



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΙΩΑΝΝΑ ΓΑΚΑ

Διπλωματική Εργασία

**«N-AΙΘΥΛΟ-4-ΑΛΟΓΟΝΟΦΑΙΝΥΛΟ ΠΥΡΡΟΛΕΣ :
ΣΥΝΘΕΣΗ,ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ,ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ»**

ΛΑΡΙΣΑ 2016

Διπλωματική Εργασία

«N-αίθυλο-4-αλογονο-φαινυλο πυρρόλες: σύνθεση, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιική αποτίμηση»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης Δημήτριος - Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης - Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αμουτζάς Γρηγόριος – Επ. Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Δημητρίου Κομιώτη.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κομιώτη, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την εκπόνησή της.

Τις θερμές ευχαριστίες μου οφείλω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα. Στυλιανή Μαντά για τη συνεχή παρακολούθηση και υποστήριξή της.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο τη σύνθεση και βιολογική αποτίμηση N-αιθυλο-4-αλογονοφαινυλο-πυρρολών. Αυτό επιτεύχθηκε σε μία αντίδραση ενός σταδίου με την χρήση τριών αντιδραστηρίων. Τα αντιδραστήρια αυτά ήταν διαιθυλικό οξαλοξικό άλας, αιθυλαμίνη και 4-αλογονο βενζαλδεΐδη (όπου αλογόνο X=F,Cl,I). Όλες οι νεοσυντιθέμενες ενώσεις μελετήθηκαν ως προς την κυτταροτοξική και αντιϊική τους δράση. Οι δομές όλων των προϊόντων ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H NMR).

ABSTRACT

The main focus of the present thesis was the synthesis and biological evaluation of N-ethylo-4-pyrroles. This was achieved in an one-step multi component reaction using diethyl oxalacetate, primary amines and 4-alogen-benzaldehyde. All the newly synthesized compounds were evaluated for their cytotoxic and antiviral activity. The structures of all the newly synthesized products were determined by using ^1H NMR spectroscopy.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Καρκίνος.....	7
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά καρκίνου.....	7
1.1.2 Μοριακοί μηχανισμοί σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα.....	8
1.1.3 Περιστατικά καρκίνου.....	9
1.1.4 Ανάπτυξη φαρμάκων για την καταπολέμηση του καρκίνου.....	10
1.1.5 Μοριακοί θεραπευτικοί στόχοι των καρκινικών κυττάρων.....	10
1.2 Οξειδωτικό Στρες-Αντιοξειδωτικά-Καταπολέμηση.....	11
1.2.1 Οξειδωτικό Στρες.....	11
1.2.2 Αντιοξειδωτικά-Καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες.....	11
1.2.3 Πρόληψη.....	11
1.2.4 Αναχαίτηση.....	12
1.2.5 Πυρρολιδίνες.....	14
1.2.6 Vindesine.....	15
1.2.7 Piracetam.....	15
1.2.8 Clausenamide.....	15
1.2.9 Atrovastatine.....	16
1.2.10 Σύνθεση πυρρολινονών.....	17
1.2.11 Αντίδραση Mannich.....	18
1.2.12 Αντίδραση πολλών συστατικών (MCRs).....	18
1.2.13 Χρήση μικροκυμάτων.....	19
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	20
3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC).....	21
3.2 Χρωματογραφία Στήλης.....	22
3.3 Ταυτοποίηση Ενωσης.....	23
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
4.1 Σύνθεση 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.....	25
4.2 Σύνθεση 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-χλωροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.....	26
4.3 Σύνθεση 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-ιωδοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.....	27
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	28
6. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΚΡΩΝΥΜΙΩΝ.....	29
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	30

1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1.1 Γενετική των καρκινικών κυττάρων

Στο ανθρώπινο σώμα, τα κύτταρα συνεχώς πεθαίνουν και αντικαθίστανται. Φυσιολογικά, το σώμα δημιουργεί καινούρια κύτταρα αντιγράφοντας τα παλαιότερα. Σε σπάνιες περιπτώσεις όμως, κατά την αντιγραφή ενσωματώνονται "λάθη" στα νεοσχηματισμένα κύτταρα. Εάν το λάθος συμβεί στο γενετικό υλικό του κυττάρου, αυτό ονομάζεται "μετάλλαξη". Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι ακίνδυνες και το αποτέλεσμά τους εξαρτάται από το εάν συμβούν σε ζωτικής σημασίας γονίδιο ή όχι. Οι περισσότερες των μεταλλάξεων είναι ακίνδυνες καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό του συνόλου του γενετικού υλικού αποτελεί "λειτουργικά" γονίδια (κατά προσέγγιση μόνο το 1,5% του συνολικού γονιδιώματος κωδικοποιεί "λειτουργικά" γονίδια, και ο αριθμός των "λειτουργικών" γονιδίων όπως αυτός περιγράφεται στο *Human Genome Project* είναι περίπου 30.000). Κατά συνέπεια, η πιθανότητα οποιαδήποτε δεδομένη μετάλλαξη να συμβεί σε ένα σημαντικό γονίδιο και να οδηγήσει σε αλλαγές στην λειτουργία ή σε προϊόντα του κυττάρου είναι σχετικά μικρή. Συνήθως, χρειάζονται πολλά σετ μεταλλάξεων για να δημιουργηθεί ένα αθροιστικό αποτέλεσμα το οποίο θα τροποποιήσει τα κύτταρα. Όμως, η πιθανότητα να επηρεαστεί ένα κύτταρο αυξάνεται εάν η πρώτη μετάλλαξη συμβεί σε γονίδιο που ευθύνεται για την αποτροπή ή επιδιόρθωση άλλων μεταλλάξεων. Επιπροσθέτως, λόγω αποτελεσματικών αυτο-διορθωτικών μηχανισμών που σχεδόν όλοι οι επιτυχημένοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει, οι περισσότεροι καρκίνοι που προέρχονται από αυτή τη διαδικασία αθροιστικών μεταλλάξεων είναι σποραδικοί και δεν κληροδοτούνται στις επόμενες γενιές.

Σε σπάνιες περιπτώσεις όπου η μετάλλαξη συμβαίνει σε γαμετικά κύτταρα, μπορεί να κληροδοτηθεί στους απογόνους του οργανισμού. Αυτές οι μεταλλάξεις αποτελούν το περίπου 3-5% του συνολικών περιπτώσεων καρκίνου. Συνηθέστερα, συμβαίνουν όταν τα κύτταρα των ωοθηκών και των όρχεων, στα οποία δημιουργούνται τα ωάρια και το σπέρμα, περιέχουν τη μετάλλαξη, και όταν ο οργανισμός αναπαράγεται αυτές οι μεταλλάξεις κληρονομούνται στους απογόνους. Παρόλο που γενικά μία μετάλλαξη από μόνη της δεν οδηγεί σε καρκίνο, άνθρωποι που έχουν κληρονομήσει τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι ένα βήμα πιο κοντά στο να αναπτύξουν καρκίνο σε σχέση με ανθρώπους που δεν έχουν τέτοια διαφοροποιημένα γονίδια. Μερικές ευρέως γνωστές καρκινικές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν αυτές που βρίσκονται σε κάποια από τα συγκεκριμένα γονίδια τα οποία σχετίζονται με ρυθμίσεις πρωτεϊνικής έκφρασης όπως τα BRCA1 και BRCA2 στον καρκίνο του στήθους και των ωοθηκών, και πρωτο-ογκογονίδια όπως το RET στον καρκίνο του κόλον (Πίνακας 1).

Επίκτητες μεταλλάξεις συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου και δεν

μεταβιβάζονται από τον γονέα στο παιδί. Η χρήση καπνού ή η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ιούς, το γήρας, και άλλοι παράγοντες είναι συχνά αίτια επίκτητων μεταλλάξεων οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν “σποραδικό καρκίνο”, ο οποίος είναι πολύ πιο συνήθης από ότι οι κληρονομήσιμοι τύποι καρκίνου. Σε ανθρώπους με σποραδικό καρκίνο, ορισμένα κύτταρα του σώματός τους (σωματικά κύτταρα) αναπτύσσουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε καρκίνο. Ακόμη, στον σποραδικό τύπο καρκίνου, μόνο τα κύτταρα του όγκου περιέχουν αυτές τις βλαβερές μεταλλάξεις. Εν αντιθέσει, στον κληρονομικό καρκίνο, κάθε κύτταρο στο σώμα του ανθρώπου περιέχει την μετάλλαξη, καθώς κάθε κύτταρο προέρχεται από το γαμετικό κύτταρο με το μεταλλαγμένο(α) γονίδιο(α). Όπως και στον σποραδικό καρκίνο, ένα σύνολο περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων ευθύνονται για τον οικογενειακό ή κληρονομικό τύπο καρκίνου. Στον Πίνακα 1 φαίνονται μερικά από τα γονίδια που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο στους ανθρώπους. (R. Paulmurugan, 2012)

