



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Ανάπτυξη νέων σκουαραϊνικών παραγώγων με βιολογικό ενδιαφέρον**

**Λαζαρίδου Άννα  
Νεοφώτιστος Σταύρος**

**Επιβλέπων: Γεώργιος Βουγιουκαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Ανάπτυξη νέων σκουαραϊνικών παραγώγων με βιολογικό ενδιαφέρον

**Λαζαρίδου Άννα**  
**A.M.: 1111201100053**

**Νεοφώτιστος Σταύρος**  
**A.M.: 1111201200072**

**Επιβλέπων:** Γεώργιος Βουγιουκαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Τα υδατοδιαλυτά παράγωγα του σκουραϊκού οξέος μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φωτοευαίσθητοποιητές σε φωτοδυναμική θεραπεία και άλλες πιθανές βιολογικές εφαρμογές. Επίσης, βρίσκουν ποικίλες τεχνολογικές εφαρμογές και εφαρμογές στην επιστήμη υλικών.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Οργανική Χημεία

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** υδατοδιαλυτά σκουραϊνικά παράγωγα, βιοχημεία σκουραϊνών, παραγωγή  $^1\text{O}_2$  (οξυγόνο απλής κατάστασης), φωτοδυναμική θεραπεία.

## **ABSTRACT**

Water-soluble squaraine derivatives can be used as photosensitizers in photodynamic therapy and other possible biological applications. Moreover, they find many technological applications as well as applications in materials science.

**THEMATIC AREA:** Organic Chemistry

**KEYWORDS:** water soluble squaraine derivatives, squaraine biochemistry, singlet oxygen  $^1\text{O}_2$  production, photodynamic therapy.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον επιβλέποντα καθηγητή μας, Επίκουρο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, **Δρ. Γεώργιο Βουγιουκαλάκη**, για την ευκαιρία που μας έδωσε να εκπονήσουμε την Πτυχιακή μας Εργασία στην ερευνητική του ομάδα, καθώς και την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκειά της.

Ακολούθως, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον υποψήφιο Διδάκτορα **Αντώνιο Καμπανάκη**, ο οποίος μας επέβλεπε και μας καθοδηγούσε στο εργαστήριο αλλά και κατά τη συγγραφή της εργασίας. Οι πρακτικές του γνώσεις ήταν πολύτιμες και η συνεισφορά του στην διεκπεραίωση της εργασίας ήταν ζωτικής σημασίας.

Επιπλέον, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όλη την ερευνητική ομάδα του Δρ. Βουγιουκαλάκη για την βοήθειά και το οικογενειακό κλίμα στο εργαστήριο. Ήταν χαρά και τιμή μας να είμαστε μέλη αυτής της εκπληκτικής ερευνητικής ομάδας.

Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειές μας και τους κοντινούς μας ανθρώπους για την υπομονή και στήριξη τους σε όλη την χρονική διάρκεια της παρούσας εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ .....	9
ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	10
<b>1) Σκουαραίνες – ημισκουαραίνες δομή και εφαρμογές.....</b>	<b>11</b>
1.1 Σκουαραϊνικά και ημισκουαραϊνικά παράγωγα .....	11
1.2 Ιδιότητες σκουαραϊνών-ημισκουαραϊνών .....	12
1.3 Βιοχημεία σκουαραϊνών-ημισκουαραϊνών .....	19
1.4 Άλλες εφαρμογές.....	23
<b>2) Αλληλεπιδράσεις με το DNA .....</b>	<b>33</b>
2.1 Ρόλος σκουαραϊνών ως αντικαρκινικά .....	33
<b>3) Φωτοδυναμική θεραπεία και εφαρμογές της.....</b>	<b>37</b>
3.1 Προφάρμακα.....	37
3.2 PDT και PACT – φωτοδυναμική θεραπεία .....	38
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>49</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1</b> Σκουαραϊκό οξύ (1).....	11
<b>Εικόνα 2</b> Συζυγής βάση του σκουαραϊκού οξέος (1).....	11
<b>Εικόνα 3</b> Συντονισμός συζυγούς βάσης σκουαραϊκού οξέος (2).....	12
<b>Εικόνα 4</b> Δομή συντονισμού διυποκατεστημένης σκουαραϊνης με ετεροκυκλικό δακτύλιο (7) .....	12
<b>Εικόνα 6</b> Μηχανισμός αποδιέγερσης κεκαμμένης σκουαραϊνης (15) .....	14
<b>Εικόνα 5</b> Σκουαραϊνη που μελετήθηκε με δομή DAD (15) .....	14
<b>Εικόνα 7</b> Δομή συντονισμού σκουαραϊνης 5α-5b-5c (16) .....	15
<b>Εικόνα 8</b> Ενδομοριακοί δεσμοί H σε σκουαραϊνη 12a-b (20).....	16
<b>Εικόνα 9</b> Πρόσδεση Sq σε αλβουμίνη.....	19
<b>Εικόνα 10</b> Δομές των 5-(διμέθυλάμινο)-1-ναφθαλενοσουλφαμιδίου (DNSA) και δανσυλ-L-προλίνης (DP) .....	20
<b>Εικόνα 11</b> Αυτοοργάνωση διμερούς σκουαραϊνης.....	20
<b>Εικόνα 12</b> Συσσωμάτωση διμερούς Sq με αλλαγή πολικότητας διαλύτη (28).....	21
<b>Εικόνα 13</b> Ανίχνευση από σκουαραϊνες και NPs αυτών (29).....	21
<b>Εικόνα 14</b> Cis και trans δομές της σκουαραϊνης.....	22
<b>Εικόνα 15</b> Μοριακός διακόπτης και λειτουργεία (33) .....	24
<b>Εικόνα 16</b> Δομή σκουαραϊνης (34).....	25
<b>Εικόνα 17</b> Τρόπος δράσης σκουαραϊνης στον εντοπισμό των τοξικών Vx και Tabun (35) .....	26
<b>Εικόνα 18</b> Tabun.....	26
<b>Εικόνα 19</b> Vx .....	26
<b>Εικόνα 20</b> Συνθετικό σχήμα του πολυμερούς (36).....	27
<b>Εικόνα 21</b> Υδατοδιαλυτή σκουαραϊνη για ανίχνευση CN <sup>-</sup> (37).....	28
<b>Εικόνα 22</b> Τροποποιημένη σκουαραϊνη ανιχνευτής Hg (38).....	28
<b>Εικόνα 23</b> Αυτοοργάνωση ημισκουαραϊνης σε τιτανία (44).....	29
<b>Εικόνα 24</b> Σύνθεση των μορίων κεραιών (48) .....	32
<b>Εικόνα 25</b> Κυκλοαναστροφή και παραγωγή ρίζας O <sub>2</sub> σε SREPs (53).....	35
<b>Εικόνα 26</b> Χημειοφωταύγεια έναντι φθορισμού ως μεθόδου βιοαπεικόνισης (53) ....	35
<b>Εικόνα 27</b> Σκουαραϊνη που αξιοποιήθηκε σε in vivo πείραμα (57).....	36
<b>Εικόνα 28</b> HPD και άλλα παράγωγα (63) .....	40
<b>Εικόνα 29</b> Photophrin (63).....	41
<b>Εικόνα 30</b> Μηχανισμός δράσης του φωτοευαισθητοποιητή (64) .....	41
<b>Εικόνα 31</b> Ηλεκτρονιακές καταστάσεις e <sup>-</sup> .....	42
<b>Εικόνα 32</b> Σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης με σκουαραϊνη (65).....	45
<b>Εικόνα 33</b> DMBA.....	45
<b>Εικόνα 34</b> Οι 5 ομάδες ποντικών του πειράματος (65) .....	46
<b>Εικόνα 35</b> Μηχανισμός κυτταρικής απόπτωσης με επίδραση στο μιτοχόνδριο- Διαγραμματική αναπαράσταση ενεργοποίησης προ αποπτωτικών πρωτεϊνών (57).47	47
<b>Εικόνα 36</b> Δραστικότητα κασπάσης-3 στις ομάδες I-IV δύο βδομάδες μετά από εφαρμογή της PDT (57) .....	48

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ**

<b>Πίνακας 1</b> Ιδιότητες των 2 πολυμερών (36) .....	27
---	----



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<b>Διάγραμμα 1</b> Φάσμα απορρόφησης σκουαραϊνών και βαθυχρωμικό φαινόμενο (9)	12
<b>Διάγραμμα 2</b> Φάσμα απορρόφησης πολυμερούς σκουαραϊνης με αύξηση μονομερικών ομάδων (13)	13
<b>Διάγραμμα 3</b> Απορρόφηση κοινής σκουαραϊνης και cis στοχευμένης σε UV-Vis (19)	15
<b>Διάγραμμα 4</b> Δράση διαλύτη επί συσσωμάτωσης και αντίστοιχης μετάτοπισης απορρόφησης σε σκουαραϊνες (20)	16
<b>Διάγραμμα 5</b> J-συσσωμάτωμα και αλληλεπιδράσεις που το οργανώνουν (23)	17
<b>Διάγραμμα 6</b> Φάσμα εκπομπής και απορρόφησης (22)	17
<b>Διάγραμμα 7</b> Φάσμα απορρόφησης για απλή σκουαραϊνη (...) για φιλμ από περιστροφή (---) και για φιλμ από θερμό τολουόλιο (συνεχής) (24)	18
<b>Διάγραμμα 8</b> Απορρόφηση διαλύματος Sq-BSA με βαθμιαία αύξηση συγκέντρωσης DP (5)	19
<b>Διάγραμμα 9</b> Φάσμα απορρόφησης και μετατοπίσεις με βάση την αλλαγή του διαλύτη (28)	20
<b>Διάγραμμα 10</b> Διαγράμματα απορρόφησης cis και trans Sq σε ρυθμιστικό διάλυμα και σε EtOH (31)	22
<b>Διάγραμμα 11</b> α) Απορρόφηση απλού μη συσσωματωμένου μορίου Sq (κόκκινο) και συσσωματωμένης δομής (μαύρο) β) Απορρόφηση συμπλόκου Sq-HSA σε διάρκεια 0 ημερών (μπλε) και 140 ημερών (κόκκινο) (32)	23
<b>Διάγραμμα 12</b> Συγκέντρωση σκουαραϊνης σε σίλικα και ένταση φθορισμού (34)	25
<b>Διάγραμμα 13</b> Διάγραμμα απορρόφησης (συνεχής) και εκπομπής (διακεκομμένη) της σκουαραϊνης (43)	30
<b>Διάγραμμα 14</b> Διάγραμμα απορρόφησης για διάφορες τιμές συγκέντρωσης CDCA (43)	30
<b>Διάγραμμα 15</b> Διάγραμμα κβαντικής απόδοσης (47)	31
<b>Διάγραμμα 16</b> Κβαντική απόδοση μορίων κεραιών σε σχέση με σκουαραϊνη (48)	31
<b>Διάγραμμα 17</b> Ένταση φθορισμού BSA σε σχέση με συγκέντρωση Sq (49)	33
<b>Διάγραμμα 18</b> Ένταση φθορισμού σε σχέση με το χρόνο (49)	33
<b>Διάγραμμα 19</b> Απορρόφηση διαλύματος DPBF παρουσία σκουαραϊνης σε σχέση με τον χρόνο (51)	34

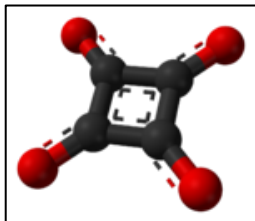
## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή έγινε στα πλαίσια της υποχρεωτικής εκπόνησης πτυχιακής εργασίας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την απόκτηση πτυχίου. Πραγματοποιήθηκε από τους φοιτητές Λαζαρίδου Άννα και Νεοφώτιστο Σταύρο κατά το εαρινό εξάμηνο του ακαδημαϊκού έτους 2015-2016 και χειμερινό εξάμηνο του ακαδημαϊκού έτους 2016-2017 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας.

# 1) Σκουαραίνες – ημισκουαραίνες δομή και εφαρμογές

## 1.1 Σκουαραϊνικά και ημισκουαραϊνικά παράγωγα

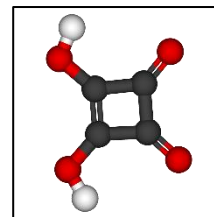
Το σκουαραϊκό οξύ ή κατά IUPAC 3,4-διυδροξυ-3-κυκλοβουτένιο-1,2-διόνη (εικόνα 1) είναι λευκό κρυσταλλικό στερεό με σταθερές οξύτητας  $pK_{a1}=1,5$  και  $pK_{a2}=3,4$  και όχι



Εικόνα 2 Συζυγής βάση του σκουαραϊκού οξέος (1)

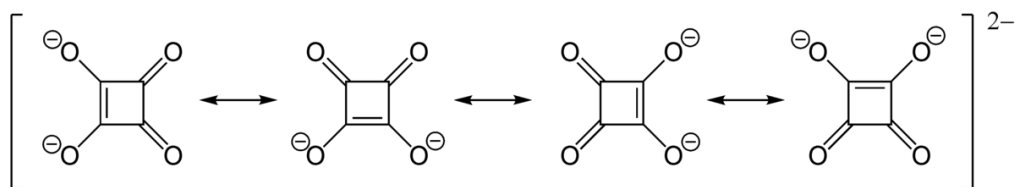
απόλυτα συμμετρική δομή (οι δεσμοί C-O και C-C δεν έχουν όλοι το ίδιο μήκος). Η συζυγής βάση του ( $C_4O_4^{2-}$ , εικόνα 2) είναι σταθεροποιημένη λόγω της συζυγιακής σταθεροποίησης του ανιόντος, καθώς το

φορτίο του μοιράζεται σε όλα τα άτομα οξυγόνου ομοιόμορφα. Ως αποτέλεσμα, η συζυγής βάση είναι απόλυτα συμμετρική με δομή τετραγώνου και κοινό μήκος μεταξύ όλων των δεσμών C-C και C-O. Οι δομές



Εικόνα 1 Σκουαραϊκό οξύ (1)

συντονισμού και η μορφή του οξέος και της συζυγούς βάσης δίνονται στις εικόνες 1,2 και 3. Το μόριο της συζυγούς βάσης ικανοποιεί τον κανόνα αρωματικότητας του Huckel με επίπεδη δομή, αποτελεσματική συζυγία και αριθμό π-ε να είναι  $4n+2$ , για  $n=0$ .<sup>(1)-(3)</sup> Ο σκουαραϊκός δακτύλιος είναι φτωχός ηλεκτρονιακά, οπότε και επιδεκτικός σε πυρηνόφιλη προσβολή, η οποία είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί σε μία ως δύο θέσεις του δακτυλίου. Στην πρώτη περίπτωση, τα μονοϋποκατεστημένα μόρια ονομάζονται ημισκουαραίνες και χρησιμοποιούνται συνήθως ως ενδιάμεσες ενώσεις (εκτός από την περίπτωση σχηματισμού τους με αντίδραση υποκατάστασης σε σκουαραϊκό διαιθυλεστέρα, οπότε και είναι σταθερές και απομονώσιμες). Στην δεύτερη περίπτωση, τα μόρια είναι διϋποκατεστημένα και αποτελούν τις σκουαραίνες. Το όνομα σκουαραίνες δόθηκε το 1981 από τον Schimt. Αρχικά αξιοποιήθηκαν ως φωτοευαίσθητοποιητές σε ημιαγωγό ZnO. Η ιδιότητα τους να απορροφούν ηλιακή ακτινοβολία βρέθηκε το 1974 όταν οι Champ και Shattick<sup>(4)</sup> τις παρουσίασαν ως γεννήτορες για ζεύγη ηλεκτρονίων-οπών (electron-hole) για ξηρογραφική χρήση, αν και η σύνθεσή τους έχει γίνει αρχικά από τους Treibus και Jacob το 1965.<sup>(5)</sup> Γενικά, είναι γνωστές για την έντονη απορρόφησή τους στο εγγύς υπέρυθρο (NIR) οπότε και είναι δυνατή η χρήση τους σε πληθώρα εφαρμογών που παρουσιάζονται στα επόμενα κεφάλαια. Κατά τον σχηματισμό των σκουαραϊνών, οι δύο αντιδράσεις υποκατάστασης μπορούν να γίνουν είτε σε cis είτε σε trans θέσεις μεταξύ τους, αν και παρατηρείται κυρίως η trans δομή, λόγω υψηλότερης σταθερότητας. Η cis υποκατάσταση παρατηρείται σπάνια (κυρίως λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης) αν και είναι δυνατή όταν οι ομάδες υποκατάστασης απάγουν ηλεκτρονιακό φορτίο.

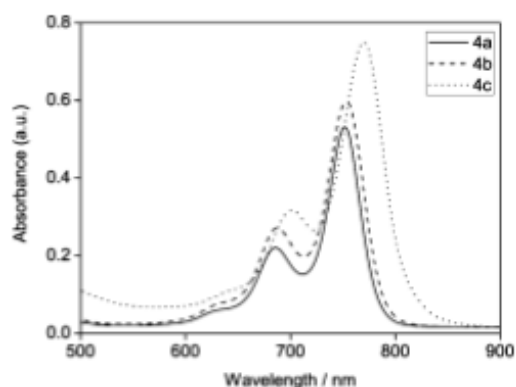


Εικόνα 3 Συντονισμός συζυγούς βάσης σκουαραϊκού οξέος (2)

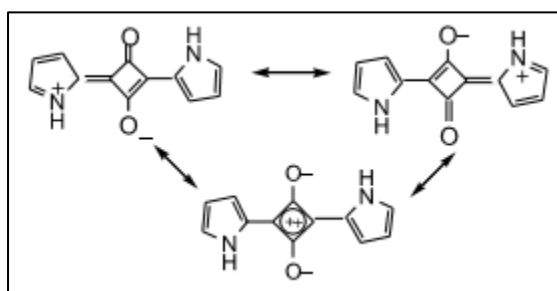
## 1.2 Ιδιότητες σκουαραϊνών-ημισκουαραϊνών

Η χρήση βαφών και χρωστικών χρονολογείται αιώνες πριν, αλλά μόνο σχετικά πρόσφατα αξιοποιήθηκαν σε τεχνολογικές εφαρμογές όπως φωτοβολταϊκά κελιά, οπτικά φίλτρα και διακόπτες, αλλά και ως υλικά ξηρογραφίας. Η χρήση βαφών (dyes) ή χρωστικών (pigments) αποτελεί κλασικό πεδίο μελέτης. Αυτές οι δύο κατηγορίες ενώσεων έχουν διαφορετικές ιδιότητες: Οι βαφές είναι διαλυτές και μπορούν να καθαριστούν και να απομονωθούν με συμβατικές μεθόδους. Μειονέκτημα των διαλυμάτων των βαφών είναι η πιθανή συσσωμάτωση εντός διαφόρων συσκευών, κάτι που αυξάνει το κόστος χρήσης τους. Αντίθετα, οι χρωστικές είναι αδιάλυτες και χρησιμοποιούνται ως αιωρήματα εντός ενός υγρού μέσου, με πολύ μικρή συσσωμάτωση, η οποία, ακόμη και όταν υπάρχει, ελέγχεται και τροποποιείται. Μειονέκτημα των χρωστικών είναι ο δύσκολος και δαπανηρός καθαρισμός τους.

