺: 484.2829

1-μεθυλο-7-(3-τριφθορομεθυλοφαινυλοξυ)-N-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)φαινυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-αμίνη (17c)

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφηκε για το παράγωγο **17a**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη 95-5 έως 90-10 και λαμβάνεται το παράγωγο **17c** (40 mg, 64%). Κιτρινοπράσινο έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.36 (s, 3H, -CH₃ piperazine), 2.59 (brs, 4H, H-3, H-5 piperazine), 3.15 (brs, 4H, H-2, H-4 piperazine), 4.37 (s, 3H, -CH₃ pyrazole), 5.93 (brs, 1H, D₂O exch, NH), 6.85 (d, 2H, H-3''', H-5''', J=8.8 Hz), 6.91 (s, 1H, H-4), 7.09 (d, 2H, H-2''', H-6''', J=8.8 Hz), 7.36 (t, 1H, H-4', J=7.4 Hz), 7.46 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.7 Hz), 7.50-7.60 (m, 4H, H-2'', H-4'', H-5'', H-6''), 7.84 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.4 Hz). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 38.98 (-CH₃ pyrazole), 46.14 (-CH₃ piperazine), 49.87 (C-2, C-6 piperazine), 55.25 (C-3, C-5 piperazine), 89.27 (C-4), 117.49 (C-3''', C-5'''), 119.23 (C-2''), 121.16, 122.96, 124.77, 126.57 (-CF₃), 121.50 (C-2''', C-6'''), 121.95 (C-4''), 124.09 (C-7a), 125.62 (C-6''), 126.94 (C-2', C-6'), 127.88 (C-4'), 129.01 (C-3', C-5'), 130.19 (C-5'), 131.91, 132.12, 132.34, 132.55 (C-3''), 131.97 (C-3a), 133.39 (C-1'), 134.18 (C-1'''), 142.33 (C-3), 147.08 (C-4'''), 147.73 (C-7), 148.23 (C-5). ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₁H₃₀F₃N₆O⁺ [M+H]⁺: 559.243319 Ευρεθέν: [M+H]⁺: 559.2443

3.1.4 Σύνθεση των παραγώγων που φέρουν N1-(4-μεθοξυβενζυλ) ομάδα 23a-b

5-χλωρο-3-ιωδο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (18)

Σε διάλυμα της ιωδοπυραζολοπυριδίνης **11** (1.75 g, 6.261 mmol) εντός άνυδρου διμεθυλοφορμαμίδιου (11 ml) προστίθενται υπό ατμόσφαιρα αργού 452 mg (11,27 mmol) νατριοϋδριδίου (60 % εναίωρημα σε παραφινέλαιο) στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά, ακολούθως ψύχεται εκ νέου στους 0 °C όπου προστίθενται 1.10 ml (8.14 mmol) του 4-μεθοξυβενζυλοχλωριδίου. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες οπότε η αντίδραση ολοκληρώνεται. Στη φιάλη προστίθεται 0.5 ml αιθανόλης, και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με χλωροφόρμιο και

νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το παράγωγο **18** (1.95 g, 78%) λαμβάνεται, μετά από χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-διχλωρομεθάνιο σε αναλογία 3-7 έως 1-9. Λευκό στερεό. Σ.τ.: 126 - 127 °C (EtOAc).^[39]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 5.59 (s, 2H, -CH₂-), 6.85 (d, 2H, H-2', H-6', *J* = 8.5 Hz), 7.22 (d, 2H, H-3', H-5', *J* = 8.5 Hz), 7.38 (s, 1H, H-4), 8.51 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 54.4 (-CH₂-), 55.3 (-OCH₃), 88.9 (C-3), 114.4 (C-3', C-5', C-4), 126.9 (C-3a), 129.2 (C-2', C-6'), 133.6 (C-7a), 135.6 (C-1'), 136.2 (C-7), 141.4 (C-5), 159.8 (C-4').

5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (19)

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφηκε για το παράγωγο **13**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silicagel με κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 1-1 οπότε λαμβάνεται το προϊόν **19** (5.5 g, 95%). Σ.τ.: 73 - 75 °C (MeOH).^[27]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.71 (s, 3H, -OCH₃), 5.56 (s, 2H, -CH₂-), 6.83 (d, 2H, H-2', H-6', *J* = 8.5 Hz), 7.23 (d, 2H, H-3', H-5', *J* = 8.5 Hz), 7.40 (t, 1H, H-4'', *J* = 7.5 Hz), 7.49 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J* = 7.5 Hz), 7.83 (s, 1H, H-4), 7.91 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J* = 7.5 Hz), 8.58 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 53.5 (-CH₂-), 55.0 (-OCH₃), 114.1 (C-4), 114.5 (C-3', C-5'), 126.8 (C-3'', C-5''), 127.3 (C-4''), 128.3 (C-3a), 128.4 (C-7a), 128.8 (C-2', C-6'), 129.0 (C-2'', C-6''), 131.8 (C-1'), 133.3 (C-7), 136.6 (C-1''), 141.1 (C-5), 142.8 (C-3), 159.4 (C-4'). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C₂₀H₁₇N₃OCl⁺ [MH⁺]: 350.1055 Ευρεθέν 350.1062.

N-Οξειδίου της 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (20)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για τη λήψη του N-οξειδίου **14**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (**19**) (3 g, 8.58 mol). Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση κυκλοεξάνιο – οξικό αιθυλεστέρα 8-2 έως 2-8 και λαμβάνεται το παράγωγο **20** (2.8 g, 89%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 142 – 144 °C (EtOH).^[27]

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.75 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.48 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 6.83 (d, 2H, H-3', H-5', $J = 8.5$ Hz), 7.23 (d, 2H, H-2', H-6', $J = 8.5$ Hz), 7.44 (t, 1H, H-4'', $J = 8$ Hz), 7.51 (t, 2H, H-3'', H-5'', $J = 8$ Hz), 7.85 (d, 2H, H-2'', H-6'', $J = 8$ Hz), 8.01 (s, 1H, H-4), 8.60 (s, 1H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 53.8 ($-\text{CH}_2-$), 55.2 ($-\text{OCH}_3$), 114.4 (C-3', C-5'), 126.6 (C-3a, C-4), 127.0 (C-2'', C-6''), 128.4 (C-1'), 129.0 (C-2', C-6'), 129.0 (C-4'), 129.1 (C-3'', C-5''), 131.1 (C-7), 132.1 (C-1''), 136.0 (C-7a), 136.4 (C-5), 143.9 (C-3), 159.7 (C-4').

5,7-Διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (21)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για τη λήψη του διχλωροπαραγώγου **15**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το *N*-οξειδίο της 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (**20**) (2.5 g, 6.84 mmol). Το επιθυμητό προϊόν **21** (92%, 2.4 g) καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1. Λευκό στερεό. Σ.τ.: 126 – 127 °C ($\text{Et}_2\text{O} - n\text{-hexane}$).^[27]

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.78 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.96 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 6.85 (d, 2H, H-3', H-5', $J = 9$ Hz), 7.26 (d, 2H, H-2', H-6', $J = 9$ Hz), 7.48 (t, 1H, H-4'', $J = 8$ Hz), 7.55 (t, 2H, H-3'', H-5'', $J = 8$ Hz), 7.85 (s, 1H, H-4), 7.89 (d, 2H, H-2'', H-6'', $J = 8$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 54.0 ($-\text{CH}_2-$), 55.2 ($-\text{OCH}_3$), 114.0 (C-3', C-5'), 114.3 (C-4), 127.3 (C-2'', C-6''), 128.6 (C-2', C-6'), 128.7 (C-1'), 128.9 (C-4''), 129.1 (C-3'', C-5''), 130.9 (C-1''), 131.4 (C-3a), 132.5 (C-7a), 133.7 (C-5), 139.0 (C-7), 144.0 (C-3), 159.3 (C-4'). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{OCl}_2^+$ [MH^+]: 384.0665, ευρεθέν 384.0671.