Gene Name	Type of Gene	Syndrome
BRC1 and BRC2	DNA repair genes	Hereditary Breast/Ovarian Cancer
MSH2, MLH1, MSH6, PMS1, PMS2	DNA repair genes	Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer syndrome (HNPCC)
RET (Rearranged during transfection)	Proto- oncogene	Multiple Endocrine Neoplasia type 2a and 2b
PTEN	Tumor suppressor gene	Cowden syndrome
VHL μετάλλαξη στο 3P25.3:	Tumor suppressor gene	Renal angioma, renal cell carcinoma
p53 tumor suppressor gene	Tumor suppressor gene	Li-Fraumeni syndrome, breast cancer, brain tumors
Autosomal recessive genetic disorder	DNA repair genes	Xeroderma pigmentosa, metastatic malignant melanoma and squamous cell carcinoma

Πίνακας 1: Ελάττωμα σε σημαντικά κυτταρορυθμιστικά γονίδια οδηγεί σε κληρονομικούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο. (R. Paulmurugan, 2012)

1.1.2 Μοριακοί μηχανισμοί σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα

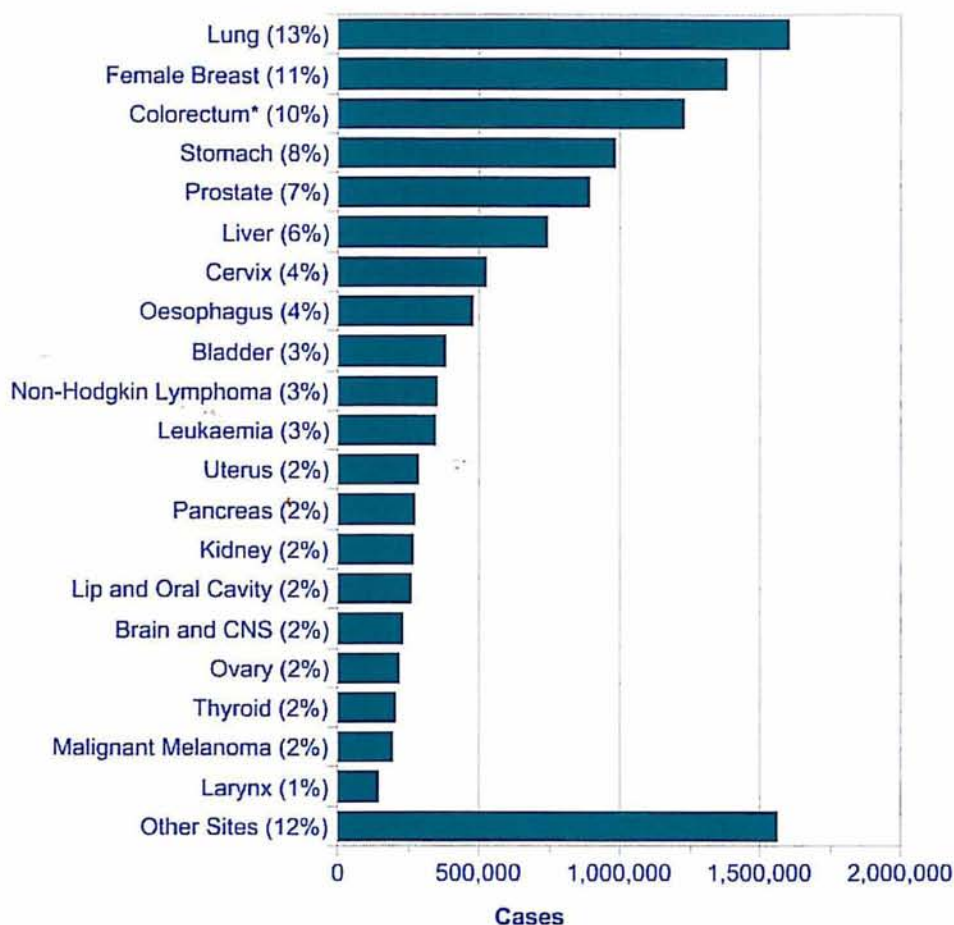
Οι φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες διαχειρίζονται και συντηρούνται από ένα δίκτυο συνεργατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αρκετών κυτταρικών μονοπατιών, τα οποία περιλαμβάνουν κυτταρικές κυκλικές πρωτεΐνες, ελεγχόμενη αποπτωτική διαδικασία, λειτουργικές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, υπεύθυνους κυτταρικούς υποδοχείς, ελεγχόμενο δίκτυο μεταφοράς σημάτων και ενεργούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA. Όλα μαζί, αυτά τα μονοπάτια δημιουργούν αυτό που είναι γνωστό ως οι «έξι σημαντικοί κανόνες», απαιτούμενοι για τη συντήρηση των κυττάρων σε φυσιολογική κατάσταση. Ο κληρονόμος διατηρεί την φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, αλλά εάν υπάρξει μία σημαντική ρωγμή σε οποιονδήποτε από τους

μηχανισμούς αυτού του κυκλώματος, μπορεί να οδηγήσει σε μία παθολογική κατάσταση του κυττάρου η οποία με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο. Επιπροσθέτως, κάθε ένας από αυτούς τους μηχανισμούς ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Σε αντιπαράθεση με τους έξι σημαντικούς κανόνες που απαιτούνται για τη διατήρηση των κυττάρων σε φυσιολογική κυτταρική κατάσταση, η ανάπτυξη του καρκίνου περιλαμβάνει μεταλλαγμένες ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, ενεργοποιημένη αγγειογένεση, απενεργοποιημένα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, αντι-αποπτωτικές ιδιότητες, ενεργό σήμα ανάπτυξης (growth signaling), και ανεπαρκή συστήματα επιδιόρθωσης DNA. (R. Paulmurugan, 2012)

1.1.3 Περιστατικά καρκίνου

Τα στατιστικά στοιχεία δείχνουν διπλασιασμό των περιστατικών καρκίνου τα τελευταία 20 χρόνια. Κάποιες από τις κυρίαρχες προτεινόμενες αιτίες που σχετίζονται με την εξάπλωση του καρκίνου περιλαμβάνουν αλλαγές στον τρόπο ζωής, όπως η αυξημένη χρήση διατηρημένων τροφών με χημικά συντηρητικά και διευρυμένη ημερήσια έκθεση σε διαφορετικές καρκινογόνες χημικές ενώσεις. Οι πιο συχνά διαγνωσμένοι τύποι καρκίνου παγκοσμίως σύμφωνα με εκτιμήσεις για το 2008 παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.

Προς το παρόν, η πρόληψη είναι το κλειδί για τη μείωση των περιστατικών καρκίνου και των θανάτων που συνδέονται με αυτόν. Σήμερα, οι κύριες μέθοδοι πρόληψης και θεραπείας είναι η έγκαιρη διάγνωση (υπέρηχος, CT, MRI, PET, SPECT), η χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και οι θεραπείες με ακτινοβολία. Για τις σχετικά λίγες περιπτώσεις καρκίνου που γνωρίζουμε ότι προκαλούνται από μολυσματικά στελέχη (infectious agents), υπάρχει η δυνατότητα χρήσης προληπτικών εμβολίων. (R. Paulmurugan, 2012)



Εικόνα 1: Οι 20 Πιο Συχνά Διαγνωσμένοι Τύποι Καρκίνου Παγκοσμίως, Εκτίμηση 2008. (Ferlay et al, 2008)

1.1.4 Ανάπτυξη φαρμάκων για καταπολέμηση του καρκίνου

Για την ανάπτυξη φαρμάκων κατά του καρκίνου, είναι πολύ σημαντικό να αναγνωριστεί ένας ή περισσότεροι μοριακοί στόχοι που να είναι διαφορετικοί ειδικά στα καρκινικά κύτταρα και να μην είναι διαθέσιμοι, ή να είναι διαθέσιμοι σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτοί μπορεί να περιλαμβάνουν υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου όπως είναι οι EGFR και VEGFR και η ιντεγκρίνη, ή άλλους μηχανισμούς όπως η σύνθεση του DNA ή καταστολείς του μεταλλαγμένου όγκου και ενεργοποιημένα ογκογονίδια. Ακόμη, ο καρκίνος είναι ετερογενούς φύσης, οπότε οι αναγνωρισμένοι μοριακοί στόχοι για έναν συγκεκριμένο τύπο καρκίνου μπορεί να μην είναι αποτελεσματικοί για κάποιον άλλο τύπο. Έτσι, απαιτείται ειδική στόχευση συγκεκριμένων μεμονωμένων ειδών καρκίνου, ή ίσως είναι δυνατή η αναγνώριση ενός κοινού μηχανισμού που να είναι αποτελεσματικός για μια πληθώρα τύπων καρκίνου. Η επιτυχημένη ανάπτυξη φαρμάκων κατά του καρκίνου απαιτεί την συνεργασία ειδικών σε διαφορετικά πεδία, συμπεριλαμβανομένων της βιοχημείας, κυτταρικής βιολογίας, μοριακής βιολογίας, και κλινικούς ειδικούς. (R. Paulmurugan, 2012)

1.1.5 Μοριακοί θεραπευτικοί στόχοι των καρκινικών κυττάρων

Έχουν ταυτοποιηθεί και ερευνηθεί πολλοί διαφορετικοί τύποι μοριακών στόχων με σκοπό την