Οι σκουαραϊνες έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα τόσο ως χρωστικές όσο και ως βαφές, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους.<sup>(6)</sup> Κύριο χαρακτηριστικό των σκουαραϊνών είναι η δομή δότη-π-δέκτη-π-δότη (D-π-A-π-D), η οποία προτάθηκε από τον Langals, όπου D είναι πλούσιες ηλεκτρονικά λειτουργικές ομάδες (όμοιες μεταξύ τους ή διαφορετικές) ενώ A ο κεντρικός σκουαραϊνικός δακτύλιος που είναι



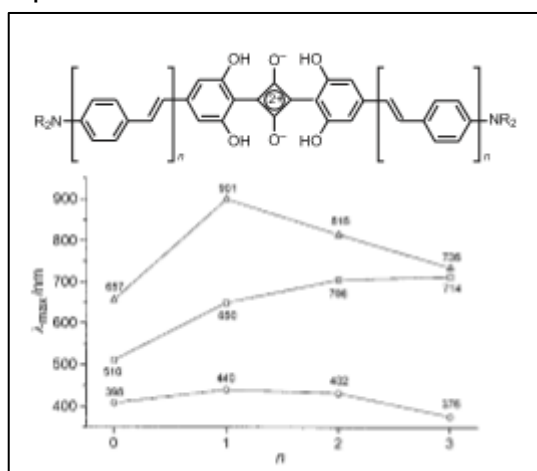
Διάγραμμα 1 Φάσμα απορρόφησης σκουαραϊνών και βαθυχρωμικό φαινόμενο (9)



Εικόνα 4 Δομή συντονισμού διυποκατεστημένης σκουαραϊνης με ετεροκυκλικό δακτύλιο (7)

φτωχός ηλεκτρονικά. Η δομή τους σταθεροποιείται μέσω δομών συντονισμού (εικόνα 4).<sup>(7)</sup> Παρουσιάζουν απορρόφηση (Διάγραμμα 1) στην περιοχή NIR (600-800nm), η οποία εμφανίζεται λόγω του δι-ιοντικού χαρακτήρα των ενώσεων αυτών (zwitterion) στη βασική τους κατάσταση. Έχει προταθεί η ύπαρξη μεταφοράς φορτίου μέσω  $\pi \rightarrow \pi^*$  μεταπτώσεων.<sup>(8)</sup> Επιπλέον, η χαρακτηριστική κορυφή στα 600-800nm που εμφανίζεται λόγω  $\pi \rightarrow \pi^*$  μεταφοράς φορτίου, παρουσιάζει

βαθυχρωμική μετατόπιση με την αύξηση της έκτασης της συζυγίας, καθώς και με την αύξηση πολικότητας της σκουαραϊνής.<sup>(9)</sup> Επιπροσθέτως, σε συμμετρικές σκουαραϊνες με δομή D-π-A-π-D παρατηρείται βαθυχρωμικό φαινόμενο, το οποίο εξαρτάται κυρίως από το ενεργειακό χάσμα των HOMO-LUMO μοριακών τροχιακών καθώς και από την γεωμετρία των υποκαταστατών, επηρεάζοντας τις φωτοχημικές ιδιότητες. Επιπλέον, σε σκουαραϊνες με ομάδες δότες που διαθέτουν ετεροκυκλικό δακτύλιο (εικόνα 4) δε φαίνεται να συνεισφέρει έντονα το άζωτο των δακτυλίων αυτών στις παραπάνω ιδιότητες. Τα άτομα του οξυγόνου φαίνεται να δρουν ως δέκτες στη βασική κατάσταση, αλλά ως δότες στην διεγερμένη, αναστέλλοντας την  $\pi \rightarrow \pi^*$  μεταφορά φορτίου η οποία παρατηρείται στο κέντρο του δακτυλίου. Στη διέγερση  $S_0 \rightarrow S_1$  δεν εμπλέκεται η ομάδα-δότης αλλά ούτε ο διαλύτης. Αντίθετα, αυτή επηρεάζεται από την έκταση της συζυγίας.<sup>(10)</sup> Η εισαγωγή βαρύτερων στοιχείων φαίνεται να ενισχύει την βαθυχρωμία, όπως και η αύξηση της ηλεκτρονιοδοτικής ικανότητας των υποκαταστατών του δακτυλίου.<sup>(11)</sup> Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι όταν γίνεται χρήση ομάδας N-πυρρολιδινουανιλίνης, λόγω ακαμψίας της εν λόγω ομάδας υπάρχει μικρή δράση στις φωτοχημικές ιδιότητες οι οποίες κυρίως επηρεάζονται από την συσσωμάτωση των σκουαραϊνών και την μικροκρυσταλλική δομή τους. Ελέγχοντας τη συσσωμάτωση μπορεί να προκύψει παγχρωμία, δηλαδή απορρόφηση σε όλο το ορατό φάσμα με 2 κύριες ζώνες στα 300nm (συσσωμάτωμα) και στα 600nm (μονομερές/συσσωμάτωμα).<sup>(12)</sup> Η συσσωμάτωση θα αναλυθεί παρακάτω στο κεφάλαιο αυτό.

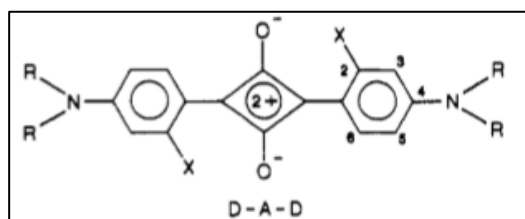


**Διάγραμμα 2** Φάσμα απορρόφησης πολυμερούς σκουαραϊνής με αύξηση μονομερικών ομάδων (13)

Σε παλαιότερη μελέτη, όπου μελετάται η επίδραση της έκτασης της π-συζυγίας σε ολιγομερή και πολυμερή, υπάρχει μια εξαιρετικά ενδιαφέρουσα παρατήρηση: Κατά την αύξηση των μονομερών, αρχικά παρατηρείται η αναμενόμενη αύξηση του βαθυχρωμικού φαινομένου λόγω αύξησης της συζυγίας, αλλά μετά από κάποιο αριθμό μονομερών παρατηρείται υποχρωμική μετατόπιση (Διάγραμμα 2). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: με την αύξηση του αριθμού των μονομερών χάνεται η συνεχόμενη συζυγία λόγω

παρουσίας δακτυλίων p-κινονης έναντι βενζολίου οπότε θα παρατηρηθεί υποχρωμικό φαινόμενο αντί του βαθυχρωμικού που αναμενόταν λόγω αύξησης των μονομερών.<sup>(13)</sup>

Σε μελέτη των ηλεκτρονιακών καταστάσεων της δι-(4-διμεθυλαμινοφαινόλη) σκουαραΐνης με χρήση μεθόδων υπολογισμού τροχιακών MNDO και CNDO, βρέθηκε ότι οι σκουαραΐνες έχουν ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα στον δακτύλιο με δομή  $D^- \rightarrow A^+ \leftarrow D^-$ , οπότε και προκύπτει ενδομοριακή μεταφορά φορτίου και ισχυρή επιδιалύτωση. Πρακτικά φαίνεται πως ο δακτύλιος είναι θετικά

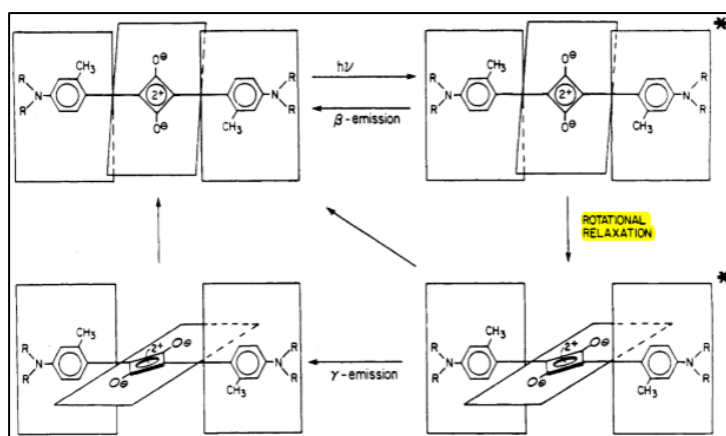


Εικόνα 6 Σκουαραΐνη που μελετήθηκε με δομή DAD (15)

φορτισμένος ενώ οι υποκαταστάτες αρνητικά, οπότε έλκουν τις αντίθετα φορτισμένες περιοχές πολικού διαλύτη σχηματίζοντας μία σφαίρα διαλύτη γύρω από το μόριο.<sup>(14)</sup> Σε παρόμοια μελέτη χρησιμοποιώντας τις ίδιες τεχνικές, η σκουαραΐνη με δομή D-A-D, όπου D: ανιλίνη και A: σκουαραϊκός

δακτύλιος (εικόνα 5), η μεταφορά φορτίου που αντιστοιχεί σε  $S_0 \rightarrow S_1$  μετάπτωση, λαμβάνει χώρα εντός του δακτυλίου του κυκλοβουτενίου. Μάλιστα παρατηρείται πως ισχυρή ζώνη απορρόφησης στα 627-661nm οφείλεται στον υποκατάστατη ανιλίνης. Οι N-άλκυλο ομάδες οδηγούν σε βαθυχρωμία και αύξηση του συντελεστή μοριακής απορρόφησης  $\epsilon$ , καθώς το μήκος της αλυσίδας μεγαλώνει. Επιπλέον, η υποκατάσταση στον άνθρακα 2 οδηγεί σε έντονη βαθυχρωμία η οποία σχετίζεται με το είδος της πλευρικής ομάδας (άλκυλο, αλκόξυ, αλογονίδιο). Παράλληλα παρατηρείται μείωση του  $\epsilon$  λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης, η οποία οδηγεί σε ανισόπεδη διευθέτηση των δακτυλίων τόσο σε βασική όσο και σε διεγερμένη κατάσταση. Αντίστοιχα η υποκατάσταση σε θέση

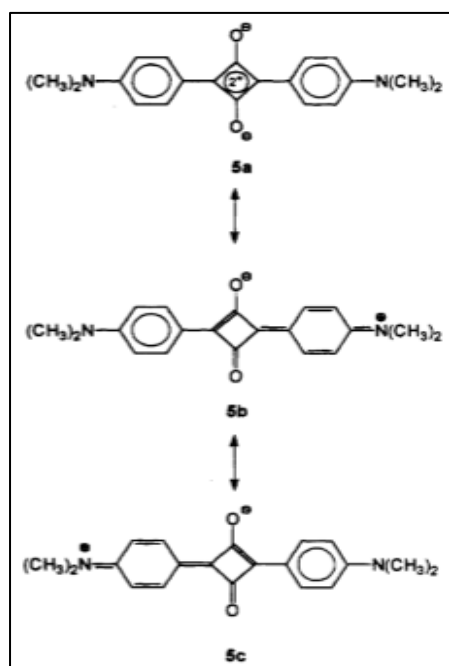
3 του δακτυλίου ευνοεί τον σχηματισμό συμπλόκου μορίου-διαλύτη και συνδυαστικά με στερικές αλληλεπιδράσεις προκαλεί βαθυχρωμικό φαινόμενο και αύξηση του  $\epsilon$ . Ενίσχυση της ενδομοριακής και διαμοριακής μεταφοράς φορτίου παρατηρείται



Εικόνα 5 Μηχανισμός αποδιέγερσης κεκαμμένης σκουαραΐνης (15)

κατά τη διέγερση του μορίου τόσο σε επιδιалυτωμένη όσο και σε μη επιδιалυτωμένη, κατάσταση. Αυτή η διέγερση μπορεί να αποσβεστεί χωρίς

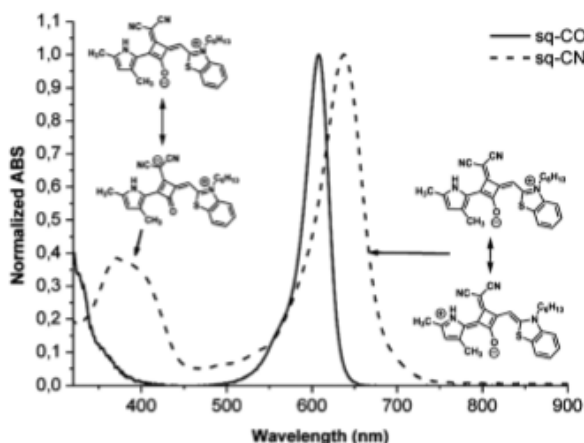
εκπομπή ακτινοβολίας μέσω του φαινομένου της περιστροφικής χαλάρωσης (εικόνα 6).<sup>(15)</sup>



Εικόνα 7 Δομή συντονισμού σκουαραϊνής 5a-5b-5c (16)

Σε μελέτη της δι-(4-διμεθυλάμινοφαινυλ)-σκουαραϊνής παρατηρήθηκε ότι η κύρια δομή του μορίου είναι αυτή που εντοπίζεται το διανιόν, εντός του σκουαραϊκού δακτυλίου (εικόνα 7-5<sup>a</sup>). Η προσθήκη ισχυρού οξέος, οδηγεί σε πρωτονίωση του μορίου, οπότε παρατηρείται αποχρωματισμός και κατά συνέπεια παύση του φθορισμού λόγω έλλειψης ενδομοριακής μεταφοράς φορτίου.<sup>(16)</sup> Μάλιστα, σε μη συμμετρικές φθοριωμένες σκουαραϊνες, όπως η 3,4-διμεθόξυ-φαινυλ-2'-φθόρο-(4'-διμεθυλάμινοφαινύλ)-σκουαραϊνη, έχει παρατηρηθεί υψηλή παγχρωματική φωτοευαισθησία στο Vis-NIR που ξεπέρασε κάθε άλλη σκουαραϊνη δείχνοντας ότι είναι ιδανικό υλικό για χρήση σε εκτυπωτικά μηχανήματα<sup>(17)</sup>

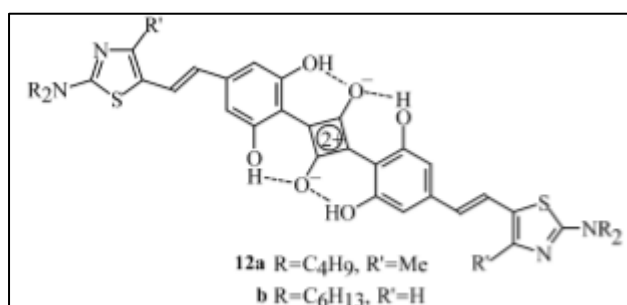
Μελέτες σε συμμετρικές και μη συμμετρικές σκουαραϊνες έδειξαν πώς η ενέργεια του μορίου επηρεάζεται από τις cis και trans διαμορφώσεις, και παρατηρήθηκε διαφορά ~0,8kJ/mol μεταξύ τους. Σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα, προκύπτει πως και οι δύο μορφές (cis και trans) συνυπάρχουν εντός διαλύματος. Στις συμμετρικές σκουαραϊνες, οι cis δομές είναι πιο πολωμένες συνεπώς, γίνεται πιο έντονος διαχωρισμός φορτίων και τα HOMO-LUMO τροχιακά έχουν χαμηλότερη ισχύ δόνησης από τα αντίστοιχα των trans διαμορφώσεων ενώ συνεισφέρουν περισσότερο στην διέγερση των μορίων. Στις μη συμμετρικές σκουαραϊνες παρατηρείται έντονη ανισοτροπία της ενέργειας μετάβασης, οπότε τα LUMO τροχιακά είναι λιγότερο κατειλημμένα κατά την διέγερση. Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι cis διαμορφώσεις έχουν πιο αποτελεσματική ενδομοριακή μεταφορά φορτίου.<sup>(18)</sup> Για να επιτευχθεί ο έλεγχος σύνθεσης της κάθε διαμόρφωσης αξιοποιείται η παρατήρηση ότι η cis διαμόρφωση προκύπτει όταν γίνεται χρήση ηλεκτρονιοελκτικών ομάδων πάνω στον σκουαραϊνικό δακτύλιο. Η



Διάγραμμα 3 Απορρόφηση κοινής σκουαραϊνής και cis στοχευμένης σε UV-Vis (19)

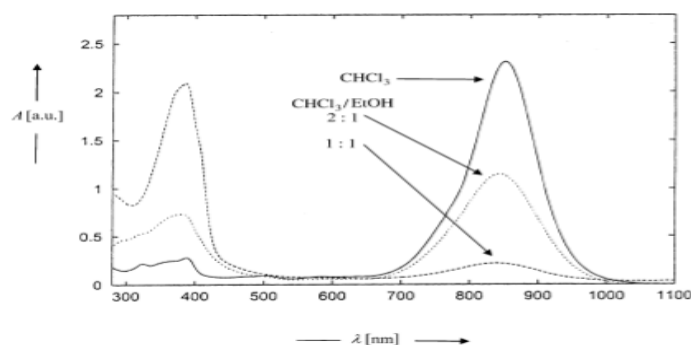


συμμετρία / μη συμμετρία δεν επηρεάζει την NIR ζώνη απορρόφησης αλλά κυρίως τις ιδιότητες συσσωμάτωσης. Με χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων επιτυγχάνεται η τροποποίηση της ενέργειας HOMO-LUMO τροχιακών οπότε και παρατηρείται παγχρωμία δηλαδή απορρόφηση και εκπομπή σε όλο το ορατό φάσμα όπως έχει διαπιστωθεί από πλήθος μελετών.<sup>(19)</sup>



Εικόνα 8 Ενδομοριακοί δεσμοί H σε σκουαραϊνή 12a-b (20)

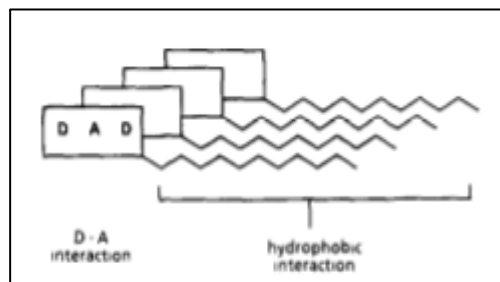
Οι σκουαραϊνες έχουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες στερεάς κατάστασης και μία από αυτές είναι το φαινόμενο της συσσωμάτωσης. Υπάρχουν δύο τρόποι συσσωμάτωσης των σκουαραϊνών. Το **J-συσσωμάτωμα** το οποίο έχει δομή στοίβαξης κεφαλή-ουρά (όπου κεφαλή ο υποκαταστάτης και ουρά ο σκουαραϊκός δακτύλιος) και προκαλεί ωφέλιμο βαθυχρωμικό φαινόμενο καθώς και το **H-συσσωμάτωμα** με δομή στοίβαξης κεφαλή-κεφαλή το οποίο προκαλεί ανεπιθύμητη υψοχρωμική μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης. Από μελέτες, προέκυψε η σκουαραϊνή 12a-12b (εικόνα 8) ως σκούρο μπλε προϊόν με μέγιστο απορρόφησης στο NIR το οποίο όμως επηρεάζεται από την παρουσία διαλυτών όπως η EtOH. Μεταξύ των δύο διαλυτών EtOH/CHCl<sub>3</sub> εμφανίζεται διαφορά στα μέγιστα της απορρόφησης περίπου 450nm. Παρατηρήθηκε ότι, με μείωση δεσμών H<sub>2</sub> ενδομοριακά, εμφανίζεται τάση στρέψης από το επίπεδο δότη δέκτη οπότε και αύξηση της NIR απορρόφησης η οποία απαιτεί ισχυρή διαμοριακή μεταφορά φορτίου. Η ύπαρξη της EtOH αλλάζει την συμπεριφορά του χρωμοφόρου καθώς επηρεάζει το συσσωμάτωμα, μετατρέποντάς το από J σε H οπότε και αντί για βαθυχρωμικό, παρατηρείται υψοχρωμικό φαινόμενο (διάγραμμα 20). Συγκεκριμένα η αιθανόλη εμποδίζει την μεταφορά ηλεκτρονίων από S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> μειώνοντας τους διαμοριακούς δεσμούς H<sub>2</sub> μεταξύ κεφαλής-ουράς οπότε και υπάρχει τάση στρέψης μεταξύ δότη-δέκτη. Η αλλαγή αυτή είναι 100% αντιστρεπτή απουσία πολικού / πρωτικού διαλύτη.<sup>(20)</sup>