5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (22α)

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφηκε για το παράγωγο **16b**. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silicagel, με κινητή φάση κυκλοεξάνιο – οξικό αιθυλεστέρα 9-1 έως 7-3 και λαμβάνεται το παράγωγο **22α** (80mg, 95%). Μπεζ έλαιο.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.31 (t, 4H, H-3''', H-5''', $J=4.5$ Hz), 3.71 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.91 (t, 4H, H-2''', H-6''', $J=4.5$ Hz), 5.76 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 6.80 (d, 2H, H-3', H-5', $J=8.7$ Hz), 7.20 (d, 2H, H-2', H-6', $J=8.7$ Hz), 7.39 (t, 1H, H-4'', $J=7.4$ Hz), 7.48 (t, 2H, H-3'', H-5'', $J=7.6$ Hz), 7.58 (s, 1H, H-4), 7.89 (d, 2H, H-2'', H-6'', $J=7.3$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 51.03 (C-3''', C-5'''), 53.23 ($-\text{CH}_2-$), 55.10 ($-\text{OCH}_3$), 66.46

(C-2''', C-6'''), 109.89 (C-4), 113.96 (C-3', C-5'), 127.21 (C-2'', C-6''), 128.39 (C-2', C-6'), 128.51 (C-4''), 128.89 (C-3'', C-5''), 129.07 (C-1', C-7a), 130.85 (C-3a), 132.18 (C-1''), 139.19 (C-5), 144.85 (C-3), 148.71 (C-7), 159.07 (C-4').

5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-7-(3-τριφθορομεθυλοφαινυλοξυ)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (22b)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη του παραγώγου **16c**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5,7-Διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (**21**) (80 mg, 0.208 mmol). Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση κυκλοεξάνιο – οξικό αιθυλεστέρα 95-15 έως 70-30 και λαμβάνεται το παράγωγο **22b** (60 mg, 57%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 129-131 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 5.85 (s, 2H, -CH₂-), 6.81 (d, 2H, H-3', H-5', J=8.7 Hz), 7.24 (d, 2H, H-2', H-6', J=8.7 Hz), 7.37 (brs, 1H, H-2'''), 7.39-7.42 (m, 1H, H-6'''), 7.44 (t, 1H, H-4'', J=7.4 Hz), 7.51-7.58 (m, 4H, H-3'', H-5'', H-4''', H-5'''), 7.60 (s, 1H, H-4), 7.92 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=7.6 Hz). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 55.34 (-OCH₃), 55.36 (-CH₂-), 110.53 (C-4), 114.18 (C-3', C-5'), 118.81 (C-2'''), 121.02, 122.83, 124.63, 126.44 (-CF₃), 122.45 (C-4'''), 125.31 (C-6'''), 126.76 (C-3a), 127.32 (C-2'', C-6''), 128.73 (C-4''), 128.96 (C-2', C-6'), 129.15 (C-3'', C-5''), 129.30 (C-1'), 130.34 (C-5'''), 131.44 (C-7a), 131.96, 132.18, 132.39, 132.61 (C-3'''), 132.30 (C-1''), 137.52 (C-5), 143.96 (C-3), 147.46 (C-7), 152.67 (C-1'''), 159.55 (C-4'). ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₇H₂₀ClF₃N₃O₂⁺ [M+H]⁺: 510.119614 Ευρεθέν: [M+H]⁺: 510.1202

1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-7-(μορφολιν-4-υλο)-N-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)φαινυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-αμίνη (23a)

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφηκε για το παράγωγο **17a**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (**22a**) (70 mg, 0.161 mmol). Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη 10-0.2 έως 95-5 και λαμβάνεται το παράγωγο **23a** (50 mg, 53%). Καστανέρυθρο έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.38 (s, 3H, -CH₃ piperazine), 2.62 (m, 4H, H-3, H-5 piperazine), 3.19 (m, 4H, H-2, H-4 piperazine), 3.28 (m, 4H, H-3, H-5 morpholine), 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 3.92 (m, 4H, H-2, H-6 morpholine), 5.75 (s, 2H, -CH₂-), 6.17 (brs, 1H, D₂O exch, NH), 6.78 (d, 2H, H-3', H-5', J=8.7 Hz), 6.91-6.95 (m, 3H, H-4, H-3''', H-

5'''), 7.18 (d, 2H, H-2''', H-6''', $J=8.7$ Hz), 7.23 (d, 2H, H-2', H-6', $J=8.8$ Hz), 7.35 (t, 1H, H-4'', $J=7.4$ Hz), 7.44 (t, 2H, H-3'', H-5'', $J=7.5$ Hz), 7.84 (d, 2H, H-2'', H-6'', $J=7.4$ Hz). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 46.06 (-CH₃ piperazine), 49.84 (C-2, C-6 piperazine), 51.15 (C-3, C-5 morpholine), 53.23 (-CH₂-), 55.23 (C-3, C-5 piperazine), 55.32 (-OCH₃), 66.93 (C-2, C-6 morpholine), 89.93 (C-4), 113.97 (C-3', C-5'), 117.66 (C-3''', C-5'''), 121.39 (C-2''', C-6'''), 127.17 (C-2'', C-6''), 127.80 (C-7a), 127.94 (C-4''), 128.59 (C-2', C-6'), 128.91 (C-3'', C-5''), 129.97 (C-1'), 131.90 (C-3a), 133.42 (C-1''), 134.79 (C-1'''), 144.19 (C-3), 146.79 (C-4'''), 148.34 (C-7), 149.37 (C-5), 159.04 (C-4'). **ESI-HRMS** Υπολογισθέν ως προς C₃₅H₄₀N₇O₂⁺ [M+H]⁺: 590.324348 Ευρεθέν: [M+H]⁺: 590.3251

1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-7-(3-τριφθορομεθυλοφαινυλοξυ)-N-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)φαινυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-αμίνη (23b)

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφηκε για το παράγωγο **17a**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-7-(τριφθορο μετα φαινόλη)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (**22b**) (50 mg, 0.098 mmol). Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση χλωροφόρμιο – μεθανόλη 10-0.2 έως 95-5 και λαμβάνεται το παράγωγο **23b** (25 mg, 39%). Κιτρινοπράσινο έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.36 (s, 3H, -CH₃ piperazine), 2.60 (m, 4H, H-3, H-5 piperazine), 3.15 (m, 4H, H-2, H-4 piperazine), 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 5.79 (s, 2H, -CH₂-), 5.91 (brs, 1H, D₂O exch, NH), 6.80 (d, 2H, H-3', H-5', $J=8.7$ Hz), 6.84 (d, 2H, H-3''', H-5''', $J=8.8$ Hz), 6.90 (s, 1H, H-4), 7.07 (d, 2H, H-2''', H-6''', $J=8.8$ Hz), 7.24 (d, 2H, H-2', H-6', $J=8.7$ Hz), 7.34-7.39 (m, 3H, H-4'', H-2''', H-6'''), 7.47 (t, 2H, H-3'', H-5'', $J=7.7$ Hz), 7.51-7.56 (m, 2H, H-4''', H-5'''), 7.87 (d, 2H, H-2'', H-6'', $J=7.4$ Hz). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 45.51 (-CH₃ piperazine), 49.34 (C-2, C-6 piperazine), 54.89 (C-3, C-5 piperazine), 55.11 (-CH₂-), 55.38 (-OCH₃), 89.60 (C-4), 114.07 (C-3', C-5'), 117.48 (C-3''', C-5'''), 119.34 (C-2'''), 121.16, 122.96, 124.76, 126.55 (-CF₃), 121.58 (C-2''', C-6'''), 121.97 (C-4'''), 123.31 (C-7a), 125.80 (C-6'''), 127.08 (C-2'', C-6''), 127.98 (C-4''), 128.95 (C-2', C-6'), 129.02 (C-3'', C-5''), 130.02 (C-1'), 130.17 (C-5'''), 131.85, 132.07, 132.29, 132.51 (C-3'''), 132.64 (C-3a), 133.45 (C-1''), 134.08 (C-1'''), 142.78 (C-3), 147.12 (C-4'''), 147.66 (C-7), 148.45 (C-5), 153.35 (C-1'''), 159.37 (C-4'). **ESI-HRMS** Υπολογισθέν ως προς C₃₈H₃₆F₃N₆O₂⁺ [M+H]⁺: 665.285184 Ευρεθέν: [M+H]⁺: 665.2865

