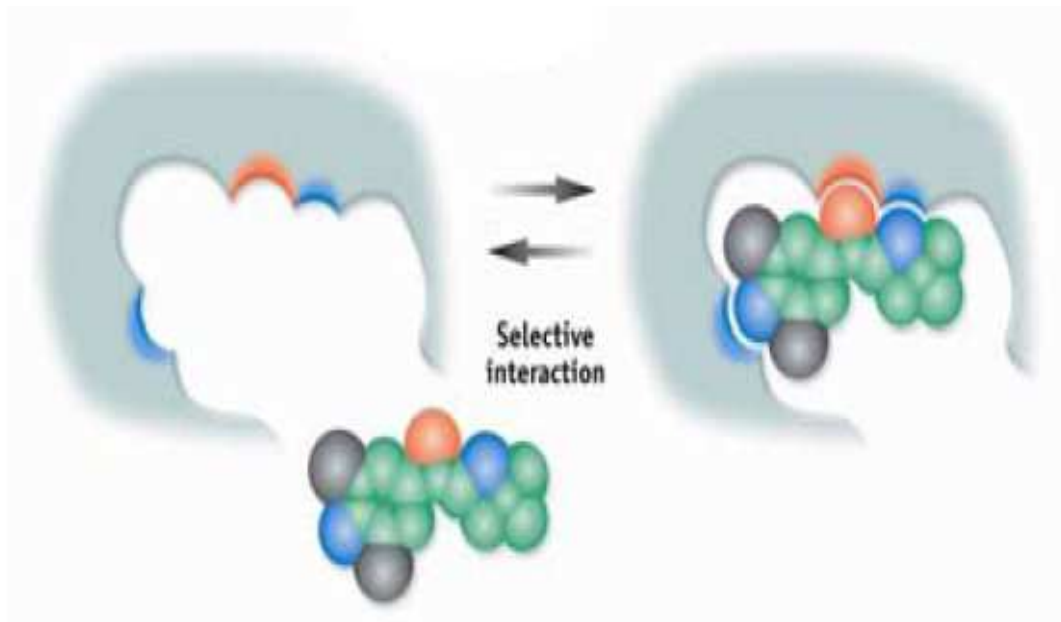




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΝΤΑΒΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ**  
**ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ**  
**ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ(HIF-1)**



ΛΑΡΙΣΑ 2010

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επικ. Καθηγητής Α.Τσακάλωφ

Επιβλέπων Καθηγητής

Καθηγητής Δ.Κουρέτας

Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Λέκτορας Μ.Κοντού

Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

## **Ευχαριστίες**

Αρχικά επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Τσακάλωφ Ανδρέα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας καθώς και για την επιστημονική επίβλεψη καθ' όλη τη διάρκεια της , για τις υποδείξεις και τις συμβουλές του.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Αχιλλεία Λάκκα για την επιστημονική και εργαστηριακή καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη συμμετοχή τους στην επιστημονική αξιολόγηση της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στο προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία, το φιλικό περιβάλλον και την ηθική τους συμπαράσταση.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου για την συμπαράσταση και την κατανόηση τους.

Ντάβου Σταυρούλα

Λάρισα 2010

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	7
Εισαγωγή	11
1. Μεταγραφικός Παράγοντας HIF-I	12
1.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-I	12
1.2. Ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF1-a μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων	13
1.2.2 Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από MAPK επηρεάζει τη μεταγραφική του ενεργότητα	13
1.3. Ο ρόλος του HIF-1α στην εμφάνιση καρκίνου	15
1.4 Αναστολή HIF-1a -Στόχος αντικαρκινικών φαρμάκων	16
2.ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	20
2.1Μοριακώς Αποτυπωμένα Πολυμερή	20
2.2 Είδη μοριακής αποτύπωσης	22
2.2.1 Ομοιοπολική Μοριακή Αποτύπωση	23
2.2.2 Μη Ομοιοπολική Μοριακή Αποτύπωση	23
2.2.3 Ημι-Ομοιοπολική Μοριακή Αποτύπωση	24
2.3 Οι παράγοντες που απαιτούνται για τη σύνθεση μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών	24
2.3.1 Το υπόστρωμα	24
2.3.2 Το Μονομερές	25
2.3.3 Αλληλεπίδραση Μονομερούς-Υποστρώματος	25
2.3.4 Το Μέσο Διασταύρωσης	26
2.3.5 Αναλογία Μονομερούς-Μέσου διασταύρωσης	27
2.3.6 Το Πορογενές	28
2.3.7 Επίδραση του πορογενούς και του μέσου διασταύρωσης στο τελικό πολυμερές	28
2.3.8. Ο Εκκινητής	29
2.4 Τεχνικές Μοριακής Αποτύπωσης	30
2.4.1 Πολυμερισμός διαλύματος/μάζας	31
2.4.2 Πολυμερισμός αιωρήματος	31
2.4.3 Πολυμερισμός καταβύθισης	31
2.5. Πειραματικές μέθοδοι για αξιολόγηση μοριακής αποτύπωσης	32

2.5.1 Χρωματογραφικός χαρακτηρισμός των MIP σύμφωνα με την ικανότητα τους να δεσμεύουν το υπόστρωμα	32
2.5.2 Αποτίμηση αποτύπωσης με πειράματα στατικής επαναδέσμευσης	33
2.6 Εφαρμογές Μοριακά Αποτυπωμένων Πολυμερών	38
2.6.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με χρήση MIP	38
2.6.2 Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)	39
2.6.3 Αισθητήρες	39
2.6.4 Φαρμακοβιομηχανία-Ανεύρεση νέων βιοδραστικών ενώσεων	39
2.6.5 MIP σε κλινικές εφαρμογές	40
ΣΚΟΠΟΣ	42
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	43
3.1. Αντιδραστήρια-Διατάξεις	43
3.2. Σύνθεση Μοριακά Αποτυπωμένων Πολυμερών	44
3.2.1.Καθαρισμός Μονομερών	44
3.2.2.Σύνθεση Πολυμερών	44
3.2.3. Επεξεργασία Πολυμερών	45
3.3. Χαρακτηρισμός των Μοριακά Αποτυπωμένων Πολυμερών	47
3.3.1. Χρωματογραφικός Χαρακτηρισμός Αποτυπωμένων Πολυμερών	47
3.3.2. Χαρακτηρισμός Αποτυπωμένων Πολυμερών με Πειράματα Στατικής Επαναδέσμευσης (Batch Rebinding)	49
3.3.3. Χαρακτηρισμός Αποτυπωμένων Πολυμερών Με Εκχύλιση Στερεής Φάσης	50
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
4.1. Σύνθεση μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών	53
4.1.1 Αναλογία Κερκετίνης –4VP-EDMA	53
4.1.2 Αναλογία ΤΟΑΑ-ΜΑΑ-EDMA	54
4.2 Απομάκρυνση και υπολογισμός ανάκτησης υποστρώματος	54
4.3. Εκτίμηση Αναγνωριστικής Ικανότητας MIP με HPLC- Προσδιορισμός Παράγοντα Αποτύπωσης	55
4.3.1 Προσδιορισμός Παράγοντα Αποτύπωσης Κερκετίνης	55
4.3.2 Προσδιορισμός Παράγοντα Αποτύπωσης ΤΟΑΑ	57
4.4. Αποτίμηση μοριακής αποτύπωσης με πειράματα στατικής επαναδέσμευσης	58
4.4.1 Ισόθερμη προσρόφησης κερκετίνης- Εφαρμογή σε μοντέλα διακριτούς και συνεχούς κατανομής	58

4.4.2 Ισόθερμη προσρόφησης ΤΟΑΑ- Εφαρμογή σε μοντέλα διακριτούς και συνεχούς κατανομής	61
4.5 Αποτελέσματα Πειράματος Εκχύλισης Στερεής Φάσης(SPE)- Υπολογισμός χωρητικότητας στηλών	63
Συζήτηση	65
Βιβλιογραφία	68

## **Abstract**

### **INTRODUCTION**

The vinyl polymers were imprinted with quercetin and tri-o-acetyladenosine (TOAA) with the final goal to create approximate imitation of these molecules binding sites to protein kinases - important class of enzymes that regulate the majority of cellular pathways including the important HIF-1 pathway involved in the pathology of cancer and other diseases. Quercetin is known inhibitor of protein kinases who are involved in the regulation of HIF-1, acting by adenosine mimetic mechanism. TOAA is organic solvent soluble analog of ATP - a protein kinases' cofactor-donor of phosphate group that is transferred by kinase from ATP to modified protein.

### **EXPERIMENTAL**

Molecularly imprinted polymers (MIP) were prepared by bulk polymerization of vinylpyridine (monomer for quercetin) or methacrylic acid (monomer for TOAA) in the presence of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as cross-linker. The polymerization was initiated thermally or photochemically. After overnight polymerization the polymer monolith was ground, washed for the template removal (quercetin or TOAA) and used for the evaluation of imprinting efficiency and template affinity by batch rebinding, solid phase extraction and HPLC experiments. Non-imprinted polymers were prepared by the same procedure but in the absence of template and used as control for the estimation of the imprinting effect.

### **RESULTS**

The selected templates were successfully imprinted giving molecular imprints that specifically bind with medium to high affinity the quercetin or TOAA respectively. The fabricated quercetin-MIP molecular imprint specifically binds quercetin (Imprinting Factor IF=6,6) with medium to high affinity ( $K_a=9,54 \times 10^4 M^{-1}$ ). The prepared TOAA-MIP also binds tri-o-acetyladenosine (Imprinting Factor IF=31,2) with medium to high affinity ( $K_a=6,24 \times 10^4 M^{-1}$ ).

### **CONCLUSIONS**

Quercetin and TOAA were successfully imprinted in vinyl polymer matrix giving imprints that can recognize and specifically interact with the initial template. The imprinted cavities can be anticipated as imitation of quercetin or TOAA/ATP binding

site to protein kinases. These cavities can be re-occupied by the initial template as well as template like (similar size, shape, functionalities) molecules. Consequently these polymers can be used for recognition and isolation of template like molecules with potentially similar to template biological activity.



## **Περίληψη**

### **Εισαγωγή**

Συνθετικά πολυμερή αποτυπώθηκαν για την κερκετίνη και την τρι-ο-ακετυλοαδενοσίνη (TOAA). Τελικός στόχος ήταν η δημιουργία κατάλληλης απομίμησης των θέσεων δέσμευσης τους στις πρωτεϊνικές κινάσες- σημαντική τάξη ενζύμων που ρυθμίζουν πλήθος κυτταρικών μονοπατιών, συμπεριλαμβάνοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι του HIF-1 που σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου και άλλων ασθενειών. Η κερκετίνη είναι γνωστός αναστολέας των πρωτεϊνικών κινασών δρώντας μέσω ATP μιμητικού μηχανισμού . Η TOAA είναι οργοδιαλυτή ανάλογη ένωση ATP, που είναι συμπαράγοντας πρωτεϊνικών κινασών και δότης φωσφορικής ομάδας η οποία μεταφέρεται στην πρωτεϊνική κινάση από την αδενοσίνη για την τροποποίηση πρωτεϊνών.

### **Πειραματικό Μέρος**

Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή(MIP) παρασκευάστηκαν με τη χρήση της 4-βινυλοπυριδίνης (μονομερές για την κερκετίνη) ή του μεθακρυλικού οξέος (μονομερές για την TOAA) παρουσία του αιθυλενογλυκολδιμεθυλακρυλένιο (EDMA) ως μέσο διασταύρωσης. Ο πολυμερισμός πραγματοποιήθηκε θερμικά ή φωτοχημικά. Ύστερα από 24 ώρες πολυμερισμού το πολυμερές (μονόλιθος) θρυμματίστηκε, απομακρύνθηκε το υπόστρωμα και χρησιμοποιήθηκε για εκτίμηση της απόδοσης της αποτύπωσης και της συγγένειας ως προς το υπόστρωμα σε πειράματα στατικής επαναδέσμευσης , εκχύλισης στερεής φάσης και υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC. Μη μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή παρασκευάστηκαν χωρίς την παρουσία υποστρώματος κατά τον πολυμερισμό και χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλό-μάρτυρας για την εκτίμηση του αποτελέσματος της αποτύπωσης.

### **Αποτελέσματα**

Τα επιλεγμένα υποστρώματα (κερκετίνη και TOAA) αποτυπώθηκαν επιτυχώς δίνοντας μοριακά αποτυπώματα που δεσμεύουν ειδικά με μέση έως υψηλή συγγένεια την κερκετίνη και την τρι-ο-ακετυλοαδενοσίνη.

Το παρασκευασθέν μοριακό αποτύπωμα για την κερκετίνη δεσμεύει ειδικά το υπόστρωμα (συντελεστής αποτύπωσης  $IF=6,6$ ) με μέση έως υψηλή συγγένεια ( $Ka=9,54 \times 10^4 M^{-1}$ ).

Το παραχθέν αποτυπωμένο πολυμερές για την ΤΟΑΑ επίσης δεσμεύει ειδικά το υπόστρωμα (συντελεστής αποτύπωσης  $IF=31,2$ ) με μέση έως υψηλή συγγένεια ( $Ka=6,24 \times 10^4 M^{-1}$ ).

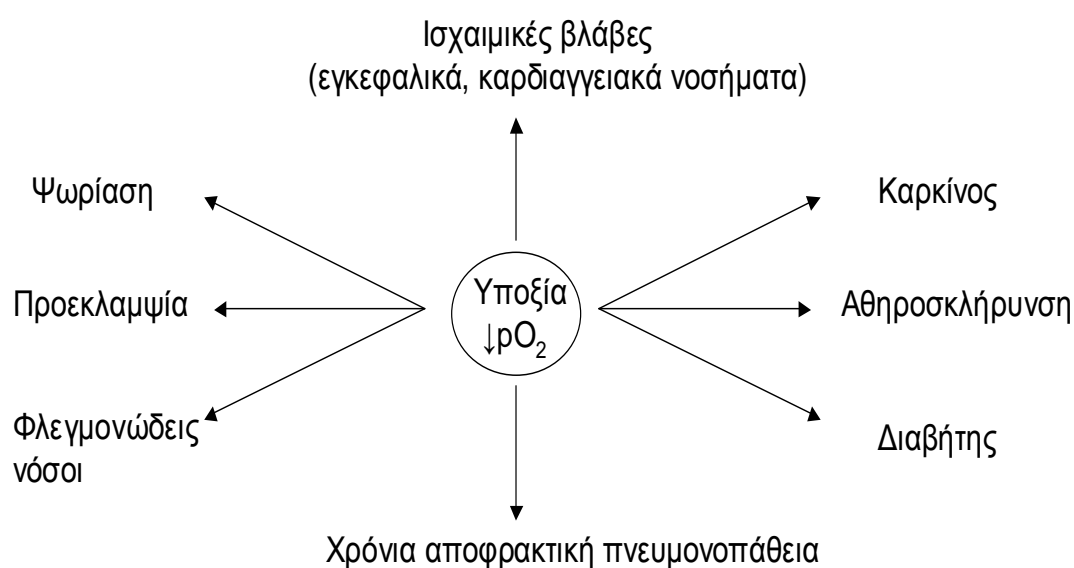
### **Συμπεράσματα**

Η κερκετίνη και η ΤΟΑΑ αποτυπώθηκαν επιτυχώς σε τεχνητές μήτρες πολυμερούς δίνοντας αποτυπώματα ικανά να αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν ειδικά και ισχυρά με το αρχικό υπόστρωμα. Οι κοιλότητες που προέκυψαν από τον πολυμερισμό προσδοκείται ότι είναι συνθετική απομίμηση των θέσεων δέσμευσης της κερκετίνης και της ΤΟΑΑ ως προς τις πρωτεϊνικές κινάσες. Οι κοιλότητες αυτές είναι ικανές να επανα-καταληφθούν από το αρχικό υπόστρωμα καθώς και από ομόλογες ενώσεις (ίδιο σχήμα, μέγεθος, λειτουργικές ομάδες). Συνεπώς τα πολυμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση και την απομόνωση ομόλογων προς τα υποστρώματα ενώσεων με την ανάλογη ενδεχομένως βιολογική δράση.

## Εισαγωγή

Το οξυγόνο είναι ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία καθώς απαιτείται για την επιβίωση των περισσότερων οργανισμών.

Η κυτταρική υποξία(μειωμένη παροχή οξυγόνου) συνδυάζεται με την ανάπτυξη μίας σειράς παθολογικών καταστάσεων (σχήμα 1) που σήμερα αποτελούν τα κύρια αίτια του θανάτου του ανθρώπου και η αναζήτηση τρόπων θεραπευτικής αντιμετώπισης τέτοιων νοσημάτων είναι έγκυρο ιατρικό ζήτημα.



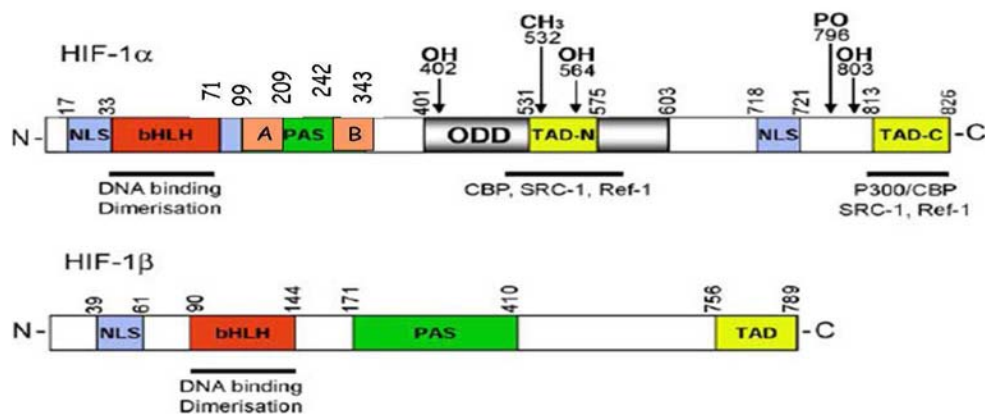
Σχήμα 1: Νοσήματα που σχετίζονται με την υποξία [Α. Τσακάλωφ 2010]

Η προσαρμογή των οργανισμών στην υποξία περιλαμβάνει αντανακλαστικό υπεραερισμό, αυξημένη παραγωγή ερυθροκυττάρων και σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων σε επίπεδο συστήματος. Σε κυτταρικό επίπεδο η προσαρμογή στην υποξία περιλαμβάνει την αλλαγή του ενεργειακού μεταβολισμού από την οξειδωτική φωσφορυλίωση σε αναερόβια γλυκόλυση, την αύξηση στην πρόληψη γλυκόζης καθώς και την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση ή την απόπτωση. Οι διαδικασίες αυτές υπόκεινται στον έλεγχο ενός μεταγραφικού παράγοντα, επαγόμενου από την υποξία του **HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1)**.

# 1. Μεταγραφικός Παράγοντας HIF-1

## 1.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1

Ο HIF-1 είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη και αποτελείται από δύο υπομονάδες τον **HIF-1α** και τον **HIF-1β** που έχουν τη χαρακτηριστική δομή bHLH-PAS (basic Helix-Loop-Helix – Per/Arnt/Sim). Και οι δύο υπομονάδες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία και είναι αρκετά συντηρημένες έχοντας περίπου 90% ομοιότητα ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Η έκφραση του HIF-1α είναι αρκετά υψηλή κατά την υποξία, ενώ διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα κατά τη νορμοξία. Αντίθετα ο HIF-1β γνωστός και ως **ARNT** (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator), εκφράζεται συνεχώς μέσα στα κύτταρα και η ενεργότητά του ρυθμίζεται ανεξάρτητα από τις συνθήκες οξυγόνου που επικρατούν [Li et al., 1996].



**Εικόνα 1: Πρωτεϊνικές περιοχές των HIF-1α (α) και HIF-1β (β).** Φαίνονται με κόκκινο και πράσινο χρώμα οι περιοχές ετεροδιμερισμού και σύνδεσης στο DNA. Οι περιοχές ενεργοποίησης φαίνονται με κίτρινο και τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) με μπλέ χρώμα. Η θέση της ODD φαίνεται με γκρι χρώμα  
Από Dery et al., 2004

Σε συνθήκες νορμοξίας (φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου), ο HIF- α υπόκειται σε ταχύτατη αποικοδόμηση μέσω του μονοπατιού της ουβικουιτίνωσης. Η διαδικασία της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης HIF-1α αρχίζει με την πρόσδεση της πρωτεΐνης pVHL (Von Hippel Lindau) σε περιοχές όπου έχουν υδροξυλιωθεί προλίνες (ODD περιοχή) σε μετα-μεταγραφικό στάδιο από υδροξυλάσες προλίνης (Prolyl Hydroxylase PHD) ή υδροξυλάσες προλίνης του HIF (HIF Prolyl Hydroxylase HPH). Η pVHL είναι αναγνωριστικός παράγοντας του συμπλέγματος της λιάσης της ουβικουιτίνης (pVHL-elonginB-elonginC-Cul2-Rbx) και στοχεύει στην πρωτεόλυση του HIF-1α μέσω του μονοπατιού ουβικουιτίνης-πρωτεοσώματος

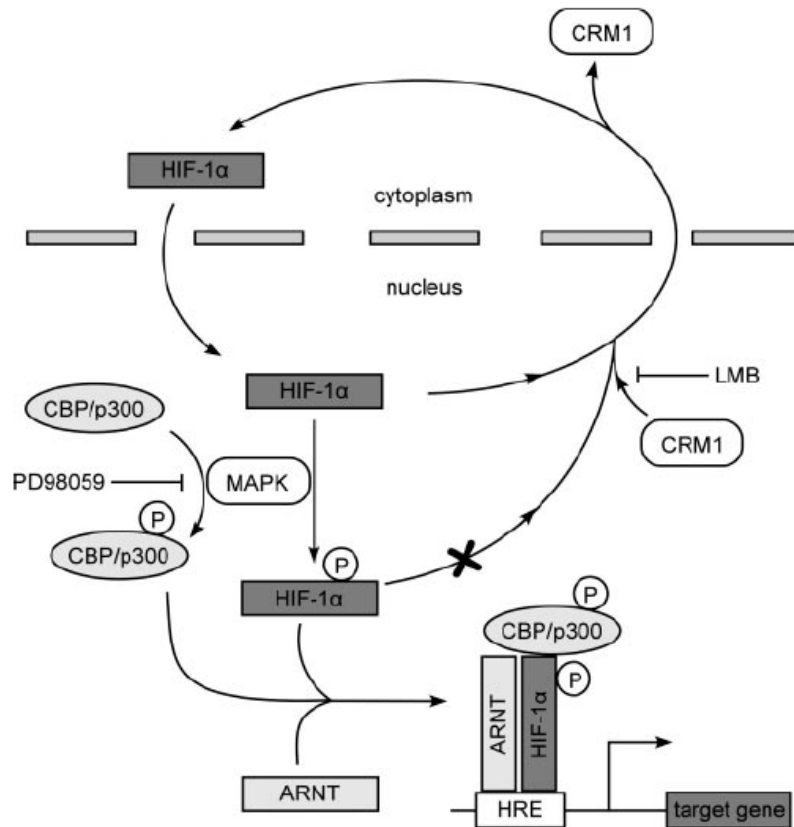
[Hon et al., 2002; Min et al., 2002]. Έτσι, παρουσία οξυγόνου και μέσα σε 5 λεπτά από τη σύνθεσή του, ο HIF-α υδροξυλιώνεται, ουβικουτινυλιώνεται και αποικοδομείται στο πρωτεόσωμα.

Σε συνθήκες υποξίας ο HIF-α οδηγείται στον πυρήνα, μέσω των ειδικών αλληλουχιών που βρίσκονται στην πρωτεΐνη, τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS). Για να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας πρέπει να διμεριστεί με τον ARNT. Η κάθε υπομονάδα HIF-1α και HIF-1β έχει δύο περιοχές (bHLH και PAS) οι οποίες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του ετεροδιμερούς καθώς και για την πρόσδεσή του στο DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες HREs (hypoxia responsive elements HRE) που μπορεί να βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων που αποκρίνονται στην υποξία [Jiang et al., 1996]. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία όπως αύξηση της μεταφοράς γλυκόζης και της μεταβολικής δραστηριότητας, καθώς και την ερυθροποίηση ή την αγγειογένεση.