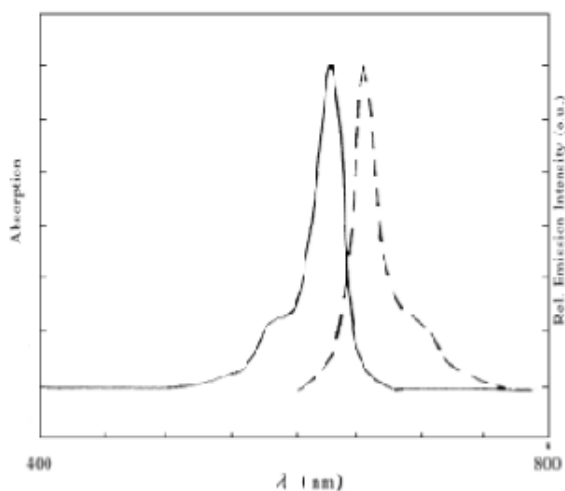
Διάγραμμα 4 Δράση διαλύτη επί συσσωμάτωσης και αντίστοιχης μετάτοπισης απορρόφησης σε σκουαραϊνες (20)



Σύμφωνα με τα προηγούμενα, σε διαφορετική έρευνα, κατά τη σύνθεση διμερούς σκουαραϊνής συνδεδεμένης στο ενδιάμεσο τμήμα της με φερροκένιο διαπιστώθηκε ότι όσο το μήκος της αλκυλοομάδας που συνδέει το φερροκένιο με τις μη συμμετρικές σκουαραϊνές αυξάνει, τόσο αυξάνει ο φθορισμός στο NIR, καθώς ευνοείται η J-συσσωμάτωση. Μάλιστα, η απόσταση μεταξύ των δακτυλίων στο φερροκένιο έχει μήκος 3,3-3,5Å που είναι ιδανικό για π-π στοίβαξη και αλληλεπίδραση. Επιπλέον, όταν η φερροκενική ομάδα βρίσκεται κοντά στα χρωμοφόρα τμήματα παρατηρήθηκε σίγαση του φθορισμού των σκουαραϊνών καθώς ευνοείται η μεταφορά  $e^-$  από το φερροκένιο στα δύο χρωμοφόρα τμήματα σε σχέση με την ενδομοριακή μεταφορά φορτίου εντός του δακτυλίου της σκουαραϊνής.<sup>(21)</sup>



Διάγραμμα 5 J-συσσωμάτωμα και αλληλεπιδράσεις που το οργανώνουν (23)

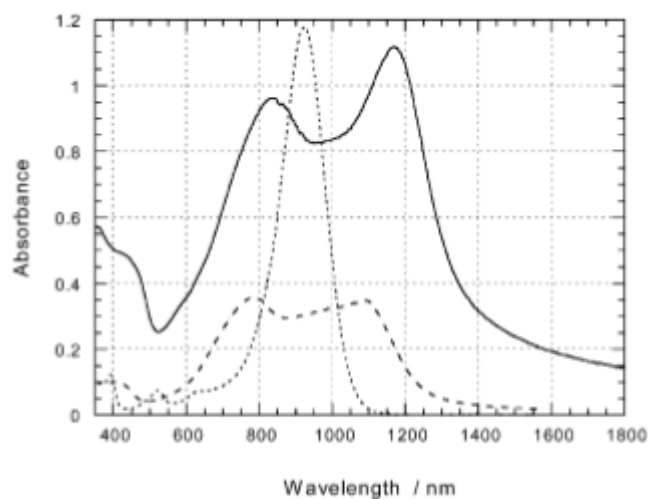


Διάγραμμα 6 Φάσμα εκπομπής και απορρόφησης (22)

Οι σκουαραϊνικές βαφές εμφανίζουν ισχυρές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και ταυτόχρονα με τον σχηματισμό συσσωματωμάτων, έχουν μικρή διαλυτότητα η οποία περιορίζει την χρήση τους. Η διαλυτότητά τους μπορεί να αυξηθεί με χρήση υποκαταστατών που διαθέτουν ιδιότητες στερεοχημικής παρεμπόδισης. Αυξάνοντας τις διαμοριακές αποστάσεις οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων μειώνονται ενώ η διαλυτότητα αυξάνεται. Αυτές οι βαφές παρουσιάζουν έντονη βαθυχρωμία του μεγίστου απορρόφησης λόγω σταθεροποίησης της D-π-A-π-D διεγερμένης κατάστασης καθώς και μειωμένο υποχρωμικό φαινόμενο λόγω παρουσίας διαλύτη. Στις ενώσεις αυτές, τα φάσματα εκπομπής και απορρόφησης είναι μεταξύ τους καθρέφτες όπως αναμένεται (διάγραμμα 6). Η αύξηση της διαλυτότητας μπορεί να επιτευχθεί με χρήση N-υποκαταστατών ή ομάδων υδροξυλίου και καρβοξυλίου.<sup>(22)</sup> Σε συμφωνία με αυτά παρατηρείται ότι, όταν υπάρχει μονοϋποκατάσταση με αλκυλοομάδες ευνοείται η J-συσσωμάτωση (διάγραμμα 5) καθώς αξιοποιείται η υδροφοβική αλληλεπίδρασή τους (σχηματισμός φιλμ). Με την εισαγωγή ολοένα και αυξανόμενης αλκυλοαλυσίδας αυξάνεται η βαθυχρωμία ενώ παρατηρείται και 2<sup>η</sup> κορυφή απορρόφησης σε στερεά φάση που δηλώνει την συσσωμάτωση της σκουαραϊνής. Η ύπαρξη N-άλκυλο αλυσίδων ευνοεί την συσσωμάτωση, καθώς προάγει την σωστή διεύθυνση των χρωμοφόρων μέσω στοίβαξης των D-A

τμημάτων και αλληλεπίδρασης των υδρόφοβων τμημάτων. Συνεπώς η αυτοσυγκρότηση των ενώσεων αυτών, πραγματοποιείται ανεξαρτήτα οποιασδήποτε περαιτέρω επεξεργασίας της ένωσης.<sup>(23)</sup>

Μελέτες διαφόρων ερευνητικών ομάδων έδειξαν ότι με εισαγωγή διαμινοάκυλο και αλκοόξυ ομάδων αυξάνει η βαθυχρωμία και η διαλυτότητα.

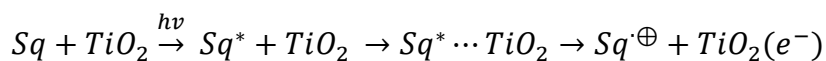


**Διάγραμμα 7** Φάσμα απορρόφησης για απλή σκουαραϊνή (...), για φιλμ από περιστροφή (---) και για φιλμ από θερμό τολουόλιο (συνεχής) (24)

Συγκεκριμένα, με αύξηση της ηλεκτρονιοδοτικής ισχύος των ομάδων δοτών ενισχύεται επιπλέον το βαθυχρωμικό φαινόμενο. Όταν σχηματίζεται στερεό μικροφίλμ μέσω περιστροφικής εναπόθεσης, ευνοείται η παγχρωματική απορρόφηση αν και με μειωμένη ισχύ λόγω Η-συσσωμάτωσης. Η μείωση αυτή (διάγραμμα 7) διαπιστώνεται όταν λαμβάνεται το φιλμ μέσω εξάχνωσης από διάλυμα θερμού τολουολίου. Στη

περίπτωση αυτή παρατηρείται τόσο Η-συσσωμάτωση (800nm το μέγιστο απορρόφησης) όσο και J-συσσωμάτωση καθώς και αντίστοιχη βαθυχρωμική μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης στα 1200nm έναντι της φυσιολογικής κορυφής απορρόφησης στα 900nm.<sup>(24)</sup> Παρατηρείται ότι ο σχηματισμός μικροφίλμ δεν είναι εύκολος λόγω θερμικής αποικοδόμησης. Όταν γίνεται προσθήκη υδροξυλίων τότε το φιλμ αυτό σταθεροποιείται και πραγματοποιείται καλύτερη εναπόθεση της σκουαραϊνης, η οποία ευνοείται λόγω διαμοριακών δυνάμεων. Η ύπαρξη δεσμών H<sub>2</sub> μεταξύ των υδροξυλίων προάγει τον σχηματισμό Η-συσσωμάτωματος αλλά όταν υπάρχουν διακλαδισμένες Ν-άλκυλο-ομάδες τότε ευνοείται το J-συσσωμάτωμα λόγω των απωστικών αλληλεπιδράσεων. Τελικώς πειραματικά δεδομένα έδειξαν πως όταν υπάρχουν υδροξυλομάδες και Ν-άλκυλο-αλυσίδες παρατηρείται J-συσσωμάτωμα.<sup>(25)</sup>

Πειράματα μελέτης της αλληλεπίδρασης των σκουαραϊνών με τιτανία, τα ζεύγη ηλεκτρονίων-οπών καταδεικνύουν μια γρήγορη αποδιέγερση και εμφάνιση ριζικού κατιόντος. Η αντίδραση της διεγερμένης σκουαραϊνης με TiO<sub>2</sub> φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



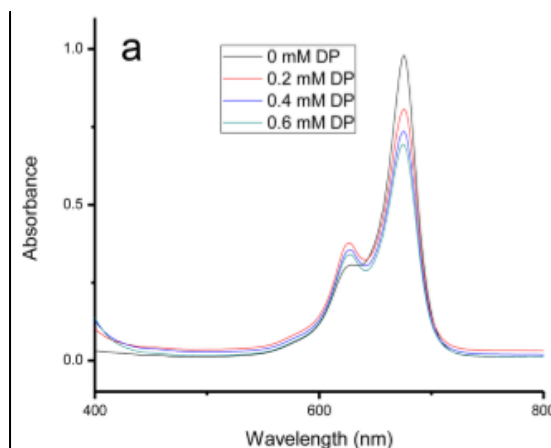
Στα ανωτέρω πειράματα, η μεταφορά ηλεκτρονίων ευνοείται με παρουσία COOH ομάδων στην επιφάνεια του ημιαγωγού οι οποίες προκαλούν ευρεία

απορρόφηση και βαθυχρωμικό φαινόμενο. Ο μηχανισμός βασίζεται σε  $\pi \rightarrow \pi^*$  διέγερση του χρωμοφόρου. Η απλή διέγερση  $\pi \rightarrow \pi^*$  αυξάνει την πυκνότητα  $e^-$  του σκουαρκίου δακτυλίου μέσω μεταφοράς φορτίου από τα άτομα οξυγόνου και σχηματίζεται διμερές διεγερμένης σκουαραϊνης και της τιτανίας. <sup>(26)</sup>

### 1.3 Βιοχημεία σκουαραϊνών-ημισκουαραϊνών



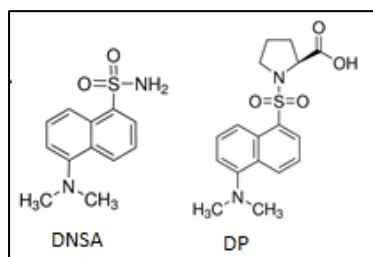
Εικόνα 9 Πρόσδεση Sq σε αλβουμίνη



Διάγραμμα 8 Απορρόφηση διαλύματος Sq-BSA με βαθμιαία αύξηση συγκέντρωσης DP (5)

Ο ορός αλβουμίνης των ανθρώπων και των βοοειδών (HSA/BSA) είναι η κύρια πρωτεΐνη του πλάσματος του αίματος και είναι γνωστή για την δυνατότητά της να δεσμεύει και να μεταφέρει διάφορα μόρια σε πολλές θέσεις. Αυτή η ιδιότητά της οφείλεται στην ύπαρξη δύο θέσεων πρόσδεσης της πρωτεΐνης (εικόνα 9). Η πρόσδεση στο τμήμα I εξαρτάται από την υδροφοβικότητα ενώ στο τμήμα II τόσο από υδροφοβικότητα όσο και από ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση. Σε βιολογικά πειράματα, γίνεται κυρίως χρήση βοδινού ορού αλβουμίνης ως μόριο για ανίχνευση και μελέτη του τρόπου δέσμευσης ουσιών αλλά και για φαρμακευτική μεταφορά υδροφοβων φαρμάκων. Συγκεκριμένα γίνεται χρήση κυρίως νανοσωματιδίων αλβουμίνης (NPs) τα οποία είναι βιοαποικοδομήσιμα και έχουν ενδιαφέρον ως φορείς φαρμάκων για την θεραπεία καρκίνου. Σε σχέση με άλλα είδη NPs είναι ελάχιστα τοξικά και παρασκευάζονται γρήγορα σε γαλάκτωμα νερού με έλαιο.

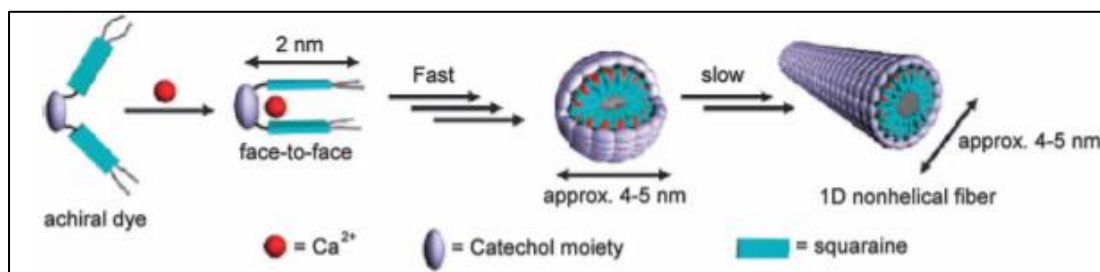
Καθώς οι πρωτεΐνες είναι σημαντικά βιομόρια, έχουν αναπτυχθεί φορείς NPs με ιδιότητες φθορισμού όταν εισάγονται σε αυτά σκουαραϊνες που λειτουργούν ως ανιχνευτές πρωτεϊνών. Οι σκουαραϊνες έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και εμφανίζουν φθορισμό, ιδιότητες που αυξάνονται όταν εγκολλιώνονται σε πρωτεΐνες. Μάλιστα αυτά τα NPs σκουαραϊνών, αξιοποιούνται και σε βιοαπεικόνιση. Η σύνδεσή τους με BSA-NPs οδηγεί σε βαθυχρωμικό φαινόμενο και αυξάνει την ένταση απορρόφησης και εκπομπής τους λόγω της συσσωμάτωσης των σκουαραϊνών εντός του μη υδατικού περιβάλλοντος του



**Εικόνα 10** Δομές των 5-(διμεθυλάμινο)-1-ναφθαλενοσουλφαμιδίου (DNSA) και δανσυλ-L-προλίνης (DP)

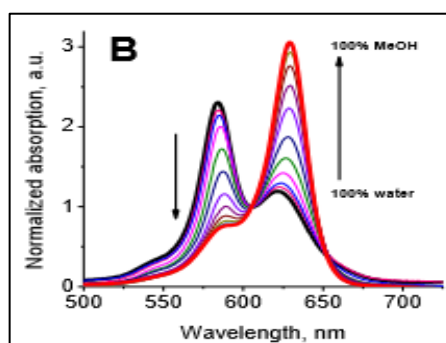
BSA. Η μελέτη σύνδεσης με τα δύο κέντρα του BSA γίνεται με χρήση των DP και DNSA (εικόνα 10) τα οποία έχουν εκλεκτική πρόσδεση στα κέντρα πρόσδεσης του BSA, II και I αντίστοιχα. Σύμφωνα με αυτά, παρατηρείται μείωση απορρόφησης στα 600nm του συμπλόκου Sq-BSA με αύξηση της κορυφής στα 600nm παρουσία DP (διάγραμμα 8), οπότε διαπιστώνεται η σύνδεση σκουαραϊνης στο κέντρο II και αύξηση συσσωμάτωσής της.<sup>(5)</sup> Η αξιοποίηση

υδατοδιαλυτών σκουαραϊνών σε βιολογική/κλινική ανίχνευση μπορεί να γίνει με χρήση του μοντέλου HSA/BSA αλλά και με αβιδίνη μελετώντας την αύξηση έντασης απορρόφησης στα 600-900nm παρουσία της πρωτεΐνης. Μια εξίσου ενδιαφέρουσα παρατήρηση προκύπτει όταν κατασκευαστούν μόρια διμερών σκουαραϊνών με ενδιάμεσο τμήμα spacer οπότε αυτά τα νέα μόρια, αυτοοργανώνονται σε υδατικό περιβάλλον (εικόνα 11) με την βοήθεια κατιόντων τα οποία προκαλούν αναδίπλωση των διμερών.<sup>(27)</sup>



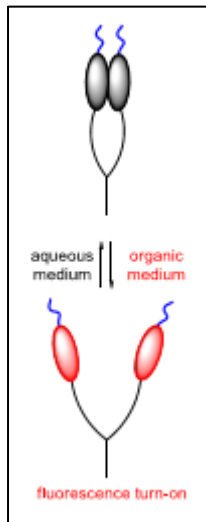
**Εικόνα 11** Αυτοοργάνωση διμερούς σκουαραϊνης

Επιπλέον, η σύνθεση χρωστικών, ευαίσθητων στην αλλαγή πολικότητας είναι σημαντική για βιολογική απεικόνιση. Συνήθως αυτές παρέχουν περιορισμένης φωτεινότητας εκπομπή λόγω συσσωμάτωσης σε υδατικά διαλύματα, οπότε δεν λειτουργούν ιδανικά στο βιολογικό παράθυρο των 600-900nm. Προτάθηκε λοιπόν η σύνθεση βαφής από διμερή σκουαραϊνης που αναδιπλώνονται σε οργανικό περιβάλλον ενώ συσσωματώνονται σε H<sub>2</sub>O