3.2 Υλικά και μέθοδοι βιολογικής αξιολόγησης

3.2.1 Αντιδραστήρια, όργανα και αναλώσιμα

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια, τα όργανα και τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας της αξιολόγησης της βιολογικής δράσης. Παρουσιάζονται επίσης και οι προμηθεύτριες εταιρίες.

Πίνακας 3.1 Αντιδραστήρια, εταιρίες παραγωγής και η χώρα προέλευσης τους.

| Αντιδραστήρια | Εταιρεία παραγωγής | Χώρα προέλευσης |
|--|--------------------|-----------------|
| Υλικόκαλλιέργειας (DMEM) <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> | GIBCO | USA |
| PBS Dulbecco <i>(Phosphate Buffer Saline)</i> <i>w/o Ca²⁺ & Mg²⁺</i> | BIOCHROM A6 | BERLIN |
| FBS (<i>Fetal bovine serum</i>) | GIBCO | USA |
| L-γλουταμίνη και αντιβιοτικά (PEN/STEP) | BIOCHROM A6 | BERLIN |
| TRYPsin-EDTA | GIBCO | USA |
| DMSO (<i>dimethylsulfoxide</i>) | Applichem | GERMANY |
| Διάλυμα MTT | SIGMA | USA/GERMANY |
| Διάλυμα HCL | SIGMA | USA/GERMANY |
| ΔιάλυμαHAT <i>(hyroxanthine-aminopterin-thymidine)</i> | GIBCO | USA |
| BSA (<i>Bovine serum albumin</i>) | SIGMA | USA/GERMANY |

Πίνακας 3.2 Χρησιμοποιούμενα όργανα, εταιρίες παραγωγής και η χώρα προέλευσης τους.

| Όργανα | Εταιρεία παραγωγής | Χώρα προέλευσης |
|--|-----------------------------------|-----------------|
| Θάλαμος νηματικής ροής MULTIMATE | Safemate 1.2 (Euroclone s.p.a) | ITALY |
| Φυγόκεντρος | Thermo Fisher Scientific | GERMANY |
| Επαστήρας 37°C-5%CO ₂ | Hettick Zentrifugen | GERMANY |
| Μικροσκόπιο | Thermo Scientific | USA |
| Υδατόλουτρο | Carl Zeiss AG | GERMANY |
| Φωτόμετρο | TECAN | AUSTRIA |
| Ειδικό δοχείο ψύξης (υγρό άζωτο) κυττάρων στους -80°C | Cryomed Thermo Scientific | USA |
| Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer | SIGMA | USA/GERMANY |
| Πιπέτες | GILSON | NETHERLANDS |
| Ripretgun | Costar | USA |

Πίνακας 3.3 Χρησιμοποιούμενα αναλώσιμα, εταιρίες παραγωγής και η χώρα προέλευσης τους.

| Αναλώσιμα | Εταιρεία παραγωγής | Χώρα προέλευσης |
|---|----------------------|-----------------|
| Αποστειρωμένα σωληνάρια | | |
| Falcon 50mL | SARSTEDT | GERMANY |
| Falcon 10mL | Greiner bio-one | GERMANY |
| Ειδικά τρυβλία κυτταροκαλλι- έργειας 10-cm | Greiner bio-one | GERMANY |
| Πιπέτες μιας χρήσης | | |
| Πιπέτες 5-10 mL | SARSTEDT | GERMANY |
| Πιπέτες 25 mL | Corning Incorporated | N.Y USA |
| Eppendorf | SARSTEDT | GERMANY |
| Ειδικά φιαλίδια για την ψύξη των κυττάρων (cryovials). | Greiner bio-one | GERMANY |
| Πλάκες 96 φρεατίων κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες | Greiner bio-one | GERMANY |
| Tips | | |
| Μπλε & λευκά | SARSTEDT | GERMANY |
| Κίτρινα | Corning Incorporated | N.Y USA |

3.2.2 Κυτταρικές σειρές και κυτταροκαλλιέργεια

➤ Κυτταρική σειρά

Έχοντας σαν στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης των συνθετικών αναλόγων που παρασκευάστηκαν στην αγγειογένεση, εξετάστηκε η δράση τους στον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς γνωρίζουμε ότι τα κύτταρα αυτά διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο σε πολλά στάδια της αγγειογένεσης^[40]. Έτσι, καλλιεργήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα της κυτταρικής σειράς EAhy926^[41], η οποία προέρχεται από τη σύντηξη ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιας φλέβας (HUVECs) με κύτταρα της καρκινικής σειράς A549, προερχόμενα από καρκίνωμα του πνεύμονα, με έκθεση σε πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Πρόκειται για την πλέον τεκμηριωμένη μικροαγγειακή ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά, που παρουσιάζει λειτουργικά χαρακτηριστικά διαφοροποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων και επομένως θεωρήθηκε κατάλληλη ως πειραματικό μοντέλο για τον προσδιορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατόπιν επώασης με τις ουσίες προς εξέταση.

➤ Κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν αρχικά ως μια μέθοδος μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων, ελεύθερων από πιθανές *in vivo* επιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό. Σκοπός των κυτταροκαλλιεργειών είναι να διατηρηθούν τα κύτταρα βιώσιμα, μακριά από το φυσιολογικό οργανισμό από τον οποίον προήλθαν και κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Όλες οι εργασίες γίνονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (hood), ο οποίος είναι εξοπλισμένος με υπεριώδη (UV) λάμπα και φίλτρα αέρος ώστε οι συνθήκες εργασίας να είναι άσηπτες. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C στον επωαστήρα (incubator) σε κορεσμένες συνθήκες υγρασίας και παρουσία 5% CO₂.

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σύμφωνα με το λειτουργικό πρωτόκολλο. Καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% v/v ορό FBS, διάλυμα PEN/STREP 1% v/v και διάλυμα HAT 2% v/v. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν στις καθιερωμένες άσηπτικές συνθήκες και διατηρήθηκαν στους 37°C, 5% CO₂.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων είναι μια διαδικασία που διασφαλίζει την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων διατηρώντας τα σε ενεργό μεταβολικό ρυθμό και υγιή. Τα κύτταρα αφήνονται στο τρυβλίο να πολλαπλασιαστούν μέχρις ότου η ανάπτυξη τους δεν παρεμποδίζεται από έλλειψη χώρου, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι αυτό προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τροποποίηση του κυτταρικού μεταβολισμού (contactinhibition). Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται σε τακτά χρονικά διαστήματα, όταν η κάλυψη της επιφάνειας του τρυβλίου έχει φτάσει σε επίπεδο 85-90%.