ανάπτυξη και εφαρμογή φαρμάκων κατά του καρκίνου. Οι πρωτεύοντες στόχοι περιλαμβάνουν ενεργοποιημένες ογκογενετικές πρωτεΐνες ή μεταλλαγμένα μη-λειτουργικά ογκοκατασταλτικά γονίδια. Σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να λειτουργήσουν ως στόχοι για τη θεραπεία τα ειδικά χαρακτηριστικά του ιστού ή η διαφοροποίηση στο μονοπάτι. Για παράδειγμα, το οιστρογόνο δρα ως μιτογόνο στον ιστό του στήθους και είναι υπερδραστήριο στα καρκινικά κύτταρα του στήθους. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει μέσω ενός στεροειδούς υποδοχέα που ονομάζεται υποδοχέας οιστρογόνου (ER). Η αναστολή της δράσης των οιστρογόνων (με τη χρήση αντι-οιστρογόνου όπως είναι το *tamoxifen*), έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός τρόπος θεραπείας των ER-θετικών καρκίνων του στήθους. Ομοίως, το διαφοροποιημένο μονοπάτι που ξεκινά από τα διαφοροποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα (*hematopoietic lineage*) έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της προμυελοκυτικής λευχαιμίας (*promyelocytic leukemia*). Σε αυτήν την στρατηγική, κύτταρα σε καλοήγη κατάσταση προκαλούνται να προωθήσουν την ωρίμανση και διαφοροποίηση κυττάρων, ώστε να αποκτήσουν κακοήγη φαινότυπο. Ακολουθεί θεραπεία με στελέχη τα οποία μπορούν, μέσω ρύθμισης των γονιδίων, να προκαλέσουν απόπτωση και έτσι να "σκοτώσουν" αποτελεσματικά τα ογκοκύτταρα. Η οξεία προμυελοκυτική λευχαιμία, ένας τύπος της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας (*myeloid leukemia*), θεραπεύεται αποτελεσματικά με αυτή την τεχνική. Η χρήση του *all-trans* ρετινοϊκού οξέος (ATRA) έχει έτσι μετατρέψει ένα θανατηφόρο είδος λευχαιμίας σε έναν θεραπεύσιμο τύπο καρκίνου. (R. Paulmurugan, 2012)

1.2 Οξειδωτικό στρες – Αντιοξειδωτικά – Καταπολέμηση

1.2.1 Οξειδωτικό στρες

Η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, με πιθανή ανάπτυξη προβλημάτων στον οργανισμό, ορίζεται ως "αντιοξειδωτικό στρες". (Helmuth, 1997)

Το οξειδωτικό στρες είναι μία μεταβολική κατάσταση όπου οι κυτταρικές αντιδράσεις οξείδωσης βρίσκονται εκτός ελέγχου. Υπό αυτές τις συνθήκες μπορεί να συσσωρευτεί υπεροξείδιο ($O_2^{\cdot-}$), οδηγώντας στον σχηματισμό υδροξυλίων OH^{\cdot} . Αυτό είναι μια ελεύθερη ρίζα η οποία αποσπά υδρογόνα από τους διπλούς δεσμούς ακόρεστων λιπαρών οξέων. Κατά συνέπεια, το λιπαρό οξύ μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα η οποία αντιδρά εύκολα με οξυγόνο προς σχηματισμό υπεροξειδικής ρίζας. Αυτό με τη σειρά του θα αποσπάσει υδρογόνο από ένα ακόμη λιπαρό οξύ, δημιουργώντας μία συνεχιζόμενη αλυσιδωτή αντίδραση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξείδωση. Το DNA, οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες μπορεί επίσης να οξειδωθούν. Υπάρχουν αρκετά στοιχεία ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να παίζει ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου, της αθηροσκλήρωσης, στην καταστροφή του ισχαιμικού ιστού και σε φλεγμονές. Πιθανώς τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον περιορισμό του οξειδωτικού στρες. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι υψηλή λήψη βιταμίνης E συνδέεται με τη μείωση της

πιθανότητας εμφάνισης της στεφανιαίας καρδιακής νόσου. (Henriksen T., Endresen M., 1994)

1.2.2 Αντιοξειδωτικά – Καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες

Σύμφωνα με τους Halliwell & Gutteridge (1989) αντιοξειδωτική είναι «οποιαδήποτε ουσία η οποία, όταν βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις συγκριτικά με τη συγκέντρωση ενός υποστρώματος το οποίο οξειδώνεται εύκολα, καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος». Αυτός ο ορισμός περιλαμβάνει ενώσεις μη-ενζυματικής καθώς και ενζυματικής φύσης. Η ποικιλομορφία των αντιοξειδωτικών ταιριάζει ξεκάθαρα με αυτή των προ-οξειδωτικών (ενώσεις που προκαλούν οξειδωτικό στρες). (Helmut, 1997)

1.2.3 Πρόληψη

Η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι η παρεμπόδιση της δημιουργίας τους. Υπάρχουν πολλές στρατηγικές στην βιολογία σχεδιασμένες για την αποφυγή του οξειδωτικού στρες, ξεκινώντας από το πλαγκτόν που κατεβαίνει από την επιφάνεια της θάλασσας σε χαμηλότερα επίπεδα ηλιακής ακτινοβολίας, έως το πακετάρισμα του DNA σε χρωματίνη για την προστασία του γενετικού υλικού προσδίδοντας εναλλακτικούς στόχους. Τα μικρόβια έχουν αναπτύξει ειδικευμένες τεχνικές ώστε να αποφεύγουν την βασισμένη στο οξυγόνο θανάτωσή τους από φαγοκύτταρα.

Όσον αφορά τον σχηματισμό ριζών, πρέπει πρώτα να αναφερθεί ότι κάποια από τα ένζυμα που έχουν τον κίνδυνο δημιουργίας ελεύθερων ριζών είναι μεγαλοφυώς σχεδιασμένα. Η οξειδάση των κυτοχρωμάτων, η οποία εκτελεί το μεγαλύτερο μέρος της μείωσης του κυτταρικού οξυγόνου, δεν απελευθερώνει υπεροξείδιο ή άλλες ελεύθερες ρίζες, αν και περιέχει σίδηρο και ιόντα χαλκού. Ομοίως, η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου ριβονουκλεοτιδική αναγωγή εμποδίζει την εξάπλωση του ριζικού χαρακτήρα της τυροσίνης στη Β υπομονάδα του ενζύμου στο περιβάλλον σχηματίζοντας ένα κατάλληλο "κελί".

Η προστασία των κυττάρων από περιστατική ραδιενέργεια μπορεί να επιτευχθεί με εξειδικευμένες χρωστικές, π.χ. με τις μελανίνες για την υπεριώδη ακτινοβολία ή με τα καροτενοειδή για ηλεκτρονιακώς προκαλούμενες καταστάσεις όπως το μονοατομικό οξυγόνο. Όμως, αυτές και άλλες στρατηγικές δεν είναι εντελώς προληπτικές, επειδή λειτουργούν μειώνοντας την παραγωγή ενός δεδομένου παράγοντα με απόδοση μικρότερη του 100%. (Helmut, 1997)

1.2.4 Αναχαίτιση

Μη-ενζυματικά αντιοξειδωτικά. Αυτός είναι ο τομέας των οξειδωτικών όπως ορίζονται σε μία πιο στενή έννοια. Το βασικό πρόβλημα είναι η αναχαίτιση των βλαβερών στελεχών, όταν αυτά σχηματιστούν, ώστε να αποτραπούν περαιτέρω βλαβερές αντιδράσεις. Αυτή είναι η διαδικασία της