**Διάγραμμα 9** Φάσμα απορρόφησης και μετατοπίσεις με βάση την αλλαγή του διαλύτη (28)

απενεργοποιώντας ή ενεργοποιώντας τον φθορισμό τους (εικόνα 12). Τα διμερή αυτά εντός υδατικού περιβάλλοντος παρουσιάζουν υψοχρωμική μετατόπιση μεγίστου απορρόφησης λόγω H-συσσωμάτωσης οπότε και δεν φθορίζουν (διάγραμμα 9). Με εισαγωγή τους σε BSA παρατηρήθηκε η ενεργοποίηση του φθορισμού καθώς η πρωτεΐνη προσφέρει το υδρόφοβο περιβάλλον για αναδίπλωση του μορίου και αποσυσσωμάτωσή του. Η αύξηση



**Εικόνα 12**  
Συσσωμάτωση  
διμερούς Sq με  
αλλαγή  
πολικότητας  
διαλύτη (28)

της διαλυτότητας εντός  $H_2O$  έγινε με προσθήκη ομάδων πολυαιθύλενογλυκόλης (PEG) η οποία βοηθά στην εκλεκτική πρόσδεση στην πρωτεΐνη έναντι των λιπιδίων. Τα διμερή παρουσίαζαν μέγιστη φωτεινότητα με  $\epsilon=660000 M^{-1}cm^{-1}$  και κβαντική απόδοση (QE) 40% οπότε μπορούν να αξιοποιηθούν σε πολλές *in vivo* και *in vitro* εφαρμογές.<sup>(28)</sup> Προφανώς η χρήση και ο σχεδιασμός τέτοιων εκλεκτικών αισθητήρων είναι χρήσιμος σε κλινικές αναλύσεις. Η χρήση μετάλλων σε αισθητήρες επιφέρει κινδύνους, ενώ σε αντιδιαστολή, μόρια σκουαραϊνών μπορούν να δράσουν ως εκλεκτικοί ανιχνευτές για HSA όταν αυτοοργανώνονται σε υδατικό διάλυμα με μεγάλη ασφάλεια. Σχηματίζονται με αυτό τον τρόπο NPs μη φθορίζοντα τα οποία όμως παρουσία της πρωτεΐνης έχουν πράσινο φθορισμό και συνδέονται με τα υπάρχοντα κατάλοιπα κυστεΐνης (εικόνα 13). Τα αντίστοιχα ελεύθερα μόρια ανιχνεύουν κάθε θειόλη που βρίσκεται σε πρωτεΐνες.<sup>(29)</sup>

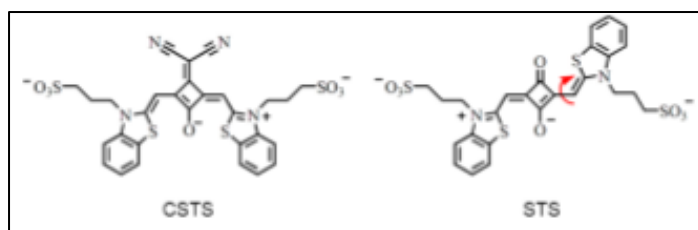
Συμπληρωματικά, η χρήση κβαντικών τελειών (Q-dots), οι οποίες αξιοποιούνται ως ανιχνευτές με NIR απορρόφηση λόγω έντασης εκπομπής και σταθερότητας, τείνουν να αντικατασταθούν. Η πιθανότητα διαρροής ιόντων βαρέων μετάλλων από αυτές οδήγησε σε σύνθεση πολυμερικών τελειών (P-dots). Αυτές έχουν μικρότερο μέγεθος (<30nm), υψηλό φθορισμό, γρήγορη εκπομπή μετά από διέγερση, εξαιρετική φωτοσταθερότητα, αμελητέα τοξικότητα με QE=0,3 αλλά και μικρή πιθανότητα διαρροής της βαφής. Η στρατηγική σύνθεσης περιλαμβάνει την ενσωμάτωση της σκουαραϊνης λόγω



**Εικόνα 13** Ανίχνευση από σκουαραϊνες και NPs αυτών (29)

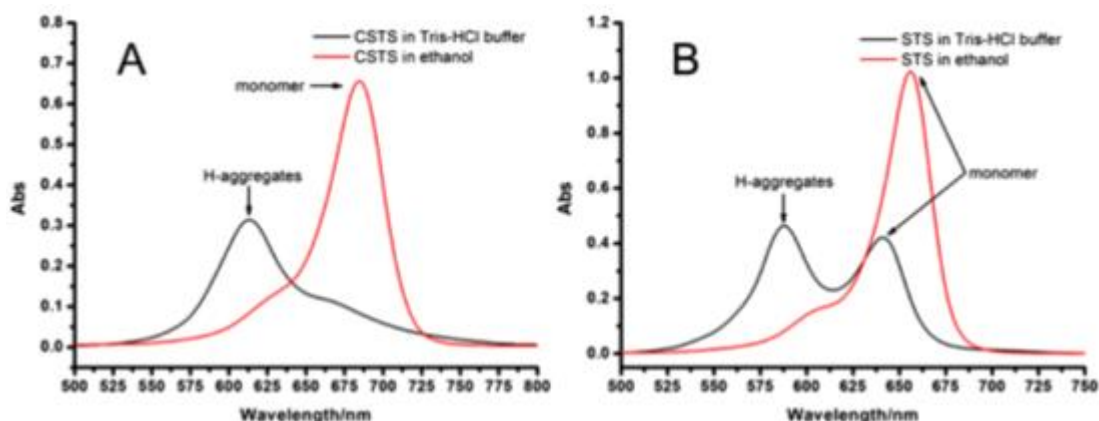
υδροφοβικότητας εντός του πολυμερούς του P-dot, οπότε και εμφανίζεται εκπομπή στο ορατό. Κατά την φωτεινή διέγερση το P-dot μεταφέρει την ενέργεια στην βαφή, οπότε η εκπομπή στην περιοχή του ορατού (Vis) εξαφανίζεται ενώ παρατηρείται NIR εκπομπή.<sup>(30)</sup>





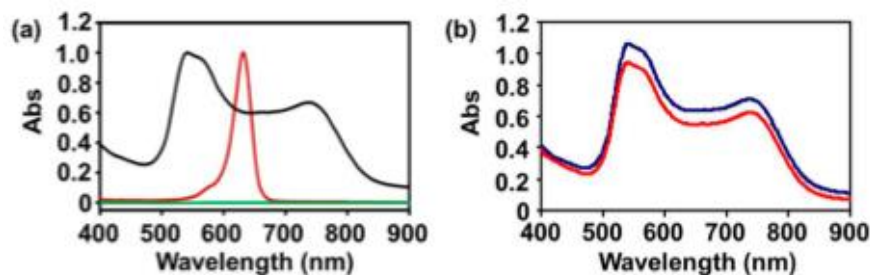
Εικόνα 14 Cis και trans δομές της σκουαρίνης

Οι σκουαρίνες βρίσκουν εφαρμογή και σε μελέτες της δομής του DNA ως ανιχνευτές. Έρευνες στα νουκλεϊκά οξέα έδειξαν ότι εντός γονιδίων υπάρχουν επαναλαμβανόμενες ομάδες γουανίνης που σχηματίζουν G-τετραμερή, τα οποία αποτελούνται από στοιβάξη πολυστρωματικών G4s μέσω οκτώ δεσμών H<sub>2</sub>. Η ύπαρξη τέτοιων δομών στα γονίδια και τα τελομερή κάνει τη μελέτη τους σημαντική για ανάπτυξη φαρμάκων. Αυτά έχουν μεγάλη ποικιλία μορφών και η δομή τους δεν είναι καλά μελετημένη. Έτσι υπάρχει ανάγκη για ανιχνευτές που λειτουργούν στο βιολογικό «παράθυρο» στο NIR με στόχο την βαθιά κυτταρική διείσδυση. Οι σκουαρίνες έχουν αυτές τις ιδιότητες και μέσω της χρήσης τους είναι δυνατός ο εντοπισμός τέτοιων δομών. Στις σκουαρίνες που έχουν μελετηθεί η trans διαμόρφωση δεν ευνοείται λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης των πλευρικών ομάδων (εικόνα 14). Τόσο οι απορροφήσεις των trans όσο και cis δομών φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 10) παρουσία όξινου ρυθμιστικού διαλύματος αλλά και EtOH. Παρατηρούμε ότι στο όξινο ρυθμιστικό διάλυμα (παρουσία ιόντων Na και K), στην trans διαμόρφωση υπάρχει το μονομερές μαζί με την δομή Η-συσσωμάτωματος, οπότε και εμφανίζεται υποχρωμική μετατόπιση. Στην cis δομή παρατηρείται κυρίως το Η-συσσωμάτωμα. Και στις δύο περιπτώσεις σε διάλυμα EtOH εμφανίζεται κυρίως η κορυφή του απλού μορίου χωρίς συσσωμάτωση.<sup>(31)</sup>



Διάγραμμα 10 Διαγράμματα απορρόφησης cis και trans Sq σε ρυθμιστικό διάλυμα και σε EtOH (31)

Στα πλαίσια της βιολογικής τους δράσης, οι σκουαραΐνες μπορούν να αξιοποιηθούν στην φωτοακουστική τομογραφία (PAT). Αυτή είναι μια καινοτόμος μορφή απεικόνισης με υψηλή ανάλυση και μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης σε σχέση με άλλες τεχνικές. Περιλαμβάνει τη τοπική απορρόφηση παλμικού LASER από τους ιστούς που οδηγεί σε παροδική θερμοελαστική διαστολή. Με τη μέθοδο αυτή παράγονται κύματα πίεσης που εντοπίζονται από ανιχνευτή υπερήχων. Οι ιστοί απορροφούν στο παράθυρο του NIR (700-900nm) οπότε το laser έχει μεγαλύτερη εισχώρηση όσο το μήκος κύματος αυξάνει. Έτσι γίνεται χρήση οργανικών μορίων με NIR απορρόφηση η οποία προκύπτει όταν υπάρχει εκτενής ππ-συζυγία. Η πολυπλοκότητα των ενώσεων αυτών απαιτεί εύκολη κατά το δυνατόν σύνθεση. Οι σκουαραΐνες απορροφούν στο ορατό-NIR ενώ εντός υδατικών διαλυμάτων συσσωματώνονται οπότε και παρατηρείται βαθυχρωμικό φαινόμενο. Με εισαγωγή τους σε αλβουμίνη συσσωματώνονται αλλά διασπείρονται επαρκώς σε υδατικό περιβάλλον. Κατά την συσσωμάτωσή τους η απορρόφηση απλώνει και εμφανίζονται ως δύο ζώνες με μέγιστα στα 532 και 740nm. Αυτό δείχνει την ύπαρξη δύο μορφών συσσωματώματος J και H με βαθυχρωμική και υποχρωμική μετατόπιση αντίστοιχα. Μόνο το πρώτο είδος συσσωματώματος ενισχύει την NIR απορρόφηση λόγω βαθυχρωμίας. Η σύμπλεξη Sq με HSA είναι ισχυρή και σταθερή, οπότε η χρήση των σκουαραϊνών είναι εφικτή στην τεχνική PAT αλλά και σε άλλες τεχνικές βιολογικής απεικόνισης.<sup>(32)</sup>



*Διάγραμμα 11 α) Απορρόφηση απλού μη συσσωματωμένου μορίου Sq (κόκκινο) και συσσωματωμένης δομής (μαύρο) β) Απορρόφηση συμπλόκου Sq-HSA σε διάρκεια 0 ημερών (μπλε) και 140 ημερών (κόκκινο) (32)*

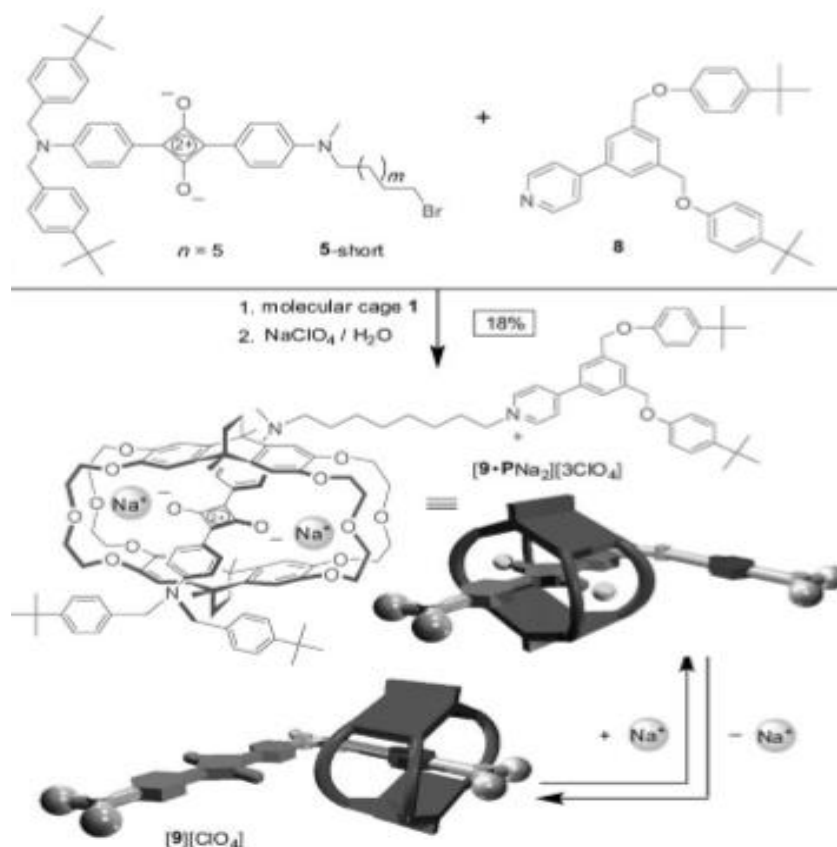
## 1.4 Άλλες εφαρμογές

Οι σκουαραΐνες αποτελούν πολλά υποσχόμενες ενώσεις με πιθανές εφαρμογές σε πολλές τεχνολογικές καινοτομίες. Παρακάτω παρατίθενται τέτοια παραδείγματα χρήσης των σκουαραϊνικών παραγώγων.

### ✓ Μοριακοί διακόπτες

Η ανάπτυξη ενδομοριακά κλειδωμένων μοριακών δομών, με χρήση ροταξανίων και κατενάνιων είναι αυτή που επιτρέπει την ελεγχόμενη μετανάστευση ενός μηχανικά κλειδωμένου τμήματος μεταξύ δύο θέσεων πάνω σε ένα μόριο. Αυτό περιγράφει σύντομα την αρχή λειτουργίας των μοριακών διακοπών. Οι μοριακοί διακόπτες υπόκεινται σε μια συνδιαμορφωτική αλλαγή υπό την επίδραση pH, φωτός, θερμότητας, H<sup>+</sup>, ανιόντων είτε ηλεκτρονίων

μεταξύ δύο διαφορετικών σταθερών καταστάσεων. Μπορούν να διεγερθούν με πολλούς τρόπους και τα αποτελέσματα της διέγερσης είναι μηχανικές δυνάμεις είτε οπτικά σήματα, τα οποία αντιστοίχως χρησιμοποιούνται σε μοριακές μηχανές και μοριακούς ανιχνευτές. Μάλιστα οι μοριακοί διακόπτες με φθορισμό στο εγγύς υπέρυθρο (NIR) έχουν σημασία σε βιολογικές μελέτες και σε φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) με εφαρμογή στην σήμανση αλλά και ανίχνευση, εντός ζωντανών ιστών και κυττάρων. Οι χρωστικές σκουαραϊνών, οι οποίες φθορίζουν, παρουσιάζουν χαμηλή κβαντική απόδοση σε πολικούς διαλύτες. Όταν όμως αυτές είναι εγκλεισμένες ενδιάμεσα σε άλλες μοριακές δομές τότε δεν «αισθάνονται» το πολικό περιβάλλον τόσο έντονα, οπότε η κβαντική απόδοση τους αυξάνεται. Αυτή η συμπεριφορά τις κάνει πολλά υποσχόμενες για χρήση σε μοριακούς διακόπτες εντός πολικού περιβάλλοντος. Τέτοιο παράδειγμα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, στην οποία ιόντα  $\text{Na}^+$  βοηθούν στην σύμπλεξη του μοριακού «κλουβιού»/δακτυλίου γύρω από το σκουαραϊνικό τμήμα του διακόπτη και τον επακόλουθο εντονότερο φθορισμό του (εικόνα 15). Η απομάκρυνση του  $\text{Na}^+$  μεταβάλλει την θέση του μηχανικά κλειδωμένου «κλουβιού» πάνω στο «καλώδιο» (με το σκουαραϊνικό τμήμα) του μοριακού διακόπτη.<sup>(33)</sup>

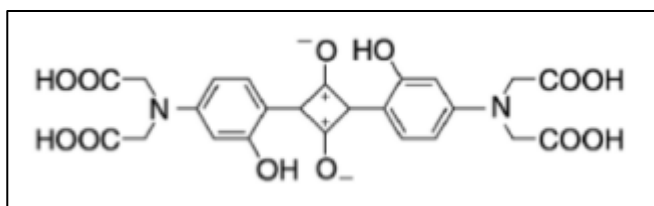


Εικόνα 15 Μοριακός διακόπτης και λειτουργία (33)



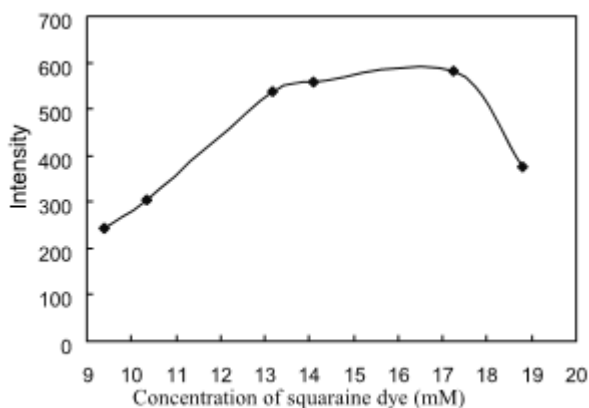
✓ pH-μετρικοί ανιχνευτές

Η χρήση pH-μέτρων φθορισμού είναι δημοφιλής την τελευταία δεκαετία και βρίσκει μεγάλη απήχηση σε τοξικολογικές, βιολογικές, αναλυτικές μελέτες ανά τον κόσμο. Το πλεονέκτημά τους



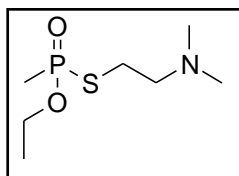
Εικόνα 16 Δομή σκουαραϊνης (34)