Διαλύματα ανακαλλιέργειας και μεθοδολογία

- Υλικό καλλιέργειας DMEM (*Gibco*) εμπλουτισμένο με 10% v/v ορό FBS (*Gibco*), L-glutamine 1% v/v και αντιβιοτικά 1% v/v PEN/STREP (*Biochrom*) και διάλυμα HAT (*Gibco*).
- Διάλυμα PBS Dulbecco (*Biochrom*)
- Τρυψίνη 0.5% v/v EDTA(*Gibco*)

Όταν παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα έχουν καλύψει το 85-90% του τρυβλίου πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια. Αρχικά το τρυβλίο μεταφέρεται στο θάλαμο νηματικής ροής όπου είναι δυνατή η εργασία υπό στείρες συνθήκες. Γίνεται αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού με πιπέτα Pasteur με υποβοήθηση κενού και έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με διάλυμα PBS ώστε να εξασφαλιστεί ότι δεν υπάρχουν ίχνη θρεπτικού υλικού που δύνανται να αδρανοποιήσουν την τρυψίνη αλλά και να απομακρυνθούν νεκρά κύτταρα ή κυτταρικά υπολείμματα. Στη συνέχεια προστίθενται 2 ml τρυψίνης 0.5% v/v ώστε να διασπαστούν οι δεσμοί των κυττάρων με την επιφάνεια του τρυβλίου και να γίνει η αποκόλληση. Το τρυβλίο έπειτα αφήνεται στον επωαστήρα για 1 min 30sec. Κατόπιν γίνεται παρακολούθηση της πορείας αποκόλλησης στο μικροσκόπιο: τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί όταν αποκτούν σφαιρική μορφή. Σε επόμενο στάδιο γίνεται αναστολή δράσης της τρυψίνης με προσθήκη τετραπλάσιου ως προς τον όγκο της τρυψίνης (8 ml) θρεπτικού υλικού. Το συγκεκριμένο εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα (falcon 15ml) και φυγοκεντρείται στις 1200 rpm για 5 min. Τέλος γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε συγκεκριμένο όγκο πλήρους θρεπτικού υλικού με τη βοήθεια πιπέτας. Μέρος από το νέο εναιώρημα με τα κύτταρα, ανάλογα με το ποσοστό των κυττάρων που προορίζονται για ανακαλλιέργεια, τοποθετείται σε νέο τρυβλίο και επωάζεται στους 37 °C, 5% CO₂.

➤ Καλλιέργεια κυττάρων σε συνθήκες 'νηστείας' (Starvation)

Η διαδικασία *starvation* θεωρείται ως μια διαδικασία ρουτίνας η οποία διεξάγεται για την προετοιμασία των κυττάρων σε συνθήκες χωρίς ορό για ένα πείραμα και επομένως δεν αποτελεί ξεχωριστό πείραμα αυτό καθ'αυτό^[42]. Αν και ο ορός παρέχει τις βέλτιστες συνθήκες για την κυτταρική ανάπτυξη, η μη καθορισμένη, περίπλοκη και κυρίως μεταβλητή σύνθεση αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για τη διεξαγωγή βιολογικών πειραμάτων. Επομένως, αφαίρεση του ορού από το υλικό καλλιέργειας μειώνει τους αστάθμητους παράγοντες και παρέχει πειραματικές συνθήκες που μπορεί να αναπαραχθούν. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι μειώνει τη βασική κυτταρική δραστηριότητα και καθιστά τον πληθυσμό των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται πιο ομοιογενή, καθώς αυτά αποσύρονται από τον κυτταρικό κύκλο και εισέρχονται στην αδρανή φάση G₀/G₁.

Διαλύματα

- Υλικό καλλιέργειας DMEM (*Gibco*), L-glutamine 1% v/v και αντιβιοτικά 1% v/v PEN/STREP (*Biochrom*) και διάλυμα HAT (*Gibco*) αλλά χωρίς FBS.
- Διάλυμα PBS Dulbecco με Ca^{2+} και Mg^{2+} (*Biochrom*).

Μεθοδολογία

Η πλάκα 96 φρεατίων τοποθετείται στο θάλαμο νηματικής ροής. Αφαιρείται από κάθε φρεάτιο της πλάκας το πλήρες καλλιεργητικό υλικό και προστίθεται 100 μl PBS με Ca^{2+} και Mg^{2+} για να γίνει η έκπλυση. Επιλέγεται PBS με ασβέστιο και μαγνήσιο, αφού η παρουσία τους βοηθάει στο να μείνουν προσκολλημένα τα κύτταρα στον πυθμένα των φρεατίων, επομένως αποφεύγεται η απώλεια κυττάρων κατά την έκπλυση που οδηγεί σε λανθασμένα αποτελέσματα. Με την βοήθεια πιπέτας απομακρύνεται το μεγαλύτερο ποσοστό του διαλύματος έκπλυσης, και προστίθεται το καλλιεργητικό μέσο starvation. Τέλος, η πλάκα 96 φρεατίων τοποθετείται στον επωαστήρα για 4 ώρες.

3.2.3 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων

➤ Κατάψυξη κυττάρων

Η δυσκολία εύρεσης κυτταρικών σειρών αλλά και το κόστος τους, έχει δημιουργήσει την ανάγκη κατάψυξης των κυττάρων και μακράς αποθήκευσής τους σε περιβάλλον υγρού αζώτου σε θερμοκρασίες μεταξύ -135°C και -175°C . Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί επιτυχώς η διαδικασία αυτή είναι η καλή μεταβολική κατάσταση των κυττάρων πριν από την ψύξη τους. Για το λόγο αυτό προτιμάται η ψύξη των κυττάρων να πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει 85-90% της επιφάνειας του τρυβλίου των 10cm.

Διαλύματα κατάψυξης και μεθοδολογία

- Διάλυμα DMSO (*Applichem*)
- Πλήρες καλλιεργητικό μέσο DMEM(*Gibco*)

Αρχικά γίνεται αποκόλληση των καλλιεργούμενων κυττάρων από την επιφάνεια του τρυβλίου, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω, και τα κύτταρα συλλέγονται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο των 15 ml και φυγοκεντρώνονται στις 1200rpm για 5min. Ταυτόχρονα παρασκευάζεται διάλυμα με πλήρες θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% v/v DMSO. Το DMSO χρησιμοποιείται για την προστασία των κυττάρων από τη

δημιουργία κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό τους κατά την ψύξη. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρισης αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 3ml θρεπτικού υλικού – DMSO. Το κυτταρικό διάλυμα μεταφέρεται σε τρία cryovials (1ml ανά cryovial) στα οποία αναγράφεται ο κυτταρικός τύπος και η ημερομηνία κατάψυξης. Τα cryovials έπειτα τοποθετούνται σε κατάλληλο δοχείο ψύξης για 24-36h στους -20°C . Τέλος, τα κύτταρα μεταφέρονται σε δοχείο με υγρό άζωτο στους -80°C όπου και μπορούν να διατηρηθούν για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

➤ Απόψυξη κυττάρων

Η διαδικασία γίνεται υπό άσηπτες συνθήκες και όσο το δυνατόν ταχύτερα, προκειμένου τα ξεπαγωμένα κύτταρα να μην εκτεθούν για πολύ στο DMSO, το οποίο δρα τοξικά.