## 1.2. Ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF1-α μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων

### 1.2.1 Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από MAPK επηρεάζει τη μεταγραφική του ενεργότητα

Η φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων είναι ένας κοινός μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητάς τους. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α πραγματοποιείται μετά τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης κάτω από υποξικές ή νορμοξικές συνθήκες [Sodhi A et al., 2000; Richard D.E. et al., 1999]. Η ενεργοποίηση των p42/44 MAPK είχε ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση του HIF-1α σε μια κυτταρική σειρά όπου η δράση των MAPK είναι επαγόμενη, κάτι που υπέδειξε ότι η τροποποίηση αυτή του HIF-1α είναι εξαρτώμενη από MAPK [Richard D.E. et al., 1999]. Στην ίδια μελέτη οι κινάσες p38 και c-Jun δεν φωσφορυλίωσαν τον HIF-1α in vitro. Ωστόσο και οι τρεις παραπάνω κινάσες βρέθηκε ότι αυξάνουν τη μεταγραφική του ενεργότητα [Sodhi A et al., 2000].



**Εικόνα 2: Βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις MAPK.** Ο HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα αφού σταθεροποιηθεί και εξέρχεται γρήγορα στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τη CRM1. Ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK προκαλεί φωσφορυλίωση του HIF-1α στις σερίνες 641 και 643 μέσω των p42/44 MAPK και αναστολή της εξόδου του από τον πυρήνα. Έτσι ο HIF-1α συσσωρεύεται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με τον ARNT, προσδένεται στα HREs των γονιδίων στόχων και διεγείρει τη μεταγραφή τους μέσω των συνενεργοποιητών CBP/p300. Η αλληλεπίδραση με τους συνενεργοποιητές CBP/p300 ενισχύεται περαιτέρω μέσω φωσφορυλίωσης από MAPK.

Από Mylonis et al., JBC, 2006

Οι p42/44 MAPK φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α στις σερίνες 641 και 643 [Mylonis et al., 2006]. Η φωσφορυλίωση αποτρέπει την έξοδο του HIF-1α από τον πυρήνα μέσω του υποδοχέα εξόδου των πυρηνικών πρωτεϊνών (CRM1) με αποτέλεσμα ο HIF-1α να είναι ικανός να δημιουργήσει διμερές με τον ARNT, να συνδεθεί στο DNA(nls) και να επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων. Μετάλλαξη των σερινών 641 και 643 οδήγησε σε εξαγωγή του HIF-1α από τον πυρήνα και εντοπισμό του αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα.

Οι p42/p44 MAP κινάσες φωσφορυλιώνουν το καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α ωστόσο φαίνεται ότι φωσφορυλίωση πραγματοποιείται και στο αμινοτελικό του τμήμα από μια άγνωστη μέχρι τώρα κινάση πρωτεϊνών με μοριακό βάρος περίπου 100kD [Mylonis et al., 2006]. Μια άλλη κινάση που φαίνεται να επηρεάζει θετικά τον

HIF-1α είναι η κινάση καζεΐνης 2 CK2, καθώς πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι αναστολές της CK2 μείωσαν τη δράση του HIF-1α [Mottet et al., 2005].

### 1.3. Ο ρόλος του HIF-1 στην εμφάνιση καρκίνου

Η υποξία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των αυξανόμενων όγκων. Κατά την ογκογένεση τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση υποξίας επειδή ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι πολύ γρήγορος ενώ τα αιμοφόρα αγγεία δημιουργούνται με χαμηλότερους ρυθμούς, με αποτέλεσμα η ροή του αίματος και κατά συνέπεια η οξυγόνωση να είναι ελαττωμένη. Η υποξία είναι τοξική για τα υγιή αλλά και για τα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο τα τελευταία έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται στις αλλαγές και να επιβιώνουν ακόμη και να πολλαπλασιάζονται σε υποξικές συνθήκες. Οι υποξικές συνθήκες στο εσωτερικό των όγκων μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένη σταθερότητα και μεταγραφική ενεργότητα του HIF. Ανοσοχημικές μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν ανιχνεύσιμα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σε καλοήθεις όγκους, αυξημένα επίπεδα σε πρόωρα κακοήθεις όγκους και ένα ενδεικτικό ποσοστό σε μεταστάσεις όγκων σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ιστούς [Harris, 2002; Zhong et al., 1999].

Σε καρκινικά κύτταρα παρατηρείται αυξημένη συχνότητα γενετικών αλλαγών η οποία σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση του HIF-1α. Για παράδειγμα απώλεια λειτουργίας της p53, η οποία είναι ανενεργή στους καρκίνους, αύξησε τα επίπεδα του HIF-1α και ενίσχυσε την μεταγραφική ενεργότητα του HIF [Ravi et al., 2000]. Ακόμη απώλεια της λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου της PTEN σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα του HIF-1α και έκφραση γονιδίων μέσω του HIF, πιθανότατα μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού των PI3K/AKT [Zundel et al., 2000]. Επίσης ενεργοποίηση του ογκογονιδίου v-Src μέσω μεταλλάξεων βρέθηκε ότι αυξάνει την έκφραση του HIF-1α και των επαγόμενων γονιδίων του [Jiang et al., 1997]. Τέλος, ενισχυμένη σηματοδότηση από τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης HER2 έχει δειχθεί ότι αυξάνει το ρυθμό σύνθεσης του HIF-1α [Laughner et al., 2001]. Αυξημένη ενεργότητα του HER2 είναι μια κυρίαρχη και σημαντική γενετική αλλαγή στον καρκίνο του μαστού και σχετίζεται με επιθετικότητα του όγκου και κακή πρόγνωση. Ωστόσο, υπάρχουν και σπάνιες περιπτώσεις όπου η υπερέκφραση του HIF-1α δε σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Για

παράδειγμα στην περίπτωση του καρκίνου των ωοθηκών, η υπερέκφραση του HIF-1a σχετίζεται με απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα (p53 αγρίου τυπου).

Η τελευταία περίπτωση είναι ιδιαίτερος σπάνια και κατά κανόνα η υπερέκφραση του HIF-1a σχετίζεται με την ανάπτυξη όγκων. Η υπερέκφραση του HIF-1 μπορεί να αποτελέσει δείκτη επικινδυνότητας για νόσο ή αντίσταση στη θεραπεία [Semenza *et al.*, 2003].

#### 1.4 Αναστολή HIF-1a -Στόχος αντικαρκινικών φαρμάκων

Η ρύθμιση της ενεργότητας του HIF-1 είναι δυνατή σε διάφορα επίπεδα του κυτταρικού κύκλου συμπεριλαμβανομένων τα στάδια της μεταγραφής, της μετάφρασης, της μετά-μεταφραστικής τροποποίησης, της αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες και της αποικοδόμησης. Η δυνατότητα ρύθμισης του HIF-1 σε όλα αυτά τα στάδια καθώς και η εμπλοκή του σε ασθένειες όπως ο καρκίνος και οι ισχαιμίες τον καθιστούν ως ένα έγκυρο φαρμακευτικό στόχο.

Τις τελευταίες δεκαετίες οι επιστήμονες εστίασαν τις προσπάθειες τους στην ανεύρεση μικρών μορίων που μπορούν έμμεσα ή άμεσα να αναστείλουν την ενεργοποίηση ή τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1. Ακολουθήθηκε η σύνηθης διαδικασία ανεύρεσης φαρμάκων η οποία περιλαμβάνει δύο κύριες στρατηγικές. Η πρώτη είναι η αναζήτηση μέσω της τυχαίας σάρωσης βιβλιοθηκών φυσικών ή συνθετικών ενώσεων και η δεύτερη διαδικασία περιλαμβάνει την ανεύρεση νέων φαρμάκων μέσω της συνθετικής χημείας. Μια άλλη προσέγγιση που χρησιμοποιείται επίσης μέχρι σήμερα βασίζεται στη σταδιακή κλασμάτωση των αργών εκχυλισμάτων από φυσικές πηγές. Κάποιες από τις ουσίες στις οποίες οδηγήθηκαν οι ερευνητές παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 1 που ακολουθεί.



**Πίνακας 1: Βασικές κυτταρικές διαδικασίες που ρυθμίζουν την έκφραση και την ενεργότητα του HIF-1.** Παραδείγματα μικρών χημικών ενώσεων που τους διακόπτουν επάγοντας (+) ή αναστέλλοντας (-) τον HIF-1 [Α.Τσακάλωφ 2010]

Κυτταρική διαδικασία	Επίδραση στο HIF-1	ΚΥΡΙΕΣ ΣΥΝΙΣΤΩΣΕΣ	ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ*	Επίδραση των αναστολέων στον HIF-1
PI3K σηματοδότηση	επαγωγή του HIF-1α	PI3K	flavonoids, wortmannin , LY294002	(-)
		AKT	Triciribine	(-)
		PDK	SB203580 , NU6102	(-)
		mTOR	Rapamycin , Everolimus , AP23573, CCI-779	(-)
		GSK3β	Aloisine, Indirubin-3'-oxime, Kenpaullone	?
MAPK σηματοδότηση	επαγωγή και ενεργοποίηση του HIF-1α	ERK1/ERK2	SB202190, SB203580, EGCG	(-)
		EGFR	Gefitinib, erlotinib, quercetin	(-)
		HER2	Tyrphostin AG 825	(-)
		B-RAF	AAL-881, LBT-613	(-)
		MEK-1/MEK-2	SL 327, U0126, PD 98059	(-)
Πρωτεασωμική αποικοδόμηση	αποικοδόμηση του HIF-1α	PHD	DMOG, desferrioxamine	(+)
		E1/E2/E3	-	
		26S proteosome	MG-132, gliotoxin, 3,4-diclorocoumarin, EGCG	(+)
Διμερισμός με HSP90	σταθεροποίηση και ενεργοποίηση	HSP90	Geldamicine, radicicol, KF55823, Dimethyl-bisphenol A	(-)
Συμπλοκοποίηση με p300	ενεργοποίηση	p300-	Chetomin	(-)
Μεταφορά από τον πυρήνα σε κυτταρόπλασμα	αναστολή	εξπορτίνες (Crm1)	Leptomycin B	(-)
Μεταφορά από το κυτταρόπλασμα σε πυρήνα	ενεργοποίηση	ιμπορτίνες (imp4, imp7)	-	(+)
DNA δεσμευση	ενεργοποίηση	-	YC-1	(-)

Κάποιοι από τους ήδη γνωστούς αναστολείς είναι φυσικές ενώσεις που ανήκουν στα φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη, η φισετίνη, η λουτεολίνη, μπαϊκαλεΐνη και η καμφερόλη. Τα φλαβονοειδή αυτά εκτός από την καμφερόλη επάγουν τον HIF-1α εξαιτίας της συμπλοκοποίησης του Fe<sup>2+</sup>(αναστολή δράσης PHD) . Επειδή όμως τα φλαβονοειδή (μαζί με την καμφερόλη) εμφανίζουν και αρνητική ρύθμιση του

HIF-1 αναστέλλοντας τη δράση των MAPK ο HIF-1α ανιχνεύεται στα κύτταρα αλλά είναι μεταγραφικά ανενεργός(ανίκανος να δυνδεθεί με τον ARNT)[A.Triantafyllou 2007].

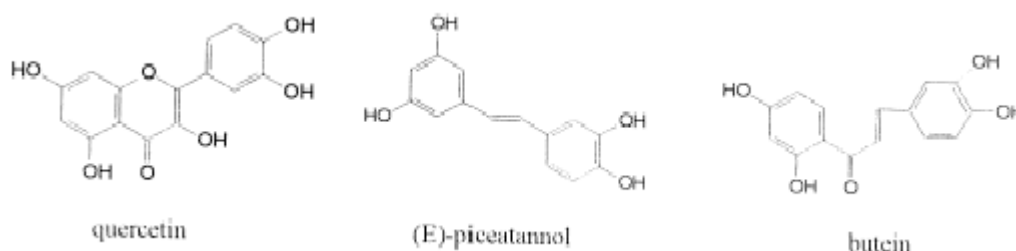
Σημαντικό είναι ωστόσο να αναφερθεί ότι ενώ για τις περισσότερες κυτταρικές διαδικασίες που σχετίζονται με την επαγωγή και την ενεργοποίηση του HIF-1 έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα αρκετοί αναστολείς [Nagle], οι αναστολείς αυτοί δεν βρίσκουν εφαρμογές ως φάρμακα λόγω τοξικότητας ή λόγω παράλληλων ανεπιθύμητων ενεργειών ή φτωχών φαρμακευτικών ιδιοτήτων. Για το λόγο αυτό η αναζήτηση νέων φαρμακευτικών ενώσεων με βελτιωμένες ιδιότητες απασχολεί μέχρι και σήμερα την επιστημονική κοινότητα.

Σήμερα στο πεδίο αναζήτησης νέων φαρμακευτικών ενώσεων ακολουθούνται κυρίως δύο στρατηγικές οι οποίες όμως παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα. Όσον αφορά τη σύνθεση νέων ενώσεων/πρόδρομων φαρμάκων, σημαντική τροχοπέδη αποτελεί το γεγονός ότι η μεγάλη ποικιλία ενώσεων, με τις μοναδικές χημικές δομές των φυσικών πηγών πολλές φορές είναι δύσκολο να παρασκευασθεί με την οργανική σύνθεση. Η απομόνωση των δραστικών ενώσεων με την κλασσική διαδικασία σταδιακής κλασμάτωσης καθοδηγούμενης από βιοδοκιμές (bioassay guided fractionation) είναι αρκετά χρονοβόρα, δύσκολα αυτοματοποιείται και πολύ συχνά οδηγεί στην απομόνωση ήδη γνωστών ενώσεων. Τέλος η προσέγγιση της τυχαίας σάρωσης δεν είναι αποδοτική εφόσον από χιλιάδες ακόμα και εκατομμύρια ενώσεις που δοκιμάζονται αποκαλύπτονται μόνο μετρημένες δραστικές ενώσεις οι οποίες κάποιες φορές δεν είναι τελικά κατάλληλες και αξιοποιήσιμες για την ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου.

Ένας νέος τρόπος αναζήτησης φαρμάκων αποτελεί χρήση των μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών για ανίχνευση και απομόνωση των βιο-δραστικών [Lakka et al 2010, Τσακάλωφ 2010]. Στην περίπτωση αυτή η απομόνωση έμμεσα καθοδηγείται από τις ιδιότητες του μοριακού στόχου, π.χ. ενός υποδοχέα ή ενός ενζύμου, τον οποίο μιμείται το MIP. Υπάρχουν περιορισμένες μα ελπιδοφόρες αναφορές για την χρήση των MIP στην στοχευμένη απομόνωση των δραστικών ενώσεων από τις βιβλιοθήκες προϊόντων συνδυαστικής χημείας και τα εκχυλίσματα θεραπευτικών βοτάνων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η απομόνωση με αποτύπωση της κερκετίνης νέων αναστολέων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 αλλά και του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) (σχήμα 2) [ Xie J, Zhu et al 2001,Lakka et al 2010 ]. Σημαντικό είναι ότι η ανασταλτική δράση των νέων

δραστικών ενώσεων στην περίπτωση του αυξητικού παράγοντα (EGFR) είναι πιο ισχυρή από το αρχικό πρότυπο την κερκετίνη(σχήμα 2).

Η νέα προσέγγιση δυνητικά πλεονεκτεί έναντι των ήδη γνωστών στρατηγικών αναζήτησης φαρμάκων καθώς αξιοποιεί τις σύγχρονες γνώσεις για το μοριακό μηχανισμό της νόσου και επιτρέπει την στοχευμένη, καθοδηγούμενη από τις προκαθορισμένες δομές και μοριακούς στόχους αναζήτηση νέων δραστικών ενώσεων.



**IC<sub>50</sub>=15 μM**

**IC<sub>50</sub>= 5 μM...**

**IC<sub>50</sub>= 10 μM**

**Σχήμα 2:** Χημική δομή της κερκετίνης (πρότυπο MIP) και δυο νέων αναστολέων του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα που απομονώθηκαν από το φυτό *Caragana jutaba* με τη χρήση αποτυπωμένου πολυμερούς κερκετίνης.

## 2.ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

### 2.1 Μοριακώς Αποτυπωμένα Πολυμερή

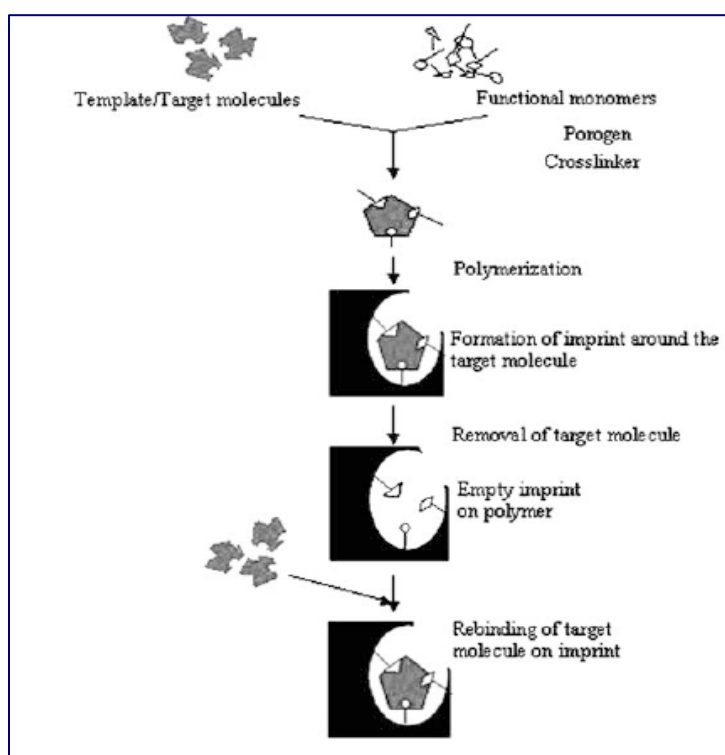
Η μοριακή αναγνώριση είναι το κλειδί της ζωής. Τα κύτταρα διαθέτουν εξειδικευμένους υποδοχείς στην κυτταρική τους μεμβράνη μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν με γειτονικά κύτταρα ή δεσμεύουν ορμόνες. Οι υποδοχείς παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα καθώς έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν ειδικά με άλλους υποδοχείς(π.χ. Notch υποδοχέας αλληλεπιδρά μόνο με DSL ligand) ή να δεσμεύουν την επιθυμητή ορμόνη ακόμη και σε πολύ μικρά επίπεδα συγκέντρωσης. Και τα ένζυμα δρουν με τον ίδιο τρόπο αλληλεπιδρώντας ειδικά με συγκεκριμένο υπόστρωμα, οπότε και παράγουν το επιθυμητό προϊόν.

Οι επιστήμονες μιμούμενοι αυτούς τους φυσικούς μηχανισμούς τα τελευταία χρόνια προσπαθούν να κατασκευάσουν ανάλογες ενώσεις (συνθετικούς υποδοχείς, τεχνητά αντισώματα) οι οποίες θα χρησιμοποιούνται στους τομείς της ιατρικής, του περιβάλλοντος, των υλικών και των τροφίμων. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται πολυμερή μοριακής αποτύπωσης (Molecularly Imprinted Polymer).

Το πρώτο πείραμα που παραπέμπει σε πολυμερή μοριακής αποτύπωσης πραγματοποιήθηκε από τον Ρώσο χημικό M.Polyakov ο οποίος δημοσίευσε μια εργασία το 1931 στην οποία ανέφερε τις επιδράσεις στην δομή του διοξειδίου του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) που προέκυψε με πολυμερισμό πυριτικού νατρίου σε νερό παρουσία ανθρακικού αμμωνίου. Στο πολυμερές μίγμα προστέθηκε τολουόλιο ή βενζόλιο ή ξυλόλιο και το κάθε μίγμα ξηράθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όταν το μίγμα (διοξείδιο του πυριτίου) τοποθετήθηκε εκ νέου σε ξηραντήρα παρουσία όλων των πρόσθετων ενώσεων παρατηρήθηκε ότι μπορούσε να προσροφήσει σε μεγαλύτερο ποσοστό τους ατμούς της ένωσης στην οποία είχε εμποτιστεί. Ωστόσο τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα δεν ενθουσίασαν την τότε επιστημονική κοινότητα και χρειάστηκαν αρκετά χρόνια και ενασχόληση πολλών ερευνητών με την τεχνική της μοριακής αποτύπωσης για την αποδοχή της ως μία επαναστατική τεχνική με απεριόριστες δυνατότητες και εφαρμογές.

Η τεχνική της μοριακής αποτύπωσης που ακολουθείται σήμερα διαφέρει αρκετά από την τεχνική που ακολούθησε ο M.Polyakov στο πείραμα του. Ως μοριακή αποτύπωση ορίζεται η δημιουργία εξειδικευμένης θέσεως αναγνώρισης ενός μορίου ή μίας ομάδας μορίων σε ένα συνθετικό πολυμερές όπου ένα μόριο οδηγός (άτομο, ιόν, μόριο, σύμπλοκο σύνταξης, ή ένα μοριακό ή ιονικό ή μακρομοριακό οργανωμένο

σύστημα περιλαμβανομένων των μικροοργανισμών), χρησιμοποιείται προκειμένου να ευνοηθεί η δημιουργία θέσεων αναγνώρισης κατά τη συγκρότηση της πολυμερικής μήτρας. Ακολουθεί απομάκρυνση ολόκληρου ή μέρους του μορίου οδηγού και ελευθερώνονται στο πολυμερές κατάλληλες θέσεις δέσμευσης οι οποίες είναι συμπληρωματικές ως προς το μέγεθος, τη δομή, το σχήμα και τη λειτουργικότητα του μορίου οδηγού. Οι θέσεις αναγνώρισης που έχουν δημιουργηθεί έχουν την ικανότητα να δεσμεύσουν επιλεκτικά το μόριο οδηγό ή ομόλογες ενώσεις[Alexander et al 2006].



Εικόνα 3: Στάδια μοριακής αποτύπωσης και χρήσης του μοριακού αποτυπώματος

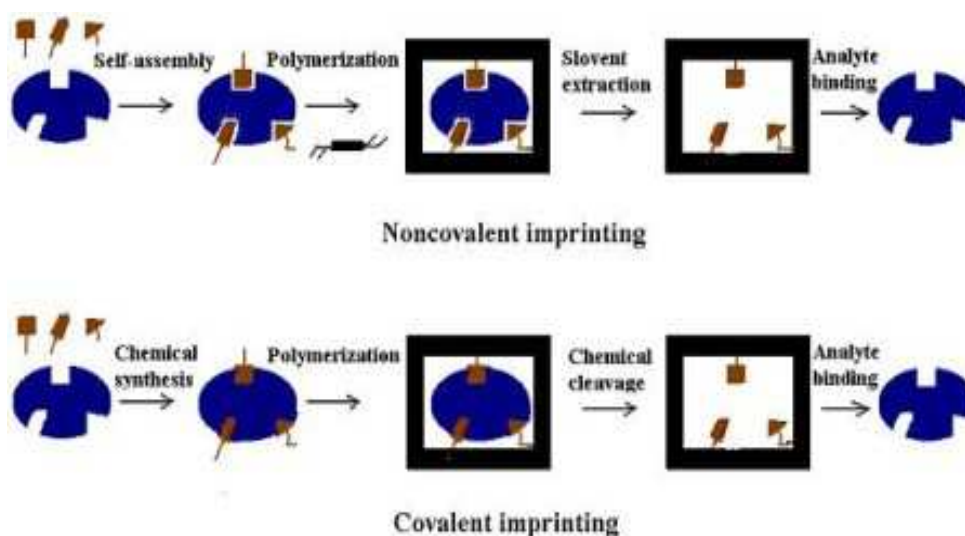
Σημαντικό είναι ότι τα μοριακώς αποτυπωμένα πολυμερή (MIP – molecular imprinted polymers) μπορούν να έχουν την επιλεκτικότητα και την συγγένεια προς το συγκεκριμένο μόριο οδηγό συγκρίσιμη με αυτές των βιολογικών μορίων που έμφυτα κατέχουν την δυνατότητα μοριακής αναγνώρισης- των αντισωμάτων(πίνακας 2), ενζύμων και υποδοχέων. Ως εκ τούτου τα MIP συχνά αναφέρονται ως συνθετικά αντισώματα, συνθετικοί υποδοχείς ή μιμητές των ενζύμων.