είναι η μη ύπαρξη ηλεκτροδίου αναφοράς, η μη ύπαρξη ηλεκτροστατικής παρεμβολής αλλά και η άμεση μέτρηση με εξαιρετική ακρίβεια. Η τάση των pH-μετρικών ανιχνευτών, είναι να λειτουργούν σε μήκη κύματος άνω των 500nm καθώς α) υπάρχουν οικονομικά lasers σε αυτά τα μήκη κύματος, β) τα περισσότερα βιολογικά δείγματα παρουσιάζουν φωταύγεια υποβάθρου σε UV αλλά και ορατό με μικρά μήκη κύματος, γ) υπάρχει μεγάλη απορρόφηση σε βιολογικά δείγματα για φως με μήκος κύματος μικρότερο των 500nm. Τα περισσότερα οπτικά pH-μετρα αποτελούνται από μία διαπερατή σε H<sup>+</sup> στερεά μήτρα, η οποία τοποθετείται στον ανιχνευτή και στην οποία ενσωματώνεται μια βαφή με ιδιότητες φθορισμού. Συνήθως χρησιμοποιείται στερεά γέλη, πολυμερή ή σίλικα. Η σίλικα επικρατεί καθώς είναι μηχανικώς σταθερή σε καταπόνηση και κατεργασία αλλά και δεν επιμολύνεται από μικροβιολογικούς παράγοντες. Σε πείραμα της ομάδας της Lina Xue σωματίδια σίλικας SiNPs 60-100nm συντέθηκαν με αντίστροφη γαλακτωματοποίηση οπότε αναπτύχθηκαν σε μορφή πόρων-κλουβιού εντός του οργανικού διαλύτη. Το σύστημα SiNPs είχε καρβοξυλικές ομάδες στην επιφάνειά του με στόχο την μικρότερη συσσωμάτωση όταν αυτό ευαισθητοποιήθηκε με την σκουαραϊνη (εικόνα 16). Το σύστημα έδειξε αποτελεσματική μέτρηση σε εύρος pH=3,01-5,72. Επίσης ο ανιχνευτής είχε αντοχή στην αλλοίωση των μετρήσεων εντός διαλύματος με 10ppm σε κάθε γνωστό κλασικό μέταλλο. (34)

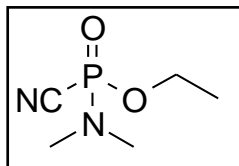


Διάγραμμα 12 Συγκέντρωση σκουαραϊνης σε σίλικα και ένταση φθορισμού (34)

✓ Ανίχνευση και διαχωρισμός νευροτοξινών

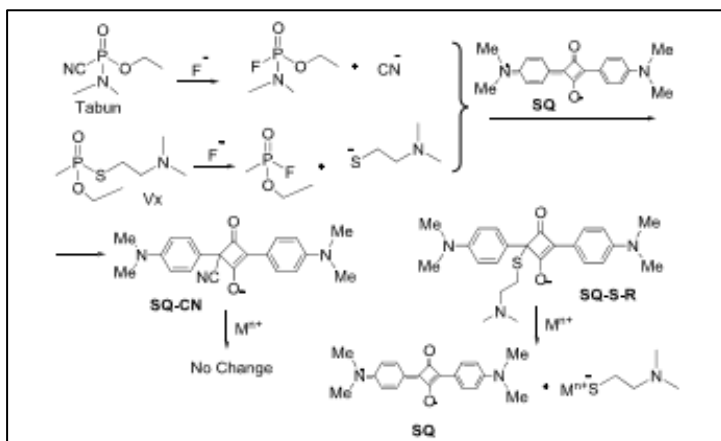


Εικόνα 19 Vx



Εικόνα 18 Tabun

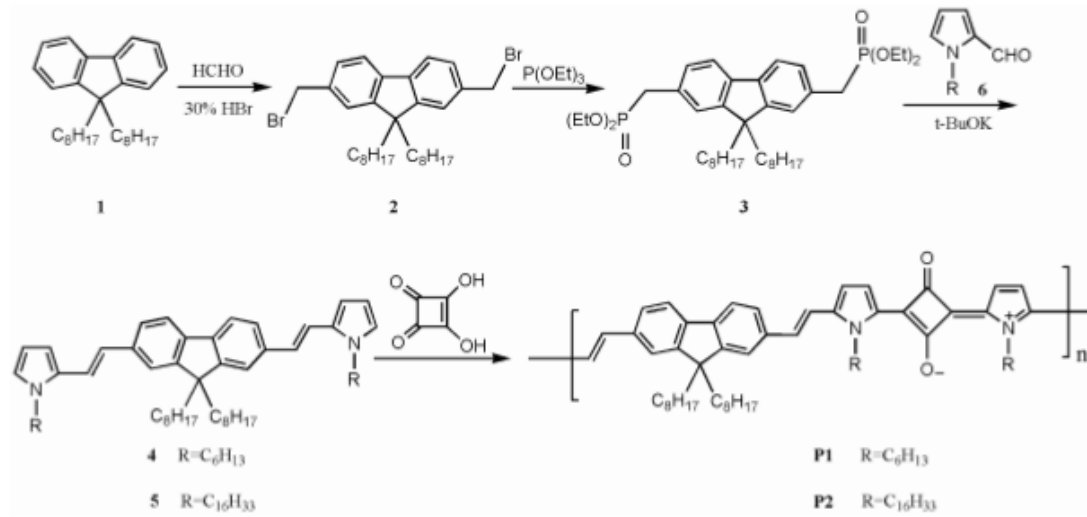
Με την χρήση σκουαραϊνών είναι δυνατή η ανίχνευση και ο διαχωρισμός νευροτοξινών που χρησιμοποιούνται στον χημικό πόλεμο, όπως μουστάρδες, καθώς και αυτών με βάση τον φώσφορο όπως τα Tabun και Vx (εικόνες 17&18). Μετά την εισπνοή τους δρουν στο ένζυμο ακέτυλοχολινεστεράση οπότε υπερδιεγείρουν το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και οδηγούν στο θάνατο. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από την ομάδα του Vinod Kumar έγιναν σε δείγματα νερού, χώματος και αέρα ώστε να προσομοιάζουν με πραγματικές συνθήκες χρήσης του ανιχνευτή. Η ανάγκη για αμεσότητα των μετρήσεων σε ρεαλιστικές συνθήκες οδήγησαν στην κατασκευή ανιχνευτών με χρήση φθοριζόντων ενώσεων ως παράγοντες ανίχνευσης. Ο γενικός μηχανισμός δράσης των ανιχνευτών είναι η πυρηνόφιλη προσβολή είτε της φωσφο-ένωσης, μετά από απομάκρυνση αποχωρούσας ομάδας, είτε παραγώγου της διάσπασής της, στο σκουαραϊνικό άνθρακα της σκουαραϊνης, που οδηγεί στον αποχρωματισμό της και παύση της ιδιότητας του φθορισμού λόγω διακοπής της εκτενούς συζυγίας του μορίου. Στα εν λόγω πειράματα αξιοποιήθηκε ένα σύστημα σκουαραϊνης παρουσία ανιόντων F<sup>-</sup>, τα οποία αντιδρώντας με τα Vx και Tabun έδωσαν ενώσεις (ως αποχωρούσες ομάδες), οι οποίες έκαναν πυρηνόφιλη προσβολή στην σκουαραϊνή αποχρωματίζοντάς την και παύοντας τον φθορισμό της. Μάλιστα το Vx αποδίδει μια θείο-άλκυλο-άμινο ομάδα, η οποία με το θείο συμπλέκεται στην σκουαραϊνή σε πρώτο βήμα αλλά παρουσία θειόφιλων μετάλλων αποσυμπλέκεται οπότε, και η σκουαραϊνή (μαζί με τις ιδιότητες όπως χρώμα και φθορισμός) ανακτάται (εικόνα 19). Έτσι είναι δυνατή η κατασκευή ενός ανιχνευτή με χρήση σκουαραϊνης που εντοπίζει παρόμοιους φωσφο-παράγοντες με τοξική δράση και μάλιστα κάνοντας επιτρεπτό την διάκρισή τους από το τουλάχιστον 10 φορές πιο τοξικό Vx.<sup>(35)</sup>



Εικόνα 17 Τρόπος δράσης σκουαραϊνης στον εντοπισμό των τοξικών Vx και Tabun (35)

✓ Πολυμερή

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον σε πολυμερή με φωτοβολταϊκές ιδιότητες με πιθανή χρήση σε PLEDs, φωτοδιόδους κ.α. Η



Εικόνα 20 Συνθετικό σχήμα του πολυμερούς (36)

ομάδα του Jiangyong Wu συνέθεσε πολύ-(φλουορένιο-alt-σκουραϊνή) με χρήση βινυλίου ως συνδετική ομάδα μέσω άμεσης συμπύκνωσης των μονομερών (εικόνα 20). Το πολυμερές αυτό έχει χαμηλό ενεργειακό χάσμα και δομή σκελετού δότη-δέκτη με την σκουραϊνή ως δέκτη και το φλουορένιο ως δότη. Όμως καθώς οι σκουραϊνες έχουν μικρή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες προστέθηκαν 9,9-διάλκυλο-ομάδες στο φλουορένιο, οπότε και αυξήθηκε η διαλυτότητα σε άπολους οργανικούς διαλύτες. Εμφανίζονται ευρείες κορυφές στο ορατό και NIR σε ζώνη απορρόφησης 500-1000nm. Η ευρεία κορυφή εμφανίζεται sharp λόγω της εκτενούς συζυγίας. Συνεπώς, η χρήση της σκουραϊνης έφερε τα επιθυμητά αποτελέσματα χαμηλού Eg έντονης NIR απορρόφησης και βελτίωσε τις οπτικές και ηλεκτρονιακές ιδιότητες.<sup>(36)</sup>

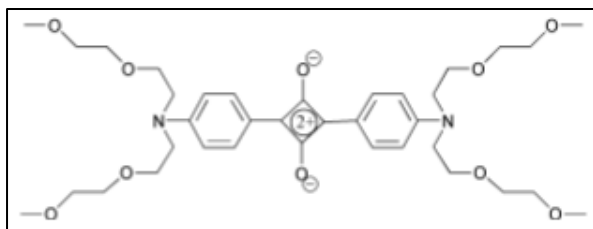
Polymers	Yield%	$M_w^a$	$M_n^a$	$M_w/M_n^a$	$T_d/\square^b$	$T_g/\square^b$
<b>P1</b>	72	142700	20400	7.00	421.23	158.66
<b>P2</b>	68	254400	28900	8.80	407.29	116.42

<sup>a</sup>GPC (THF), polystyrene standards. <sup>b</sup>TGA and DSC under nitrogen.

Πίνακας 1 Ιδιότητες των 2 πολυμερών (36)

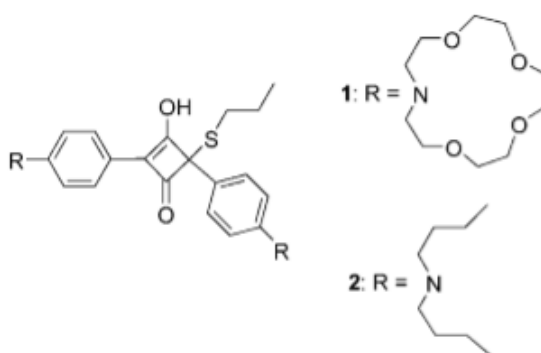
✓ Ανίχνευση  $Hg^{2+}$  και  $CN^-$

Οι υδατοδιαλυτές σκουραϊνες μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανίχνευση τοξικών παραγόντων όπως  $CN^-$  και  $Hg^{2+}$ . Στην πρώτη περίπτωση ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας του  $CN^-$  αξιοποιείται, οπότε και αυτό θα κάνει πυρηνόφιλη προσβολή στο σκουραϊνικό άνθρακα και έτσι θα γίνει αποχρωματισμός του διαλύματος. Το χρώμα προέρχεται από την μεταφορά



**Εικόνα 21** Υδατοδιαλυτή σκουαραΐνη για ανίχνευση  $CN^-$  (37)

οποίο παρουσία  $CN^-$  εκλεκτικά θα αποχρωματιστεί και θα χαθεί η κορυφή στα 641nm. Αντίθετα κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται παρουσία  $Cl^-$ ,  $F^-$ ,  $Br^-$ ,  $SCN^-$ ,  $I^-$ ,  $Ac^-$ ,  $NO_3^-$  και  $HSO_4^-$ , οπότε και η ανίχνευση είναι εκλεκτική.<sup>(37)</sup> Για τα ιόντα Hg η στρατηγική είναι ακριβώς αντίθετη. Ενσωματώθηκε σε μια υδατοδιαλυτή σκουαραΐνη ένα μικρό οργανικό μόριο εντός του σκουαραϊκού δακτυλίου ως παράγοντας εξάλειψης χρώματος και φθορισμού (εικόνα 22). Αυτό το μόριο διακόπτει την συζυγία της σκουαραΐνης. Όταν το  $Hg^{2+}$  είναι στο περιβάλλον του ανιχνευτή θα αντιδράσει με τον παράγοντα αυτό και αποσπώντας τον θα απελευθερωθεί η σκουαραΐνη, η οποία έχει ανακτήσει τον φθορισμό και το χρώμα της. Συνήθως γίνεται χρήση θείο-άλκυλο ομάδας, η οποία έχει συγγένεια με το Hg. Μόλις αυτά αντιδράσουν μεταξύ τους η σκουαραΐνη απελευθερώνεται και το έντονο χρώμα μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και με το μάτι. Ταυτόχρονα εμφανίζεται και η κορυφή του φάσματος στα 642nm.<sup>(38)</sup> Μάλιστα σε διάφορες μελέτες η ανίχνευση μπορεί να γίνει ακόμη και σε συγκέντρωση 2ppb.



**Εικόνα 22** Τροποποιημένη σκουαραΐνη ανιχνευτής Hg (38)

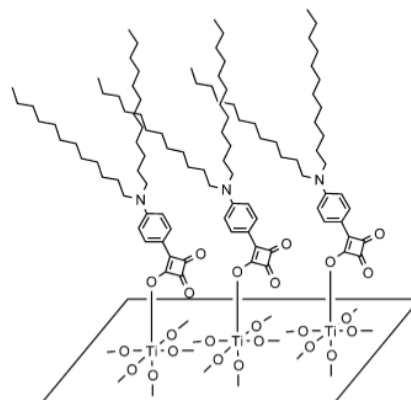
### ✓ Ηλεκτρόδια $SnO_2$

Τροποποιημένα ηλεκτρόδια, τα οποία περιέχουν μονοστοιβάδα επιφανειακής 4-(διστεάρυλάμινο)φαινύλ-4'-(διμεθυλάμινο)φαινύλ-σκουαραΐνης (DSSQ) πάνω σε  $SnO_2$ , χρησιμοποιήθηκαν από ερευνητικές ομάδες για μελέτες φωτοηλεκτρικών κυττάρων. Παρατηρήθηκε πως το χρωμοφόρο της σκουαραΐνης συσσωματώνεται στο ηλεκτρόδιο. Σε συνθήκες περιβάλλοντος καθοδικό φωτορεύμα εμφανίζεται όταν το ηλεκτρόδιο φωτιστεί με ορατό φως. Το δραστικό φάσμα απορρόφησης εμφανίζεται ταυτόχρονα, οπότε καταδεικνύεται ότι το συσσωμάτωμα ευθύνεται για την παραγωγή ρεύματος.

Τα ηλεκτρόνια ρέουν από το ηλεκτρόδιο μέσω του φίλτρου στο διάλυμα ηλεκτρολύτη (1M NaNO<sub>3</sub>). Το O<sub>2</sub> είναι ζωτικό για την παραγωγή ρεύματος, με διπλάσια παραγωγή να παρατηρείται για διάλυμα κορεσμένο σε O<sub>2</sub> ενώ 90% μείωση παραγωγής ρεύματος μετά από απαέρωση με N<sub>2</sub>. Το καθοδικό ρεύμα παράγεται με μεταφορά e<sup>-</sup> από το διεγερμένο συσσωμάτωμα σκουαραϊνης στο O<sub>2</sub> για σχηματισμό ανιοντικής ρίζας σουπεροξειδίου και άμεση μεταφορά e<sup>-</sup> από την ζώνη αγωγιμότητας του ηλεκτροδίου στις ηλεκτρονιακές «τρύπες» που βρίσκονται στο συσσωμάτωμα. Σε πειράματα με ασθενούς δότες όπως EDTA, οι «τρύπες» δεσμεύονται και το καθοδικό ρεύμα βραχυκυκλώνει. Ωστόσο όταν χρησιμοποιηθούν ισχυρότεροι δότες, τότε η απόσβεση της διέγερσης του συσσωματώματος ευνοείται και το σχηματιζόμενο ριζικό ανιόν μεταφέρει e<sup>-</sup> είτε στο O<sub>2</sub> (αν υπάρχει) είτε στο SnO<sub>2</sub>, οπότε και εμφανίζεται ανοδικό ρεύμα.<sup>(39)-(41)</sup>

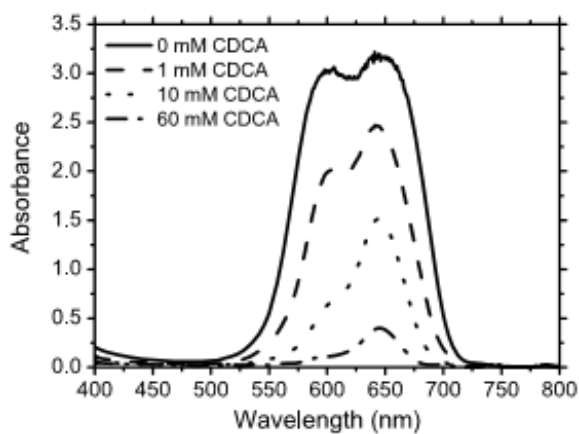
#### ✓ Φωτοβολταϊκά κελιά

Οι ευαισθητοποιητές φωτοβολταϊκών κελιών, χωρίς τη χρήση μετάλλων, είναι πολύ ελκυστικοί καθώς έχουν χαμηλό κόστος, διότι δεν αξιοποιούν πολύτιμα μέταλλα.<sup>(42)</sup> Αναγκαίο για την αποτελεσματική μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε ηλεκτρική από φωτοβολταϊκές κυψελίδες (DSCs) είναι η φασματική ταύτιση της απορρόφησης του ευαισθητοποιητή με την ηλιακή ακτινοβολία. Έτσι είναι αναγκαία η δημιουργία ευαισθητοποιητών με εκτενή απορρόφηση/ ευαισθησία στην περιοχή ερυθρού/ NIR/ IR.<sup>(43)</sup> Οι σκουαραϊνες είναι γνωστό ότι έχουν έντονη NIR απορρόφηση γι' αυτό και αποτελούν εξαιρετική επιλογή για εφαρμογή σε DSCs πάνω σε στρώμα TiO<sub>2</sub>.<sup>(44)-(43)</sup> Αναγκαίο είναι το δυναμικό οξειδωσης (LUMO τροχιακά) της διεγερμένης κατάστασης της βαφής να ταιριάζει με την ενέργεια της ζώνης αγωγιμότητας του οξειδίου. Επιπροσθέτως, η φωτεινή διέγερση πρέπει να συνδέεται με κάθετη ροή e<sup>-</sup> από τη διεγερμένη βαφή στη ζώνη αγωγιμότητας του TiO<sub>2</sub>. Στην EtOH παρουσιάζεται κορυφή στα 636nm ( $\epsilon=158500 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) που αντιστοιχεί σε π→π\* μεταπτώσεις μεταφοράς φορτίου για την ημισκουαραϊνη της εικόνας 23. Η απόδοση μετατροπής μπορεί να φτάσει στο 4,5% με κατάλληλη μοριακή σχεδίαση. Παρατηρήθηκε ότι η ύπαρξη COOH εντός συζυγίας οδηγεί σε καλή σύζευξη με την ζώνη αγωγιμότητας του TiO<sub>2</sub>. Η μη συμμετρία εξασφαλίζει την μη-συσσωμάτωση και βοηθά στο να μην αποσβένεται η διεγερμένη κατάσταση, οπότε και η αποτελεσματικότητα μετατροπής ενέργειας να διατηρείται.<sup>(43)</sup> Κατά τη μελέτη ημισκουαραϊνών στη πρόσδεση με TiO<sub>2</sub> η μέτρηση της ποσότητάς τους δεν μπορούσε να ολοκληρωθεί, γεγονός που έδειξε την πρόσδεση του οξυγόνου του δακτυλίου