Μεθοδολογία

Αρχικά το φιαλίδιο των παγωμένων κυττάρων τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C για ένα σύντομο χρονικό διάστημα μέχρι να λιώσουν οι κρύσταλλοι. Έπειτα όλο το περιεχόμενο του φιαλιδίου μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 15 ml που περιέχει 6 ml πλήρους θρεπτικού υλικού, με σκοπό την άμεση αραιώση της συγκέντρωσης του DMSO. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 1200 rpm για 5 min. Στην συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 4 ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Το κυτταρικό διάλυμα προστίθεται σε τρυβλίο που περιέχει 6 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τοποθετείται σε επωαστήρα 37°C , 5% CO_2 .

3.2.4 Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Η μέτρηση των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο είναι η πιο απλή, άμεση και οικονομική μέθοδος υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα.

Το αιμοκυτταρόμετρο, είναι μια ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρος που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες με τη δική της καλυπτρίδα.^[43] Αρχικά, κατασκευάστηκε για την καταμέτρηση των στερεών συστατικών του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια) σε ορισμένο όγκο αίματος. Το όργανο όμως αυτό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την καταμέτρηση άλλων μικροσκοπικών δομών ή κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα μιας κυτταροκαλλιέργειας (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Κάθε επεξεργασμένη επιφάνεια φέρει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm. Επίσης, κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που θα καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι $0,1 \text{ mm}^3$ ή $1 \times 10^{-4} \text{ ml}$ (0,1 μl). Έτσι η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα/ml) είναι:

$$\text{Σύνολο αριθμού κυττάρων στα τετράγωνα 6,7,8,9} \times 2500$$

Μεθοδολογία

Αρχικά το αιμοκυτταρόμετρο ξεπλένεται ώστε να είναι καθαρό και στηρίζεται η καλυπτρίδα πάνω στις δύο ράχες. Έπειτα επαναιωρούνται τα κύτταρα με πιπέτα μέχρις ότου να μην υπάρχουν συσσωματώματα που θα κάνουν δύσκολο τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων στο αιματοκυτταρόμετρο και αφαιρούνται 10 μίτα οποία προστίθενται στην ειδική υποδοχή του αιμοκυτταρόμετρου. Τέλος παρατηρούνται με μικροσκόπιο και μετρούνται τα κύτταρα που βρίσκονται στα 4 εξωτερικά τετράγωνα 6,7,8 και 9, καθένα από τα οποία διαιρείται σε 16 μικρότερα και υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκεται στο συνολικό διάλυμα.

Παράδειγμα υπολογισμού αριθμού κυττάρων

Έστω ότι μετρήθηκαν 34, 38, 43 και 36 κύτταρα στο κάθε εξωτερικό τετράγωνο. Το σύνολο αυτών είναι:

$$34 + 38 + 43 + 36 = 151 \quad \text{Άρα} \quad C_{\text{κυτ/ml}} = 151 \times 2500 = 377.500 \text{ κύτταρα/ml}$$

Επομένως σε κάθε ml περιέχονται 377.500 κύτταρα. Αναλόγως τη συγκέντρωση των κυττάρων που χρειάζεται το εκάστοτε πείραμα γίνονται και οι κατάλληλες αραιώσεις του εναιωρήματος των κυττάρων με πλήρες θρεπτικό υλικό.

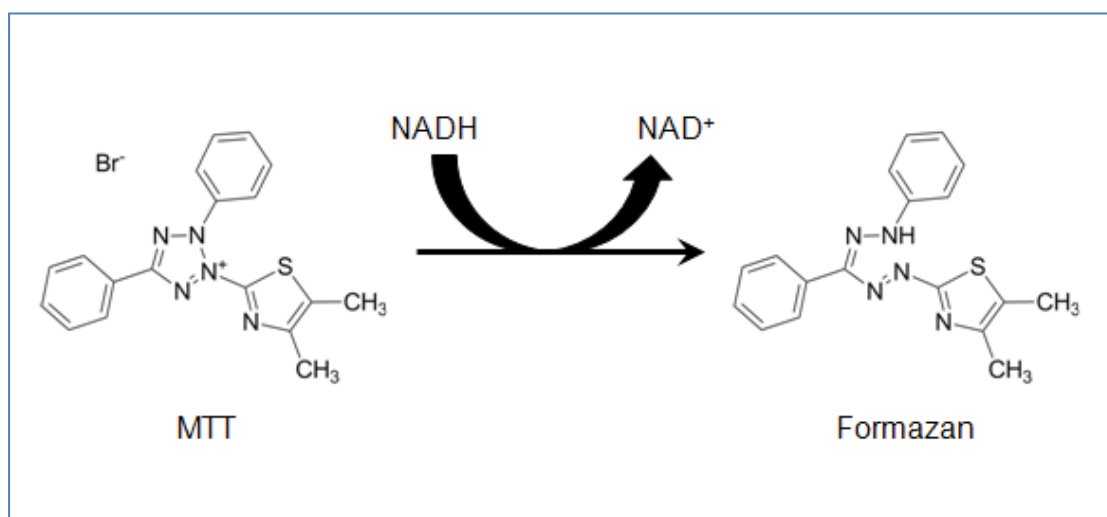
3.2.5 Προσδιορισμός πολλαπλασιασμού κυττάρων με τη μέθοδο MTT (MTT assay)

Τα πρωτόκολλα τα οποία βασίζονται σε κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται συχνά για να διερευνήσουν το αν οι προς εξέταση ουσίες έχουν επιπτώσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή επιδεικνύουν άμεσες κυτταροτοξικές επιδράσεις που τελικά οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Ανεξάρτητα από τον τύπο του πρωτόκολλου που χρησιμοποιείται είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τον αριθμό των κυττάρων που παραμένουν ζωντανά μετά το τέλος του πειράματος. Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι ανάλυσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων. Μερικές από αυτές είναι: αναγωγή τετραζολίου, αναγωγή ρεσαζουρίνης, δείκτες πρωτεάσης, ανίχνευση ATP, κυτταρομετρία ροής, απεικόνιση υψηλού περιεχομένου κλπ..

Η αναγωγή αλάτων τετραζολίου είναι η μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία^[30]. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μέτρηση ενός μέρους του γενικού μεταβολισμού ή ενζυματικής δραστηριότητας ως δείκτη βιώσιμων κυττάρων. Απαιτείται επώαση ενός αντιδραστηρίου με ένα πληθυσμό βιώσιμων κυττάρων για τη μετατροπή ενός υποστρώματος σε ένα έγχρωμο προϊόν το οποίο θα μπορεί να ανιχνευτεί από έναν αναγνώστη πλακιδίων (platereader). Κάτω από

τις περισσότερες πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας, η επώαση αυτή του υποστρώματος με βιώσιμα κύτταρα θα οδηγήσει στη δημιουργία ενός σήματος που είναι ανάλογος προς τον αριθμό των κυττάρων αυτών. Όταν τα κύτταρα πεθαίνουν χάνουν ακαριαία την ικανότητα τους να μετατρέψουν το υπόστρωμα στο προϊόν. Αυτή είναι λοιπόν η διαφορά που αποτελεί τη βάση για τον συγκεκριμένο αλλά και άλλους προσδιορισμούς βιωσιμότητας κυττάρων.

Το MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας τετραζόλης κίτρινου χρώματος που οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και δίνει αδιάλυτους μωβ χρώματος κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου (Εικόνα 3.2). Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με την προσθήκη διαλύματος HCl και το χρώμα που παράγεται υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά στα 595 και 630nm.^[44]



Εικόνα 3.2 Αντίδραση αναγωγής του κίτρινου άλατος τετραζολίου (MTT) σε μωβ χρώματος κρυστάλλους φορμαζάνη.