**Πίνακας 2:** Ιδιότητες μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών έναντι ιδιοτήτων αντισωμάτων

	<b>Mip</b>	<b>Antibodies</b>
<b>Affinity</b>	$10^3$ to $10^9$ L mol <sup>-1</sup> (heterogeneous)	$5 \times 10^4$ to $10^{12}$ L mol <sup>-1</sup> (homogeneous)
<b>Selectivity</b>	Medium-High	High
<b>Stability</b>	High	Low
<b>Production</b>	Easy, cheap, large scale	Laborious, expensive, small scale

## 2.2 Είδη μοριακής αποτύπωσης

Οι δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ υποστρώματος και μονομερούς πρέπει να είναι ισχυροί και να δημιουργούν σταθερό σύμπλοκο έτσι ώστε να είναι επιτυχής η μοριακή αποτύπωση. Ανάλογα με τη φύση του δεσμού, ομοιοπολικό ή μη, διαχωρίζεται και η τεχνική αποτύπωσης σε ομοιοπολική και μη ομοιοπολική μοριακή αποτύπωση.



**Εικόνα 4 :** Είδη μοριακής αποτύπωσης. Η φύση του δεσμού που σχηματίζεται ανάμεσα στο υπόστρωμα και το μονομερές διαχωρίζει την τεχνική αποτύπωσης σε ομοιοπολική ή μη ομοιοπολική.

### 2.2.1 Ομοιοπολική Μοριακή Αποτύπωση

Η ομοιοπολική μοριακή αποτύπωση προτάθηκε από τον G. Wulff και περιλαμβάνει τον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ μονομερούς και υποστρώματος πριν από την έναρξη του πολυμερισμού. Με τη μέθοδο αυτή δημιουργούνται σημεία δέσμευσης στο πολυμερές που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια ως προς το υπόστρωμα.

Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δυσκολία της απομάκρυνσης του υποστρώματος το οποίο δεσμεύεται ισχυρά στο πολυμερές σώμα. Χρήση δραστικών συνθηκών όπως αλκαλική υδρόλυση οδηγεί στην απελευθέρωση των καταλυτικών κέντρων του πολυμερούς ωστόσο μέρος τους απενεργοποιείται. Η χρήση πολυμερών ομοιοπολικής αποτύπωσης σε πειράματα (αναλύσεις) επαναδέσμευσης υποστρώματος αποτελεί δύσκολη και χρονοβόρα διαδικασία.

### 2.2.2 Μη Ομοιοπολική Μοριακή Αποτύπωση

Η τεχνική της μη ομοιοπολικής μοριακής αποτύπωσης προτάθηκε από τον K. Mosbach και περιλαμβάνει μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο μονομερές και το υπόστρωμα, όπως δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ιοντικές δυνάμεις κτλ. Σε αντίθεση με την προηγούμενη τεχνική τα σημεία δέσμευσης στο πολυμερές σώμα σταθεροποιούνται κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, είναι λιγότερα σε αριθμό και παρουσιάζουν μικρότερο βαθμό εκλεκτικότητας ως προς το υπόστρωμα. Οι δεσμοί στη μη ομοιοπολική αποτύπωση είναι πολύ ασθενείς αλλά σχηματίζουν πολύ σταθερά σύμπλοκα λόγω αθροιστικού φαινομένου.

Οι περισσότεροι πολυμερισμοί μη ομοιοπολικής αποτύπωσης βασίζονται σε δεσμούς υδρογόνου καθώς αυτοί είναι αρκετά ισχυροί για να δημιουργηθούν σταθερά σύμπλοκα. Οι δεσμοί αυτοί (μη ομοιοπολικοί) επηρεάζονται από τις συνθήκες πολυμερισμού (διαλύτης, θερμοκρασία) καθώς και από το σχήμα των μορίων, την μεταξύ τους απόσταση και τον προσανατολισμό τους στο χώρο. Η μέθοδος αυτή είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος αποτύπωσης εξαιτίας της απλότητας της εφαρμογής της (π.χ. απομάκρυνση υποστρώματος μόνο με χρήση διαλύτη) και στη μεγάλη ποικιλία μορίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα και μονομερή. Επιπλέον η γρήγορη κινητική η οποία χαρακτηρίζει τις διεργασίες δέσμευσης και αποδέσμευσης του υποστρώματος εξαιτίας της μη ομοιοπολικής φύσης των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται, επιτρέπει τη χρήση των

πολυμερών σε μεγάλο εύρος εφαρμογών όπως βιοαισθητήρες, αναλύσεις περιβαλλοντικών δειγμάτων κτλ.

### 2.2.3 Ημι-Ομοιοπολική Μοριακή Αποτύπωση

Η ημι-ομοιοπολική μοριακή αποτύπωση προτάθηκε από τον M. Whitcombe και συνδυάζει και τα δύο είδη αποτύπωσης. Αρχικά δημιουργείται ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ του υποστρώματος και του μονομερούς. Πραγματοποιείται ο πολυμερισμός και ύστερα με κατάλληλη κατεργασία απομακρύνεται το υπόστρωμα. Τα ενεργά κέντρα είναι ικανά να αλληλεπιδράσουν με ομοιοπολικούς και μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Η μέθοδος αυτή συνδυάζει τα πλεονεκτήματα και των δύο τεχνικών καθώς έχει ενεργά κέντρα που παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα για το πολυμερές και η απομάκρυνση/επαναδέσμευση του υποστρώματος πραγματοποιείται εύκολα.

## 2.3 Οι παράγοντες που απαιτούνται για τη σύνθεση μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών

Για τη σύνθεση ενός πολυμερούς μοριακής αποτύπωσης χρειάζονται 5 βασικά συστατικά: το υπόστρωμα, το μονομερές, ο μέσο διασταύρωσης, το πορογενές και ο εκκινητής.

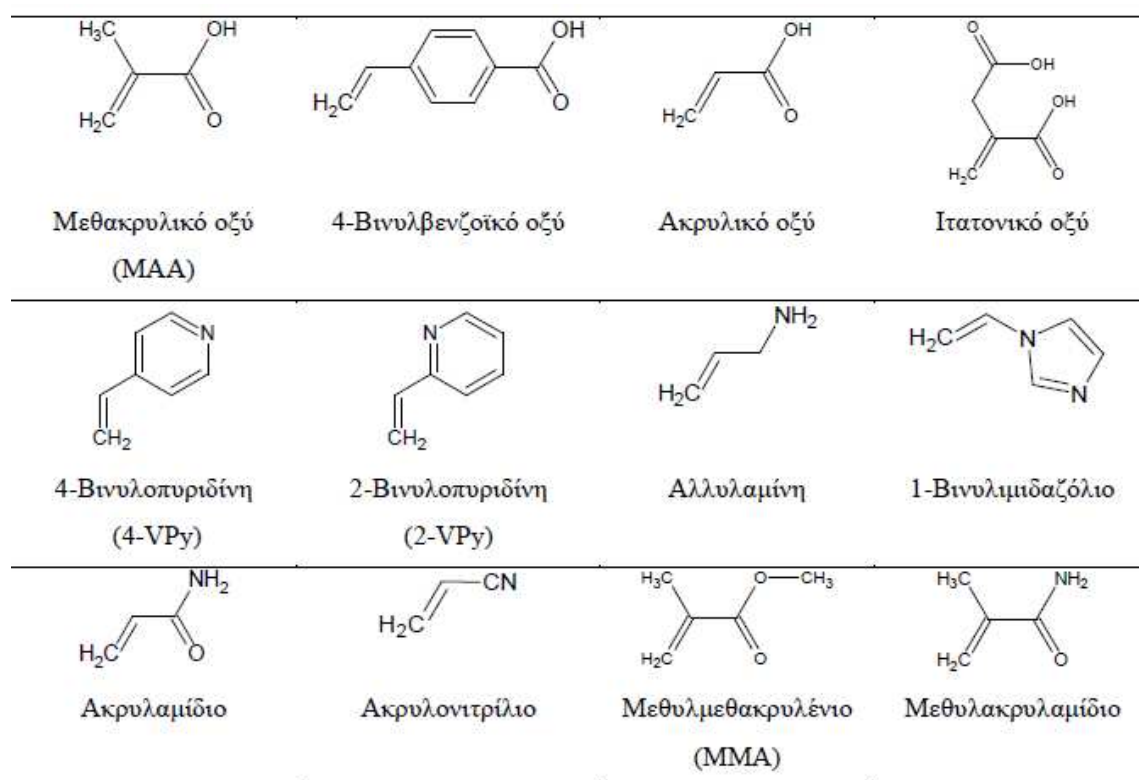
### 2.3.1 Το υπόστρωμα

Ως μόριο οδηγός ή αλλιώς υπόστρωμα ορίζεται η ένωση που επιδιώκεται να αποτυπωθεί στο πολυμερές. Μία ένωση για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα θα πρέπει αρχικά να έχει σταθερή δομή έτσι ώστε να μην υφίσταται πολυμερισμό και χημικές αλλαγές κατά τη διαδικασία του πολυμερισμού. Είναι απαραίτητο να έχει μία λειτουργική ομάδα(τουλάχιστον), η οποία να αλληλεπιδρά με το μονομερές με ομοιοπολικούς ή μη ομοιοπολικούς δεσμούς και δεν θα πρέπει να παρεμποδίζει ή να καθυστερεί τη διαδικασία του πολυμερισμού [Koimiyama et al 2003, Cormarc et al 2004]. Επιπλέον εξετάζεται η διαλυτότητα της ένωσης στον διαλύτη που πραγματοποιείται ο πολυμερισμός. Συνήθως ως υπόστρωμα προτιμώνται μικρά και τρισδιάστατα μόρια όπως αμινοξέα, στεροειδή και βάσεις γιατί σχηματίζουν μικρές κοιλότητες στο σώμα του πολυμερούς και αποτελούν σταθερές δομές[Borje Sellegren 2001].



### 2.3.2 Το Μονομερές

Το μονομερές είναι η ένωση που έχει δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκου με το υπόστρωμα και ταυτόχρονα έχει την ικανότητα πολυμερισμού. Αποτελεί το βασικό κορμό τελικού πολυμερούς και η επιλογή του γίνεται βάση της ικανότητας του να σχηματίσει ισχυρό σύμπλοκο με το υπόστρωμα. Υπάρχουν περιπτώσεις πολυμερισμού που έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο του ενός μονομερή [Sellegren 2001]. Στην εικόνα 5 τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μονομερή στην μη ομοιοπολική μοριακή αποτύπωση.



Εικόνα 5: Μονομερή που χρησιμοποιούνται ευρέως στην μη ομοιοπολική μοριακή αποτύπωση

### 2.3.3 Αλληλεπίδραση Μονομερούς-Υποστρώματος

Η ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των λειτουργικών ομάδων του μονομερούς και του υποστρώματος είναι απαραίτητη προϋπόθεση για επιτυχή μοριακή αποτύπωση. Είναι επιθυμητό να σχηματίζονται περισσότεροι του ενός δεσμοί μεταξύ των ενώσεων για να είναι σταθερό το σύμπλοκο αλλά και πιο εκλεκτική η θέση πρόσδεσης που σχηματίζεται με την απομάκρυνση του υποστρώματος. Η σταθερότητα του συμπλόκου εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως είναι η

δομή, το σχήμα, το μέγεθος του υποστρώματος καθώς και το pH και η θερμοκρασία του πολυμερισμού.

Η αναλογία μεταξύ υποστρώματος και μονομερούς είναι ιδιαίτερα σημαντική. Στις ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις η αναλογία είναι στοιχειομετρική ενώ εάν πρόκειται για μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις τότε για την εύρεση της κατάλληλης αναλογίας απαιτείται διερεύνηση καθώς η δημιουργία συμπλόκου εξαρτάται από την αρχή Le Chatelier. Συγκεκριμένα τα περισσότερα σημεία δέσμευσης είναι αποτέλεσμα του σταθερού συμπλόκου που δημιουργήθηκε από το υπόστρωμα και το μονομερές πριν την έναρξη του πολυμερισμού. Προκειμένου να ευνοηθεί η δημιουργία συμπλόκου μονομερούς υποστρώματος πρέπει μία από τις δύο ουσίες να βρίσκεται σε περίσσεια. Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί το υπόστρωμα σε περίσσεια μετά την συμπλοκοποίηση όλων των μορίων του μονομερούς δεν θα υπάρχει άλλη ποσότητα ώστε να αλληλεπιδράσει το υπόστρωμα περαιτέρω άρα δεν αυξάνεται ο αριθμός των σημείων δέσμευσης. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται το μονομερές σε περίσσεια. Ωστόσο σε κάθε περίπτωση χρειάζεται πειραματική διερεύνηση γιατί κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού μπορεί οι αρχικοί δεσμοί να καταστραφούν[Sellergren 1989].

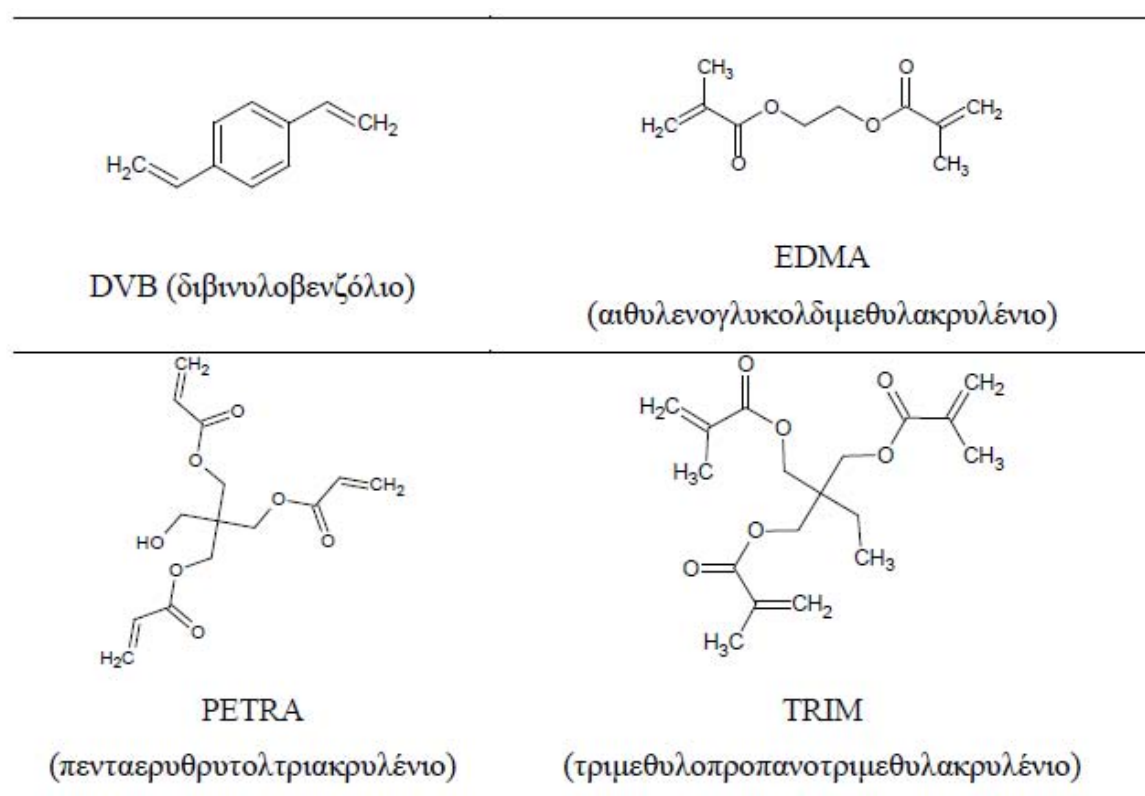
#### 2.3.4 Το Μέσο Διασταύρωσης

Το μέσο διασταύρωσης είναι ένα μονομερές το οποίο περιλαμβάνει περισσότερους από έναν διπλούς δεσμούς που το καθιστούν ικανό να πολυμεριστεί προς περισσότερες κατευθύνσεις.

Το μέσο διασταύρωσης δημιουργεί γέφυρες ανάμεσα στις κύριες αλυσίδες καθορίζοντας τη μορφολογία του πολυμερούς δηλαδή αν θα έχει τη μορφή πηκτής ή αν θα είναι μακροπορώδες στερεό. Οπότε το μήκος των αλυσίδων και το σχήμα των μορίων είναι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν.

Τα περισσότερο ευρέως χρησιμοποιούμενα μέσα διασταύρωσης είναι το αιθυλενο-γλύκο-διμεθυλακρυλένιο (EDMA) και το διβινυλοβενζόλιο (DVB), και τα λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενα το τριμεθυλοπροπανο-τριμεθυλακρυλένιο (TRIM) και το πεντα-ερυθροτολ-τριακρυλένιο(PETRA). Το EDMA εμφανίζει υψηλή πολικότητα και δημιουργεί πολυμερή θερμικά σταθερά και συμβατά με περισσότερους διαλύτες. Τα πολυμερή που προκύπτουν είναι σταθερά αλλά όχι άκαμπτα με αποτέλεσμα να είναι εύκολη η προσέγγιση ή η απομάκρυνση του υποστρώματος. Το DVB είναι μη πολικό μόριο και παράγει πολύ σταθερά πολυμερή.

Εξαιτίας αυτής της υψηλής σταθερότητας η απομάκρυνση και η επαναδέσμευση του υποστρώματος καθίσταται ιδιαιτέρως δύσκολη. Ακόμη παρουσιάζει μειωμένη αντοχή στη θερμότητα και τους διαλύτες σε σχέση με το EDMA. Ωστόσο υπάρχουν και συστήματα όπου το DVB προτιμάται γιατί παρουσιάζει καλύτερη συμπεριφορά από τα άλλα μέσα διασταύρωσης, κυρίως όταν ο πολυμερισμός βασίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις όπως στη δέσμευση καφεΐνης από υδατικό διάλυμα[Villamena et al 2001].



Εικόνα 6: Ευρέως χρησιμοποιούμενες ενώσεις ως μέσα διασταύρωσης στην μοριακή αποτύπωση

### 2.3.5 Αναλογία Μονομερούς-Μέσου διασταύρωσης

Η επιτυχής αποτύπωση επηρεάζεται όπως έχει ήδη αναφερθεί από την αναλογία υποστρώματος- μονομερούς(2.3.3), εξίσου σημαντική είναι και η αναλογία μονομερούς- μέσου δικτύωσης. Εάν το ποσοστό του μέσου διασταύρωσης είναι μικρό τα ενεργά κέντρα που θα δημιουργηθούν θα βρίσκονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο και δεν θα μπορούν να λειτουργούν ανεξάρτητα. Ακόμη και στην περίπτωση όπου η αναλογία του μέσου διασταύρωσης είναι πολύ μεγάλη, οι συνέπειες για το πολυμερές είναι αρνητικές γιατί οι δυνάμεις που μπορούν να δημιουργηθούν ανάμεσα στο υπόστρωμα και το μέσο δικτύωσης μπορεί να εμποδίζουν τον πολυμερισμό. Από

πειραματικές μεθόδους έχει γίνει αποδεκτό ότι το ποσοστό του μέσου διασταύρωσης είναι 50-80% σε σχέση με το μονομερές [Spivac 2005].

### 2.3.6 Το Πορογενές

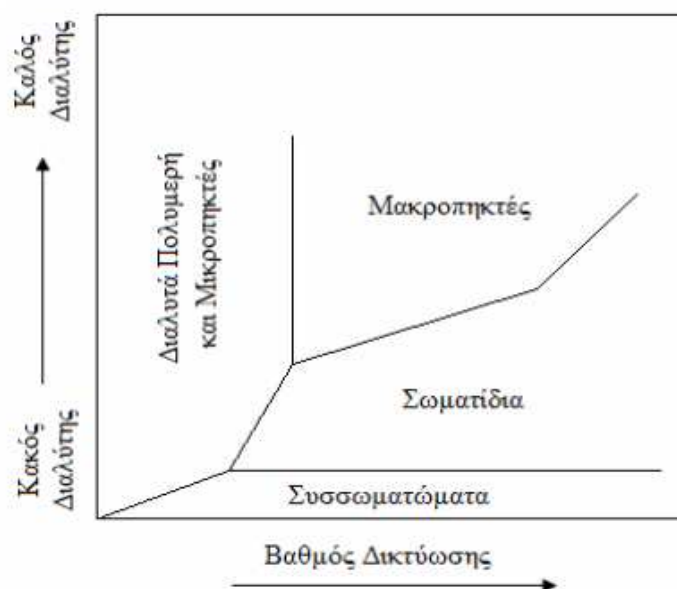
Το πορογενές είναι ο διαλύτης στον οποίο πραγματοποιείται ο πολυμερισμός. Ονομάζεται πορογενές γιατί είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό πόρων στην επιφάνεια του πολυμερούς σώματος. Κατά τη διαδικασία του πολυμερισμού ο διαλύτης εγκλωβίζεται στο εσωτερικό της μάζας του πολυμερούς και ανάλογα με την διαλυτική ικανότητα του η απομάκρυνση του δημιουργεί πόρους με διαφορετικό μέγεθος. Διαλύτης ο οποίος παρουσιάζει μικρή διαλυτική ικανότητα απομακρύνεται γρήγορα από την μάζα του πολυμερούς σχηματίζοντας πόρους με μεγάλη διάμετρο και το τελικό πολυμερές παρουσιάζει μικρή ειδική επιφάνεια. Ενώ διαλύτης που έχει υψηλή διαλυτική ικανότητα δημιουργεί πόρους με μικρή διάμετρο και το πολυμερές έχει μεγάλη ειδική επιφάνεια. Οι πόροι που δημιουργούνται αποτελούν τη δίοδο εισόδου/εξόδου του υποστρώματος στην μήτρα του πολυμερούς. Ωστόσο το πορώδες και η ειδική επιφάνεια δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητα του πολυμερούς να αναγνωρίζει το υπόστρωμα του [Sellegren et al 1993]

Η επιλογή του πορογενούς πραγματοποιείται με βάση την ικανότητα του να διαλυτοποιεί όλα τα αντιδρώντα, την ικανότητα του να δημιουργεί μακροπορώδη πολυμερή και την επιδρασή του στον πολυμερισμό βάση της πολικότητας του (δεν επηρεάζει τις θέσεις δέσμευσης). Ανάλογα με την πολικότητα του μπορεί να ενισχύσει ή να εμποδίσει την αλληλεπίδραση του υποστρώματος με το μονομερές (κυρίως μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις). Συνήθως χρησιμοποιούνται άπολοι ή μέτρια πολικοί διαλύτες (π.χ. ακετονιτρίλιο) και σπανίως χρησιμοποιούνται υδατικά διαλύματα.

### 2.3.7 Επίδραση του πορογενούς και του μέσου διασταύρωσης στο τελικό πολυμερές

Η αναλογία του πορογενούς και του μέσου διασταύρωσης στο μίγμα του πολυμερισμού καθορίζει την τελική μορφή του πολυμερούς που θα προκύψει. Το προκύπτον πολυμερές μπορεί να έχει μορφή πηκτής, σκόνη πηκτής ή μακροπορώδους στερεού. Ο συνδυασμός μικρής ποσότητας διαλύτη αλλά υψηλού ποσοστού του μέσου διασταύρωσης, ή μεγάλη ποσότητα διαλύτη αλλά χαμηλή ποσότητα μέσου διασταύρωσης μπορεί να οδηγήσει σε μη διαχωρισμό του πολυμερούς σαν ξεχωριστή φάση στη διάρκεια του πολυμερισμού. Το πολυμερές που προκύπτει έχει

μορφή πηκτής και μετά την απομάκρυνση του διαλύτη έχει μορφή άμορφου υαλώδους πολυμερούς. Τέτοιου είδους υλικά έχουν κακές μηχανικές ιδιότητες και χαμηλή ειδική επιφάνεια γιατί το μέσο διασταύρωσης δεν επαρκεί ή δεν είναι ικανό να σταθεροποιήσει τις αλυσίδες στο πλέγμα.