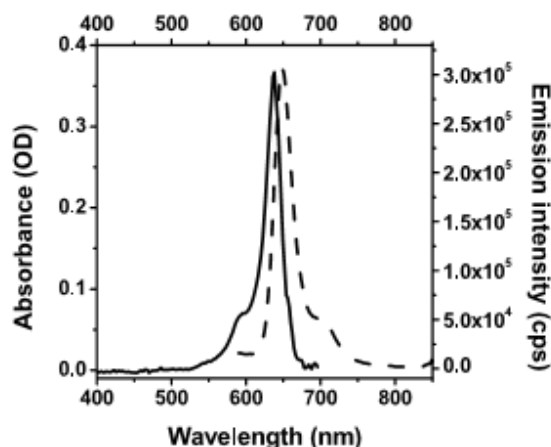


Εικόνα 23 Αυτοοργάνωση ημισκουαραϊνης σε τιτανία (44)

με το στρώμα  $\text{TiO}_2$  (εικόνα 23), με τέτοιο τρόπο ώστε η απόδοση μετατροπής φωτός σε ρεύμα να είναι στο 0,96%. Η υποκατάσταση με αλειφατικές αλυσίδες αυξάνει την απόδοση καθώς το μήκος τους αυξάνει. Αυτό είναι λογικό καθώς η υδροφοβικότητα των αλυσίδων και οι π-π αλληλεπιδράσεις αυτοοργανώνουν το σύστημα και αποτρέπουν τη συσσωμάτωση, οπότε η απόδοση αυξάνεται. Ο τρόπος σύνδεσης της ημισκουαραϊνης με την τιτανία μελετήθηκε από πολλές ερευνητικές ομάδες και προτάθηκαν οι εξής μηχανισμοί: α) πυρηνόφιλη προσβολή ανιόντος σκουαραϊνης σε άτομα Ti, β) πυρηνόφιλη προσβολή OH του  $\text{TiO}_2$  στον καρβοξυλικό άνθρακα της σκουαραϊνης σε θέση 1, γ) πυρηνόφιλη προσβολή OH του  $\text{TiO}_2$  στον καρβοξυλικό άνθρακα της σκουαραϊνης σε θέση 2, δ) αντίδραση Michel με 1-4 προσθήκη OH και επακόλουθη αποβολή ενός μορίου νερού.<sup>(44)</sup> Με την χρήση ασύμμετρων σκουαραϊνών, που έχουν καρβοξυλική ομάδα πάνω στον δακτύλιο, όταν εισάγονται στην τιτανία παρουσιάζουν μετασχηματισμό φωτός σε ρεύμα κατά 85% και συνολικά 4,5% μετατροπή. Συμπροσροφητές όπως χενοδεόξυ-χολικό οξύ (CDCA) εμποδίζουν την συσσωμάτωση που δημιουργείται κατά την προσρόφηση της βαφής στη síλικά και μετατοπίζουν την ζώνη αγωγιμότητας της  $\text{TiO}_2$  επηρεάζοντας την απόδοση του κελιού. Τα φάσματα απορρόφησης των διαλυμάτων βαφής με και χωρίς CDCA δεν παρουσιάζουν διαφορές, όπως φαίνεται και στα διαγράμματα 14 και 13 παρακάτω. Η κορυφή στα 600nm προέρχεται λόγω συσσωμάτωσης.<sup>(45)</sup>

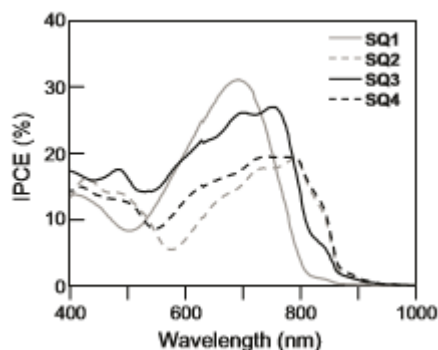


**Διάγραμμα 14** Διάγραμμα απορρόφησης για διάφορες τιμές συγκέντρωσης CDCA (43)



**Διάγραμμα 13** Διάγραμμα απορρόφησης (συνεχής) και εκπομπής (διακεκομμένη) της σκουαραϊνης (43)



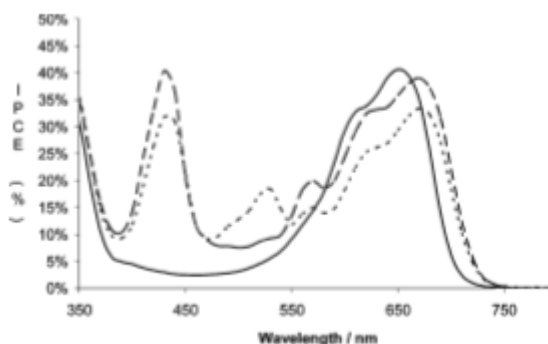


Διάγραμμα 15 Διάγραμμα κβαντικής απόδοσης (47)

Με την χρήση μη συμμετρικών σκουαραϊνών σε υποκατεστημένο 2,3,3-τριμέθυλο-ινδολενίνιο παρήχθησαν DSCs με ικανοποιητική απόδοση μετατροπής ενέργειας που διαθέτουν την ισχυρή οξεία κορυφή στο NIR που καταδεικνύει την  $\pi \rightarrow \pi^*$  μετάπτωση μεταφοράς φορτίου ( $\epsilon=77792 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Αυτό δείχνει την υψηλή δυνατότητα φωτοσυλλογής των σκουαραϊνών με τελική κβαντική απόδοση στο 1,7% ακόμη και χωρίς παρουσία

CDCA.<sup>(46)</sup> Παρά τα δεδομένα η ομάδα το Takeshi Maeda παρατήρησε ιδιαίτερα χαμηλή ICPE/QE (διάγραμμα 15) ακόμη και με την προσθήκη του CDCA λόγω συσσωμάτωσης που παρατηρήθηκε ως ώμος δίπλα στην αναμενόμενη κορυφή στα φάσματα απορρόφησης των σκουαραϊνών. Αν και θεωρητικά θα έπρεπε και η απορρόφηση στην περιοχή των 600nm να είναι πιο χαμηλή (σύμφωνα με την μείωση της QE) αυτό δεν παρατηρήθηκε, πιθανότατα λόγω

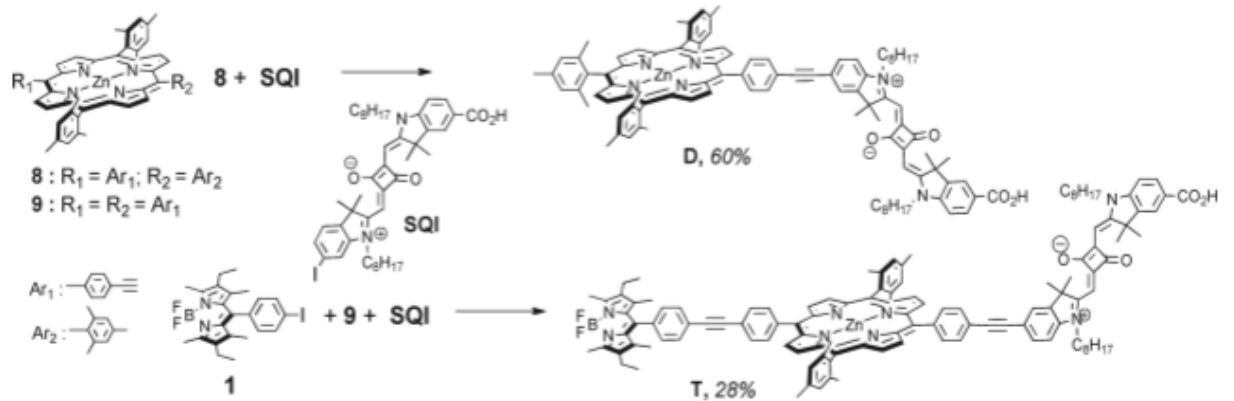
των ετεροκυκλικών ομάδων που βελτιώνουν τις ηλεκτροχημικές και φωτοβολταϊκές ιδιότητες των σκουαραϊνών.<sup>(47)</sup> Η σύνθεση σκουαραϊνών μπορεί να γίνει με χρήση αντίδρασης Stille ή Suzuki στις π-γέφυρες με άρυλο αντιδραστήριο trans-μεταλλίωσης. Μέγιστο απορρόφησης εμφανίζεται στα 635-680nm και η εισαγωγή



Διάγραμμα 16 Κβαντική απόδοση μορίων κεραιών σε σχέση με σκουαραϊνή (48)

θειοφαινίου οδηγεί σε αύξηση μήκους κύματος (βαθυχρωμία) αντίθετα από την εισαγωγή βενζυλομάδας που οδηγεί σε μείωση. Στην μελέτη με απουσία CDCA παρατηρείται συσσωμάτωση, η οποία δεν φαίνεται να μειώνει την ένταση της απορρόφησης όπως αναφέρθηκε.<sup>(42)</sup> Για βελτίωση της απόδοσης της κυψελίδας μπορεί να χρησιμοποιηθεί μίγμα φωτοευαισθητοποιητών (συνεαυαισθητοποίηση) που ωστόσο μειώνει την δυνατότητα φόρτωσης πολλών σκουαραϊνών ταυτόχρονα ενώ παράλληλα απαιτείται μελέτη εύρεσης ιδανικών συνθηκών λειτουργίας του συστήματος. Έτσι προτάθηκε και μελετήθηκε η ιδέα χρήσης ενός μορίου-κεραία έλξης φωτονίων (εικόνα 24), ομοίως με την φωτοσύνθεση. Με την χρήση σκουαραϊνής το μόριο κεραία δίνει  $e^-$  στη ζώνη αγωγιμότητας της  $\text{TiO}_2$  βελτιώνοντας την απόδοση της κυψελίδας. Τα φάσματα μελέτης της QE δεν επηρεάζονται αρνητικά ως προς της μέγιστη απόδοση σε σχέση με την απλές σκουαραϊνες (διάγραμμα 16). Έτσι με την χρήση μορίων κεραιών με

σκουραϊνικά τμήματα είναι δυνατή η κατασκευή υπερειασθητοποιητών με βελτιωμένες αποδόσεις μετατροπής φωτός σε ρεύμα.<sup>(48)</sup>



<sup>a</sup> Coupling conditions:  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ ,  $\text{AsPh}_3$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 4 h, rt.

Εικόνα 24 Σύνθεση των μορίων κεραιών (48)

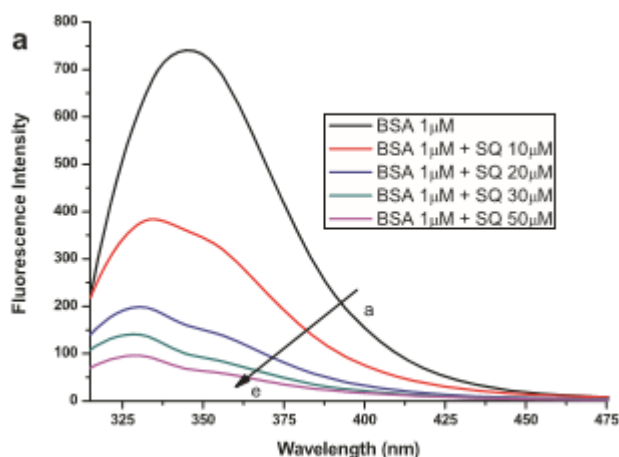


## 2) Αλληλεπιδράσεις με το DNA

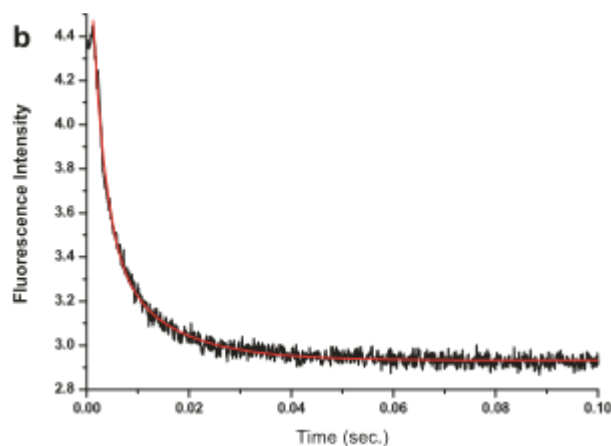
### 2.1 Ρόλος σκουαραϊνών ως αντικαρκινικά

Ο βασικός τρόπος με τον οποίο οι σκουαραΐνες δρουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες είναι ως ευαισθητοποιητές σε φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) (κεφάλαιο 3). Η δράση τους γίνεται μέσω παραγωγής της δραστικής ρίζας οξυγόνου απλής κατάστασης  $^1O_2$ .

Κατά την εφαρμογή PDT οι σκουαραΐνες συσσωρεύονται με ένεση στους ιστούς στόχους και μέσω ακτινοβολήσής τους, ενεργοποιούν το μοριακό οξυγόνο διεγείροντάς το. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται καλή επαναληπτικότητα των πειραμάτων, λίγες παρενέργειες και χαμηλό κόστος. Ο φωτοευαισθητοποιητής (PS) ενεργοποιείται με ακτινοβολήση, οπότε και αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο



**Διάγραμμα 17** Ένταση φθορισμού BSA σε σχέση με συγκέντρωση Sq (49)



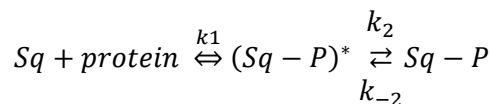
**Διάγραμμα 18** Ένταση φθορισμού σε σχέση με το χρόνο (49)

καλή υδατοδιαλυτότητα όταν τροποποιούνται. Η σύνδεση με την πρωτεΐνη γίνεται σε 2 βήματα και παρουσιάζεται υποχρωμικό φαινόμενο και μείωση φθορισμού, λόγω συσσωμάτωσης, κατά το πέρασ ικανού χρόνου. Τελικώς

σχηματίζοντας στους ιστούς τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS). Αυτές αντιδρούν με τα βασικά βιομόρια προκαλώντας νέκρωση ή απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Μελέτες γίνονται στην σύνδεση των PS με HSA/BSA, καθώς υπάρχει χαμηλό κόστος και σταθερότητα μέσω του τρόπου σύνδεσης (1<sup>ο</sup> κεφάλαιο).

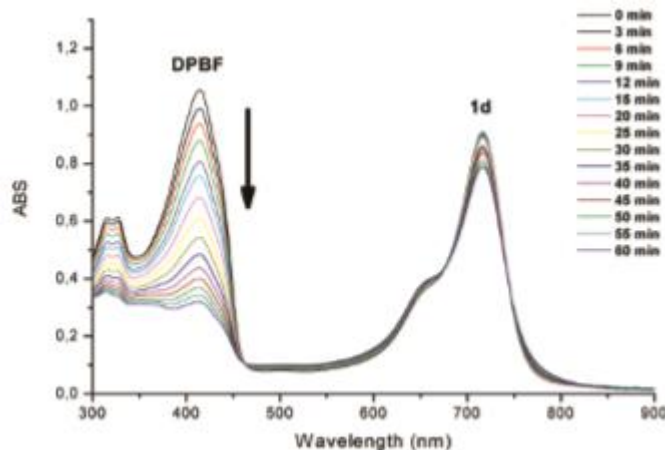
Αρχικά γινόταν χρήση πορφυρινών ως PS που διαθέτουν επίσης εκτενή π-συζυγία, μικρή τοξικότητα, υψηλή QE απορρόφηση στο βιολογικό παράθυρο (NIR) και καλή απόδοση παραγωγής  $^1O_2$ . Οι σκουαραΐνες διαθέτουν τις ίδιες ιδιότητες και ισχυρή οξεία απορρόφηση στο NIR σε διάλυμα. Στις σκουαραΐνες παρατηρείται μια υψηλή κινητικότητα σύνδεσης (διάγραμμα 17) με BSA σε σχέση με τις πορφυρίνες και

όμως ο φθορισμός σταθεροποιείται χρονικά (διάγραμμα 18) κάτι που δεν συμβαίνει αντίστοιχα με τις πορφυρίνες.<sup>(49)</sup>



$$K_{obs} = k_2 \frac{k_1[Sq]}{k_1[Sq] + 1} + k_{-2}$$

Εμβαθύνοντας στη φωτοχημεία των χρωστικών και βαφών, ως βιολογικά δραστικές ενώσεις, διαπιστώνεται από μελέτες ότι τα μόρια φωτοευαισθητοποιητές, όπως οι σκουαραϊνες, πρέπει να διαθέτουν προσβάσιμη διεγερμένη τριπλή κατάσταση, οπότε μέσω διασυστηματικής μεταφοράς διέγερσης να σχηματίζουν <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, που είναι εξαιρετικά δραστικό (0,6ms χρόνος ημιζωής και διάχυση 0,1μm σε H<sub>2</sub>O). Από τις βιολογικές διεργασίες το <sup>1</sup>O<sub>2</sub> αυξάνεται παρουσία O<sub>2</sub>, οπότε και θα υπάρξει ως αποτέλεσμα κυτταρικός θάνατος και απόπτωση εκεί όπου γίνεται εφαρμογή του ευαισθητοποιητή. Επίσης, ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να απομακρύνεται από το σώμα