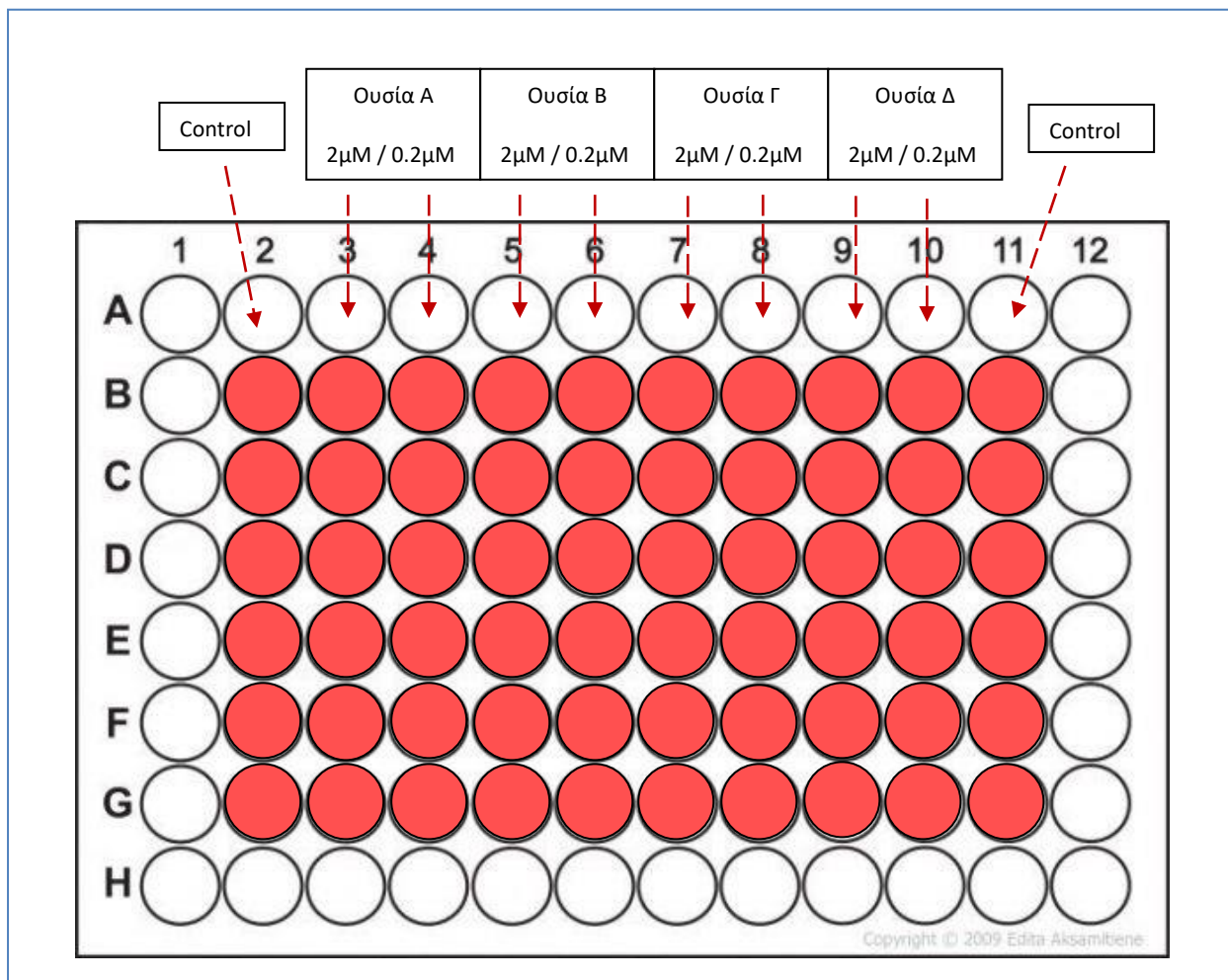
Η ένταση του εκάστοτε παραγόμενου σήματος εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους που περιλαμβάνουν: τη συγκέντρωση του MTT, το χρόνο επώασης των κυττάρων, τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων και τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Όλες αυτές οι παράμετροι θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ώστε να δημιουργηθεί επαρκής ποσότητα προϊόντος ώστε να δώσει σήμα πάνω από το όριο ανίχνευσης αλλά και σε περιοχή όπου υπάρχει γραμμικότητα μεταξύ έντασης σήματος και αριθμού κυττάρων.

Υλικά και Διαλύματα

- Υλικό καλλιέργειας DMEM (*Gibco*) εμπλουτισμένο με 10% v/v ορό FBS (*Gibco*), L-glutamine 1% v/v και αντιβιοτικά 1% v/v PEN/STREP (*Biochrom*) και διάλυμα HAT (*Gibco*).
- Διάλυμα PBS Dulbecco (*Biochrom*)
- Διάλυμα MTT 5g/ml (*Sigma*). (Διατηρείται στους 4°C απουσία φωτός).
- Διάλυμα HCL 0.01 mmol/ml (*Sigma*)

Μεθοδολογία

Αρχικά τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται σε πλάκα 96 φρεατίων όπου τοποθετούνται 4000 κύτταρα ανά φρεάτιο σε 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου. Ο αριθμός αυτός επιλέχθηκε ώστε κατά τη διάρκεια του πειράματος τα κύτταρα να βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους, να είναι μεταβολικώς ενεργά και ταυτόχρονα να μην επηρεάζεται η ανάπτυξη τους λόγω κάλυψης όλης της επιφάνειας του φρεατίου. Μετά από 24 ώρες επώασης, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και επωάζονται σε 100 μl υλικού καλλιέργειας που δεν περιέχει FBS, για 4 ώρες (πρωτόκολλο starvation που περιγράφηκε νωρίτερα). Σε αυτό το χρονικό διάστημα παρασκευάζονται τα διαλύματα από ταπρος εξέταση παράγωγα, σε δύο αντιπροσωπευτικές συγκεντρώσεις (2 μM και 0.2 μM) σε καλλιεργητικό μέσο starvation με 2.5% v/v FBS παρουσία 0.1% v/v DMSO (το επιτρεπτό όριο του διαλύτη ώστε να μην προκαλέσει τοξικότητα). Μετά την ολοκλήρωση της τετράωρης επώασης αφαιρούμε το καλλιεργητικό μέσο starvation από κάθε φρεάτιο και προσθέτουμε 100 μl από τα διαλύματα των παραγώγων που παρασκευάστηκαν νωρίτερα. Σε 10-12 από τα φρεάτια τοποθετείται μόνο καλλιεργητικό υλικό starvation με 2.5 % FBS και 0.1% DMSO, απουσία παραγώγου, ώστε αυτά να αποτελέσουν τα φρεάτια ελέγχου (control). Οι πλάκες επανατοποθετούνται στον επωαστήρα για 48 ώρες. Κατά την διάρκεια της επώασης τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο ώστε να καταγραφούν τυχόν διακριτές επιδράσεις που μπορεί να έχουν προκαλέσει οι νέες ενώσεις στη μορφολογία και τον αριθμό των κυττάρων. Αυτό γίνεται ώστε να συνδυαστούν οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις με τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία MTT. Μετά από 48 ώρες οι πλάκες τοποθετούνται στον θάλαμο νηματικής ροής, όπου προστίθενται σε κάθε φρεάτιο 10 μl διαλύματος MTT (5 mg/ml), το οποίο έχει παρασκευαστεί ακριβώς πριν τη χρήση σε ασηπτικές συνθήκες και απουσία φωτός. Η επώαση των κυττάρων με το MTT συνεχίζεται για άλλες 3 ώρες οπότε προστίθεται σε κάθε φρεάτιο 100 μl διαλύματος HCL συγκέντρωσης 0.01 mmol/ml. Ακολουθεί πιπετάρισμα ώστε να διαλυθούν όλοι οι κρύσταλλοι φορμαζάνης και τέλος γίνεται φωτομέτρηση στα 595 και 630 nm σε φωτόμετρο tescan. Από τις απορροφήσεις υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων με βάση πρότυπη καμπύλη που έχει ήδη κατασκευαστεί (Εικόνα 3.3).