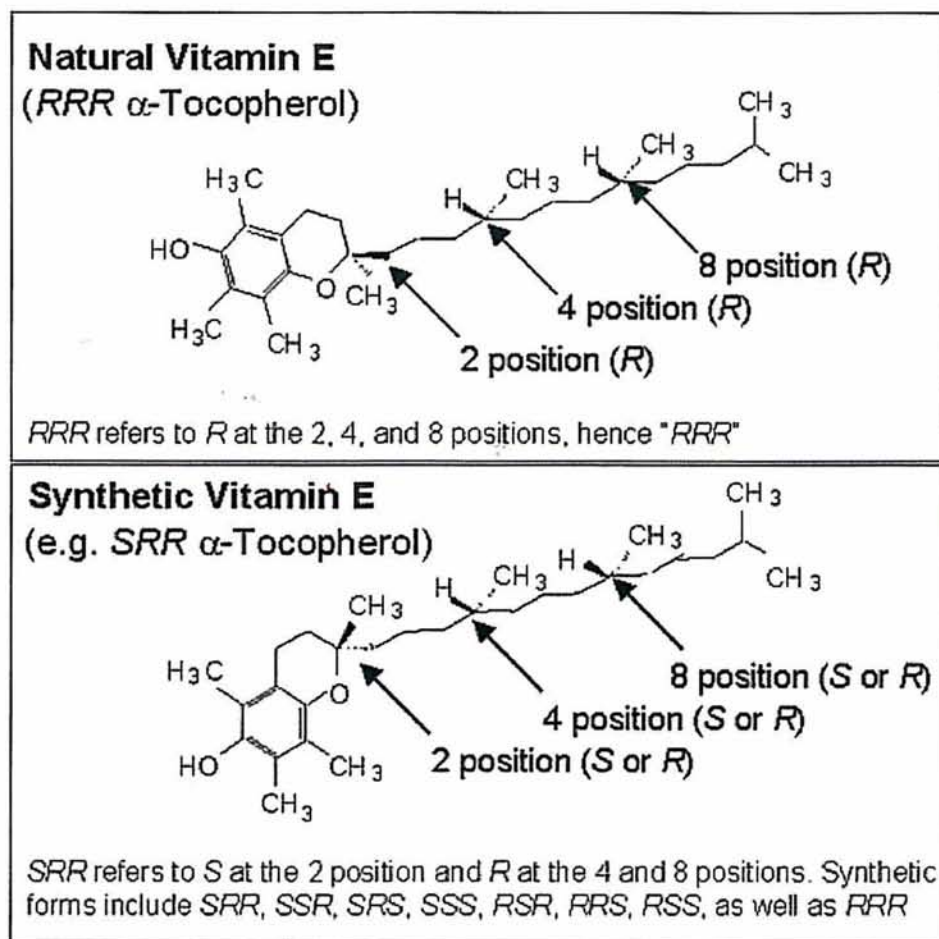
απενεργοποίησης. Για ριζικές ενώσεις η τελική απενεργοποίηση αποτελείται από την δημιουργία μη-ριζικών και μη-ενεργών τελικών προϊόντων. Λόγω της φύσεως των ελεύθερων ριζών, υπάρχει μία τάση προς αλυσιδωτές αντιδράσεις, π.χ. μία ένωση η οποία μεταφέρει ένα αδεσμικό ηλεκτρόνιο θα αντιδράσει με μία άλλη ένωση ώστε να αφήσει το αδεσμικό της ηλεκτρόνιο σε αυτήν την ένωση ("τα ριζικά δημιουργούν ριζικά").

Ένας δεύτερος βιολογικής σημασίας στόχος είναι η μεταφορά της ριζικής λειτουργίας μακριά από ευαίσθητες περιοχές-στόχους, προς μέρη του κυττάρου όπου η πρόκληση οξειδωτικού στρες θα ήταν λιγότερο βλαβερή. Γενικά, αυτό περιλαμβάνει την μεταφορά των οξειδωτικών ισοδύναμων από τις υδρόφοβες φάσεις σε υδατικές φάσεις, π.χ. από τη μεμβράνη στο ενδοκυτταρικό υγρό ή από τις λιποπρωτεΐνες στην υδατική φάση του πλάσματος. Από βιολογική άποψη, τα πιο αποτελεσματικά αναχαιτιστικά αντιοξειδωτικά συνδυάζουν τις βέλτιστες ιδιότητες και για τους δύο αυτούς στόχους: πρώτον, αντιδρούν με αρχικές ελεύθερες ρίζες, όπως είναι οι λιπιδικές υπερόξυ ρίζες, σε κατάλληλες ποσότητες, και δεύτερον, μπορούν και αλληλεπιδρούν με υδατοδιαλυτές ενώσεις ώστε να αυτό-ανανεώνονται. Αυτή η συνδυαστική δράση μεταφέρει τη ριζική λειτουργία μακριά από περεταίρω πιθανούς στόχους. Στις βιολογικές μεμβράνες, όπου υπάρχει ένα υψηλής αποτελεσματικότητας σύστημα υποστήριξης, μπορεί να είναι αναγκαία μόνο 1-3 αντιοξειδωτικά μόρια ανά 1000 πιθανούς μοριακούς στόχους.

Τέτοια αναχαιτιστικά αντιοξειδωτικά είναι συχνά φαινολικά παράγωγα. Η (R,R,R)-a-

Tocopherol είναι πιθανότατα η πιο αποτελεσματική ένωση στη φάση των λιπιδίων. (Εικόνα 2).

Προαπαιτούμενο για αποτελεσματική αναχαίτιση από τα φαινολικά αντιοξειδωτικά είναι ότι ο χρόνος ζωής της αναχαιτιζόμενης ρίζας δεν πρέπει να είναι πολύ μικρός. Άρα, εφόσον ο χρόνος ζωής τους εκτείνεται στο εύρος των δευτερολέπτων, οι υπερόξυ ρίζες είναι πολύ καλές υποψήφιες για αντίδραση. Αντιθέτως, η υδροξυλική ρίζα, με την υψηλή συντιδραστικότητα που την χαρακτηρίζει και ιδιαίτερα μικρό χρόνο ζωής, δεν μπορεί να αναχαιτιστεί αποτελεσματικά. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου 100mm αναχαιτιστικής ένωσης θα χρειάζονταν για 90% απόδοση, αποκλείοντας την αναχαίτιση ως χρήσιμη στρατηγική ενάντια στις υδροξυλικές ρίζες, εκτός και αν είναι για ωσμωτικούς λόγους. Τέτοιες ενώσεις με υψηλή αποτελεσματικότητα όσον αφορά στο μονομοριακό οξυγόνο, κυρίως καρροτενοειδή και οξυ-καρροτενοειδή, αποτελούν ένα κατάλληλο σύστημα αντιμετώπισης των ριζών οξυγόνου, παρά την αντιδραστικότητα και τον μικρό χρόνο ζωής του. Οι τοπικές συγκεντρώσεις των καρροτενοειδών καθορίζουν αποφασιστικά την αποτελεσματικότητα της καταστολής του μονομοριακού οξυγόνου και άλλων ηλεκτρονιακά διεγερμένων καταστάσεων.



Εικόνα 2: (R,R,R)- α -Τοκοφερόλη.

Ενζυματικά αντιοξειδωτικά. Όλα τα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών περιέχουν ισχυρά αντιοξειδωτικά ένζυμα. Οι τρεις μεγαλύτερες κατηγορίες αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι οι δισμουτάση του υπεροξειδίου, οι καταλάσες και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GSH). Ακόμη, υπάρχουν πολλά εξειδικευμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα που αντιδρούν και, γενικά, αποτοξινώνουν οξειδωτικές ενώσεις. Έμμεσες αντιοξειδωτικές λειτουργίες των ενζύμων είναι: (α) η λειτουργία υποστήριξης, π.χ. η αναπλήρωση της GSH από γλουταθειονικά δισουλφίδια (GSSG) από την φλαβοπρωτεΐνη GSSG αναγωγάση και (β) η μεταφορά και εξάλειψη αντιδραστικών ενώσεων, π.χ. οι S- τρανσφεράσες και τα συστήματα των S-συμπλόκων της γλουταθειόνης. Διαφορετικές υποκυτταρικές περιοχές και διαφορετικοί τύποι κυτάρων μπορεί να περιέχουν διαφορετικές ποσότητες αντιοξειδωτικών ενζύμων. (Helmut, 1997)

1.2.5 Πυρρολιδίνες

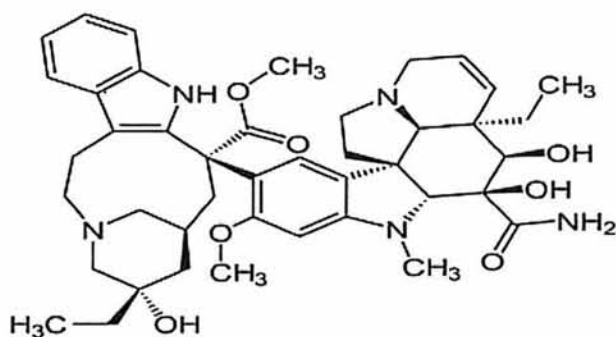
Η πυρρολιδίνη είναι ένα βασικό δομικό συστατικό ενός πλήθους συνθετικών και μη ενώσεων. Πρόκειται για μία δευτεροταγή κυκλική αμίνη, που συνίστανται από ετεροκυκλικό δακτύλιο με τέσσερα άτομα άνθρακα και ένα άτομο αζώτου (Εικ.3). Η ύπαρξη του ατόμου αζώτου προσδίδει στον πυρρολιδινικό δακτύλιο βασικό χαρακτήρα.

Ο πυρρολιδινικός δακτύλιος αποτελεί δομικό στοιχείο των αμινοξέων προλίνη και υδροξυπρολίνη, στα οποία ο πενταμελής δακτύλιος έχει υποκατασταθεί με τις λειτουργικές ομάδες του υδροξυλίου και του καρβοξυλίου. Επίσης, υπάρχουν ενώσεις πυρρολιδίνης, άλλες με υποκατεστημένη πλευρική αλειφατική αλυσίδα και άλλες με καρβονύλιο επί του δακτυλίου (Εικ. 4). Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται η υδροξυπρολίνη, η πυρρολιδινόνη, η προλινόλη και η προλίνη.