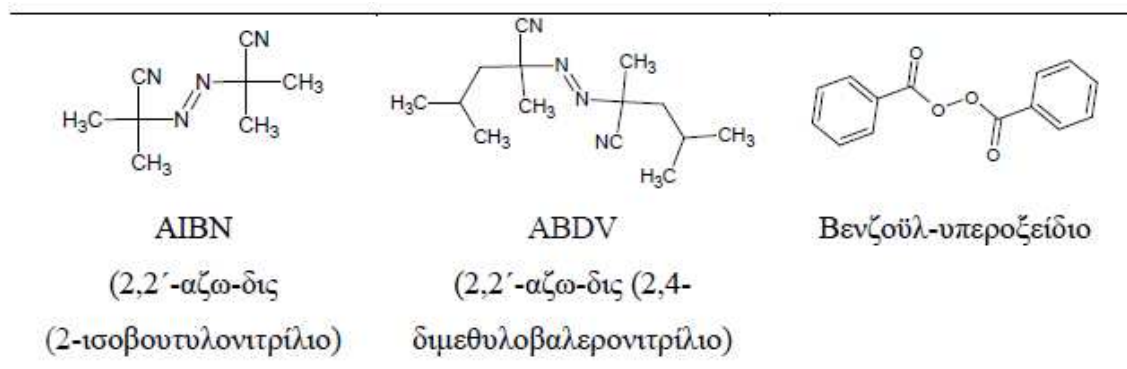


Εικόνα 7: Επίδραση αναλογίας διαλύτη-μέσου διασταύρωσης στη μορφή του τελικού πολυμερούς

### 2.3.8. Ο Εκκινητής

Η σύνθεση των μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών πραγματοποιείται με πολυμερισμό ανιονικό, κατιονικό ή ελευθέρων ριζών. Στον πολυμερισμό ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητος ένας εκκινητής. Ο εκκινητής ως απόκριση σε ένα θερμικό ή φωτοχημικό ερέθισμα διασπάται και παράγει ελεύθερες ρίζες από τις οποίες ξεκινούν οι αλυσιδωτές αντιδράσεις του πολυμερισμού. Η επιλογή του εκκινητή καθορίζεται από τη μέθοδο έναρξης του πολυμερισμού (θερμικά ή φωτοχημικά) και από τη θερμοκρασία. Συνήθως χρησιμοποιείται σε ποσοστό 1% σε σχέση με το μονομερές και δεν επηρεάζει τον σχηματισμό ενεργών κέντρων.

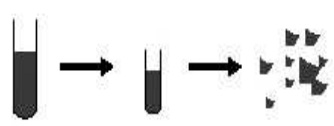
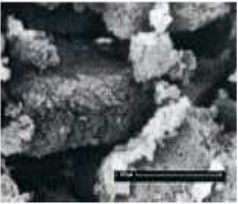
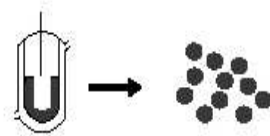
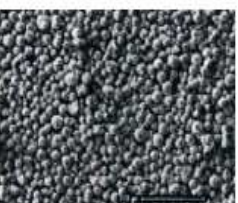
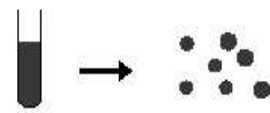

Συνήθως ως εκκινητές χρησιμοποιούνται αζωενώσεις και κυρίως το AIBN (2,2', άζω -δισ(2-ισοβουτυρονιτρίλιο)) στους 60C° και το ABDV (2,2', άζω -δισ(2,4-διμέθυλοβαρελονιτρίλιο)) στους 40C°. Λιγότερο συνηθισμένη είναι η χρήση οργανικών υπεροξειδίων όπως το βενζοϋλπεροξειδίο και το λαϋρολυπεροξειδίο (εικόνα 8).



**Εικόνα 8:** Συχνότερα χρησιμοποιούμενοι εκκινητές στην μοριακή αποτύπωση

#### 2.4 Τεχνικές Μοριακής Αποτύπωσης

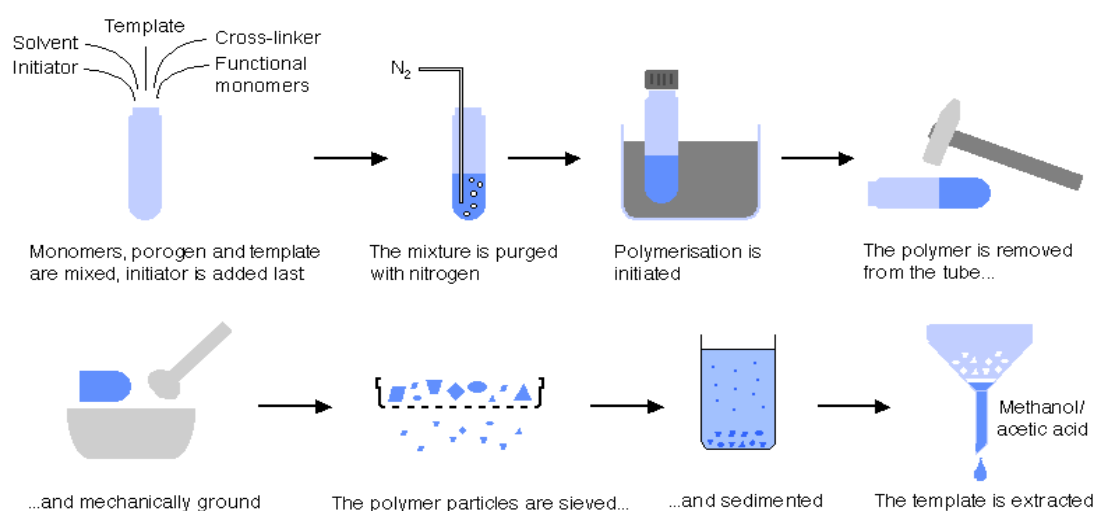
Τα πολυμερή μοριακής αποτύπωσης μπορούν να παρασκευαστούν με τεχνικές πολυμερισμού διαλύματος, αιωρήματος, καταβύθισης και γαλακτώματος κ.τ.λ. Οι τεχνικές αυτές οδηγούν σε τελικό προϊόν με διαφορετική μορφή.

Polymerization method	Particles morphology	Comments
 Bulk polymerization		Simple, versatile Convenient for SPE Time consuming, labourious, wasteful Irregular particles shape, large size distribution Peak tailing in HPLC
 Suspension polymerization		Simple, fast Quantitative yield Improved HPLC characteristics Polar suspension medium (water) Expensive suspension medium (perfluorocarbon)
 Precipitation polymerization		Simple, convenient Similar to bulk Avoid grinding and sieving steps High reaction yield Higher amount of porogen and reagents required

**Εικόνα 9 :** Βασικές τεχνικές πολυμερισμού και βασικά χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων

### 2.4.1 Πολυμερισμός Διαλύματος/ Μάζας (bulk polymerization)

Ο πολυμερισμός διαλύματος είναι η πιο εύκολη και διαδεδομένη τεχνική μοριακής αποτύπωσης. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται ως εξής: διαλύεται το υπόστρωμα και το μονομερές στον διαλύτη-πορογενές, το διάλυμα αφήνεται μικρό χρονικό διάστημα για δημιουργία συμπλόκου. Έπιτα προστίθεται ο παράγοντας δικτύωσης και τελευταίος ο εκκινητής. Το τελικό προϊόν είναι ένας συμπαγής μονόλιθος και μειονέκτημα της μεθόδου είναι η χρονοβόρα επεξεργασία του για παραλαβή κατάλληλων σωματιδίων για χρωματογραφικές εφαρμογές και πειράματα εκχύλισης στερεής φάσης.



**Εικόνα 10 : Στάδια πολυμερισμού διαλύματος/μάζας και επεξεργασίας μονόλιθου**

### 2.4.2 Πολυμερισμός αιωρήματος (suspension polymerization)

Στην τεχνική αυτή το μονομερές αιωρείται στο μέσο διασποράς και ο πολυμερισμός προκαλεί τη δημιουργία σφαιριδίων. Για να αποφευχθεί η συσσωμάτωση των τελευταίων χρησιμοποιούνται μέσα αιωρηματοποίησης. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει δυσκολία στην επιλογή των κατάλληλων συστατικών πολυμερισμού(π.χ. διαλύτης) ωστόσο ενδείκνυται γιατί παράγονται απευθείας κατάλληλα σωματίδια για χρωματογραφικές μεθόδους[Mayes et al 1996].

### 2.4.3 Πολυμερισμός Καταβύθισης (precipitation polymerization)

Στην τεχνική καταβύθισης το μονομερές, το υπόστρωμα, το μέσο δικτύωσης και ο εκκινητής διασπείρονται στη μάζα του πορογενούς και ο πολυμερισμός

δημιουργεί σφαιρίδια που δεν είναι διαλυτά στο πορογενές, τα οποία καταβυθίζονται. Τα σφαιρίδια αυτά είναι συμπαγή και δεν συσσωματώνονται.

## 2.5. Πειραματικές μέθοδοι για αξιολόγηση μοριακής αποτύπωσης

Η παρασκευή των μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών έχει ως σκοπό τη δημιουργία αποτυπωμάτων (υποδοχείς) που θα δεσμεύουν ειδικά και εκλεκτικά το υπόστρωμα τους. Για την αποτίμηση επιτυχούς ή μη της μοριακής αποτύπωσης έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που αφορούν την επαναδέσμευση του υποστρώματος. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στη σύγκριση του MIP με το αντίστοιχο μη αποτυπωμένο ανάλογο NIP (non-imprinted polymer) το οποίο παρασκευάστηκε απουσία υποστρώματος.

### 2.5.1 Χρωματογραφικός χαρακτηρισμός των MIP σύμφωνα με την ικανότητα τους να δεσμεύουν το υπόστρωμα

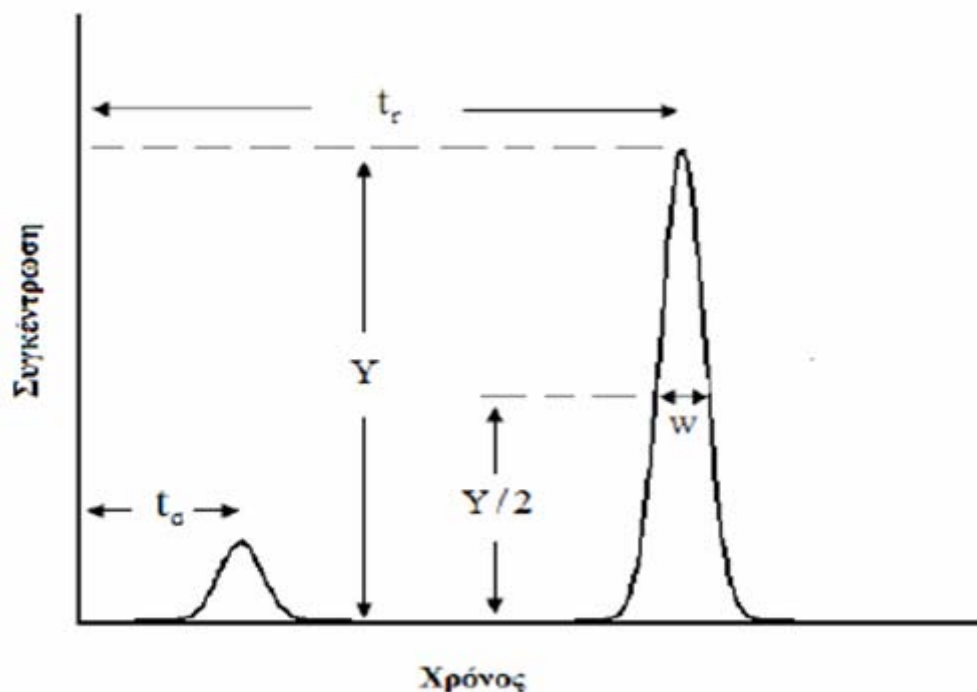
Μέτρο της αποτελεσματικότητας της μοριακής αποτύπωσης αποτελεί ο συντελεστής αποτύπωσης IF (Imprinting Factor). Είναι καθαρός αριθμός και μετράται χρωματογραφικά σε στήλες αποτυπωμένου (MIP) και τυφλού πολυμερούς (NIP) όπου αποτελούν στατικές φάσεις αντίστοιχα. Για τον υπολογισμό του είναι απαραίτητος ο υπολογισμός του παράγοντα συγκράτησης  $k$  ο οποίος προκύπτει από τη σχέση

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

όπου  $t_r$  : ο χρόνος έκλουσης της ουσίας από την στήλη που έχει πληρωθεί με το μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές

όπου  $t_o$  : ο χρόνος έκλουσης ουσίας (αδρανής) η οποία δεν παρουσιάζει ειδική ειδική συγκράτηση στη στήλη (δεν έχει καμία αλληλεπίδραση με την ακίνητη φάση)





**Εικόνα 11:** Χρωματογράφημα και διάγραμμα συγκεντρώσεων δύο ουσιών μίας αδρανούς και μία ενεργούς με την στατική φάση κατά σειρά εξόδου από τη χρωματογραφική στήλη

Ο συντελεστής αποτύπωσης δείχνει την εκλεκτική δέσμευση μιας ένωσης στο μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές και όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του, τόσο μεγαλύτερη είναι η ειδική δέσμευση.

$$\text{Imprinting factor} = \frac{k_{mip}}{k_{nip}}$$

Όπου  $k_{mip}/k_{nip}$  ο παράγοντας συγκράτησης μιας ένωσης στο αποτυπωμένο και το τυφλό πολυμερές αντίστοιχα

Από τον παράγοντα αποτύπωσης προκύπτει και ο παράγοντας ειδικής εκλεκτικότητας  $S$  (specific selectivity factor) ο οποίος δείχνει την ικανότητα δύο ενώσεων να δεσμεύονται εκλεκτικά στο αποτύπωμα. Δίνεται από τη σχέση:

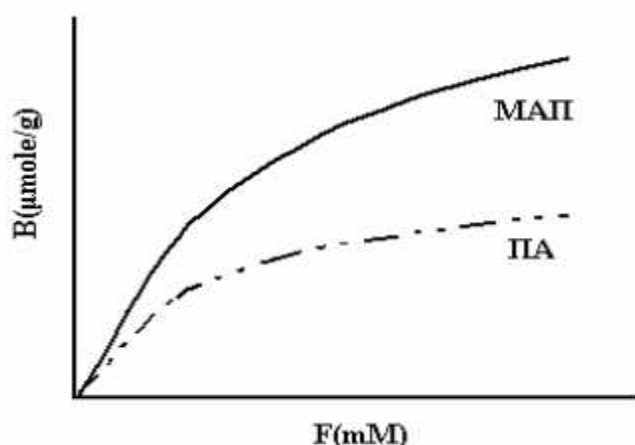
$$S = \frac{IF_1}{IF_2}$$

### 2.5.2 Αποτίμηση αποτύπωσης με πειράματα στατικής επαναδέσμευσης

Σε πειράματα στατικής επαναδέσμευσης γνωστή ποσότητα πολυμερούς αναμιγνύεται με διάλυμα υποστρώματος γνωστής συγκέντρωσης. Μετά την επίτευξη

της ισορροπίας μέρος του υπερκείμενου παραλαμβάνεται και υπολογίζεται η ποσότητα του υποστρώματος που παρέμεινε ελεύθερη στο υπερκείμενο. Με αφαίρεση από την αρχική συγκέντρωση υπολογίζεται η ποσότητα που προσροφήθηκε και χαράζεται η ισόθερμη προσρόφησης. Η γραφική παράσταση ορίζεται ως η συγκέντρωση της δεσμευμένης ουσίας B(Bound) συναρτήσει της ελεύθερης στο διάλυμα F(Free). Από την ισόθερμη προσρόφησης υπολογίζεται η σταθερά δέσμευσης K (binding constant) και η σταθερά χωρητικότητας N(capacity) που ορίζει τον αριθμό των σημείων δέσμευσης.

Η γραφική σύγκριση των ισόθερμων δέσμευσης των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών(MIP) και των πολυμερών αναφοράς(NIP) είναι ο πιο εύκολος και γρήγορος τρόπος αξιολόγησης της επίδρασης της μοριακής αποτύπωσης.



Εικόνα 12 : Ισόθερμες δέσμευσης του μοριακά αποτυπωμένου πολυμερούς MAPI και του αντίστοιχου πολυμερούς αναφοράς

Για την μελέτη των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών εφαρμόζονται στις ισόθερμες προσρόφησης συνήθως 3 μαθηματικά μοντέλα Langmuir, bi-Langmuir και Freundlich. Τα δύο πρώτα μοντέλα ανήκουν στην κατηγορία διακριτής κατανομής σύμφωνα με τα οποία θεωρείται ότι υπάρχει ένας πεπερασμένος αριθμός διαφορετικών ειδών θέσεων δέσμευσης στο πολυμερές, με κάθε είδος να έχει μία σταθερά K. Το μοντέλο Freundlich ανήκει στην κατηγορία των μοντέλων συνεχούς κατανομής. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο τα πολυμερή εμφανίζουν άπειρο αριθμό ειδών θέσεων δέσμευσης και η κατανομή τους ακολουθεί μια συνεχή συνάρτηση.

Η εφαρμογή των 2 πρώτων μοντέλων πραγματοποιείται με την ανάλυση Scatchard. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο η γραφική παράσταση σχηματίζεται από το λόγο B/F συναρτήσει του B. Στο μοντέλο Langmuir το σύστημα είναι ομοιογενές και υπάρχει μόνο ένα είδος θέσεων δέσμησης. Η γραφική παράσταση είναι απλή γραμμή, η κλίση της ισούται με  $-K$  και η τετμημένη της στον άξονα χ ισούται με τον αριθμό θέσεων δέσμησης N όπως προκύπτει και από την εξίσωση που ακολουθεί.

$$B = \frac{NKF}{1 + KF}$$

Όπου N ο αριθμός θέσεων δέσμησης στο πολυμερές (μmole/gr) και K η σταθερά δέσμησης ( $\text{mM}^{-1}$ )

$$\frac{B}{F} = KN - KB$$

Το μοντέλο bi-Langmuir χρησιμοποιείται για συστήματα που παρουσιάζουν ετερογένεια και αυτό οφείλεται στην ύπαρξη ποικίλων θέσεων δέσμησης τα οποία διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα και την ακαμψία. Το μοντέλο bi-Langmuir εμφανίζει μη γραμμική Scatchard καμπύλη η οποία προσομοιάζεται από δύο ανεξάρτητες ευθείες γραμμές. Κάθε μία γραμμή χαρακτηρίζεται από διαφορετικό ζεύγος τιμών N και K. σύμφωνα με το μοντέλο αυτό υπάρχουν δύο είδη θέσεων δέσμησης, ένα χαμηλής συγγένειας το οποίο αντιστοιχεί στην ευθεία με τη μικρότερη κλίση και ένα είδος θέσεων υψηλής συγγένειας το οποίο αντιστοιχεί στην ευθεία με την μεγαλύτερη κλίση.

Εξίσωση bi-Lamguir

$$B = \frac{N_1 K_1 F}{1 + K_1 F} + \frac{N_2 K_2 F}{1 + K_2 F}$$



**Εικόνα 13 : Εφαρμογή του μοντέλου διακριτής κατανομής bi-Langmuir**

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα του μοντέλου bi-Langmuir, το οποίο είναι χαρακτηριστικό των μοντέλων διακριτής κατανομής είναι ότι οι προκύπτουσες τιμές των σταθερών N και K εξαρτώνται από το εύρος της συγκέντρωσης για το οποίο εκτελούνται οι πειραματικές μετρήσεις ενώ θα έπρεπε να είναι σταθερές[Umpreby et al 2000].

Το μοντέλο Freundlich στηρίζεται στην ύπαρξη μίας συνεχούς κατανομής των θέσεων δέσμευσης με διαφορετικές τιμές σταθερών δέσμευσης. Το μοντέλο Freundlich προβλέπει σχέση εκθετικής μορφής μεταξύ των τιμών B και F όπως φαίνεται και στην εξίσωση που ακολουθεί:

$$B=aF^m$$

Οι σταθερές a και m είναι ένα μέτρο των φυσικών παραμέτρων δέσμευσης του συστήματος. Συγκεκριμένα ο συντελεστής a εξαρτάται από τις τιμές και των δύο φυσικών παραμέτρων K και N χωρίς όμως να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συνεισφοράς τους στην τιμή του a. Η σταθερά m είναι δείκτης ετερογένειας και χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών. Η τιμή της κυμαίνεται από 0 για ένα ετερογενές σύστημα έως 1 για ένα ομογενές σύστημα. Με απλή λογαρίθμηση της εξίσωσης Freundlich προκύπτει η εξίσωση:

$$\log B = m \log F + \log a$$

Η γραφική παράσταση των τιμών  $\log B$  συναρτήσει των τιμών  $\log F$  δίνει μία ευθεία όπου η κλίση της ισούται με  $m$  και η τετμημένη της με τον άξονα  $y$  ισούται με  $\log a$ .

Ο Shimizu και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μία αναλυτική έκφραση για την κατανομή της συγγένειας των θέσεων δέσμευσης ενός πολυμερούς που να υπακούει στο μοντέλο Freundlich.

$$N(K)=2.303am(1-m^2)k^{-m}$$

Η εξίσωση είναι έγκυρη για συγκεκριμένο εύρος  $K$ , το οποίο ορίζεται από το εύρος των τιμών συγκέντρωσης για το οποίο πραγματοποιούνται οι μετρήσεις.

Πρέπει: 
$$K_{\max} = \frac{1}{F_{\min}} \quad \text{και} \quad K_{\min} = \frac{1}{F_{\max}}$$

Όπου  $F_{\max}$  και  $F_{\min}$  η μέγιστη και η ελάχιστη ποσότητα ουσίας στο διάλυμα.

Το μοντέλο Freundlich δεν μπορεί να οδηγήσει στον υπολογισμό μοναδικών τιμών  $N$  και  $K$ , γιατί το μοντέλο αυτό στηρίζεται στην ύπαρξη συνεχούς κατανομής θέσεων δέσμευσης με διαφορετικές τιμές σταθερών δέσμευσης. Ωστόσο είναι δυνατός ο υπολογισμός των αριθμών θέσεων δέσμευσης για συγκεκριμένο εύρος σταθερών δέσμευσης  $N_{K_1-K_2}$  καθώς και ο υπολογισμός μίας μέσης σταθεράς δέσμευσης  $\bar{K}_{K_1-K_2}$  για το ίδιο εύρος

$$N_{K_1-K_2} = a(1-m^2)(K_1^{-m}-K_2^{-m})$$

$$\bar{K}_{K_1-K_2} = \frac{m}{m-1} \frac{K_1^{1-m} - K_2^{1-m}}{K_1^{-m} - K_2^{-m}}$$

Για την ορθή σύγκριση δύο μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών θα πρέπει τα  $N_{K_1-K_2}$  και  $\bar{K}_{K_1-K_2}$  να υπολογίζονται για το ίδιο εύρος σταθερών δέσμευσης  $K_1-K_2$  [Yan and Ramstrom 2005, και Umpleby et al 2004]

## 2.6 Εφαρμογές Μοριακώς Αποτυπωμένων Πολυμερών

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα ενδιαφέρεται ολοένα και περισσότερο για την εύρεση νέων αναλυτικών μεθόδων που θα δίνουν γρήγορα αποτελέσματα για την ανάλυση περιβαλλοντικών και φαρμακευτικών δειγμάτων. Η μοριακή αποτύπωση είναι μια νέα τεχνολογία ιδιαίτερα υποσχόμενη καθώς έχει 4 βασικά πλεονεκτήματα σε σχέση με παλαιότερες μεθόδους.