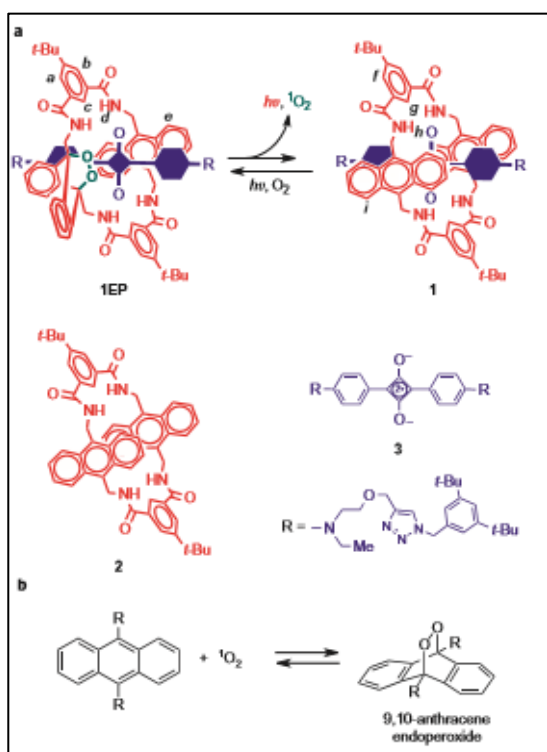


**Διάγραμμα 19** Απορρόφηση διαλύματος DPBF παρουσία σκουαραϊνης σε σχέση με τον χρόνο (51)

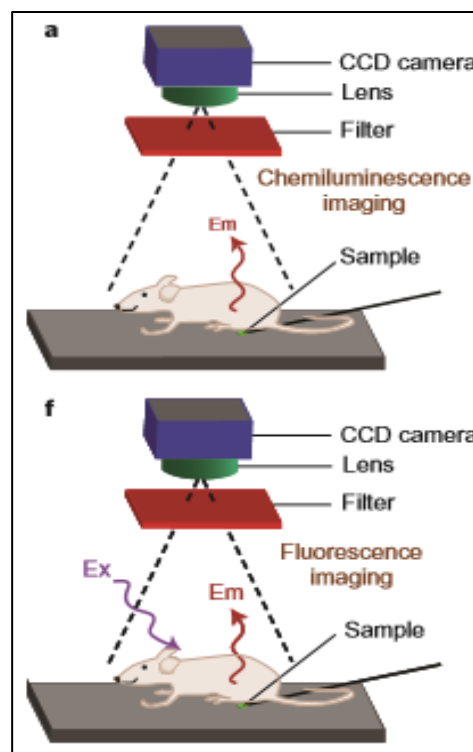
μέσω των μεταβολικών οδών και να διαθέτει εκτενή π-συζυγία για απορρόφηση στο NIR (700-900nm), το οποίο αποτελεί το λεγόμενο «βιολογικό παράθυρο». Λόγω των ιδιοτήτων αυτών οι σκουαραϊνες είναι εξαιρετικοί αντικαρκινικοί παράγοντες και με εφαρμογή τους σε PDT η τεχνική γίνεται εκλεκτική και εξιδεικευμένη για την καταπολέμηση του

καρκίνου. Ταυτόχρονα, απαιτείται η σκουαραϊνη να διαθέτει μηδενική τοξικότητα απουσία φωτός. Από ερευνητές σχεδιάστηκαν μόρια δέκτες 2 ηλεκτρονίων και πιο στενή ζώνη απορρόφησης καθώς αυξήθηκε η π-συζυγία.<sup>(50)</sup> Με χρήση TGME οι σκουαραϊνες γίνονται διαλυτές σε πρωτικό περιβάλλον όταν διαθέτουν ετεροκυκλικές ομάδες, δότες e<sup>-</sup>. Μέσω της χρήσης 1,3-διφάνυλισοβενζοφουράνιο (DPBF) παρακολουθείται η παραγωγή ρίζας οξυγόνου καθώς σχηματίζεται ενδοπεροξειδίο κατά την κυκλοπροσθήκη του O<sub>2</sub>, οπότε και χάνεται η κορυφή απορρόφησης του DPBF στα ~430nm (διάγραμμα 19).<sup>(51)</sup> Με προσθήκη βαρέων στοιχείων όπως I και Br η παραγωγή <sup>1</sup>O<sub>2</sub> μπορεί να αυξηθεί με επακόλουθη αύξηση QE λόγω βελτιωμένης διασυστηματικής διασταύρωσης αν και αυτή η ιδιότητα εξαρτάται και από τις ομάδες δότες.<sup>(52)</sup>

Έχουν επίσης συντεθεί από διάφορους ερευνητές, νέα μόρια με NIR φθορισμό και χημειοφωταύγεια τα ενδοπεροξειδία ροταξανίου-σκουραϊνης (SREPs), τα οποία είναι κατάλληλα για βιολογική απεικόνιση και διαθέτουν μόνιμα ενδοκλειδωμένες δομές. Τα τμήματα δενδριμερών σκουραϊνης σε αυτά, έχουν



Εικόνα 25 Κυκλοαναστροφή και παραγωγή ρίζας O<sub>2</sub> σε SREPs (53)



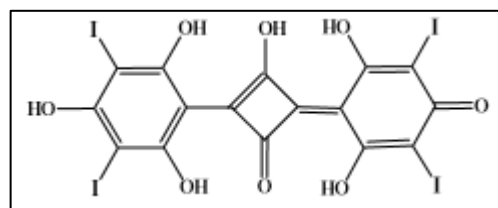
Εικόνα 26 Χημειοφωταύγεια έναντι φθορισμού ως μεθόδους βιοαπεικόνισης (53)

μορφή αλτήρα, κλειδωμένου στην λαβή από τετραλακτάμη, η οποία περιέχει το θερμικά ασταθές 9,10-ανθρακένιο-ενδοπεροξειδίο. Η κυκλοαναστροφή, δηλαδή η διάσπαση του δακτυλίου του ενδοπεροξειδίου με ταυτόχρονο σχηματισμό του ενδιάμεσου αρωματικού δακτυλίου του ανθρακενίου, εμφανίζει χημειοφωταύγεια, οπότε και παράγονται με αυτό τον τρόπο ενώσεις, όπως <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, με εφαρμογή σε αντικαρκινικές θεραπείες (εικόνα 25). Η χημειοφωταύγεια εντοπίζεται εύκολα και είναι ακίνδυνη. Επειδή όμως διαχέεται εντός των ιστών, υπάρχει ανάγκη για λειτουργία των υπερμοριακών αυτών δομών, στο πλαίσιο του βιολογικού παραθύρου (NIR). Μέσω μοριακού σχεδιασμού ελέγχεται η προϋπόθεση αυτή αλλά και η QE. Κύριο χρωμοφόρο είναι ο δακτύλιος του ενδοπεροξειδίου. Το υπερμοριακό σύστημα αποθηκεύεται στους -20°C, αλλά σε θερμοκρασία σώματος εκπέμπει στο NIR και παράγει <sup>1</sup>O<sub>2</sub> με κυκλοαναστροφή (εικόνα 25). Με αυτό τον τρόπο η παρακολούθηση της PDT μπορεί να γίνει με αμεσότητα, ευκολία και καλύτερη ευκρίνεια, χωρίς ανάγκη ύπαρξης πηγής εκπομπής φωτός (εικόνα 26), για φθορισμό του στόχου-καρκινικού όγκου.<sup>(53),(54)</sup>

Πραγματοποιήθηκαν μάλιστα από διάφορους ερευνητές, θεωρητικοί υπολογισμοί για εύρεση της ιδανικής διαμόρφωσης σκουαραϊνών με μέγιστη NIR απορρόφηση και χρήση σε βιολογικές εφαρμογές όσο και σε παραγωγή  $^1\text{O}_2$ . Για την παραγωγή της ρίζας οξυγόνου δύο μηχανισμοί προτείνονται: I) η ρίζα  $^1\text{O}_2$  παράγεται από ηλεκτρονιακή μεταφορά ανάμεσα σε διεγερμένο μόριο σκουαραϊνης (PS) και οργανικό υπόστρωμα και ακολουθεί αλληλεπίδρασή του υποστρώματος με  $\text{O}_2$  προς παραγωγή δραστικών ριζών  $\text{O}_2$  (ROS), II) το μόριο φωτοευαισθητοποιητή (PS) μέσω ακτινοβόλησης πηγαίνει σε  $S_1$  απλή διεγερμένη κατάσταση και τότε, μέσω διασυστηματικής διασταύρωσης πηγαίνει σε  $T_1$  τριπλή διεγερμένη. Η ανταλλαγή ενέργειας ανάμεσα σε  $T_1$  διεγερμένη χρωστική και σε μοριακό  $\text{O}_2$  οδηγεί σε παραγωγή  $^1\text{O}_2$  που είναι κυτταροτοξικό. Για μέγιστη απόδοση απαιτείται απορρόφηση στα 600-900nm που ελέγχεται με κατάλληλη προσθήκη λειτουργικών ομάδων και διαμορφώνεται ώστε η διαφορά ενέργειας HOMO-LUMO να μειωθεί. Με την χρήση υπολογιστικής χημείας και την θεωρία χρονικής εξάρτησης πυκνότητας (TDDFT) βρίσκονται οι ενέργειες των HOMO-LUMO ανάμεσα στις διάφορες διαμορφώσεις, καθώς και οι τετραεδρικές γωνίες των σκουαραϊνών. Όπως έχει αναφερθεί, με την ύπαρξη ιωδίου και θείου στις σκουαραϊνες βελτιώνεται η διασυστηματική διασταύρωση στην  $T_1$  και αυξάνεται η QE του συστήματος. Η κυτταροτοξικότητα μελετάται με χρήση DPBF, οπότε παρουσία της σκουαραϊνης παράγεται  $^1\text{O}_2$ . Διαπιστώνεται έτσι ότι ο φωτοευαισθητοποιητής δρα με τον 2<sup>ο</sup> μηχανισμό. Αντίστοιχα, για μελέτη πιθανής δράσης με τον 1<sup>ο</sup> μηχανισμό γίνεται χρήση 2,7-διυδρόξυ-διχλωρο-διακετυλιωμένη-φλουορεσκίνη ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ), που μέσω ενζύμων της κυτταρικής μεμβράνης αποακετυλιώνεται σε 2,7-διυδρόξυ-διχλώρο-φλουορεσκίνη ( $\text{H}_2\text{DCF}$ ), η οποία ανιχνεύει τα παραγόμενα (ROS), καθώς την οξειδώνουν σε 2,7-διχλώρο-φλουορεσκίνη (DCF), της οποίας η εκπομπή παρακολουθείται στα 523nm.<sup>(55), (56)</sup>

Σε *in vivo* πείραμα με ποντίκια με χρήση υδατοδιαλυτής σκουαραϊνης, η μελέτη έδειξε, πως όταν οι όγκοι τους (στους οποίους είχε γίνει εισαγωγή της ένωσης με ένεση) εκτέθηκαν σε ορατή ακτινοβολία με λάμπα αλογόνου 1000W υπήρξε μείωση του μεγέθους των όγκων και οι βιοχημικοί δείκτες των ποντικίων, υποχώρησαν σε φυσιολογικά επίπεδα.

Με αυτό τον τρόπο γίνεται αντιληπτό πως η σκουαραϊνή ήταν αποτελεσματική για χρήση σε PDT. Η χρωστική είχε σχεδιαστεί ώστε να φέρει βαριά άτομα, όπως ιώδιο, οπότε και διέθετε βελτιωμένη  $S_1 \rightarrow T_1$  διασυστηματική διασταύρωση, άρα και μεγαλύτερη απόδοση σε παραγωγή  $^1\text{O}_2$ .<sup>(57)</sup> Αναλυτικότερα θα γίνει αναφορά στο επόμενο κεφάλαιο.

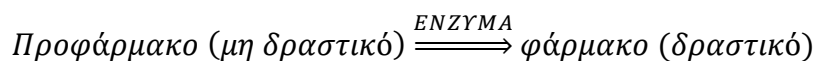


**Εικόνα 27** Σκουαραϊνή που αξιοποιήθηκε σε *in vivo* πείραμα (57)

### 3) Φωτοδυναμική θεραπεία και εφαρμογές της

#### 3.1 Προφάρμακα

Η ανακάλυψη μιας νέας φαρμακευτικής ουσίας ξεκινά με την επιλογή αντιμετώπισης και θεραπείας μιας συγκεκριμένης ασθένειας, προχωρά με τον εντοπισμό ενός βιολογικού στόχου (ένζυμο, υποδοχέας, DNA, κλπ.) που εμπλέκεται στην εμφάνιση ή την ανάπτυξη της ασθένειας και καταλήγει στην αναγνώριση κάποιας ένωσης-οδηγού. Για να είναι επιτυχημένη η παραπάνω πορεία ανακάλυψης νέων φαρμάκων, είναι σημαντικό να είναι γνωστό το μεταβολικό μονοπάτι και η σχέση του βιολογικού στόχου με τη συγκεκριμένη ασθένεια. Επίσης, είναι ζωτικής σημασίας να υπάρχουν οι απαραίτητες βιοχημικές (in vitro) και βιολογικές δοκιμές (ex vivo, in vivo) που θα βοηθήσουν στην ανίχνευση και μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας της ένωσης-οδηγού, καθώς και των βελτιωμένων ενώσεων που θα προκύψουν από την αρχική ένωση-οδηγό. Η βελτίωση της ένωσης-οδηγού συνήθως ξεκινά με τη βελτιστοποίηση της δραστηριότητας της με ποικίλες τροποποιήσεις στη δομή της. Πολλές φορές οι ερευνητές, αφού ανακαλύψουν τη βέλτιστη δομή, προχωρούν σε πιο λεπτομερείς βιολογικές μελέτες της δραστηριότητας της νέας φαρμακευτικής ένωσης που περιλαμβάνουν αφενός την ικανότητα της σε πιο περίπλοκα συστήματα, όπως είναι οι κυτταρικές καλλιέργειες και οι in vivo μελέτες σε κατάλληλα ζωικά μοντέλα, αφετέρου την τοξικότητα και το μεταβολισμό της. Δεν είναι λίγες οι φορές που μια «ιδανική» σε in vitro βιοχημικές δοκιμές ένωση παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα ή αυξημένη τοξικότητα στις αντίστοιχες ex vivo ή in vivo δοκιμές και έτσι καθίσταται μη αξιοποιήσιμη ως νέα φαρμακευτική δραστική ουσία. Υπάρχουν πολλοί λόγοι για τους οποίους μια ένωση μπορεί να μην εμφανίζει ικανοποιητική δραστηριότητα σε περίπλοκα βιολογικά συστήματα όπως είναι οι κυτταρικές καλλιέργειες ή τα ζωικά μοντέλα. Οι πιο κοινοί είναι να μην μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο, να μεταβολίζεται εξαιρετικά γρήγορα και επομένως να καθίσταται ανενεργή ή να παρουσιάζει τοξικότητα. Ένας τρόπος αντιμετώπισης της μειωμένης δραστηριότητας είναι η ανάπτυξη ενός προφαρμάκου το οποίο θα μπορεί να ξεπεράσει το αντίστοιχο πρόβλημα. Τα προφάρμακα είναι ενώσεις που είναι αρχικά ανενεργές, αλλά μετατρέπονται σε δραστικές ουσίες μέσω μεταβολισμού στον οργανισμό. Είναι εξαιρετικά χρήσιμα στην αντιμετώπιση προβλημάτων, όπως είναι η κακή διαπερατότητα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και ο μικρός χρόνος δραστηριότητας, ακόμη και η κακή γεύση ενός φαρμάκου, που επηρεάζει αρνητικά τη λήψη του από τους ασθενείς.<sup>(58)</sup>



Η μετατροπή του προφαρμάκου στην ενεργή μορφή του φαρμάκου συνήθως απαιτεί τη δράση κάποιου μεταβολικού ενζύμου, επομένως είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε τα συνήθη μονοπάτια μεταβολισμού των φαρμάκων

και των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτά ώστε ο μεταβολισμός στην αντίστοιχη ενεργή μορφή να είναι επιτυχής. Τα προφάρμακα μπορούν να αντιμετωπίσουν και άλλα προβλήματα πέραν των προαναφερθέντων, όπως είναι η κακή ή η υπερβολική υδατοδιαλυτότητα, ο πόνος που προκαλεί το φάρμακο όταν ενίεται, η χημική και βιολογική σταθερότητα του, αλλά και η μεταφορά του σε συγκεκριμένη περιοχή του σώματος. Δύο είναι οι κύριες κατηγορίες προφαρμάκων: τα βιοπρόδρομα προφάρμακα (bioprecursor prodrugs) και τα προφάρμακα μεταφοράς (carrier prodrugs). Τα βιοπρόδρομα προφάρμακα είναι ενώσεις που εμπεριέχουν στη δομή τους την ενεργή μορφή του φαρμάκου και βασίζονται στο μεταβολισμό τους για να παράγουν την ενεργή ουσία. Οι πιο συνηθισμένες αντιδράσεις που πραγματοποιούνται για τη μετατροπή ενός βιοπρόδρομου προφαρμάκου στην αντίστοιχη ενεργή μορφή του φαρμάκου είναι η οξειδωση, η αναγωγή και η φωσφορυλίωση.<sup>(59)</sup>

Τα προφάρμακα μεταφοράς διαφέρουν από τα βιοπρόδρομα προφάρμακα καθώς περιλαμβάνουν στη δομή τους, πέραν της ενεργής μορφής της φαρμακευτικής ουσίας, και ένα τμήμα μεταφορέα, το οποίο προσδίδει στο προφάρμακο τις απαραίτητες χημικές και βιολογικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, μια μεγάλη ανθρακική αλυσίδα μπορεί να αυξήσει τη λιποφιλικότητα και να βοηθήσει στη διαπερατότητα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Ο χημικός δεσμός ανάμεσα στο ενεργό φάρμακο και στο τμήμα μεταφορέα θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να μπορεί εύκολα να διασπαστεί από την στιγμή που θα έχει επιτευχθεί η είσοδος στο κύτταρο ή η μεταφορά στο επιθυμητό μέρος τους σώματος. Για την ενεργοποίηση των προφαρμάκων μεταφοράς οι διάφορες ερευνητικές ομάδες βασίζονται σε εξωτερικά ερεθίσματα όπως είναι η εφαρμογή κάποιου μαγνητικού πεδίου, η μεταβολή της θερμοκρασίας ή η ακτινοβολία, παράγοντες που προσφέρουν πλήρη χωρικό και χρονικό έλεγχο για την επαγόμενη παραγωγή της τοξικής ένωσης. Σήμερα, η πιο ευρέως εφαρμόσιμη τεχνική για την παραγωγή δραστικών μορίων είναι η ακτινοβολία.<sup>(60),(61)</sup>

### **3.2 PDT και PACT – φωτοδυναμική θεραπεία**

#### ➤ PDT και PACT

Η ενεργοποίηση των ενώσεων-φαρμάκων μέσω ακτινοβολίας μπορεί γενικά να χωριστεί σε δυο κατηγορίες: τη φωτοδυναμική θεραπεία (photodynamic therapy-PDT) και την χημειοθεραπεία μέσω φωτοενεργοποίησης (photo activated chemotherapy-PACT).<sup>(60)</sup> Η κύρια διαφορά τους είναι ότι ενώ η PDT βασίζεται στην παραγωγή του εξαιρετικά κυτταροτοξικού οξυγόνου απλής κατάστασης ( $^1O_2$ ) για να οδηγηθεί το κύτταρο σε απόπτωση, στην PACT ο κυτταρικός θάνατος προκαλείται με άλλους μηχανισμούς, οι οποίοι ενεργοποιούνται επίσης με ακτινοβολία της χορηγούμενης ουσίας, όπως είναι η αποδέσμευση ενός υποκαταστάτη του φαρμάκου ή η δημιουργία δεσμών με το DNA.