Ο βασικός δακτύλιος της πυρρολιδίνης εμπεριέχεται σε πληθώρα ενώσεων, οι οποίες απαντώνται στη φύση και εμφανίζουν σημαντική βιολογική δράση. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων αποτελούν η βιντεσίνη (vindesine), η πιρακετάμη (piracetam), η κλοσεναμίδα (clausenamide) και η ατορβαστατίνη (atorvastatin), για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν αντιμυτωτικές, αντιβακτηριακές και άλλες ιδιότητες. Επιπλέον, οι ενώσεις αυτές αποτελούν ενδιάμεσα για τη σύνθεση πιο περίπλοκων και σημαντικών φαρμακευτικά ενώσεων όπως της διτοξίνης (detoxine), της λακτακυστίνης (lactacystin) και πολλών άλλων. Στη συνέχεια, παραθέτονται παραδείγματα αυτών των ενώσεων και η εφαρμογή τους στη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενειών (Υαακob, 2009).

1.2.6 Vindesine

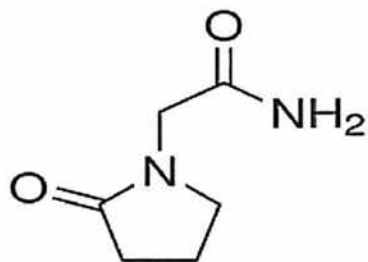
Λειτουργεί ως αναστολέας της μίτωσης και χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση πολλών μορφών καρκίνου όπως είναι η λευχαιμία, το λέμφωμα, το μελάνωμα, ο καρκίνος του μαστού και του πνεύμονα.



Εικόνα 1 Μοριακή δομή του Vindesine

1.2.7 Piracetam

Εμφανίζει ιδιότητες ενίσχυσης της νόησης και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νοσημάτων όπως το Alzheimer.



Εικόνα 2 Μοριακή δομή του Piracetam

Clausenamide

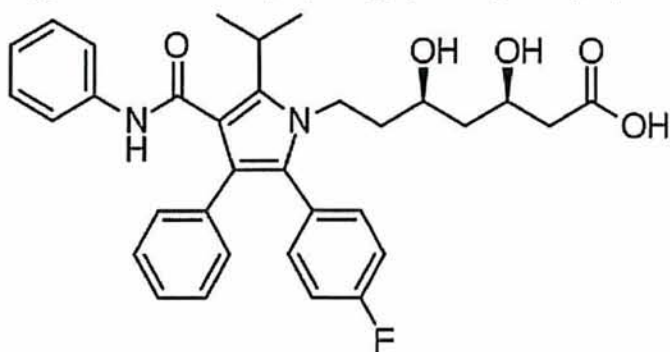
Παράγοντας προστασίας του ήπατος που χρησιμοποιείται συνήθως στην θεραπεία κατά της οξείας και χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας.



Εικόνα 3 Μοριακή δομή του Clausenamide

1.2.8 Atorvastatin

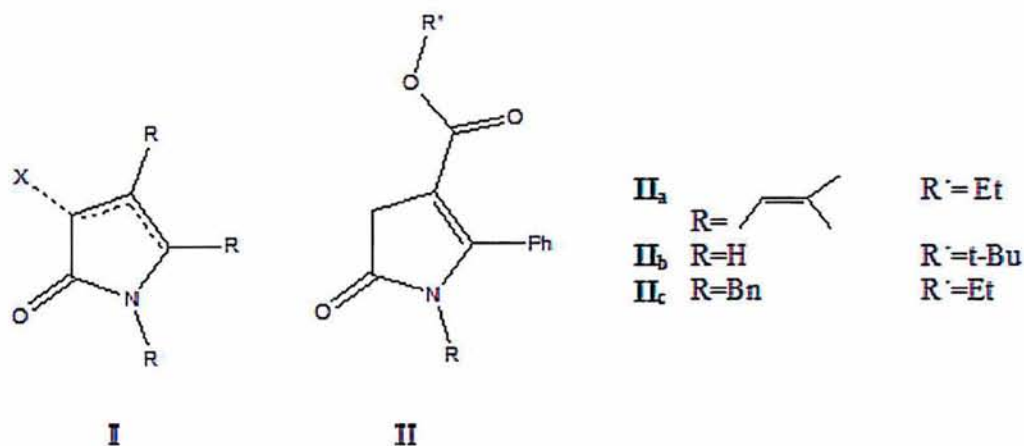
Χρησιμοποιείται για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και είναι ανταγωνιστικός αναστολέας της HMG-CoA αναγωγάσης εμποδίζοντας τη de novo σύνθεση χοληστερόλης στον οργανισμό.



Εικόνα 4 Μοριακή δομή του Atorvastatin

Εκτός από τα παραπάνω φυσικά παράγωγα, υπάρχουν και άλλα ανάλογα που φέρουν στη δομή τους τον πυρρολιδινικό δακτύλιο, διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία νέων θεραπευτικών ενώσεων. Επιπλέον, εμφανίζουν αξιόλογη αντιική και αντικαρκινική δράση. Συγκεκριμένα, οι 2-οξοπυρρόλες (Εικ. 9 ένωση Ι) χρησιμοποιούνται ευρέως και αποτελούν το

βασικό συστατικό σε πολλά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων και προϊόντων που έχουν ενεργή δράση ενάντια σε ιικές μολυσματικές ασθένειες (HIV, γρίπη), αντικαρκινικούς παράγοντες και προϊόντα που δρουν ενάντια σε ασθένειες μικροβιολογικής φύσεως (είτε βακτηριακής, είτε μυκητιακής). Επιπλέον, οι ενώσεις αυτές είναι απαραίτητες για τη σύνθεση αλκαλοειδών, καθώς και προϊόντων όπως οι 2,2'-διπυρρόλες, οι τετραπυρρόλες και κάποιες χρωστικές. Με εξαίρεση τις 5-αλκυλο-2-οξοπυρρόλες, που πρωτοαναφέρθηκαν το 1890 από τον Emery, έχει γίνει ελάχιστη αναφορά στα 5-αρυλο-2-πυρρολο παράγωγα (Εικ. 9 ένωση II). Ωστόσο, οι 5-αρυλο-2-οξοπυρρόλες χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση δικετοπυρρολοπυρρολών ως πιθανοί μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs), με φθορίζουσα ικανότητα (Dehaen et al., 2006).



Εικόνα 5 2-οξοπυρρόλες I και 5-αρυλο-2-οξοπυρρόλες II

Αξιοσημείωτη είναι η δημιουργία παραγώγων του 2-οξοπυρρολίου με αλδεΐδες, διαζωνιακά άλατα, ενεργούς εστέρες και διθειάνθρακα με στόχο τη σύνθεση νέων ενώσεων.

III

IV

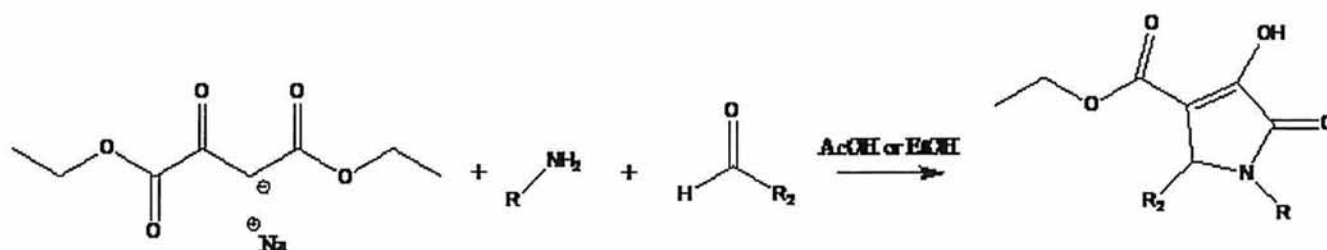
Συνεπώς, απεδείχθη ότι οι οξοπυρρόλες και τα ανάλογά τους αποτελούν ενδιαφέροντες και πολύπλευρους δομικούς λίθους στη Συνθετική Οργανική Χημεία. Επίσης πολλές από αυτές τις ενώσεις απεδείχθησαν νέα ενδιάμεσα στη σύνθεση πολύ-υποκατεστημένων πυρρολίων (Dehaen et al., 2006).

1.2.9 Σύνθεση των πυρρολινονών

Σύμφωνα με μελέτες, υπάρχουν διαφορετικές στρατηγικές σύνθεσης των πυρρολινονών. Ωστόσο οι τρόποι σύνθεσης των ενώσεων αυτών ακόμη ερευνώνται. Έτσι, η μέθοδος σύνθεσής τους

διαφοροποιείται ανάλογα με τη δομή της ένωσης. Για παράδειγμα, οι 2-πυρρολινόνες συνθέτονται με διαφορετικό τρόπο από ότι οι 3-πυρρολινόνες.