1. Έχει δυνατότητες αυτοματοποίησης
2. Ικανότητα ιχνοανάλυσης (τάξης pg)
3. Μικρή προεργασία δειγμάτων
4. Χαμηλό κόστος

Τα μοριακώς αποτυπωμένα πολυμερή έχουν ποικίλες εφαρμογές, ακολουθούν οι πιο διαδεδομένες:

1. Χρωματογραφία
2. Εκχύλιση στερεής φάσης
3. Αισθητήρες περιβαλλοντικά – βιομηχανικά δείγματα
4. Φαρμακοβιομηχανία-Ανεύρεση νέων βιοδραστικών ουσιών
5. MIP σε κλινικές εφαρμογές

### 2.6.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με χρήση MIP

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μία αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή για τον χαρακτηρισμό τους προσδιορίζοντας τον IF (βλ 2.5.1) αλλά και για αναλύσεις περιβαλλοντικών και φαρμακευτικών δειγμάτων[Sellegren et al pElsevier]. Η στήλη HPLC που περιέχει mipr έχει την ικανότητα να ανιχνεύει και να συγκρατεί ειδικά το υπόστρωμα ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Εισαγωγή στη στήλη μίγματος που περιέχει το υπόστρωμα και εφαρμόζοντας κατάλληλη κινητή φάση έχει ως αποτέλεσμα όλες οι ενώσεις που περιέχει το μίγμα να εκλουστούν γρήγορα και η κορυφή του υποστρώματος να μείνει τελευταία. Η μέθοδος καθιστά εύκολη και γρήγορη την ανάλυση περίπλοκων περιβαλλοντικών και βιολογικών δειγμάτων, των οποίων η συμβατική προετοιμασία πριν τη χρωματογραφία ήταν ιδιαίτερα ακριβή και χρονοβόρα. Κατά συνέπεια έχουν αναπτυχθεί εκλεκτικά mipr για πλήθος αντιβιοτικών[Caro et al 2005, Schirmer et al 2000], αλκαλοϊδών[Theodoridis et al

2003], αλλά και οργανοφωσφορικών και αζωτούχων ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως φυτοφάρμακα[Graham et al 2002, Sanchez et al 2007].

### 2.6.2 Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)

Η χρήση πολυμερών μοριακής αποτύπωσης σε πειράματα εκχύλισης στερεής φάσης είναι μία αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως σε αναλύσεις βιολογικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων [Sellergen et al 2001 pElsevier]. Η μέθοδος πλεονεκτεί έναντι των απλών μεθόδων γιατί τα μοριακώς αποτυπωμένα πολυμερή παρασκευάζονται εύκολα, είναι ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες και οργανικούς διαλύτες αλλά και εξαιτίας του χαμηλού τους κόστους έναντι των προσροφητικών ανοσοσυγγένειας.(βλ 3.3.3)

### 2.6.3 Αισθητήρες

Οι αισθητήρες είναι ανιχνευτές οι οποίοι λαμβάνοντας ένα ερέθισμα φυσικό ή χημικό αποκρίνονται παράγοντας ένα σήμα (π.χ. φθορισμός). Η εφαρμογή των MIP στην κατασκευή αισθητήρων έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον καθώς η παρασκευή τους είναι εύκολη και όχι ιδιαίτερα δαπανηρή έναντι των βιολογικών αισθητήρων. Με τη χρήση των μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών είναι δυνατή η δημιουργία ενός πολυλειτουργικού αισθητήρα ο οποίος θα είναι εφοδιασμένος με πολλούς τύπου MIP και θα έχει την ικανότητα να ανιχνεύει αρκετές ενώσεις ταυτόχρονα. Τα όρια ανίχνευσης είναι σε αρκετές περιπτώσεις εφάμιλλα των βιολογικών αισθητήρων ενώ το κόστος είναι ιδιαίτερος χαμηλό[Xu et al 2004, Sellergen et al 2001]..

### 2.6.4 Φαρμακοβιομηχανία-Ανεύρεση νέων βιοδραστικών ουσιών

Η εφαρμογή αυτή είναι μια νέα κατεύθυνση που αναπτύσσεται και στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Παν. Θεσσαλίας από την ομάδα Επίκουρου Καθηγητή Α. Τσακάλωφ. Με τη μοριακή αποτύπωση επιλεγμένων ρυθμιστών μεταβολικών μονοπατιών επιτυγχάνεται η τρισδιάστατη απομίμηση των θέσεων δράσης τους. Μετά την απομάκρυνση του υποστρώματος το αποτυπωμένο πολυμερές διαθέτει λειτουργικές κοιλότητες, συμπληρωματικές σε μέγεθος, σχήμα και λειτουργικότητα ως προς το υπόστρωμα-στόχο που χρησιμοποιήθηκε. Αυτές οι κοιλότητες μπορούν να καταληφθούν αποκλειστικά από ενώσεις οι οποίες μοιάζουν στο αρχικό πρότυπο σε μέγεθος, σχήμα και λειτουργικότητα. Οι ενώσεις αυτές αναμένεται να εμφανίζουν βιολογική δραστηριότητα παρόμοια με αυτή του αρχικού

προτύπου (ομόλογες ενώσεις). Η συγκεκριμένη εφαρμογή των MIP παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς καθίσταται εφικτή η ανεύρεση φαρμάκων με απλές, εύκολες και μη χρονοβόρες διαδικασίες(βλ 1.4).

Η επιλεκτικότητα των MIP μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί από την φαρμακοβιομηχανία για την επίτευξη καλύτερης καθαρότητας φαρμάκων η οποία είναι ιδιαίτερος σημαντική όταν το μόριο του φαρμάκου βρίσκεται με τη μορφή εναντιομερών, το ένα εκ των οποίων είναι δραστικό και το άλλο δυνητικά επιβλαβές. Με την χρήση των MIP είναι δυνατή η ανίχνευση και η απομάκρυνση της ανεπιθύμητης μορφής του φαρμάκου (π.χ.φάρμακο θαλιδομίδη).

#### 2.6.5 MIP σε κλινικές εφαρμογές

Ο οργανισμός αυθόρμητα παράγει αντισώματα όταν το ανοσοποιητικό του σύστημα αναγνωρίσει συστατικά μέρη ξένης ουσίας ή αντιγόνα τα οποία εισήλθαν στον οργανισμό. Τα αντισώματα παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση καθώς αναγνωρίζουν ένα μοναδικό αντιγόνο. Οι ερευνητές εκμεταλευόμενοι την εξειδίκευση των αντισωμάτων τα χρησιμοποιούν για κατασκευή διαγνωστικών τεστ. Προκειμένου να παράγουν τις επιθυμητές ποσότητες αντισωμάτων ακολουθούν την εξής μέθοδο: Μεταφέρουν με ένεση ξένες πρωτείνες/αντιγόνα σε πειραματόζωα και έπειτα με λήψη αίματος απομονώνουν τα αντισώματα που έχουν παραχθεί. Τα αντισώματα αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή εξειδίκευση ωστόσο έχουν μικρό χρόνο ζωής, χαμηλή σταθερότητα και υψηλό κόστος παραγωγής. Μιμητές των αντισωμάτων για χρήση διαγνωστικών τεστ με μεγάλη διάρκεια ζωής και υψηλή σταθερότητα είναι δυνατόν να κατασκευαστούν με την τεχνική της μοριακής αποτύπωσης[G.Vlatakis et al 1993]. Οι τιμές εξειδίκευσης είναι αρκετές φορές εφάμιλλη με αυτή του αντισώματος αγρίου τύπου ενώ το κόστος παραγωγής είναι ιδιαίτερος χαμηλό (επίσης αποφεύγεται η χρήση πειραματόζωων).

Ακόμη μία από τις πιθανές χρήσεις για τις οποίες προορίζονται τα MIP αφορά την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών από βιολογικά υγρά. Δημιουργία αποτυπωμάτων των εν λόγω ουσιών και σχεδίαση ειδικής συσκευής θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην αντιμετώπιση χρόνιων ασθενειών (π.χ αιμοκάθαρση, απομάκρυνση χοληστερόλης).

Τέλος υπάρχει ιατρικό ενδιαφέρον για χρήση των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών σε ασθένειες όπου η χορήγηση του φαρμάκου πραγματοποιείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα π.χ. ινσουλίνη για σακχαρώδη διαβήτη. Η παρασκευή



μήτρας(MIP) ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκου (υποστρώματος) σύμφωνα με τις ανάγκες μίας ασθένειας είναι επιθυμητός μελλοντικός στόχος.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας είναι η δημιουργία μοριακών αποτυπωμάτων με ικανότητα ανίχνευσης, εκλεκτικής δέσμευσης και απομόνωση αναστολέων του HIF-1α. από διαφορά υποστρώματα (π.χ. βιβλιοθήκες χημικών ενώσεων, εκχυλίσματα φυτών).

Στην παρούσα διπλωματική θα αποτυπωθεί η κερκετίνη γνωστός αναστολέας του HIF-1, θα πραγματοποιηθεί αξιολόγηση του παρασκευασθέντος πολυμερούς και εκτίμηση της ικανότητας του να επαναδεσμεύει ειδικά την κερκετίνη καθώς και ομόλογες ενώσεις.

Επίσης θα αποτυπωθεί η ουσία τρι-Ο-ακέτυλο-αδενοσίνης (TOAA). Η TOAA είναι οργανοδιαλυτό ανάλογο του ATP που είναι συνένζυμο των πρωτεϊνικών κινασών και δότης φωσφορικών ομάδων που καθιστά ικανές τις πρωτεϊνικές κινάσες, συγκεκριμένα MAPK κινάσες, να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν τον HIF1-α. Η αποτύπωση της ουσίας θα δημιουργήσει κοιλότητες στο πολυμερές σώμα ικανές να δεσμεύσουν μόρια ίδιου όγκου και σχήματος με την TOAA χωρίς την ικανότητα να παρέχουν την φωσφορική ομάδα (ATP mimetic). Οι ενώσεις που θα δεσμευτούν αναμένεται να είναι αναστολείς του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α. Τέλος για το αποτύπωμα της TOAA θα πραγματοποιηθεί αξιολόγηση της ικανότητας ανίχνευσης και επαναδέσμευσης του υποστρώματος

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1. Αντιδραστήρια-Διατάξεις

Η κερκετίνη (3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone), η τρι-Ο-ακέτυλο-αδενοσίνη (TOAA), η 4-βινυλοπυριδίνη (4-VP) και το αιθυλενογλυκολδιμεθυλακρυλένιο (EGDMA), είναι της εταιρείας Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Ο εκκινητής άζο-δισ-ισοβουτύρονιτρίλιο (AIBN) αγοράστηκε από την Acros Organics (Geel Belgium). Το 3-Ο-Ακέτυλο-11-κετο-β-μποςβελλικό οξύ (ΑΚβΒΑ) είναι της Alexis Biochemicals (Lausen Switzerland). Το ακετονιτρίλιο HPLC και η ακετόνη αναλυτικής καθαρότητας είναι της Lab-Scan Analytical Sciences (Dublin Ireland). Η μεθανόλη είναι της Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) και το οξικό οξύ (ACS reagent) της Fluka Chemie GmbH (Switzerland).

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά συστήματα χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης.

- Στο σύστημα Ultimate LC system (Dionex corporation) η ανίχνευση έγινε με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει μια quaternary αντλία βαθμωτής έκλουσης LPG-3400A, ένα αυτόματο δειγματολήπτη WPS-3000SL, μία στήλη Acclaim® 120 C18 3μm 4,6×150mm, έναν φούρνο στήλης, και τον ανιχνευτή UV-Diode Array, PDA 3000. Η καταγραφή των χρωματογραφημάτων και η ανάλυση των κορυφών έγινε με την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή με το λογισμικό Chromeleon.
- Στο σύστημα SSI LC system η ανίχνευση έγινε με μονοχρωματικό ανιχνευτή UV-vis. Το σύστημα περιλαμβάνει μία αντλία HPLC SSI 222D, ένα σύστημα ελέγχου αντλιών SSI 232, τον μονοχρωματικό ανιχνευτή UV-vis SSI 500 συνδεδεμένο με το συλλέκτη κλασμάτων Foxy Jr. και μία στήλη Alltech, KromasilC18 5μm 3,2×150mm. Η καταγραφή των χρωματογραφημάτων και η ανάλυση των κορυφών έγινε με την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή με το λογισμικό Clarity.

## 3.2. Σύνθεση Μοριακά Αποτυπωμένων Πολυμερών

### 3.2.1.Καθαρισμός Μονομερών

Τα μονομερή που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο εμπεριέχουν σε μικρό ποσοστό αναστολείς πολυμερισμού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η περίπτωση πολυμερισμού κατά την περίοδο της αποθήκευσης. Προκειμένου να παραληφθούν τα μονομερή σε καθαρή μορφή ώστε να είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν υπόκεινται σε καθαρισμό. Τα λειτουργικά μονομερή: μεθακρυλικό οξύ, 4-βινυλοπυριδίνη καθώς επίσης και το μονομερές διασταύρωσης: αιθυλενογλυκολδιμεθυλακρυλένιο, παρελήφθησαν σε καθαρή μορφή αφού υποβλήθηκαν σε απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση.

### 3.2.2.Σύνθεση Πολυμερών

Για τη σύνθεση μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε η τεχνική του πολυμερισμού μάζας. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: η απαιτούμενη ποσότητα υποστρώματος ζυγίζεται σε ογκομετρική φιάλη και διαλύεται στον επιλεγμένο διαλύτη πολυμερισμού (πορογενές). Μετά τη διαλυτοποίηση του υποστρώματος, στο διάλυμα προστίθεται το μονομερές και το μείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο υποστρώματος-μονομερούς για 20 λεπτά. Έπειτα προστίθεται το μονομερές διασταύρωσης και στο τέλος ο εκκινητής, ο οποίος βρίσκεται διαλυτοποιημένος σε μικρή ποσότητα διαλύτη. Το διάλυμα μεταφέρεται αμέσως στην ειδική αμπούλα πολυμερισμού και τοποθετείται σε παγόλουτρο. Ακολουθεί απομάκρυνση του οξυγόνου με συνεχή διέλευση αζώτου για 5-8min, γιατί το οξυγόνο δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες παρεμποδίζοντας με αυτό το τρόπο τον πολυμερισμό. Η ειδική αμπούλα πολυμερισμού ψύχεται με υγρό άζωτο και σφραγίζεται αεροστεγώς υπό κενό με τη βοήθεια φλόγιστρου.

Η έναρξη του πολυμερισμού πραγματοποιείται με διάσπαση του εκκινητή θερμικά ή φωτοχημικά ώστε να παραχθούν ελεύθερες ρίζες όπου θα ξεκινήσουν οι αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμερισμού. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο τρόποι διάσπασης. Η θερμική διάσπαση διεξάγεται σε υδατόλουτρο στους 60°C όπου και ολοκληρώνεται ο πολυμερισμός(24h). Για τη φωτοχημική διάσπαση χρησιμοποιείται λάμπα UV (312nm, 230V/50Hz). Η έκθεση του διαλύματος πολυμερισμού στην υπεριώδη ακτινοβολία πραγματοποιείται με παράλληλη διαρκή περιστροφή του σωλήνα έτσι ώστε να είναι ομοιόμορφη η ακτινοβολία για χρονικό

διάστημα 3 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 3 ωρών ο σωλήνας με το συμπαγές σώμα πολυμερούς τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 60°C όπου και ολοκληρώνεται ο πολυμερισμός (για άλλες 21h).

Ως πρότυπα προς αποτύπωση επιλέχθηκαν το φλαβονοειδές κερκετίνη και το ανάλογο του ATP, τρι-Ο-ακέτυλο-αδενοσίνης. Για τη σύνθεση των MIP και των αντίστοιχων NIP, χρησιμοποιήθηκαν ως μονομερή η 4-βινυλοπυριδίνη και το μεθακρυλικό οξύ. Ως παράγοντας διασταύρωσης χρησιμοποιήθηκε το EDMA. Ως εκκινητής χρησιμοποιήθηκε το AIBN το οποίο διασπάται τόσο στους 60°C, όσο και κατά την έκθεση σε UV ακτινοβολία. Ως πορογενή χρησιμοποιήθηκαν τα διαλυτικά μέσα: ακετόνη και ακετονιτρίλιο. Η σύνθεση των πολυμερών και οι πειραματικές συνθήκες παρασκευής τους παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1. Για κάθε πολυμερές αποτύπωσης παρασκευάστηκε και το αντίστοιχο τυφλό-μάρτυρας (NIP) από το οποίο έλειπε το υπόστρωμα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού.

**Πίνακας 3. Σύσταση των μειγμάτων πολυμερισμού και μέθοδος εκκίνησης**

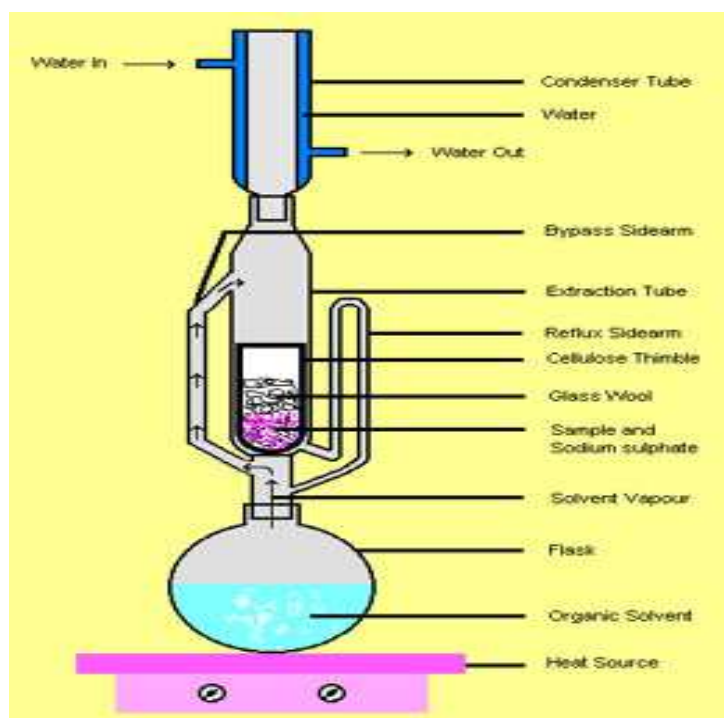
Πολυμερές	Υπόστρωμα (Y)	Μέσο Δικτύωσης (ΜΔ)	Μονομερές (Μ)	Μοριακή Αναλογία Y/M/MΔ	Πορογενές	Μέθοδος Εκκίνησης
MIP1	Quercetin	EDMA	4-VPy	1/8/40	Ακετόνη	Θέρμανση
NIP1	-	EDMA	4-VPy	1/8/40	Ακετόνη	Θέρμανση
MIP2	TOAA	EDMA	MAA	1/6/30	Ακετονιτρίλιο	UV
NIP2	-	EDMA	MAA	1/6/30	Ακετονιτρίλιο	UV

### 3.2.3. Επεξεργασία πολυμερών και απομάκρυνση του υποστρώματος

Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού από το αποτυπωμένο πολυμερές πρέπει να απομακρυνθεί το υπόστρωμα, καθώς επίσης και η ποσότητα του μονομερούς, του μέσου διασταύρωσης και του εκκινητή που δεν έχουν αντιδράσει.

Το πολυμερές(μονόλιθος) το οποίο έχει πάρει το σχήμα της ειδικής αμπούλας πολυμερισμού παραλαμβάνεται με θραύση της αμπούλας και κονιοποιείται ελαφρώς σε πορσελάνινο ιγδίο παρουσία αδρανούς διαλύτη. Η παρουσία του διαλύτη βοηθά στην αποφυγή απωλειών εξαιτίας αιωρούμενων σωματιδίων (σκόνη). Ο διαλύτης απομακρύνεται με διήθηση(αιώρημα σύνθλιψης).

Η απομάκρυνση του υποστρώματος πραγματοποιείται σε συσκευή Soxhlet με πολλαπλή ζεστή εκχύλιση. Κατά την εκχύλιση Soxhlet το δείγμα (πολυμερές) τοποθετείται σε πορώδη περιέκτη μιας χρήσεως (κυλινδρικά χάρτινα φίλτρα) και ο διαλύτης σε φιάλη βρασμού που συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα. Οι υδρατμοί του διαλύτη ρέουν στον περιέκτη και διαλύουν τους αναλύτες. Πλήρωση του χώρου του περιέκτη οδηγεί σε σιφωνισμό, οι αναλύτες οδηγούνται στη φιάλη βρασμού όπου και συλλέγονται.



Εικόνα 14: Συσκευή Soxhlet

Για την εκχύλιση Soxhlet της κερκετίνης χρησιμοποιείται μεθανόλη/οξικό οξύ 9/1 ενώ για την εκχύλιση Soxhlet της τρι-Ο-ακέτυλο-αδενοσίνης ακετονιτρίλιο/μεθανόλη 4/1. Η εκχύλιση διαρκεί 24- 48 ώρες με χρόνο ανακύκλωσης(σιφωνισμός) 20-30 λεπτά. Μετά το τέλος της εκχύλισης το πολυμερές απομακρύνεται από τον περιέκτη και κονιοποιείται περαιτέρω για τη συλλογή ομογενών κλασμάτων. Από τη φιάλη βρασμού συλλέγεται το εκχύλισμα προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό της ανάκτησης του υποστρώματος (splitting yield).

Το ποσοστό της ανάκτησης υπολογίζεται προσδιορίζοντας τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος Soxhlet και του αιωρήματος σύνθλιψης του πολυμερούς σε υπόστρωμα. Για το σκοπό αυτό ποσότητα 1ml των δύο εκχυλισμάτων ξεχωριστά εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό (speed vac)

και μετά από επαναδιάλυση τους σε κατάλληλο διαλύτη προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του ως προς το υπόστρωμα είτε με απλή φωτομετρία υπεριώδους – ορατού, είτε χρωματογραφικά. Ο χρωματογραφικός προσδιορισμός της κερκετίνης πραγματοποιείται ισοκρατικά και ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιείται μίγμα μεθανόλη / νερό / οξικό οξύ σε αναλογία 50/48/2: v/v/v. Ο προσδιορισμός της τρι-Ο-ακετυλοαδενοσίνης πραγματοποιείται επίσης ισοκρατικά και ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιείται μίγμα ακετονιτρίλιο / νερό σε αναλογία 24/76: v/v. Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε ροή 0.8 ml/min σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια το πολυμερές κονιοποιείται σε πορσελάνινο ιγδίο και η κοσκίνιση του πραγματοποιείται σε μεταλλικά κόσκινα κατάλληλου μεγέθους βρογχίδων, με τη χρήση αδρανούς διαλύτη ώστε να διευκολυνθεί η διέλευση των πολύ ελαφρών σωματιδίων από τα κόσκινα. Οι διαδικασίες κονιοποίησης-κοσκίνισης λαμβάνουν χώρα διαδοχικά ώστε να ελαχιστοποιηθεί η δημιουργία σωματιδίων κάτω των 5μ. Τα σωματίδια απομακρύνονται γιατί προκαλούν απόφραξη στις φρίττες των στηλών HPLC. Η απομάκρυνσή τους πραγματοποιείται με επαναιώρησεις του πολυμερούς σε ακετόνη (150-200ml). Συγκεκριμένα πραγματοποιείται αιώρηση, το πολυμερές αφήνεται να καθίσει για περίπου 30 λεπτά. Τα λεπτότερα σωματίδια αργούν να καταβυθιστούν οπότε και απομακρύνονται μαζί με τον διαλύτη, με πιπέτα Pasteur. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται 4-6 φορές .

Κλάσμα σωματιδίων μεγέθους 45-90μm χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του πολυμερούς με πειράματα στατικής επαναδέσμευσης και την παρασκευή στηλών εκχύλισης στερεής φάσης SPE, ενώ κλάσμα 25-45μm εφαρμόζεται στην πλήρωση στηλών HPLC. Τα τυφλά πολυμερή κατεργάστηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως και τα πολυμερή αποτύπωσης.

### 3.3. Χαρακτηρισμός των Μοριακά Αποτυπωμένων Πολυμερών

#### 3.3.1. Χρωματογραφικός Χαρακτηρισμός Αποτυπωμένων Πολυμερών

##### Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι χημική αναλυτική τεχνική διαχωρισμού με πολλές εφαρμογές, που επιτρέπει τον προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος οργανικών και ανόργανων ενώσεων.