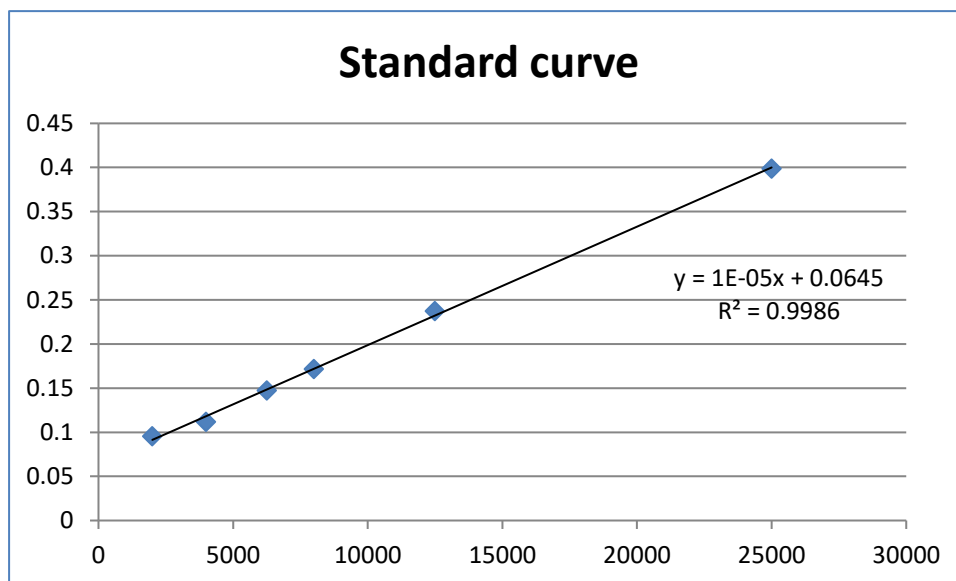


Εικόνα 3.3 Σχηματική αναπαράσταση πλάκας 96-φρεατίων στρωμένη με 4000 κύτταρα ανα φρεάτιο και τις προς εξέταση ουσίες σε δύο ενδεικτικές συγκεντρώσεις με 6 τεχνικές επαναληψεις στην καθεμία (*technical replicates*)

➤ **Δημιουργία πρότυπης καμπύλης**

Για την δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης είναι απαραίτητα ζεύγη τιμών οπτικής πυκνότητας πρότυπων δειγμάτων με γνωστό αριθμό κυττάρων και ο αριθμός αυτός. Επομένως, αφού έχει πραγματοποιηθεί η ανακαλλιέργεια των κυττάρων και η μέτρηση τους σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, παρασκευάζονται τα κυτταρικά διαλύματα επιθυμητής συγκέντρωσης. Οι αραιώσεις υπολογίζονται κατάλληλα έτσι ώστε σε κάθε φρεάτιο της πλάκας 96 φρεατίων να προστεθούν 100 μL κυτταρικού διαλύματος που να περιέχουν από 2000 έως 25.000 κύτταρα. Ακολουθεί επώαση για 16 ώρες οπότε αφαιρείται το καλλιεργητικό μέσο, και προστίθεται καλλιεργητικό μέσο starvation και τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 4 ώρες. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα MTT και ακολουθεί η προαναφερθείσα μεθοδολογία. Τέλος, μετά από την φωτομέτρηση και την καταγραφή των OD, αναλύονται τα αποτελέσματα, δημιουργείται η καμπύλη αναφοράς και

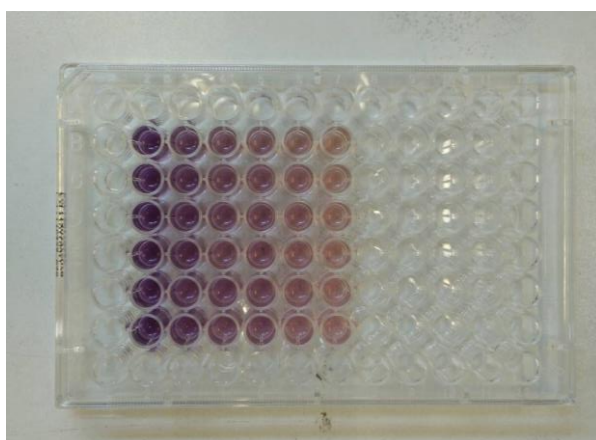
υπολογίζεται η εξίσωση που συνδέει την οπτική πυκνότητα με των αριθμό κυττάρων (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 Πρότυπη καμπύλη για την κυτταρική σειρά EAhy926.

Σημείωση:Κάθε φορά που χρησιμοποιείται MTT από καινούργια παραλαβή του αντιδραστηρίου, ή παρασκευάζεται εκ νέου διάλυμα από το ίδιο stock επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία και δημιουργείται καινούργια πρότυπη καμπύλη.

Παρακάτω (Εικόνα 3.5) παρουσιάζεται παράδειγμα πλάκας 96 φρεατίων πριν την φωτομέτρηση. Παρατηρείται ότι υπάρχει μια αύξουσα τάση στην ένταση του μωβ χρώματος που είναι ανάλογη με την παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης και συνεπώς είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού ζωντανών μεταβολικά ενεργών κυττάρων.



Εικόνα 3.5 Πλάκα 96-φρεατίων πριν τη φωτομέτρηση για την παρασκευή πρότυπης καμπύλης

3.2.6 Προσδιορισμός IC₅₀ των νέων μορίων.

Η μισή της μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC₅₀) είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας.^[31]

Αυτή η ποσοτικοποίηση της δράσης υποδεικνύει την ποσότητα που χρειάζεται από ένα συγκεκριμένο φάρμακο ή μια άλλη ουσία (αναστολέας) για να ανασταλεί κατά το ήμισυ μια δεδομένη βιολογική διαδικασία (ή ένας παράγοντας που λαμβάνει μέρος σε μια διαδικασία, δηλαδή ένζυμα, υποδοχείς κυττάρων ή μικροοργανισμοί). Χρησιμοποιείται συνήθως ως μέτρο δραστηριότητας ενός φαρμάκου που δρα ως ανταγωνιστής στη φαρμακολογική έρευνα. Σύμφωνα με τον FDA, η IC₅₀ αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου που απαιτείται για μια αναστολή της τάξης του 50% in vitro. Είναι ανάλογη με την EC₅₀ για φάρμακα που δρουν ως αγωνιστές.

Για τον προσδιορισμό της IC₅₀ χρειαζόμαστε ένα εύρος συγκεντρώσεων από την προς εξέταση ουσία, έτσι ώστε να γίνει αντιστοίχιση κάθε συγκέντρωσης από αυτές με το βιολογικό της αποτέλεσμα (στην περίπτωσή μας αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων). Αφού συλλεχθούν τα δεδομένα συγκέντρωσης ουσίας-βιολογικό αποτέλεσμα, θα περαστούν στο πρόγραμμα Graphpad, το οποίο θα μας δώσει την καμπύλη καθώς και την τιμή της IC₅₀.