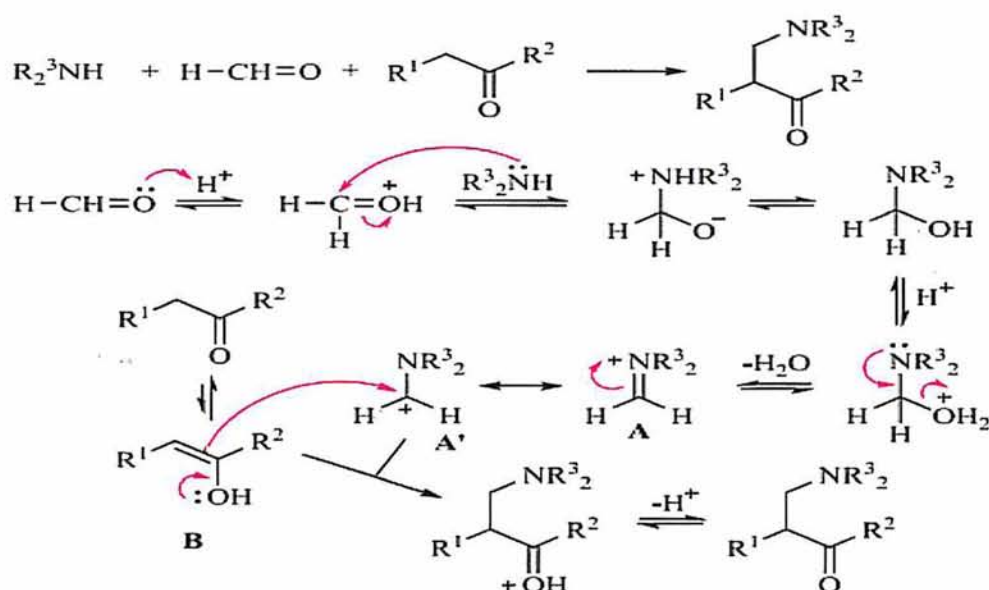
Η κύρια μέθοδος σύνθεσής τους αποτελεί μία αντίδραση τριών συστατικών, ξεκινώντας από διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου, αμμωνία ή πρωτοταγή αμίνη και αλδεΐδη. Στην αντίδραση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί οξύ ως καταλύτης ή να θερμανθούν τα συστατικά χρησιμοποιώντας αιθανόλη ως διαλύτη. Αρχικά η αμίνη και η αλδεΐδη σχηματίζουν μία ιμίνη. Κατόπιν, με αντίδραση Mannich, η ιμίνη και το διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου σχηματίζουν δακτύλιο. Μετά από ισομερισμό, σχηματίστηκε πυρρολινόνη με υποκαταστάτες στην 1-και/ή 2-θέση.



Εικόνα 6 Αντίδραση τριών συστατικών με κυκλοποίησηMannich.

1.2.10 Η αντίδραση Mannich

Η αντίδραση Mannich (Mannichreaction) είναι μια αντίδραση τριών συστατικών: μια πρωτοταγής ή δευτεροταγής αμίνη, μια μη ενολοποιήσιμη αλδεΐδη (συνήθως φορμαλδεΐδη) και μια ενολοποιήσιμη καρβονυλική ένωση αντιδρούν για να δώσουν μια β-αμινοκαρβονυλική ένωση. Η αντίδραση καταλύεται από οξύ (στην πράξη η αμίνη είναι με την πρωτονιωμένη της μορφή). Στο πρώτο στάδιο σχηματίζεται από τη μη ενολοποιήσιμη αλδεΐδη και την αμίνη το ιμινιακόκατιόν Α, το οποίο στη συνέχεια προσβάλλεται από την ενολική μορφή της ενολοποιήσιμης καρβονυλικής ένωσης(Β).



Εικόνα 7 Μηχανισμός της αντίδρασης Mannich

1.2.11 Αντιδράσεις πολλών συστατικών (MCRs)

Οι αντιδράσεις πολλών συστατικών (Multicomponentreactions - MCRs) μπορούν να οριστούν ως συγκλίνουσες χημικές διαδικασίες όπου τρία ή περισσότερα αντιδραστήρια συνδυάζονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε το τελικό προϊόν διατηρεί σημαντικά τμήματα όλων των αρχικών συστατικών. Ως εκ τούτου, οδηγούν στη σύνδεση τριών ή περισσότερων αρχικών υλικών σε ένα ενιαίο σύνθετο μόριο με υψηλή άτομική οικονομία και αποτελεσματικότητα σχηματισμού δεσμών, αυξάνοντας έτσι τη μοριακή ποικιλία και πολυπλοκότητα με έναν γρήγορο και συχνά πειραματικά απλό τρόπο. Για το λόγο αυτό, οι MCRs έχουν αναδειχθεί ως μια ισχυρή στρατηγική στην οργανική, συνδυαστική, και φαρμακευτική χημεία. Διάφορες MCRs έχουν αναπτυχθεί, όχι μόνο για την αποτελεσματικότητά τους, αλλά και για την οικονομία και την οικολογία στην οργανική σύνθεση. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν MCRs κατάλληλες για την εύκολη κατασκευή ποικίλων ετεροκυκλικών ικριωμάτων. Στην πραγματικότητα, οι MCRs έχουν καταδειχθεί ως μια ευθύς προσέγγιση των πυρρολών, οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενώς. Πιο πρόσφατα, ο Parrainetal. ανέπτυξε την σύνθεση τρισυποκατεστημένων πυρρολών, που καταλύεται από το παλλάδιο και τον χαλκό μέσω της MCR 3,4-διοδοαλκ-2-ενοϊκών παραγώγων, πρωτοταγών αμινών, και τερματικών αλκινίων. Οι Zhuetal. ανέφεραν μια MCR/ μετα-ενεργοποιητική στρατηγική για τη σύνθεση 2-αμινο-5-κυανοπυρρολών. Τα ενεργοποιημένα πυρρόλια συντέθηκαν επίσης από ενώσεις 1,3-δικορβονυλίου, αμίνες, αλδεΐδες, και νιτρο αλκάνια μέσω ενός σιδήρου-καταλυόμενης MCR.

1.2.12 Χρήση μικροκυμάτων

Η θέρμανση με μικροκύματα χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην οργανική σύνθεση το 1986, από τις ομάδες των Gedye και Giguere-Majetich (Gedye et al, 1986, Giguere et al, 1986). Σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα και με μεγάλη επιτυχία γιατί δίνει υψηλές αποδόσεις υπό ηπιότερες και φιλικότερες προς το περιβάλλον συνθήκες, συχνά χωρίς την χρήση διαλυτών, άλλοτε με ανακύκλωση τους, αλλά και με μικρότερη κατανάλωση ενέργειας. Η δυνατότητα εκτέλεσης αντιδράσεων με απ' ευθείας αλληλεπίδραση μικροκυματικής ενέργειας επί του μίγματος της αντίδρασης, σε πολύ μικρούς χρόνους, σε αντιδιαστολή προς την έμμεση μεταφορά ενέργειας με την χρήση ελαιόλουτρου ή παρόμοιας συσκευής, επιτρέπει να θεωρηθεί, η πρώτη, ως «πράσινη» διεργασία, όχι μόνον λόγω της μειωμένης κατανάλωσης ενέργειας αλλά και λόγω της οικονομίας χρόνου, δηλαδή της αυξημένης αποτελεσματικότητας της.

Μια από τις πιο σημαντικές και περισσότερο μελετημένες ομάδες των αντιδράσεων που υποβοηθούνται με μικροκύματα, είναι η σύνθεση των πυρρολών

Γενικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι η οργανική σύνθεση με χρήση μικροκυμάτων αποτελεί «πράσινη» τεχνική και υπερέχει σε σχέση με τη συμβατική θέρμανση στα εξής βασικά σημεία:

- Προσφέρει ομοιόμορφη θέρμανση σε όλο το μίγμα της αντίδρασης
- Αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της αντίδρασης
- Ελαττώνει τις παράπλευρες αντιδράσεις
- Παρέχει αυξημένες αποδόσεις

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η ανάγκη για την εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών ουσιών με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες καθώς και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων τα οποία περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο πύρρολο παράγωγο.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι:

- Η σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(4-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (όπου αλογόνο φθόριο, χλώριο, ιώδιο) μέσω μιας αντίδρασης ενός σταδίου με θέρμανση με επαναρροή και διαλύτη αιθανόλη η οποία διακόπτεται με προσθήκη υδροχλωρικού οξέως (37%).
- Η σύζευξη των παραπάνω ενώσεων με ο-φαινυλο διαμίνη με θέρμανση με επαναρροή και διαλύτη οξικό οξύ.
- Η ταυτοποίηση των προϊόντων με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR.
- Η αποτίμηση της ανασταλτικής τους δράσης έναντι μιας σειράς καρκινικών κυτταρικών σειρών.