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιείται ο ακόλουθος ηλεκτρονικός/μηχανολογικός εξοπλισμός: Μία συσκευή απαερίωσης του εκλουστικού, έναν εισαγωγέα δείγματος, μία αντλία που πιέζει τον διαλύτη(εκλουστικού) προς την στήλη με πιέσεις τάξεως μερικών χιλιάδων psi, μία στήλη, έναν ανιχνευτή και ένα καταγραφικό.

Ο διαχωρισμός των ενώσεων στην HPLC επιτυγχάνεται εξαιτίας της συνδυασμένης δράσης της κινητής φάσης και του πληρωτικού υλικού. Εντός της στήλης πραγματοποιείται διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος ανάλογα με τη συγγένεια που παρουσιάζουν με το πληρωτικό υλικό ενώ η κινητή φάση μετακινεί τα συστατικά κατά μήκος της στήλης. Ανάλογα με το μηχανισμό αλληλεπίδρασης με την στατική φάση διακρίνονται οι εξής τύποι χρωματογραφίας: κανονικής φάσης, αντίστροφης φάσης, απορρόφησης, διάχυσης πηκτής, συγγένειας και ιοντοανταλλάγης. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης στην οποία το πληρωτικό υλικό είναι διοξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες όπως αλκύλια, φαινύλιο κτλ. Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης χρησιμοποιείται ως κινητή φάση μίγμα οργανικών διαλυτών με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ή νερό.

Εξίσου σημαντική παράμετρος είναι η χρήση κατάλληλου ανιχνευτή. Οι απλοί ανιχνευτές UV-Vis και παράταξης φωτοδιοδίων χρησιμοποιούνται για ενώσεις που φέρουν χρωμοφόρο ομάδα και παρουσιάζουν απορρόφηση σε ορατό-υπεριώδες. Και στις δύο περιπτώσεις η ανίχνευση βασίζεται στο νόμο Lambert-Beer

$$A = \epsilon C b$$

Όπου A η απορρόφηση της ουσίας,  $\epsilon$  ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης, C η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας και b το πάχος της κυψελίδας.

### Πλήρωση στηλών HPLC

Πειραματικά η πλήρωση των στηλών πραγματοποιείται ως εξής: στήλη 150x3mm πληρώνεται με το προς μελέτη πολυμερές. Η στήλη συνδέεται στο σύστημα HPLC και η στατική φάση συμπιέζεται με συνεχή ροή διαλύτη 1ml/min για 1h. Ακολούθως η στήλη ανοίγεται και στην περίπτωση που έχει δημιουργηθεί κενό, αυτό συμπληρώνεται με νέα ποσότητα πολυμερούς. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να μην παρατηρείται περαιτέρω συμπίεση της στατικής φάσης.



### Προσδιορισμός Παράγοντα Αποτύπωσης

Ο παράγοντας αποτύπωσης  $I_f$  που χαρακτηρίζει την εξειδίκευση των MIP υπολογίστηκε ξεχωριστά για κάθε ένα από τα πολυμερή που παρασκευάστηκαν. Για τον προσδιορισμό του παράγοντα αποτύπωσης ενός πολυμερούς μία μεταλλική στήλη χρωματογραφίας πακετάρεται με το προς μελέτη πολυμερές. Η στήλη συνδέεται στο σύστημα HPLC και αφήνεται να ισορροπήσει στην επιθυμητή κινητή φάση καταγράφοντας ταυτόχρονα με την χρήση του ανιχνευτή UV-Vis την τυχόν έκλυση υποστρώματος. Αρχικά πραγματοποιείται έγχυση μάρτυρα, μίας ουσίας δηλαδή που δεν εμφανίζει συγκράτηση από το πολυμερές, έτσι ώστε να υπολογιστεί ο νεκρός όγκος της στήλης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έγχυση του υποστρώματος και καταγράφεται ο χρόνος έκλυσης.

Για τον προσδιορισμό του παράγοντα αποτύπωσης της κερκετίνης χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μείγμα MeCN/H<sub>2</sub>O/MeCOOH: 80/16/4, v/v/v. Υπολογίστηκε επίσης ο συντελεστής αποτύπωσης για το AKBA σε κινητή φάση ακετονιτρίλιο. Για τον προσδιορισμό του παράγοντα αποτύπωσης της τρι-Ο-ακετυλο-αδενοσίνης χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μείγμα ACN/H<sub>2</sub>O 97/3 v/v. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε ροή 1 ml/min και θερμοκρασία δωματίου.

### 3.3.2. Χαρακτηρισμός Αποτυπωμένων Πολυμερών με Πειράματα Στατικής Επαναδέσμευσης (Batch Rebinding)

Όλα τα πολυμερή που παρασκευάστηκαν υποβλήθηκαν σε πειράματα στατικής επαναδέσμευσης για την εκτίμηση της σταθεράς συγγένειας ( $K_a$ ), της κατανομής των κέντρων δέσμευσης που δημιουργήθηκαν και της χωρητικότητάς τους. Το πείραμα πραγματοποιείται ως εξής: 30mg του πολυμερούς, ζυγίζονται σε ογκομετρικά φιαλίδια των 50ml και παραμένουν σε ισορροπία με 5ml διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης (2.5-300μM) υποστρώματος για 24ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Μετά την πάροδο των 24ωρών τμήμα του υπερκείμενου παραλαμβάνεται και φυγοκεντρείται σε σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό (speed vac). Ακολουθεί επαναδιάλυση σε κατάλληλο για χρωματογραφία διαλύτη, ανάλυση με HPLC και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Αφαιρώντας τη συγκέντρωση που μετρήθηκε χρωματογραφικά από την αρχική συγκέντρωση του διαλύματος υπολογίζεται η ποσότητα του υποστρώματος που δεσμεύτηκε ανά γραμμάριο πολυμερούς και διαμορφώνονται οι ισόθερμες προσρόφησης. Εφαρμογής των ισόθερων προσρόφησης σε κάποιο από τα μοντέλα

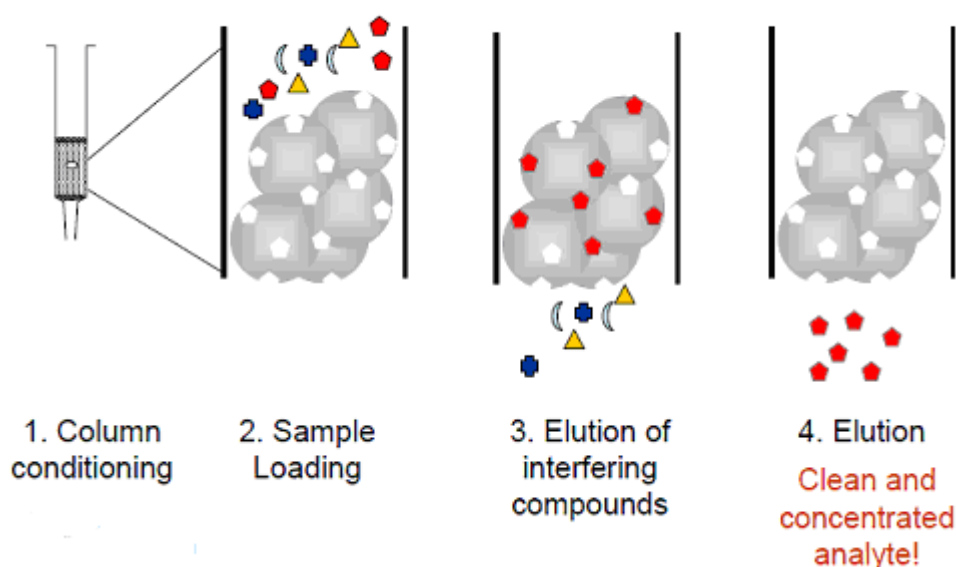
κατανομής υπολογίζονται η σταθερά δέσμευσης/διάσπασης, ο αριθμός και η κατανομή των θέσεων δέσμευσης του πολυμερούς.

Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κυμαίνονται από 2.5 έως 300μM και ως διαλύτης επιλέχθηκε ο διαλύτης πολυμερισμού(πορογενές). Οι ανάλυσεις πραγματοποιήθηκαν στα χρωματογραφικά συστήματα που περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.3.

### 3.3.3. Χαρακτηρισμός Αποτυπωμένων Πολυμερών Με Εκχύλιση Στερεής Φάσης

Η χρήση πολυμερών μοριακής αποτύπωσης σε πειράματα εκχύλισης στερεής φάσης χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Sellegren και είναι μία αναλυτική τεχνική που βρίσκει εφαρμογή κυρίως σε αναλύσεις βιολογικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων. Εφόσον η ειδική στήλη πληρώνεται με mIP(mIP-spre) έχει την ικανότητα να συγκρατεί ειδικά και ισχυρά το υπόστρωμα. Η εισαγωγή στη στήλη μίγμα διαλύματος που περιέχει το υπόστρωμα και η εφαρμογή κατάλληλης σύστασης διαλυτών έχει ως αποτέλεσμα προσμίξεις που περιέχει το μίγμα να εκλουστούν στο στάδιο έκπλυσης των στηλών με εφαρμογή ενός μη πολικού διαλύτη ενώ το υπόστρωμα να εκλουστεί στο τελικό στάδιο με εφαρμογή ενός πολικού διαλύτη.

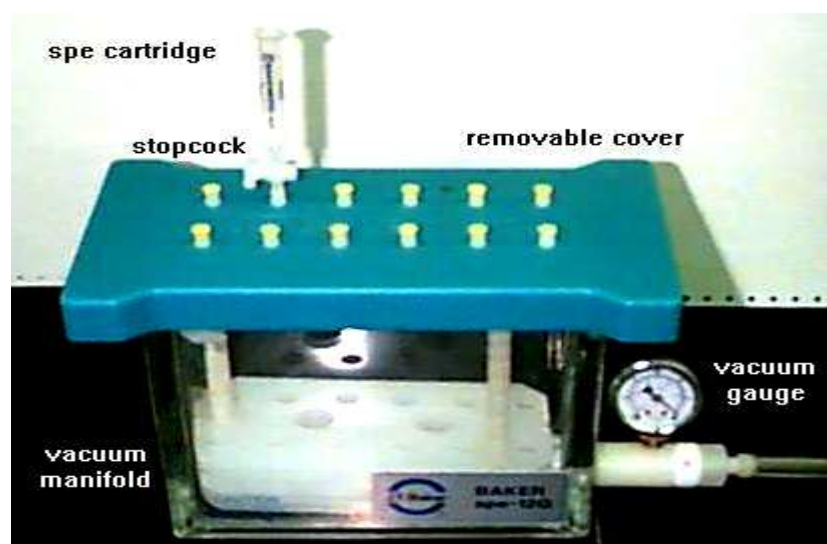
## Selective Extractions by MIPs



**Εικόνα 15:** Στάδια εκχύλισης στερεής φάσης 1<sup>ο</sup> στάδιο εξισορρόπησης στήλης, 2<sup>ο</sup> στάδιο φόρτωση δείγματος, 3<sup>ο</sup> στάδιο έκπλυση προσμίξεων και 4<sup>ο</sup> στάδιο έκλυση των ειδικά συγκρατημένων ενώσεων

### Πλήρωση στήλης SPE με πολυμερή μοριακής αποτύπωσης

Για την κατασκευή στηλών εκχύλισης στερεής φάσης με αποτυπωμένα πολυμερή ακολουθείται η εξής διαδικασία: κενές στήλες πολυπροπυλενίου χωρητικότητας 3ml (Altech Associates Inc,USA) τοποθετούνται σε συσκευή εκχύλισης στερεής φάσης(εικόνα 16) αφού προστεθεί η κάτω φρίττα πολυαιθυλενίου. Ακολούθως 100mg του πολυμερούς αφού αιωρηθούν σε μικρή ποσότητα διαλύτη (1-3ml) προστίθονται ως αιώρημα στην κενή στήλη. Το πολυμερές αφήνεται για μικρό χρονικό διάστημα να καθιζάνει και στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη το πολυμερές συμπιέζεται και προστίθεται η πάνω φρίττα πολυαιθυλενίου.



Εικόνα 16: Συσκευή εκχύλισης στερεής φάσης με αντλία κενού

### Προσδιορισμός χωρητικότητας στήλης MIP-SPE

Η χωρητικότητα των στηλών MIP-SPE εκτιμάται με πειράματα ανάκτησης του υποστρώματος στη στήλη του αποτυπωμένου πολυμερούς σε σύγκριση πάντα με τη στήλη του τυφλού πολυμερούς. Συγκεκριμένα αφού η στήλη MIP-SPE εξισορροπηθεί, διάλυμα του υποστρώματος στο διαλύτη που πραγματοποιήθηκε ο πολυμερισμός φορτώνεται στη στήλη με διαδοχικές φορτώσεις του 1ml και ροή 1ml/min. Μετά το πέρας των φορτώσεων (στάδιο load) ακολουθεί έκπλυση της στήλης αρχικά με μη πολικό (στάδιο wash) και στη συνέχεια με πολικό διαλύτη (στάδιο elute). Μετά από κάθε βήμα το έκλουσμα συλλέγεται, εξατμίζεται μέχρι

ξηρού σε σύστημα φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό (speed vac) και μετά από επαναδιάλυση σε κατάλληλο διαλύτη αναλύεται χρωματογραφικά.

Οι πειραματικές συνθήκες για τον προσδιορισμό της χωρητικότητας των στηλών ως προς κερκετίνη δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

**Πίνακας 4 : Η σύσταση διαλυτών στα στάδια mp-spe**

Εξισορρόπηση στήλης	1 ml μείγματος μεθανόλης / οξικού οξέος (1:1, v/v)
	1ml μεθανόλης
	1 ml μείγματος μεθανόλης, 2 mol/l NaOH (1:1, v/v)
	1 ml μείγματος μεθανόλης, νερού, οξικού οξέος (18:1:1, v/v/v)
	1 ml μεθανόλης
	1 ml ακετονιτρίλιο
Φόρτωση	1 ml διαλύματος κερκετίνης σε ακετονιτρίλιο ( 16μg/ml)
Ξέπλυμα	2 ml ακετονιτρίλιο
Έκλουση	3 ml μείγματος μεθανόλης, οξικού οξέος (7:1, v/v)

Η χρωματογραφική ανάλυση των εκλουσμάτων πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τις χρωματογραφικές συνθήκες για την κερκετίνη που αναφέρονται στην παράγραφο 3.2.3.

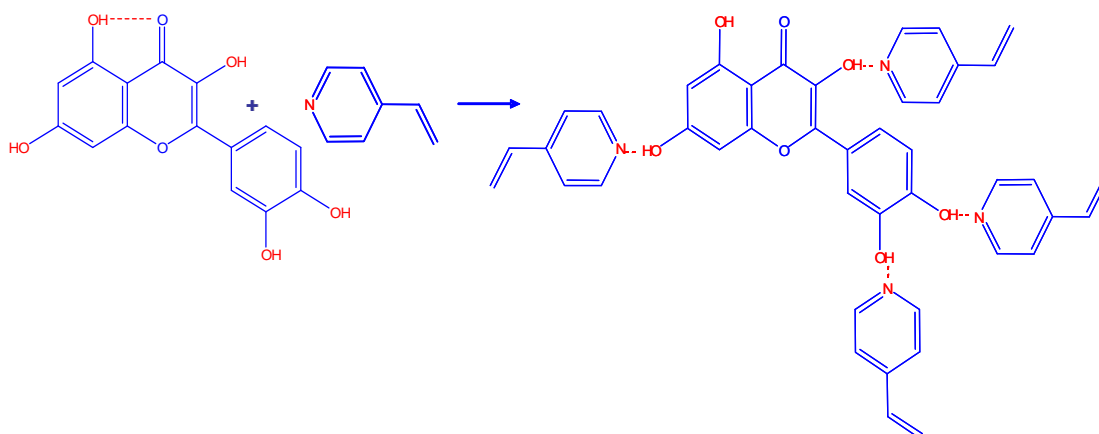
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Σύνθεση μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών

Για τη σύνθεση μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε η τεχνική του πολυμερισμού διαλύματος/μάζας. Ως πρότυπα προς αποτύπωση επιλέχθηκαν το φλαβονοειδές κερκετίνη και το ανάλογο του ATP, τρι-Ο-ακέτυλο-αδενοσίνη. Για τη σύνθεση των MIP και των αντίστοιχων NIP, χρησιμοποιήθηκαν ως μονομερή η 4-βινυλοπυριδίνη και το μεθακρυλικό οξύ. Ως παράγοντας διασταύρωσης χρησιμοποιήθηκε το EDMA, ως εκκινητής χρησιμοποιήθηκε το AIBN και ως πορογενή τα διαλυτικά μέσα ακετόνη και ακετονιτρίλιο. Η αναλογία υποστρώματος/μονομερούς/μέσου διασταύρωσης επιλέχθηκε σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν στις παραγράφους 2.3.3 και 2.3.5.

#### 4.1.1 Αναλογία Κερκετίνης –4VP-EDMA

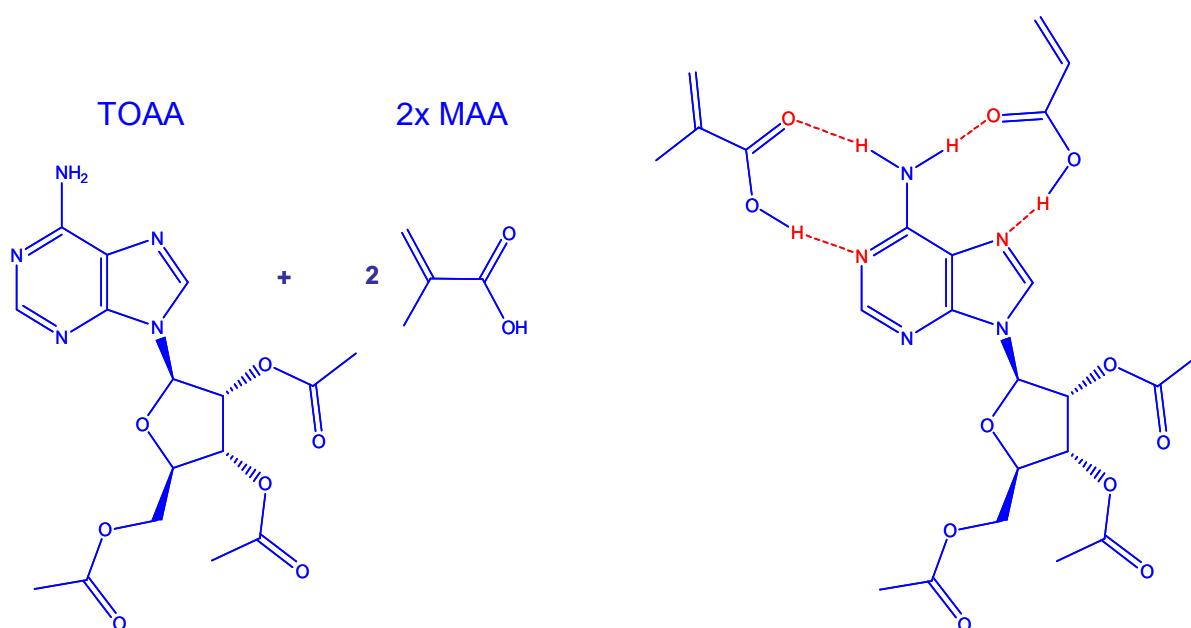
Η κερκετίνη έχει 5 υδροξυλομάδες αλλά μόνο οι 4 μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς με την 4-βινυλοπυριδίνη. Η στοιχειομετρική αναλογία με την οποία δεσμεύει/συμπλοκοποιεί η κερκετίνη την 4-βινυλοπυριδίνη θεωρείται 1/4 γιατί το υδροξύλιο του C5 συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου. Επειδή η αλληλεπίδραση βασίζεται σε μη ομοιοπολικούς δεσμούς η περίσσεια ποσότητα του μονομερούς είναι απαραίτητη. Η αναλογία υποστρώματος/μονομερούς/μέσου δικτύωσης που επιλέχθηκε για την μοριακή αποτύπωση της κερκετίνης είναι η εξής : Template/monomer/cross-linker **1/8/40**



Εικόνα 17: Η κερκετίνη έχει 4 λειτουργικές ομάδες ικανές να αλληλεπιδράσουν με το μονομερές 4VP

#### 4.1.2 Αναλογία TOAA-MAA-EDMA

Η στοιχειομετρική αναλογία με την οποία δεσμεύει/συμπλοκοποιεί ένα μόριο TOAA το μονομερές MAA είναι 1/2. Προκειμένου ωστόσο να μετατοπιστεί η ισορροπία της αντίδρασης προς το σχηματισμό του συμπλόκου το μονομερές προστίθεται σε περίσσεια και συγκεκριμένα στην αναλογία **1/6**. Η αναλογία υποστρώματος/μονομερούς/μέσου δικτύωσης που επιλέχθηκε για την μοριακή αποτύπωση της TOAA (βλ 2.3.3 και 2.3.5) είναι η εξής : Template/monomer/cross-linker **1/6/30**



**Εικόνα 18 :** Η TOAA έχει 2 λειτουργικές ομάδες ικανές να αλληλεπιδράσουν με το μονομερές MAA

#### 4.2 Απομάκρυνση και υπολογισμός ανάκτησης υποστρώματος

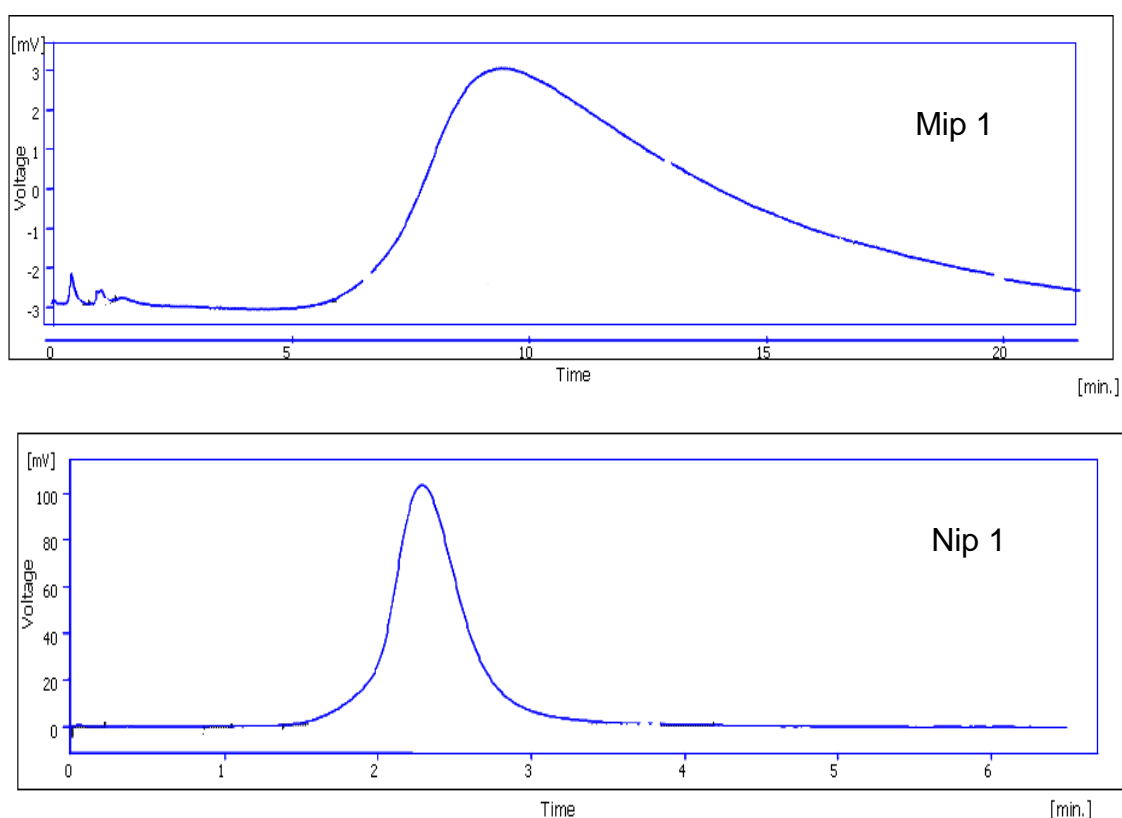
Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του υποστρώματος από το αποτυπωμένο πολυμερές με εκχύλιση Soxhlet. Η ανάκτηση του υποστρώματος μετρήθηκε χρωματογραφικά όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3. Η ανάκτηση της κερκετίνης υπολογίστηκε σε ποσοστό 82% και η ανάκτηση της TOAA υπολογίστηκε σε ποσοστό 79%. Το ποσοστό ανάκτησης του υποστρώματος είναι δείκτης της ύπαρξης ελεύθερων ενεργών κέντρων.