Υλικά και Διαλύματα

- Υλικό καλλιέργειας DMEM (*Gibco*) εμπλουτισμένο με 10% v/v ορό FBS (*Gibco*), L-glutamine 1% v/v και αντιβιοτικά 1% v/v PEN/STREP (*Biochrom*) και διάλυμα HAT (*Gibco*).
- PBS Dulbecco (*Biochrom*)
- Διάλυμα MTT 5g/ml (*Sigma*). (Διατηρείται στους 4°C απουσία φωτός).
- Διάλυμα HCL 0.01 mmol/ml (*Sigma*)

Μεθοδολογία

Αρχικά τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται σε πλάκα 96 φρεατίων όπου τοποθετούνται 4000 κύτταρα ανά φρεάτιο σε 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου. Μετά από 24 ώρες επώασης, τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και επώάζονται σε 100 μl υλικού καλλιέργειας που δεν περιέχει FBS για 4 ώρες (starvation). Σε αυτό το χρονικό διάστημα παρασκευάζονται τα διαλύματα από το προς εξέταση παράγωγο στο

οποίο θα γίνει ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης IC_{50} , σε 7-8 ενδεικτικές συγκεντρώσεις, σε καλλιεργητικό μέσο starvation με 2.5% v/v FBS παρουσία 0.1% v/v DMSO. Η διαδικασία που ακολουθείται στη συνέχεια είναι η ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε κατά τον προσδιορισμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη μέθοδο MTT. Μετά το στάδιο της φωτομέτρησης, από τις απορροφήσεις υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων με βάση την πρότυπη καμπύλη. Τέλος αντιστοιχίζεται ο αριθμός των κυττάρων με την συγκέντρωση της ουσίας που προκάλεσε το συγκεκριμένο αποτέλεσμα και με τη βοήθεια του προγράμματος Graphpad υπολογίζεται η συγκέντρωση της IC_{50} .

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Robert A. Weinberg, "The biology of Cancer", *second edition* (2014): 31
2. LA & Harris CC (2008) "Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective." *Cancer Res.* 68, 6863–6872.
3. Peto J (2001) "Cancer epidemiology in the last century and the next decade." *Nature* 411, 390–395.
4. Greenwald P & Dunn BK (2009) "Landmarks in the history of cancer epidemiology." *Cancer Res.* 69, 2151–2162.
5. Ronald J. Trent, "Genomics to personalized healthcare", Ch. 3, *Molecular Medicine, fourth edition* (2012): 81-110.
6. Campisi J & d'Adda di Fagagna F (2007) "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.
7. Artandi SE & DePinho RA (2010) "Telomeres and telomerase in cancer." *Carcinogenesis* 31, 9–18.
8. Hiroshi SAEKI and Keizo SUGIMACHI, "Carcinogenic risk factors", *Journal of the Japan Medical Association* (2001) 44(6): 245–249.
9. Hanahan D., Weinberg A.R., "The Hallmarks of Cancer", *Cell*, vol. 100, (2000): 57-70.
10. Hanahan D., Weinberg A.R., "The Hallmarks of Cancer: The next generation", *Cell*, vol. 144, (2011): 646-674.
11. "Defining Cancer", *National Cancer Institute*, (2014).
12. Akulapalli Sudhakar, "History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods", *J. Cancer Sci. Ther.*, (2009): 1-4.
13. Sparreboom A., Verweij J., "Advances in Cancer Therapeutics", *Clin. Pharmacol. Ther.*, (2009): 113-117.
14. Neidle S., "Cancer Drug Design and Discovery", *ch.1*,: 2-3.
15. Vincent T. DeVita, Jr., Edward Chu, "A History of Cancer Chemotherapy", *Cancer Res.*, (2008): 8643-8653.
16. Christopher, *et al.*, "Micro-RNA Therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy", *Perspectives in clinical research*, (2016).
17. Battle E., Clevers H., "Cancer stem cells revisited", *Nature Medicine* 23, (2017): 1124-1134.
18. Ghirelli C., Hagemann T., "Targeting immunosuppression for cancer therapy", *J. Clin. Invest.*, (2013): 2355-2357.
19. Bikfavli A., "History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view", *Angiogenesis*, (2017).
20. Rajabi M., Mousa S. A., "The role of angiogenesis in cancer treatment", *Biomedicines*, (2017).
21. Shibuya M., "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis", *Genes and Cancer*, (2011): 1097-1105.
22. Koch S., Claesson-Welsh L., "Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors", *Cold Spring Harb Perspect Med*, (2012).
23. Viillard C., Larrivee B., "Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets", *Angiogenesis*, (2017): 409-426.

24. Peng F., Liu D., Zhang Q., Xu Y., Shi L., "VEGFR-2 inhibitors and the therapeutic applications thereof: a patent review (2012-2016)", *Expert opinion on therapeutic Patents*, (2017).
25. Montor *et al.*, "Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors", *Molecular Cancer*, (2018).
26. Jiao *et al.*, "Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance", *Molecular Cancer*, (2018).
27. Michailidou M., Giannouli V., Kotsikoris V., Papadodima O., Kontogianni G., Kostakis I.K., Lougiakis N., Chatziioannou A., Kolisis F.N., Marakos P., Pouli N., Loutrari H., "Novel pyrazolopyridine derivatives as potential angiogenesis inhibitors: Synthesis, biological evaluation and transcriptome-based mechanistic analysis", *European Journal of Medicinal Chemistry*, *121*, (2016): 143-157.
28. Wolfe J.P., Tomori H., Sadighi J., Yin J., Buchwald S. L., "Simple, efficient catalyst system for the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Chlorides, Bromides and Triflates", *J. Org. Chem.* ,*65*, (2000): 1158-1174.
29. Marks C.D., Belov L., Davey M.W., Davey R.A., Kidman A.D., "The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells", *Leukemia Research*, vol. 16, (1992): 1165-1173.
30. Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., *et al.*, "Cell Viability Assays", (2013).
31. Kalliokoski T., Kramer C., Vulpetti A., Geddeck P., "Comparability of mixed IC₅₀ Data – A Statistical Analysis", *PloS one*, (2013).
32. Pino, L.N., Zehring, W.S.III, *J. Am. Chem. Soc.* 3154 (1955).
33. Kourafalos V.N., Marakos P., Pouli N., *Townsend L.B. Synlett* (2002): 1479.
34. Burton *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 2211 (1971).
35. Roe A., Seligman R.B., *J. Org. Chem.* 20 (1955): 1729-1731.
36. E. V. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 3167 (1954).
37. Chapman D., Hurst, *J. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, (1980): 2398.
38. Giannouli V., Lougiakis N, Kostakis I.K., Pouli N., Marakos P., Skaltsounis A.L., Nam S., Pratsinis H., Kletsas D., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 26, # 21, (2016): 5229 – 5233.
39. Hanan E.J., Eigenbrot C., Bryan M.C., Burdick D.J., Chan B.K., Chen Y., Dotson J., Heald R.A., Jackson P.S., La H., Lainchbury M.D., Malek S., Purkey H.E., Schaefer G., Schmidt S., Seward E.M., Sideris S., Tam C., Wang S., Yeap S.K., Yen I., Yin J., Yu C., Zilberleyb I., Heffron T.P., *J. Med. Chem.* (2014) 57, 10176.
40. Watson E.C., Whitehead L., Adams R.H., Dewson G., Coultas L., "Endothelial cell survival during angiogenesis requires the pro survival protein MCL1", *Cell death and differentiation* 23, (2016): 1371-1379.
41. Lu Z.J. *et al.*, "Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549", *J Exp Clin Cancer Res*, (2009).
42. Pirkmajer S., Chibalin A., "Serum starvation: caveat emptor", *Am J Physiol Cell Physiol*, (2011).

43. Oscar Bastidas, Cell Counting with Neubauer Chamber, Basic Hemocytometer Usage Neubauer Chamber Cell Counting, Technical Note.
44. Mosmann T., "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays." *J. Immunol. Methods* 65, (1983): 55–63.