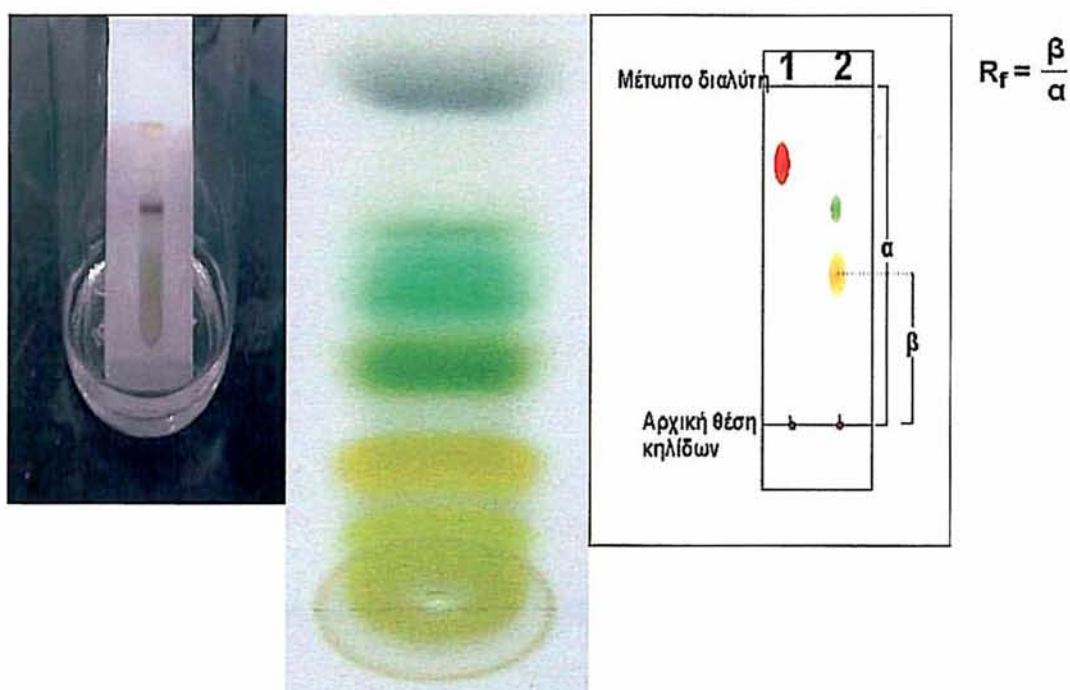
3.ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση επίπεδης χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Κατά τη τεχνική αυτήν χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F24) πάχους 0.2 mm.

Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς κορεσμένου με ατμούς διαλύτη θαλάμου. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται σύστημα δύο διαλυτών μεταβλητούς αναλογίας. Το ύψος της στάθμης του διαλύτη δεν πρέπει να καλύπτει τις κηλίδες της υπό εξέταση ουσίας, διότι υπάρχει κίνδυνος διάλυσης αυτών. Ακολούθως ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f , που ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη (α). Η τιμή R_f ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 ή 356 nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 (θειικού οξέος) 30%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στην εικόνα 3.1 που δίνεται παρακάτω.

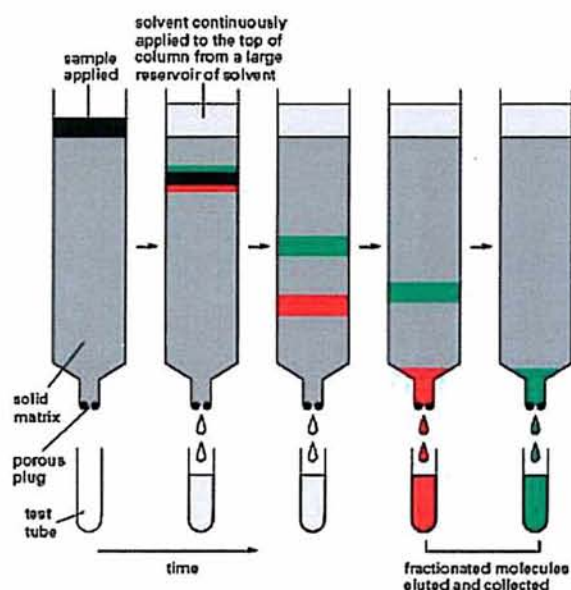


3.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade).

Η χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουση τους με μια ακίνητη φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ουσίες προσροφούνται και κολλούν στην αφετηρία, κορυφή, της στήλης και χρειάζονται πιο πολικό διαλύτη για να προχωρήσουν. Οι άπολες ουσίες συνήθως προχωρούν ή κατεβαίνουν πιο εύκολα ακόμη και με διαλύτες χαμηλής πολικότητας. Για την έκλουση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλουση της στήλης με διάφορους διαλύτες αρχίζοντας από τους λιγότερο πολικούς και καταλήγοντας στους περισσότερο πολικούς.

Στη χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από αδρανές υλικό (ύαλος, πηκτική πυριτίας, ανοξείδωτος χάλυβας). Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση διέρχεται εξαναγκασμένα μέσω της στατικής φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από την συγγένεια των συστατικών ως προς την στατική φάση όπως φαίνεται και παρακάτω στην εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.2

3.3 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της δομής των μορίων καθώς παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.

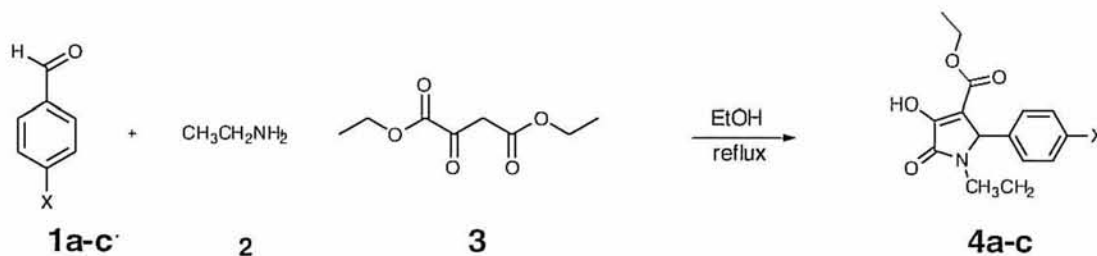
Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR, είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, άλλοι, οι λιγότεροι όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανakλώνται στην ιδιότητα του σπίν. Στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη, για την μελέτη των χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων της.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο BrukerAVAMCEIII 300 και τα φάσματα ^{13}C -NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), και διμεθυλοσουλφοξίδιο ($\text{DMSO}-d_6$). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), t (triple), q (quadruple), m (multiple). Οι συχνότητες J μετρήθηκαν σε Hz.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.

Αντίδραση:

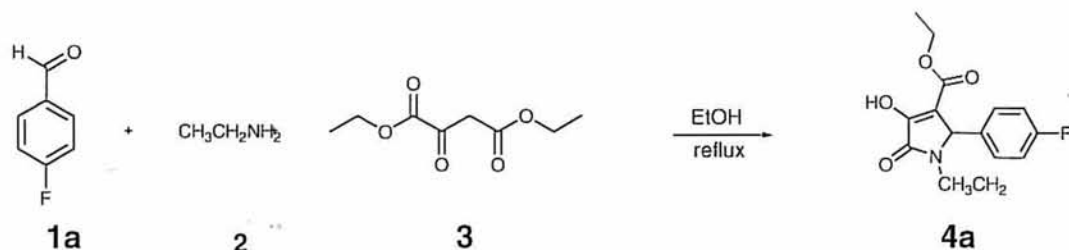


a: X = F, b: X = Cl, c: X = I

Αντίδραση. Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.
(Όπου αλογόνο X=F, Cl, I)

4.1 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.

Αντίδραση:



Αντίδραση 1. Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(4-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.

Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 4-φθορο-βενζαλδεΰδης απαιτούν : 7.11 mmol αιθυλαμίνης, 7.11 mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου και 25 ml οξικό οξύ.

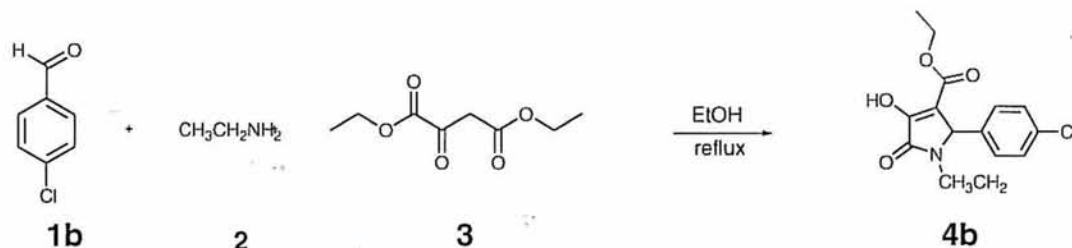
Πειραματική διαδικασία:

Σε σωληνάκι microwave CEM προστέθηκαν 4-φθορο-βενζαλδεΰδη (85,37μl, 1.42 mmol), αιθυλαμίνη (30,81μl, 1.42 mmol), διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου (169,18 mg, 1.42 mmol) και αιθανόλη (2,83ml, 1.42 mmol). Τοποθετήθηκε στο microwave CEM και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 110°C για 15' σε 100Watt. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματοχροφία στήλης για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ή παραπροϊόντα. Έπειτα τοποθετήθηκε το διάλυμα σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε. Μετά προστέθηκε λίγο παγωμένο απιονισμένο H₂O και μερικές σταγόνες πυκνού διαλύματος HCl (37%) ώστε το pH του διαλύματος της αντίδρασης να είναι περίπου 4-5. Ξύνοντας τα τοιχώματα με μια μεταλλική σπάτουλα σε θερμοκρασία δωματίου δημιουργήθηκε ίζημα και στην συνέχεια τοποθετήθηκε η φιάλη στο ψυγείο. Τέλος το επιθυμητό προϊόν διηθήκε υπό κενό και παραλήφθηκε υπό τη μορφή λευκού στερεού.