### 4.3. Εκτίμηση Αναγνωριστικής Ικανότητας MIP με HPLC- Προσδιορισμός Παράγοντα Αποτύπωσης

Για την αξιολόγηση των μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών πραγματοποιήθηκε πλήρωση κενών στηλών με τα παραγόμενα πολυμερή και ανάλυση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς τους σε συστήματα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Η μέθοδος πλήρωσης των στηλών και οι συνθήκες χρωματογραφίας παρουσιάζονται αναλυτικά στην παράγραφο 3.2.3.

#### 4.3.1 Προσδιορισμός Παράγοντα Αποτύπωσης Κερκετίνης

Πραγματοποιήθηκαν ενέσεις κερκετίνης γνωστής συγκέντρωσης σε στήλες που είχαν πληρωθεί προτύτερα με το πολυμερές υλικό mip1 ή nip1. Από τη χρωματογραφική ανάλυση που προέκυψε λαμβάνοντας υπόψιν το χρόνο έκλουσης της κερκετίνης  $t_r$  υπολογίστηκε ο συντελεστής της μοριακής αποτύπωσης ( $IF_1$ ) της κερκετίνης. Η μέθοδος υπολογισμού του  $IF_1$  βρίσκεται στην παράγραφο 2.5.1.

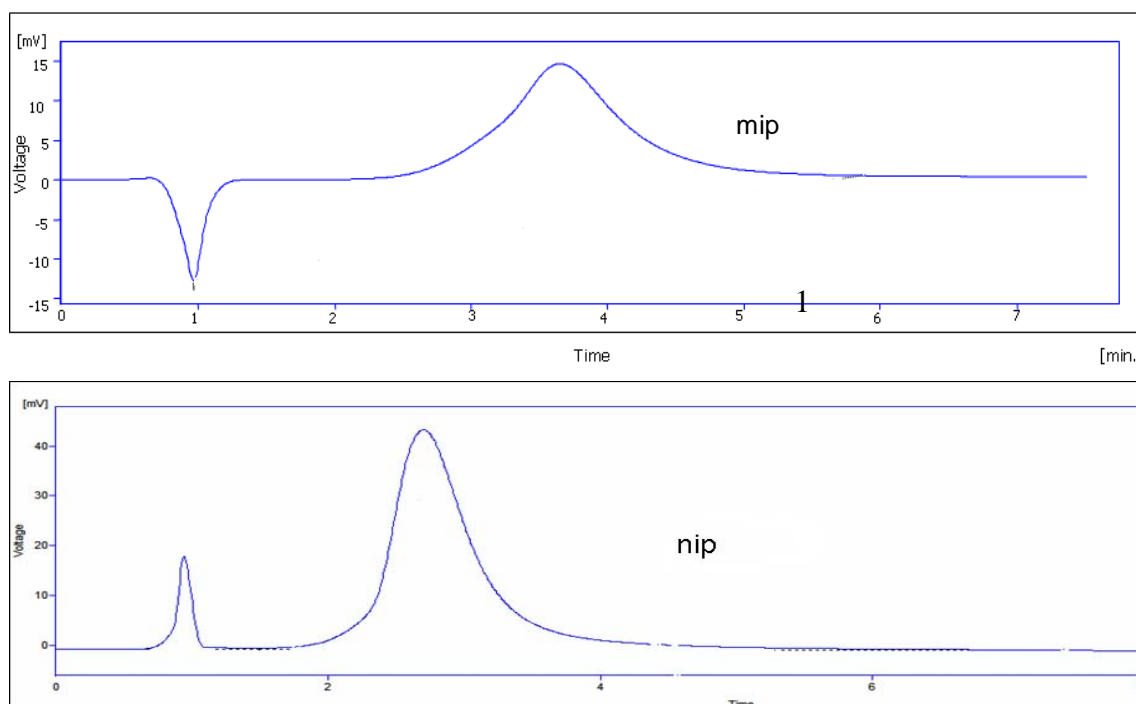


**Σχήμα 3 : Χρωματογραφήματα έκλουσης της κερκετίνης σε στήλες mip1/nip1**

- ❖ Χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μείγμα MeCN/H<sub>2</sub>O/MeCOOH: 80/16/4, v/v/v
- ❖ Η ροή στην οποία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση ήταν 1ml/min και η πίεση 1650PSI
- ❖ Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 375nm

Ο παράγοντας συγκράτησης της κερκετίνης στο μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές  $knip_1$  υπολογίστηκε 8,6 και στο τυφλό-μάρτυρα  $knip_1$  υπολογίστηκε 1,3. Ο συντελεστής αποτύπωσης της κερκετίνης είναι  $IF_1 = 6,6$ .

Στην ίδια στήλη που πληρώθηκε με πολυμερές ( $nip_1$  ή  $mip_1$ ) πραγματοποιήθηκαν ενέσεις της ουσίας ΑΚΒΑ. Η ουσία προέρχεται από το φυτό *Boswellia serrata* και επιλέχθηκε γιατί είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το ΑΚΒΑ όπως η κερκετίνη είναι ρυθμιστής του HIF-1α. [Lakka et al 2010].



**Σχήμα 4 : Χρωματογραφήματα έκλουσης του ΑΚΒΑ στο πολυμερές σώμα που αποτυπώθηκε ως προς την κερκετίνη**

- ❖ Χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση ACN
- ❖ Η ροή στην οποία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση ήταν 1ml/min, η πίεση 1150PSI
- ❖ Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 250nm

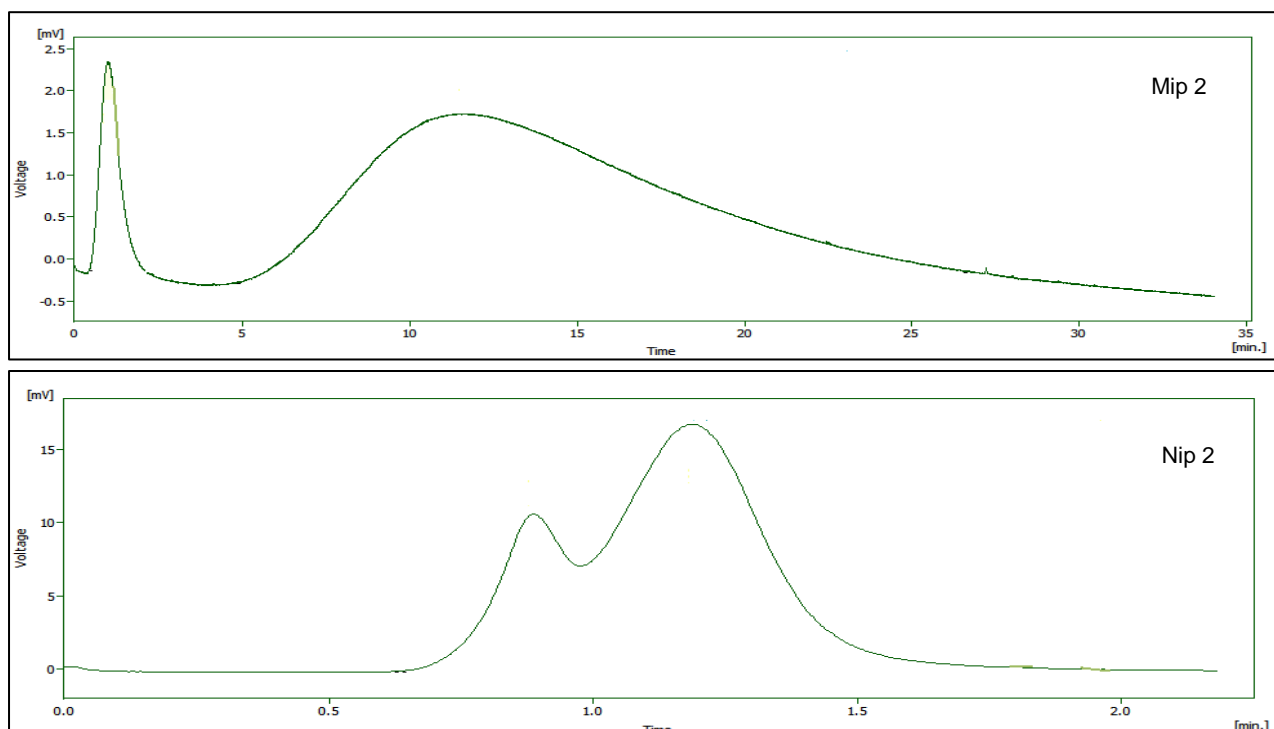
Ο παράγοντας συγκράτησης του ΑΚΒΑ στο μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές  $knip$  υπολογίστηκε 2,8 και στο τυφλό-μάρτυρα  $knip$  υπολογίστηκε 1,8. Ο συντελεστής αποτύπωσης του ΑΚΒΑ είναι  $IF = 1,6$ .

Ο συντελεστής αποτύπωσης του ΑΚΒΑ ( $IF = 1,6$ ) έχει μικρότερη τιμή από το συντελεστή αποτύπωσης της κερκετίνης ( $IF_1 = 6,6$ ), γεγονός αναμενόμενο, καθώς κάθε αποτυπωμένο πολυμερές εμφανίζει τη μέγιστη δυνατότητα επαναδέσμευσης ως προς το υπόστρωμα του. Από τα αποτελέσματα αποκαλύπτεται ότι και το ΑΚΒΑ συγκρατείται ειδικά.



#### 4.3.2 Προσδιορισμός Παράγοντα Αποτύπωσης TOAA

Πραγματοποιήθηκαν ενέσεις TOAA γνωστής συγκέντρωσης σε στήλες που είχαν πληρωθεί προτύτερα με το πολυμερές υλικό (mip2 ή nip2). Από τη χρωματογραφική ανάλυση που προέκυψε λαμβάνοντας υπόψιν το χρόνο έκλουσης της ουσίας υπολογίστηκε ο συντελεστής μοριακής αποτύπωσης  $IF_2$ .



**Σχήμα 5 : Χρωματογραφήματα έκλουσης της TOAA σε στήλες mip2/nip2**

- ❖ Χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μείγμα ACN/H<sub>2</sub>O 97/3, v/v
- ❖ Η ροή στην οποία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση ήταν 1ml/min και η πίεση 1150PSI
- ❖ Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 260nm

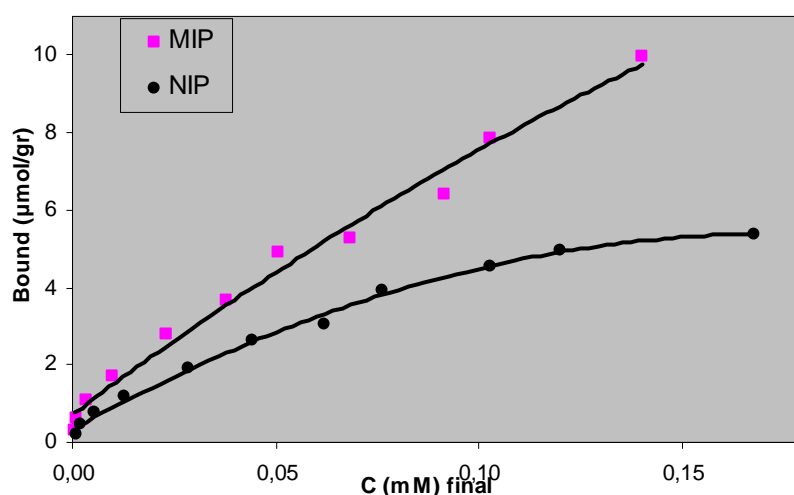
Ο παράγοντας συγκράτησης της TOAA στο μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές kmip<sub>2</sub> υπολογίστηκε 10,6 και στο τυφλό-μάρτυρα knip<sub>2</sub> υπολογίστηκε 0.34. Ο συντελεστής αποτύπωσης της TOAA είναι  $IF_2 = 31,2$ .

Από το γεγονός ότι το τυφλό παρουσιάζει μηδαμινή ικανότητα επαναδέσμευσης του υποστρώματος (knip<sub>2</sub> = 0.34) συμπεραίνουμε ότι η περίσσεια στην οποία χρησιμοποιήθηκε το μονομερές (1/6) κατά την σύνθεση του πολυμερούς δεν οδήγησε στην δημιουργία μη ειδικών θέσεων δέσμευσης.

#### 4.4. Αποτίμηση μοριακής αποτύπωσης με πειράματα στατικής επαναδέσμευσης

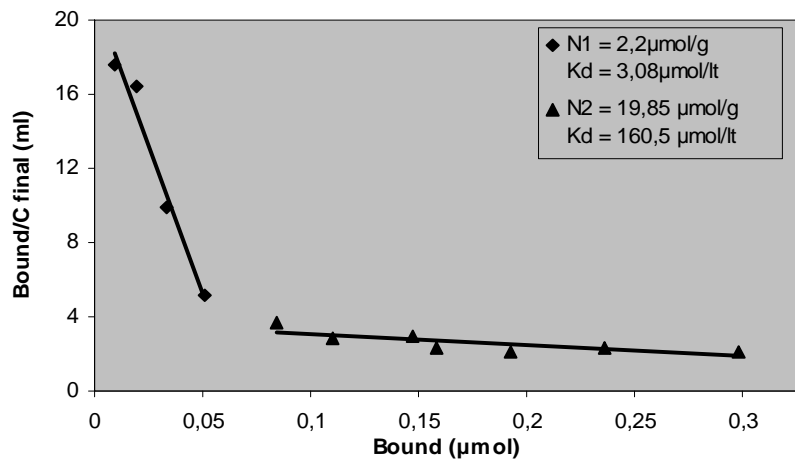
Για την εκτίμηση της προσροφητικής ικανότητας των πολυμερών πραγματοποιήθηκαν πειράματα στατικής επαναδέσμευσης (βλ 3.3.2). Οι ισόθερμες προσρόφησης που προέκυψαν εφαρμόστηκαν στο μοντέλο διακριτής κατανομής bi-Lamguir και στο μοντέλο συνεχούς κατανομής Freundlich. Για κάθε ένα από τα μοντέλα κατανομής υπολογίστηκαν η σταθερά δέσμευσης και ο αριθμός σημείων δέσμευσης. Οι συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης των πειραμάτων στατικής επαναδέσμευσης περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.3.

##### 4.4.1 Ισόθερμη προσρόφησης κερκετίνης- Εφαρμογή σε μοντέλα διακριτούς και συνεχούς κατανομής

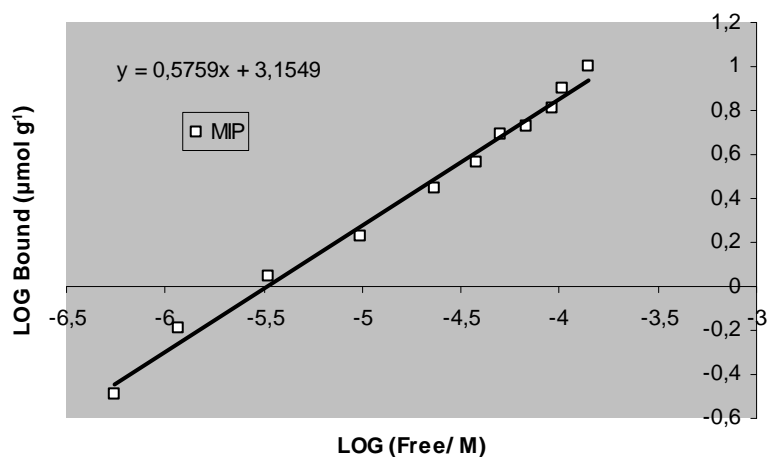


Σχήμα 6 : Γραφική απεικόνιση της ισόθερμης δέσμευσης της κερκετίνης στο mip1/nip1

Παρατηρείται ότι η προσροφητική ικανότητα του μοριακού αποτυπωμένου πολυμερούς mip1 είναι μεγαλύτερη από την προσροφητική ικανότητα του μη αποτυπωμένου πολυμερούς nip1. Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στην ικανότητα της κερκετίνης να δημιουργεί κατά τον πολυμερισμό ειδικές θέσεις δέσμευσης στο πολυμερές. Ακολούθησε ανάλυση των ισόθερμων δέσμευσης του πολυμερούς τόσο με το μοντέλο διακριτής κατανομής bi-Lamguir (σχήμα 7) όσο και με το μοντέλο συνεχούς κατανομής Freundlich (σχήμα 8). Για κάθε ένα από τα μοντέλα κατανομής υπολογίστηκαν η σταθερά δέσμευσης και ο αριθμός σημείων δέσμευσης τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 5 .



Σχήμα 7: Εφαρμογή ισόθερμης δέσμευσης με μοντέλο διακριτής κατανομής bi-Langmuir σε μορφή Scatchard plot



Σχήμα 8 : Εφαρμογή ισόθερμης δέσμευσης με μοντέλο συνεχούς κατανομής Freundlich σε log-μορφή

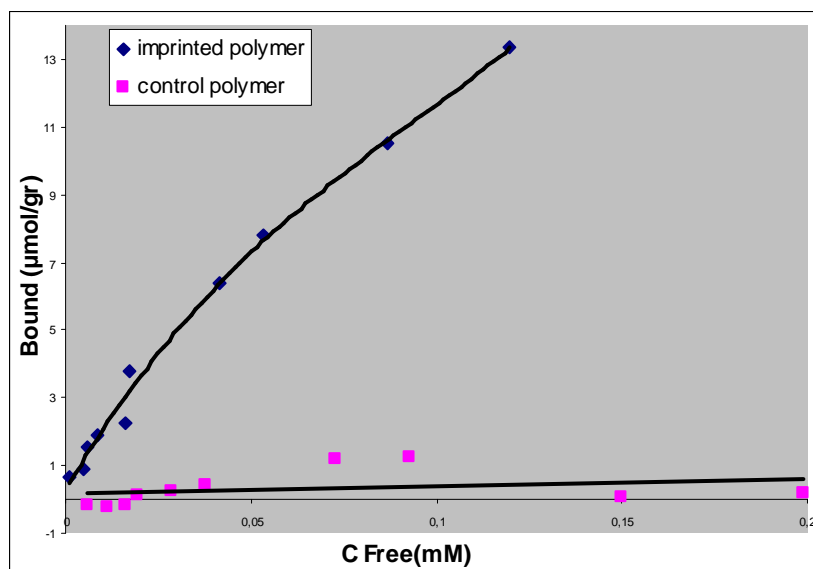
**Πίνακας 5:** Παράμετροι δέσμευσης από την προσομοίωση των ισόθερμων δέσμευσης με τα μοντέλα bi-Lamguir και Freundlich

MIP 1(Querc)	
Μοντέλο Διακριτούς Κατανομής bi-Lamguir	
$K_d$ υψηλής συγγένειας	3,08 $\mu$ mol/lit
$N_1$ ( $\mu$ mol/gr) υψηλής συγγένειας	2,2 $\mu$ mol/gr
$K_d$ χαμηλής συγγένειας	160,5 $\mu$ mol/lit
$N_2$ ( $\mu$ mol/gr) χαμηλής συγγένειας	19,85 $\mu$ mol/gr
Μοντέλο συνεχούς κατανομής Freundlich	
$\alpha$	1428,565
$m$	0,5759
$N_{K_1-K_2}$ ( $\mu$ mol/gr)	5,53 $\mu$ mol/gr
$\bar{K}_d$ ( $\mu$ M)	10,4 $\mu$ M
$K_a$	$9,54 \times 10^4 M^{-1}$

$$* K_1-K_2 = 180,32 \times 10^4 M^{-1} - 0,71 \times 10^4 M^{-1}$$

Οι σταθερές δέσμευσης που υπολογίστηκαν με βάση τα μοντέλα bi-Lamguir και Freundlich δεν παρουσιάζουν απόκλιση. Η προκύπτουσα σταθερά  $m(0,5759)$  δείχνει ότι ο βαθμός απόδοσης της αποτύπωσης ήταν αρκετά ικανοποιητικός και ότι υπάρχει ομοιογένεια των θέσεων δέσμευσης(δημιουργία ειδικών θέσεων δέσμευσης). Τα αποτελέσματα του πειράματος στατικής επαναδέσμευσης συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της αποτίμησης της μοριακής αποτύπωσης με HPLC(βλ 4.4.1). Επιβεβαιώνεται λοιπόν ότι μέσω της τεχνικής της μοριακής αποτύπωσης παρασκευάστηκαν αποτυπώματα με υψηλή σταθερά επαναδέσμευσης του υποστρώματος(πίνακας 5).

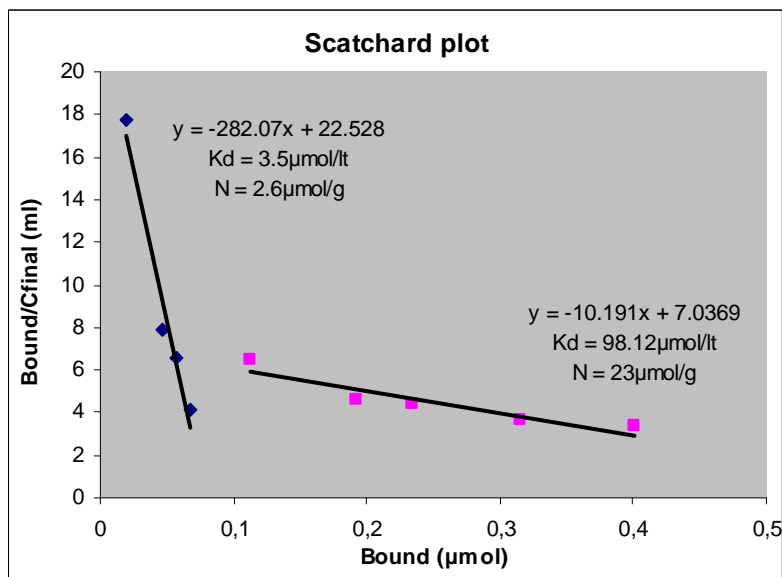
#### 4.4.2 Ισόθερμη προσρόφησης ΤΟΑΑ- Εφαρμογή σε μοντέλα διακριτούς και συνεχούς κατανομής



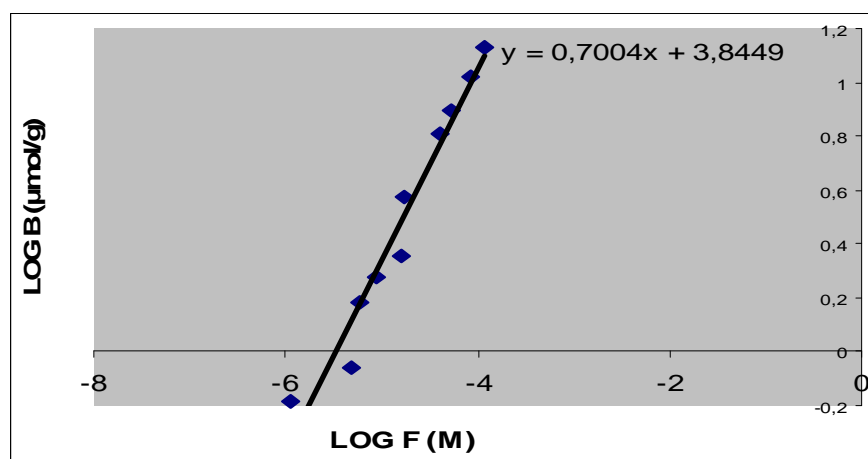
Σχήμα 9 : Γραφική απεικόνιση της ισόθερμης δέσμευσης της ΤΟΑΑ στο mip1-nip1

Παρατηρείται ότι η προσροφητική ικανότητα του μοριακού αποτυπωμένου πολυμερούς mip2 είναι πολύ μεγαλύτερη από την προσροφητική ικανότητα του μη αποτυπωμένου πολυμερούς nip2. Συγκεκριμένα φαίνεται στο σχήμα 9 ότι η καμπύλη προσρόφησης του nip2 πλησιάζει τον άξονα x. Αποδεικνύεται ακόμη μία φορά (βλ 4.3.2) ότι στο πολυμερές σώμα δεν έχουν δημιουργηθεί μη ειδικές θέσεις δέσμευσης.

Ακολούθησε ανάλυση των ισόθερμων δέσμευσης του πολυμερούς τόσο με το μοντέλο διακριτής κατανομής bi-Lamguir (σχήμα 10) όσο και με το μοντέλο συνεχούς κατανομής Freundlich(σχήμα 11). Για κάθε ένα από τα μοντέλα κατανομής υπολογίστηκαν η σταθερά δέσμευσης και ο αριθμός σημείων δέσμευσης τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 6 .



Σχήμα 10 : Εφαρμογή ισόθερμης δέσμευσης με μοντέλο διακριτής κατανομής bi-Langmuir σε μορφή Scatchard plot



Σχήμα 11 : Εφαρμογή ισόθερμης δέσμευσης με μοντέλο συνεχούς κατανομής Freundlich σε log-μορφή

**Πίνακας 6 :** Παράμετροι δέσμευσης από την προσομοίωση των ισόθερων δέσμευσης με τα μοντέλα bi-Lamguir και Freundlich

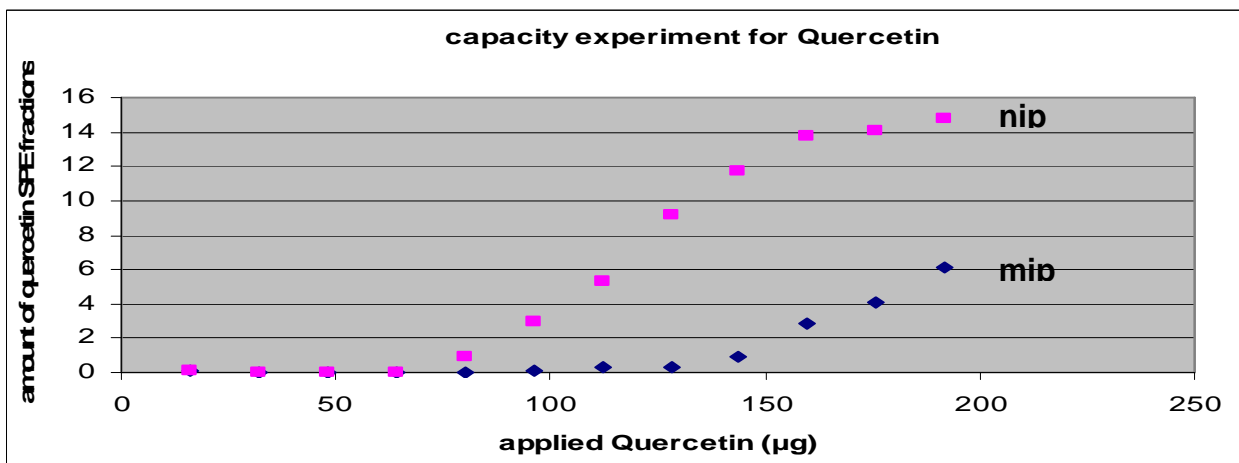
MIP 2(TOAA)	
Μοντέλο Διακριτούς Κατανομής bi-Lamguir	
$K_d$ υψηλής συγγένειας	3,5 $\mu\text{mol/l}$ t
$N_1$ ( $\mu\text{mol/gr}$ ) υψηλής συγγένειας	2,6 $\mu\text{mol/gr}$
$K_d$ χαμηλής συγγένειας	98,12 $\mu\text{mol/l}$ t
$N_2$ ( $\mu\text{mol/gr}$ ) χαμηλής συγγένειας	23 $\mu\text{mol/gr}$
Μοντέλο συνεχούς κατανομής Freundlich	
$\alpha$	6996,809
$m$	0,7004
$N_{K_1-K_2}$ ( $\mu\text{mol/gr}$ )	3,46 $\mu\text{mol/gr}$
$\bar{K}_d$ ( $\mu\text{M}$ )	16 $\mu\text{M}$
$K_a$	6,24x10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup>

$$*K_1-K_2 = 91,13x 10^4 M^{-1} - 0,83x10^4 M^{-1}$$

Οι σταθερές δέσμευσης που υπολογίστηκαν με βάση τα μοντέλα bi-Lamguir και Freundlich δεν παρουσιάζουν απόκλιση. Η προκύπτουσα σταθερά  $m(0,70041)$  δείχνει ότι ο βαθμός απόδοσης της αποτύπωσης(βλ 2.5.2) ήταν καλός καθώς υπάρχει μεγάλη ομοιογένεια των θέσεων δέσμευσης(δημιουργία ειδικών θέσεων δέσμευσης). Τα αποτελέσματα αυτά συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της αποτίμησης της μοριακής αποτύπωσης με HPLC(βλ 4.4.2).

#### 4.5 Αποτελέσματα Πειράματος Εκχύλισης Στερεής Φάσης(SPE)- Υπολογισμός χωρητικότητας στηλών (spe)

Η χωρητικότητα των στηλών MIP-SPE εκτιμήθηκε με πειράματα ανάκτησης του υποστρώματος στη στήλη του αποτυπωμένου πολυμερούς σε σύγκριση πάντα με τη στήλη του τυφλού πολυμερούς. Συγκεκριμένα αφού η στήλη MIP-SPE εξισορροπήθηκε, πραγματοποιήθηκε φόρτωση διαλύματος του υποστρώματος στη στήλη με διαδοχικές φορτώσεις των 12\*16 $\mu\text{g/ml}$  κερκετίνης. Μετά το πέρας των φορτώσεων (στάδιο load) ακολούθησε ξέπλυμα της στήλης αρχικά με μη πολικό (στάδιο wash) και στη συνέχεια με πολικό διαλύτη (στάδιο elute). Μετά από κάθε στάδιο το έκλουσμα συλλέχθηκε και με κατάλληλη προεργασία (βλ 3.3.3) αναλύθηκε χρωματογραφικά.



Σχήμα 12: Αποτελέσματα πειραμάτων εκχύλισης στερεής φάσης(στάδιο 2<sup>ο</sup>)- προσδιορισμός χωρητικότητας τυφλού-αποτυπωμένου πολυμερούς.

Η χωρητικότητα των στηλών SPE προσδιορίστηκε όπως φαίνεται και στο σχήμα, ως 144µg/100mg για την mip στήλη και 80µg/100mg για την nip στήλη.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης των δειγμάτων που παραλήφθηκαν από τα στάδια 2,3,4.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα πειράματος εκχύλισης στερεής φάσης

Πείραμα εκχύλισης SPE		
Querc	NIP (µg)	MIP (µg)
Φόρτωση	192	192
Ρόφηση	80	144
Ξέπλυμα	12,741	8,067
Έκλουση	42,958	73,398

Η χωρητικότητα του αποτυπωμένου πολυμερούς(144µg/100mg) είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν του τυφλού πολυμερούς(80µg/100mg). Όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα το αποτυπωμένο πολυμερές έχει την ικανότητα να δεσμεύει ισχυρά και ειδικά την κερκετίνη αφού είναι απαραίτητη η χρήση πολικού διαλύτη για να επιτευχθεί η απομάκρυνση της από τις κοιλότητες του αποτυπωμένου πολυμερούς. Οι ιδιότητες του αποτυπωμένου πολυμερούς οφείλονται στην ικανότητα της κερκετίνης να δημιουργεί κατά τον πολυμερισμό ειδικές θέσεις δέσμευσης.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο HIF-1 αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος είναι υπεύθυνος για τις κυτταρικές και συστηματικές αποκρίσεις στην υποξία και κατέχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία του ανθρώπου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμπλοκή του HIF-1 στην ογκογένεση. Σε πολλές καρκινικές σειρές κυττάρων έχουν ανιχνευθεί υψηλά επίπεδα του HIF-1 και έχουν να κάνουν με την προσπάθεια της επιβίωσης των ταχύτατα πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων εξαιτίας της ελλιπούς αιμάτωσης και οξυγόνωσης σε αυτές τις περιοχές. Έχει δειχθεί επίσης ότι ο HIF-1 μπορεί να προάγει την διεισδυτικότητα και την αθανασία των καρκινικών κυττάρων (*Semenza G., 2003*). Τα παραπάνω κάνουν φανερή την προοπτική της χρησιμοποίησης του HIF-1 ως στόχο αντικαρκινικής θεραπείας μέσω αναστολής της μεταγραφικής του ενεργότητας.

Για τις περισσότερες κυτταρικές διαδικασίες που σχετίζονται με την επαγωγή και την ενεργοποίηση του HIF-1 έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα αρκετοί αναστολείς [Nagle]. Οι αναστολείς αυτοί είναι αποτελεσματικοί *in cellulo* (σε κυτταροκαλλιέργειες), όμως οι περισσότεροι από αυτούς δεν βρίσκουν εφαρμογές *in vivo* ως φάρμακα εξαιτίας π.χ. μεταβολικής αστάθειας ή τοξικότητας. Και σήμερα η αναζήτηση νέων βιοδραστικών ενώσεων-πρόδρομων φαρμάκων που στοχεύουν τον HIF-1, είναι έγκυρο φαρμακευτικό ζήτημα.

Μία νέα και ιδιαίτερα υποσχόμενη στρατηγική αναζήτησης βασίζεται στην μοριακή αποτύπωση των ήδη γνωστών *in cellulo* αναστολέων ή υποστρωμάτων των ενζύμων και υποδοχέων που εμπλέκονται στη διαδικασία, μονοπάτι στόχο και μετέπειτα χρήση των αποτυπωμάτων για την ανίχνευση και απομόνωση νέων βιοδραστικών ενώσεων. Με αποτύπωση γίνεται συνθετική τρισδιάστατη αναπαράσταση στη μάζα του πολυμερούς των θέσεων δέσμησης των αναστολέων/υποστρωμάτων στα αντίστοιχα ένζυμα και υποδοχείς. Το πολυμερές αυτό μπορεί να αναγνωρίσει και να συγκρατήσει μόνο τις ουσίες που έχουν στερεοχημική και λειτουργική ομοιότητα με το αποτυπωμένο μόριο και ως αποτέλεσμα έχουν την δυνατότητα να εισχωρήσουν και να συγκρατηθούν στις αποτυπωμένες κοιλότητες. Στερεοχημική και λειτουργική ομοιότητα όμως προϋποθέτει και ανάλογη βιοδραστικότητα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η δημιουργία μοριακών αποτυπωμάτων με ικανότητα ανίχνευσης, εκλεκτικής δέσμησης και απομόνωσης αναστολέων του

HIF-1α. από διαφορά υποστρώματα (π.χ. βιβλιοθήκες χημικών ενώσεων, εκχυλίσματα φυτών).

Επιλέχθηκαν να αποτυπωθούν η ουσία κερκετίνη η οποία είναι γνωστός αναστολέας των MAPK κινασών που επάγουν την μεταγραφική ικανότητα του HIF-1 και η ουσία τρι-ακετυλοαδενοσίνη(ΤΟΑΑ) η οποία είναι ανάλογο ATP, συμπαράγοντα των πρωτεϊνικών κινασών.

Συνοπτικά, πραγματοποιήθηκε παρασκευή μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών για την κερκετίνη και την ΤΟΑΑ και τα πολυμερή σώματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα χρωματογραφίας, στατικής επαναδέσμευσης και εκχύλισης στερεής φάσης(μόνο για κερκετίνη) με στόχο τον προσδιορισμό της απόδοσης της μοριακής αποτύπωσης. Μη μοριακώς αποτυπωμένα πολυμερή παρασκευάστηκαν με την ίδια διαδικασία αλλά απουσία υποστρώματος και χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλό-μάρτυρες για την εκτίμηση του αποτελέσματος της αποτύπωσης.

Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερος ενθαρρυντικά. Το παρασκευασθέν πολυμερές για την κερκετίνη δεσμεύει ειδικά το υπόστρωμα με συντελεστή αποτύπωσης  $IF_1 = 6,6$  και παρουσιάζει μέση έως υψηλή συγγένεια ως προς το υπόστρωμα με  $Ka = 9,54 \times 10^4 M^{-1}$ . Από τα δύο αυτά αποτελέσματα που προέκυψαν από πειράματα χρωματογραφίας HPLC-MIP και από πειράματα στατικής επαναδέσμευσης αντίστοιχα, προκύπτει ότι στο μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές έχουν δημιουργηθεί ειδικές θέσεις δέσμευσης οι οποίες είναι ικανές να ανιχνεύσουν και να δεσμεύσουν ειδικά την κερκετίνη και ανάλογες ενώσεις.

Επιτυχής ήταν και η μοριακή αποτύπωση της ΤΟΑΑ. Το παρασκευασθέν πολυμερές (MIP-ΤΟΑΑ) δεσμεύει ειδικά το υπόστρωμα με συντελεστή αποτύπωσης  $IF_2 = 31,2$ . Η απόδοση της αποτύπωσης ήταν αρκετά υψηλή καθώς  $IF=31,2$  είναι από τους μεγαλύτερους βαθμούς αποτύπωσης που υπάρχουν στην βιβλιογραφία. Επίσης από τα πειράματα στατικής επαναδέσμευσης προσδιορίστηκε ότι το αποτυπωμένο πολυμερές παρουσιάζει μέση έως υψηλή συγγένεια ως προς το υπόστρωμα με  $Ka = 6,24 \times 10^4 M^{-1}$ .

Εφόσον τα μοριακά αποτυπώματα που προέκυψαν έχουν την ικανότητα ειδικής δέσμευσης του αρχικού υποστρώματος προσδοκείται ότι θα μπορούν να ανιχνεύουν και να δεσμεύουν ειδικά ομόλογες ενώσεις. Ως μελλοντικός στόχος τίθεται η στοχευόμενη αναζήτηση και απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων από

φυσικές πηγές όπως είναι τα βότανα με ενδείξεις αντικαρκινικής δράσης από επιδημιολογικές μελέτες και εφαρμογές της παραδοσιακής ιατρικής.

Σε αυτό το πλάνο κινήθηκε και η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία. Αναλυτικότερα και όσο αναφορά τη μελέτη ολόκληρου του εργαστηρίου χρησιμοποιήθηκε το αποτύπωμα της κεκρετίνης για την απομόνωση νέων αναστολέων του HIF-1α από εκχυλίσματα της ρητίνης *Boswellia Serrata*. Το 3-O-Ακέτυλο-11-κετο-β-μποςβελλικό οξύ (AKBA) το οποίο απομονώθηκε με την τεχνική αυτή και βρέθηκε εν συνεχεία ότι αναστέλλει τα επίπεδα της σύνθεσης του HIF-1α [Lakka et al 2010], στην παρούσα διπλωματική εργασία διαπιστώθηκε ότι συγκρατείται ειδικώς στο πολυμερές με συντελεστή αποτύπωσης IF=1,6.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Τσακάλωφ Α. Έφαρμογή της τεχνικής της μοριακής αποτύπωσης στη στοχευόμενη απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων για την ρύθμιση της ανταπόκρισης των κυττάρων στην υποξία',(2010)
- Alexander C., Andersson H.S., Andersson L.I., Ansell R.J., Kirsch N., Nicholls I.A., O'Mahony J., Whitcombe M.J., 'Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003', *J. Mol. Recognit.*, 19 (2006) 106–180
- Auld DS, Diller D and Ho KK, Targeting signal transduction with large combinatorial collections. *Drug Discov Today* 7(24): 1206-13, 2002.
- Berra, E. et al., (2000), Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1171–1178
- Caro E., Marcé R.M., Cormack P.A.G., Sherrington D.C., Borrull F., 'Synthesis and application of an oxytetracycline imprinted polymer for the solid-phase extraction of tetracycline antibiotics', *Anal. Chim. Acta* 552 (2005) 81-86
- Chen, E. Y., Mazure, N. M., Cooper, J. A. & Giaccia, A. J. ,(2001), Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res.* 61, 2429–2433
- Cormack P.A.G., Elroza A.Z., 'Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization', *J. Chromatogr. B*, 804 (2004) 173-182
- Dery Marc-Andre C., Maude D. Michaud, Darren E. Richard, (2005), Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* , 37 535–540
- Giovanna Scapin, 'Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors', 11(2002)
- G.Vlatakis, L.I.Andersson, R.Muller et K.Mosbach, 'Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular imprinting', *Nature*, 381, p.645-647(1993)
- Fukuda R. (2002), Insulin like growth factor 1 induces HIF-1-mediated VEGF expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling in colon cancer cells. *J Biol Chem*, 277:38205-11
- Graham A.L., Carlson C.A., Edmiston P.L., 'Development and characterization of molecularly imprinted sol-gel materials for the selective detection of DDT', *Anal. Chem.*, 74 (2002) 458-467
- G. Vlatakis, L. Andersson, R. Muller, 'Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting', *Nature* (1993)
- Harris AL (2002) Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2(1):38-47.
- Hellwig-Burgel, T., Stiehl, D. P. & Jelkmann, W. in *Oxygen Sensing: Responses and Adaptation to Hypoxia* (eds Lahiri, S., Semenza, G. L. & Prabhakar, N. R.) 95–108 (Marcel Dekker, Inc., New York, 2003).
- Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY., (2002), Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 by pVHL. *Nature*, 417:975-8
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of HIF-1 $\alpha$ ., *J Biol Chem* 1996;271:17771-8

- Jiang BH, Agani F, Passaniti A and Semenza GL (1997) V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 57(23):5328-5335
- Kandimalla VB and Ju H, Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* 380(4): 587-605, 2004.
- K.Mosbach and O.Ramstrom, 'The Emerging Technique of Molecular Imprinting and its Future Impact on Biotechnology' 14,p163-170(1996)
- Komiyama M., Takeuchi T., Mukawa T.and Asanuma H. eds, 'Molecular Imprinting: From fundamentals to applications' 2003, Germany, pp 2-5, Wiley-VCH,
- Koong, A. C. et al., (2000), Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res.* 60, 883–887
- Lai E.P.C., Wu S.G., 'Molecularly imprinted solid phase extraction for rapid screening of cephalexin in human plasma and serum', *Anal. Chim. Acta* 481 (2003) 165-174
- Lakka, I.Mylonis, S.Bonanou, G.Simos and A.Tsakalof, 'Isolation of hypoxia-inducible factor1(HIF-1) inhibitors from frankincense using molecularly imprinted polymer', *Investigational New Drugs*,2010.
- Laughner E., (2001), HRE2 signaling increases the rate of HIF-1 $\alpha$  synthesis: novel mechanism for HIF-1 mediated VEGF expression. *Mol Cell Biol*, 21:3995-4004
- Lei Ye. Klaus Mosbach, 'The development of artificial antibodies by molecular imprinting', Lund University
- Li H, Ko HP, Whitlock JP., (1996), Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of ARNT and HIF1 $\alpha$ . *J Biol Chem* , 271:21262-7
- Mayes A.G., Mosbach K., 'Molecularly Imprinted Polymer beads: Suspension polymerization using a liquid Perfluorocarbon as the dispersing phase', *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3769-3774
- Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP., (2002), Structure of an HIF-1 $\alpha$ -pVHL complex: Hydroxyproline recognition in signalling. *Science* 296:1886-9
- Mottet D, Ruvs SP, Demazy C, Raes M.,Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity, *Int J Cancer*, 2005, 117(5):764-74
- Mylonis I, Chachami G., Samiotaki M., Panayotou G, Paraskeva E., Kalousi A., Georgatsou E., Bonanou S., and Simos G. (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , *J Biol Chem*,281(44): 33095-33106
- Nagle, 'Natural product-based inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)', University Mississippi MS 38677-1848 USA(2006)
- Pérez N., Whitcombe M. J., Vulfson E. N., 'Molecularly imprinted nanoparticles prepared by core-shell emulsion polymerization' *J. Appl. Pol. Sci.*, 77 (2000) 1851–1859
- Pérez-Moral N., Mayes A.G., 'Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods', *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 15–21
- Rampley AM, Umpleby RJ 2<sup>nd</sup>, Iceman JC, Shimizu KD, 'Characterization of the imprint effect and the influence of imprinting conditions on affinity,

- capacity and heterogeneity in molecularly imprinted polymers using the Freundlich isotherm-affinity distribution analysis', Uth South Carolina 2004.
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL and Bedi A (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14(1):34-44.
  - Richard D.E., E. Berra, E. Gothie, D. Roux, J. Pouyssegur, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 32631–32637
  - Sánchez-Barragán I., Karim K., Costa-Fernández J.M., Piletsky S.A., Sanz-Medel A., 'A molecularly imprinted polymer for carbaryl determination in water', *Sensors and Actuators B*,123 (2007) 798–804
  - S.Borman, 'Two Ways to Shape New Drugs', *Chemical and Engineering News*,81, p4459-4463(2003)
  - Schirmer C., Meisel H., 'Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the selective solid-phase extraction of chloramphenicol from honey', *Journal of Chromatography A*, 1132 (2006) 325-328
  - Sellergren B., 'Molecular imprinting by noncovalent interactions. Enantioselectivity and binding capacity of polymers prepared under conditions favoring the formation of template complexes', *Makromol. Chem.*, 190 (1989) 2703– 2711.
  - Sellergren B., 'Molecularly imprinted polymers: Man-made mimics of antibodies and applications in analytical chemistry', 2001, pp1-11, Elsevier
  - Sellergren B., Shea K.J., 'Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers', *J. Chromatography A*, 635 (1993) 31-49 Sellergren B., *TrAC, Trends Anal.Chem.*, 18 (1999) 164-174
  - Sellegren, 'Molecular imprinted polymers: Man made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry' Elsevier
  - Semenza GL., (2003), Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3:721-32
  - Sherrington D.C., 'Preparation, structure and morphology of polymer supports', *Chem. Comm.*,21 (1998) 2275-2286
  - Sodhi A., S. Montaner, V. Patel, M. Zohar, C. Bais, E.A. Mesri, J.S. Gutkind, *Cancer Res.* 60 (2000) 4873– 4880
  - Spivak D.A., 'Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers', *Advanced Drug Delivery Reviews* 57(2006) 1779– 1794
  - Theodoridis G., Kantifes A., Manesiotis P., Raikos N., Tsoukali-Papadopoulou H., 'Preparation of a molecularly imprinted polymer for the solid-phase extraction of scopolamine with hyoscyamine as a dummy template molecule', *J. Chromatography A* 987 (2003) 103-109
  - Triantafyllou. A, I.Mylonis,G.Simos,S.Bonanou and A.Tsakalof, 'Flavonoids induce HIF-1 $\alpha$  but impair its nuclear accumulation and activity', *Laboratory of Biochemistry, University of Thessaly*(2007)
  - Umpleby II R.J., Baxter S.C., Rampey A.M., Rushton G.T., Chen Y., Shimizu K.D., 'Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers', *J.Chromatography B*, 804 (2004) 141– 149
  - Villamena F.A., De La Cruz A.A., 'Caffeine selectivity of divinylbenzene crosslinked polymers in aqueous media', *J. Appl. Polym. Sci.*, 82 (2001) 195– 205.

- Xie J, Zhu L, Luo H, Zhou L, Li C and Xu X, Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginkgo leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin. *J Chromatogr A* 934(1-2): 1-11, 2001.
- Xu X, Zhu L, Chen L, 'Separation and screening of compound of biological origin using molecularly imprinted polymers', *J Chromatography*, 804(2004).
- Ye L and Haupt K, Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery. *Anal Bioanal Chem* 378(8): 1887-97, 2004.
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL and Simons JW (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59(22):5830-5835
- Zhong H., (2000) , Modulation of HIF-1 $\alpha$  expression by the epidermal growth factor/PI3K/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics, *Cancer Res* 260:1541-5
- Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ., (2000), Loss of PTEN facilitates HIF-1- mediated gene expression, *Genes Dev* 14:391-6