TLC (9.8CH ₂ Cl ₂ /0.2 EtOH)	R _f =0,22
Απόδοση	α =76%

4.2 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-χλωροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.

Αντίδραση:



Αντίδραση 2. Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.

Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 4-χλωρο-βενζαλδεΰδης απαιτούν : 7.11 mmol αιθυλαμίνης, 7.11 mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου και 25 ml οξικό οξύ.

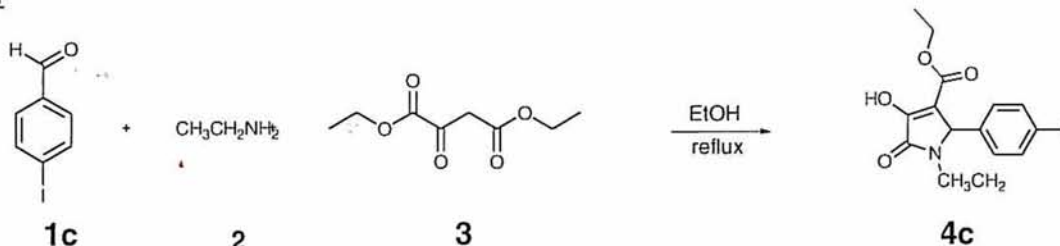
Πειραματική διαδικασία:

Σε σωληνάκι microwave CEM προστέθηκαν 4-χλωρο-βενζαλδεΰδη (85,37μl, 1.42 mmol), αιθυλαμίνη (30,81μl, 1.42 mmol), διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου (169,18 mg, 1.42 mmol) και αιθανόλη (2,83ml, 1.42 mmol). Τοποθετήθηκε στο microwave CEM και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 110°C για 15' σε 100Watt. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματοχροφία στήλης για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ή παραπροϊόντα. Έπειτα τοποθετήθηκε το διάλυμα σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε. Μετά προστέθηκε λίγο παγωμένο απιονισμένο H₂O και μερικές σταγόνες πυκνού διαλύματος HCl (37%) ώστε το pH του διαλύματος της αντίδρασης να είναι περίπου 4-5. Ξύνοντας τα τοιχώματα με μια μεταλλική σπάτουλα σε θερμοκρασία δωματίου δημιουργήθηκε ίζημα και στην συνέχεια τοποθετήθηκε η φιάλη στο ψυγείο. Τέλος το επιθυμητό προϊόν διηθήκε υπό κενό και παραλήφθηκε υπό τη μορφή λευκού στερεού.

TLC (9.8CH ₂ Cl ₂ /0.2 EtOH)	R _f =0,21
Απόδοση	α =80%

4.3 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-ιωδοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.

Αντίδραση:



Αντίδραση 3. Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(4-ιωδοοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.

Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 4-ιωδο-βενζαλδεΰδης απαιτούν : 7.11 mmol αιθυλαμίνης, 7.11 mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου και 25 ml οξικό οξύ.

Πειραματική διαδικασία:

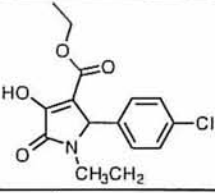
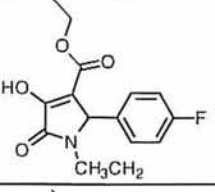
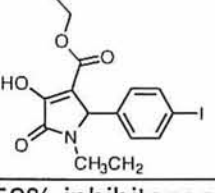
Σε σωληνάκι microwave CEM προστέθηκαν 4-ιωδο-βενζαλδεΰδη (85,37μl, 1.42 mmol), αιθυλαμίνη (30,81μl, 1.42 mmol), διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου (169,18 mg, 1.42 mmol) και αιθανόλη (2,83ml, 1.42 mmol). Τοποθετήθηκε στο microwave CEM και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 110°C για 15' σε 100Watt. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματοχροφία στήλης για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ή παραπροϊόντα. Έπειτα τοποθετήθηκε το διάλυμα σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε. Μετά προστέθηκε λίγο παγωμένο απιονισμένο H₂O και μερικές σταγόνες πυκνού διαλύματος HCl (37%) ώστε το pH του διαλύματος της αντίδρασης να είναι περίπου 4-5. Ξύνοντας τα τοιχώματα με μια μεταλλική σπάτουλα σε θερμοκρασία δωματίου δημιουργήθηκε ίζημα και στην συνέχεια τοποθετήθηκε η φιάλη στο ψυγείο. Τέλος το επιθυμητό προϊόν διηθήκε υπό κενό και παραλήφθηκε υπό τη μορφή λευκού στερεού.

TLC (9.8CH ₂ Cl ₂ /0.2 EtOH)	R _f =0,21
Απόδοση	α =82%

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όλα τα μόρια αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξική και κυτταροστατική τους δράση έναντι κυττάρων λευχαιμίας ποντικού (L1210), ανθρώπινου λεμφώματος (CEM) καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC₅₀, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%

• Τα βιολογικά αποτελέσματα

Compound	IC ₅₀ * (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
	> 250	190 ± 83	232 ± 25
	≥ 250	130 ± 33	245 ± 6
	120 ± 2	≥ 250	110 ± 5

*50% inhibitory concentration.

ΟΠΟΥ:

- 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα
- 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(4-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα
- 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(4-ιωδοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα

Όπως βλέπουμε από τον παραπάνω πίνακα, όλες οι εξετασθείσες ενώσεις παρουσίασαν μέτρια ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, παρουσιάζοντας τιμές IC₅₀ μεταξύ 88-225 μM.

Η αντική αποτίμηση των παραπάνω ενώσεων αναμένεται ακόμη.

6. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΚΡΟΝΥΜΙΩΝ

ATRA: All-Trans-Retinoic Acid (ATRA)
CML: Chronic Myelogenous Leukemia
CT: Computed Tomography
DMSO: Dimethyl Sulfoxide
DNA: DeoxyriboNucleic Acid
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
ER: Estrogen Receptor
HEL: human embryonic lung
MRI: Magnetic Resonance Imaging
NDGA: NorDihydroGuiaretic Acid
NSCLC: Non-Small Cell Lung Carcinoma
PDGF-R: Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PET: Positron Emission Tomography
Rf: Retardation factor
RTK: Receptor Tyrosine Kinase
ROS: Reactive Oxygen Species
SPECT: Single-Photon Emission Computed Tomography
TLC: Thin Layer Chromatography
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Barlow-Stewart, K. (2012). *Enviromental and genetic interactions*. 9th Edition.
- Hajdu, S.I. (2011). A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 1. *Cancer* 1097-1102.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hejmadi, M. (2010). Introduction to Cancer Biology. Ventus Publishing ApS.
- Χονδρού Βασιλική(2013) *IN VITRO* Διερεύνηση της θραυσματογόνου και αποπτωτογόνου δράσης του αντικαρκινικού αντιβιοτικού δοξορουβικίνη στην λευχαιμική κυτταρική σειρά του ανθρώπου HL-60, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα
- Yaakob I.U., Degree of Bachelor of Science (Hons.), 2009
- McMurry J. Οργανική Χημεία, τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ.334-336.
- Wade L.G.Jr, Οργανική Χημεία, Εκδόσεις Τζιόλα.
- Dehaen W.; Metten B.; Kostermans M.; Van Baelen G. and Smet M., *Tetrahedron* 62 (2006) 6018–6028.
- Diana P.; Martorana A.; Barraja P.; Montalbano A.; Dattolo G.; Cirrincione G.; Dall’Acqua F.; Salvador A.; Vedaldi D.; Basso G. and Viola G., *J. Med. Chem.* 2008, 51, 2387–2399.
- M. F. Mohammat, Z. Shaameri and A. S. Hamzah, (2009), Synthesis of 2,3-Dioxo-5-(substituted) arylpyrroles and Their 2-Oxo-5-aryl-3-hydrazone Pyrrolidine Derivatives, *Molecules*
- Srinivasa R. Cheruku ; Maniyan P. Padmanilayam ; Jonathan L. Vennerstrom
- , (2003), Synthesis of 2H-pyrroles by treatment of pyrrolidines with DDQ, Tetrahedron Letters
- Sobolev A.; Cekavicus B.; Kore K.; Jakovele L.; Plotniece A.; Pajuste K.; Petrova M. and Belyakov S., (2011), Formation of novel 1,2,3,4-tetrasubstituted 3-pyrrolines via cyclisation of γ -halo- β -ketoesters with aromatic amines and aldehydes, Tetrahedron Letters
- **Rampa A.; Piazzzi L.; Belluti F.; Bisi A.; Gobbi S.; Rizzo S.; Bartolini M.; Andrisano V. and Recanatini M., *Bioorg. , (2007), Cholinesterase inhibitors: SAR and enzyme inhibitory activity of 3-[omega-(benzylmethylamino)alkoxy]xanthen-9-ones*, Journal Article**