### ➤ Φωτοδυναμική Θεραπεία

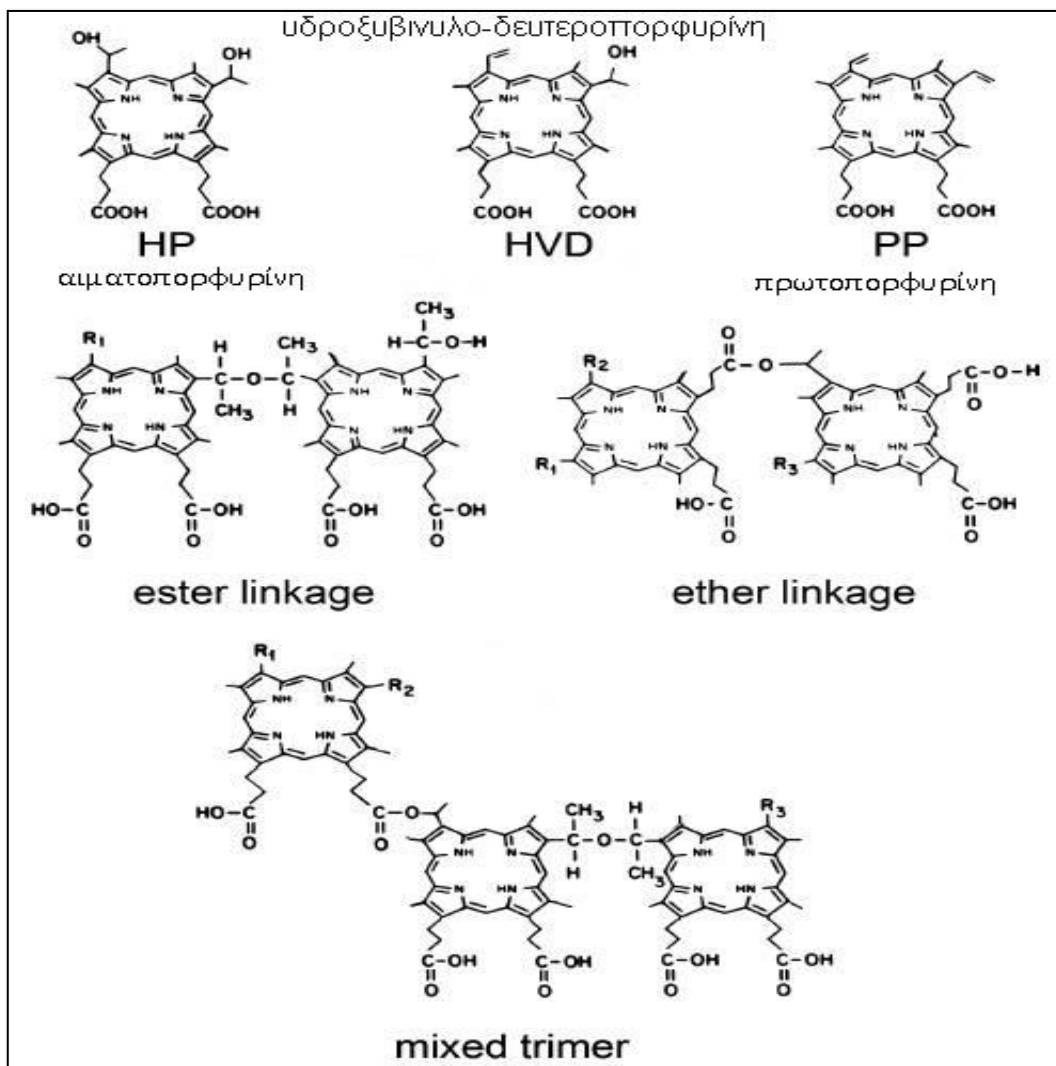
Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) ή αλλιώς φωτοχημειοθεραπεία, είναι μία μη επεμβατική τεχνική, η οποία βασίζεται στην έκθεση στο φως φωτοευαισθητοποιημένων χημικών ουσιών παρουσία μοριακού οξυγόνου οι οποίες κάτω υπό καθορισμένες συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Η φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενός ευρέος φάσματος ιατρικών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένου του υγρού ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, την ψωρίαση, την αθηροσκλήρωση ενώ ταυτόχρονα έχει επιδείξει αξιολογικά αποτελέσματα για την αντι-ιική θεραπεία του έρπη. Από τις πιο ελπιδοφόρες εφαρμογές αξίζει να σημειωθεί ότι η τεχνική αυτή έχει παρουσιάσει αξιολογικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση κακοήθων μορφών καρκίνου συμπεριλαμβανομένων του οισοφάγου, του τραχήλου, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης και ειδικότερα του καρκίνου του.<sup>(61)</sup>

Η έννοια της φωτοδυναμικής θεραπείας εισηγήθηκε για πρώτη φορά το 1900 όταν ένας φοιτητής της ιατρικής ο Oscar Raab παρατήρησε ότι μια καλλιέργεια παραμηκίων (γένος βλεφαριδοφόρων πρωτόζωων της τάξης των ολότριχων) εμβαπτιζόμενα σε διάφορες χρωστικές και στη συνέχεια εκτιθέμενα στο φως πέθαιναν. Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε το έναυσμα για την ενασχόληση με το πρωτοπόρο αυτό τομέα, οπότε και ξεκίνησαν οι πρώτες προσπάθειες για την θεραπεία του καρκίνου με τη χρήση χρωστικών σε επιφανειακούς καρκινικούς όγκους και στη συνέχεια η έκθεση τους στο φως. Η πραγματική επανάσταση στο τομέα της φωτοδυναμικής θεραπείας έγινε στις αρχές της δεκαετίας του 1970 όταν η ερευνητική ομάδα του Dr. Thomas Dougherty παρουσίασε ένα μίγμα πορφυρινών το οποίο ονομάστηκε παράγωγο αιματοπορφυρίνης (HPD) και το οποίο παρουσίαζε αξιολογικά αποτελέσματα σε μια σειρά κλινικών δοκιμών. Σήμερα χρησιμοποιείται ένα πιο εξευγενισμένο παρασκεύασμα του HPD γνωστό και ως Photophrin, καθώς και το Vysudine, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως αλλά και τα μοναδικά, προς το παρόν, που έχουν λάβει την έγκριση του FDA ( Food and Drug Administration). Παρά το γεγονός ότι το Photophrin εξακολουθεί να είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο παρουσιάζει σημαντικά και μη παραβλέψιμα μειονεκτήματα όπως για παράδειγμα η φωτοευαισθησία του δέρματος του ασθενούς η οποία μπορεί να διαρκέσει εβδομάδες ή ακόμα και μήνες καθώς και η αναποτελεσματική χρήση του στην αντιμετώπιση μεγάλων και συμπαγών καρκινικών όγκων όπου η διείσδυση του φωτός είναι προβληματική.<sup>(62)</sup>



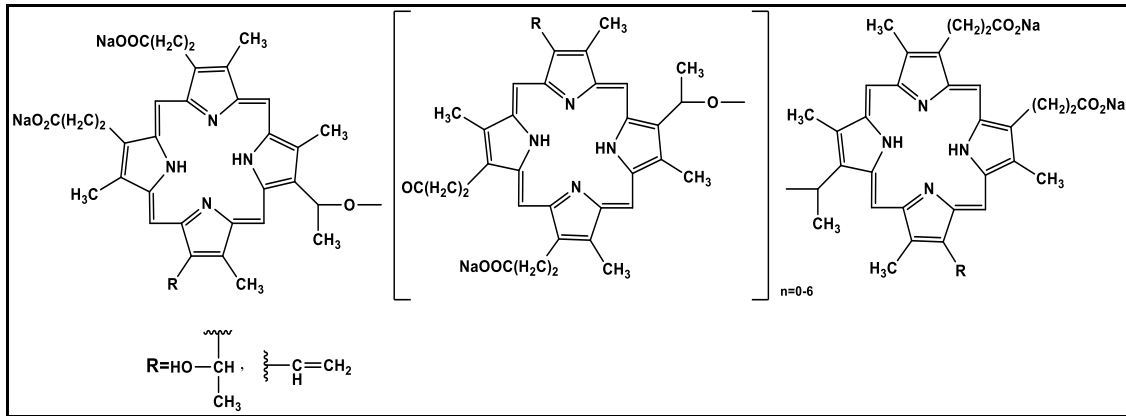
Η φύση του HPD και του Photophrin:

Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στον προσδιορισμό των συστατικών που συνιστούσαν το HPD, καθότι ήταν ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητικός παράγοντας. Το αρχικό και κυρίαρχο υλικό είναι η αιματοπορφυρίνη (HP) ενώ συνυπάρχουν σε μεταβλητές αλλά αμελητέες ποσότητες τα προϊόντα αφυδάτωσης: υδροξυβινυλο-δευτεροπορφυρίνης (HVD) και η πρωτοπορφυρίνη (PP). Βασική υδρόλυση των ακετυλιωμένων προϊόντων αποδίδουν ένα σύμπλοκο μίγμα στο οποίο εμπεριέχονται τα: HP, HVD, PP, τα διάφορα διμερή αλλά και ανώτερα ολιγομερή, τα οποία σχηματίζονται όταν οι ενώσεις αυτές συνδέονται με αιθερικούς και εστερικούς δεσμούς (εικόνες 28 και 29). Τα ολιγομερή που προκύπτουν μπορεί περιέχουν κατά βάση 2-7 μονάδες πορφυρίνης.<sup>(63)</sup>



Εικόνα 28 HPD και άλλα παράγωγα (63)

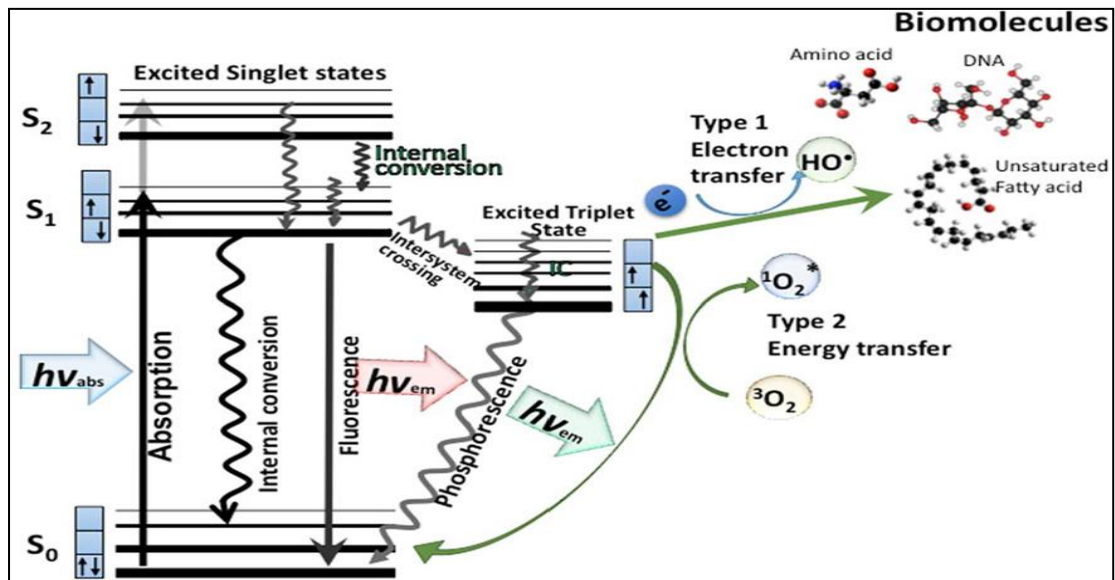




Εικόνα 29 Photophrin (63)

Τρόπος δράσης φωτοευαισθητοποιητών:

Κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία (PDT), ο φωτοευαισθητοποιητής εισάγεται με έγχυση και στη συνέχεια συσσωρεύεται επιλεκτικά στην πάσχουσα περιοχή. Η επιλεκτική αυτή συσσώρευση μπορεί να είναι είτε μια εγγενής ιδιότητα του φωτοευαισθητοποιητή, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης είτε να είναι αποτέλεσμα σύζευξης του φωτοευαισθητοποιητή με ένα επιλεκτικό φορέα.<sup>(50)</sup>

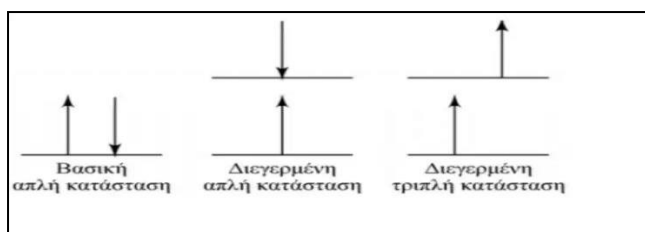


Εικόνα 30 Μηχανισμός δράσης του φωτοευαισθητοποιητή (64)

Ο φωτοευαισθητοποιητής, ο οποίος εισάγεται, βρίσκεται στη βασική κατάσταση, διαθέτοντας δύο ηλεκτρόνια με αντιπαράλληλο σπιν. Κατά την απορρόφηση ενός φωτονίου κατάλληλης κβαντικής ενέργειας (μήκος κύματος) επάγεται διέγερση ενός ηλεκτρονίου σε ένα τροχιακό με υψηλότερη ενέργεια. Αυτή η διεγερμένη κατάσταση στην οποία μεταπίπτει το ηλεκτρόνιο είναι ασταθής οπότε ακολουθεί αποδιέγερση, όπου αποβάλλεται το πλεόνασμα της ενέργειας που έχει προσροφηθεί.

Οι μηχανισμοί αποδιέγερσης που μπορεί να ακολουθήσει το ηλεκτρόνιο μπορεί να είναι:

1. **Μηχανισμός δονητικής επαναφοράς:** ένα ηλεκτρόνιο του φωτοευαισθητοποιητή κατά την ηλεκτρονιακή του διέγερση μπορεί να ανυψωθεί σε οποιοδήποτε δονητικό επίπεδο της διεγερμένης κατάστασης. Κατά τη μετάπτωση όμως, σε αυτό είδος μηχανισμού, το ηλεκτρόνιο μεταπίπτει από το κατώτερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης κατάστασης σε οποιοδήποτε δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους κατάστασης, οπότε παρατηρείται φθορισμός.
2. **Εσωτερική μετατροπή:** περιλαμβάνει ενδομοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους το ηλεκτρόνιο επανέρχεται στη θεμελιώδη κατάσταση χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, οπότε υπάρχει αποβολή θερμότητας.
3. **Διασυστηματική διασταύρωση:** Είναι ο μηχανισμός κατά τον οποίο το spin ενός διεγερμένου ηλεκτρονίου αναστρέφεται με αποτέλεσμα να αλλάζει η πολλαπλότητα του μορίου (απλή→τριπλή). Η πιθανότητα αυτής της μετάπτωσης αυξάνει όταν τα δονητικά επίπεδα των δύο καταστάσεων επικαλύπτονται. Στη περίπτωση αυτή έχουμε φωσφορισμό. Η μετάπτωση αυτή ωστόσο είναι απαγορευμένη από τους κβαντικούς κανόνες επιλογής χωρίς αυτό να επάγεται ότι δεν πραγματοποιείται ποτέ.<sup>(64)</sup>



Εικόνα 31 Ηλεκτρονιακές καταστάσεις e<sup>-</sup>

Η τριπλή κατάσταση είναι περισσότερο σταθερή από την απλή έχοντας διάρκεια ζωής της τάξης των μικροδευτερόλεπτων έναντι της απλής διεγερμένης κατάστασης που έχει διάρκεια ζωής της τάξης των

νανοδευτερόλεπτων. Όταν λοιπόν ο φωτοευαισθητοποιητής μεταβεί στην τριπλή κατάσταση, υπάρχουν δυο διαφορετικοί μηχανισμοί που μπορούν να πραγματοποιηθούν και αναφέρονται ως φωτοχημική διαδικασία τύπου I και II

Στη φωτοχημική διαδικασία τύπου I πραγματοποιείται μεταφορά ενός ηλεκτρονίου ή ενός πρωτονίου από το φωτοευαισθητοποιητή σε κάποιο υποστρώματα προκειμένου να σχηματίσει ένα ριζικό ανιόν ή κατιόν. Στη συνέχεια η σχηματιζόμενη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο O<sub>2</sub> και να σχηματιστούν ROS (reactive oxygen species) όπως είναι για παράδειγμα τα υπεροξειδία και τα υπεροξέα (superacid).

Στη φωτοχημική διαδικασία τύπου II πραγματοποιείται μεταφορά ενέργειας από τη διεγερμένη τριπλή κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή στη θεμελιώδη τριπλή του οξυγόνου <sup>3</sup>O<sub>2</sub> οπότε τελικά σχηματίζεται το οξυγόνο απλής κατάστασης <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Οι δυο αυτοί τύποι μηχανισμών μπορούν να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονα με το λόγο του τύπου της φωτοχημικής διαδικασίας I ως προς τη φωτοχημική διαδικασία τύπου II να εξαρτάται από το είδος του φωτοευαισθητοποιητή, τη συγκέντρωση του υποστρώματος και του

O<sub>2</sub>, ενώ θεωρείται πως οι φωτοευαισθητοποιητές που εμφανίζουν αντικαρκινική δράση ακολουθούν αποκλειστικά τη φωτοχημική διαδικασία τύπου II και όχι τη φωτοχημική διαδικασία τύπου I.<sup>(62),(50)</sup>

Τα ιδανικά που θα πρέπει να παρουσιάζει ένας φωτοευαισθητοποιητής είναι τα εξής:

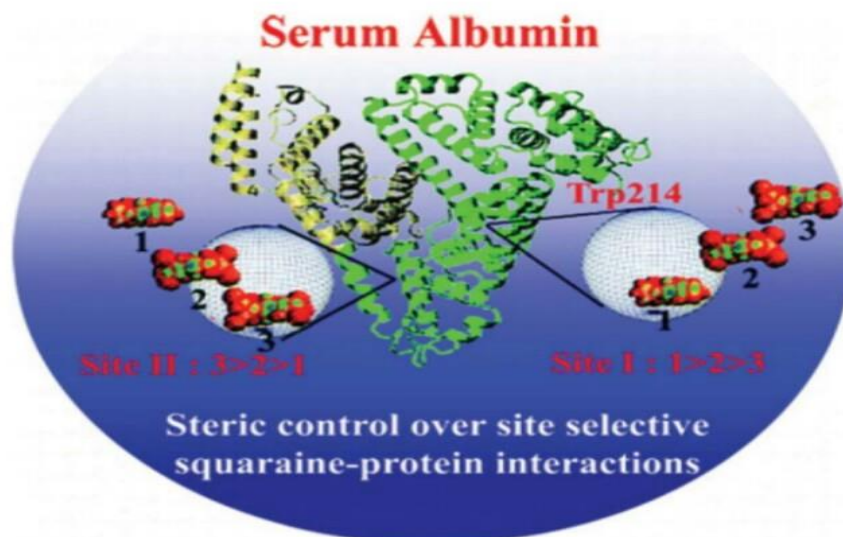
1. Μια ισχυρή κορυφή απορρόφησης στην κόκκινη προς εγγύς υπέρυθρη φασματική περιοχή (650-800nm) επειδή η απορρόφηση σε μήκη κύματος μεγαλύτερα των 800nm δεν παρέχει την απαραίτητη ενέργεια που χρειάζεται το O<sub>2</sub> για να μεταβεί από την τριπλή στην απλή κατάσταση.
2. Να μην εμφανίζει τοξικότητα απουσία φωτός και γενικότερα να μην εμφανίζει παρενέργειες
3. Να είναι διαλυτή σε βιολογικά συστήματα και οργανισμούς
4. Να συσσωρεύεται και να εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα καρκινικά κύτταρα και στα κύτταρα στόχους
5. Να αποβάλλεται εύκολα από τον οργανισμό.<sup>(62)</sup>
6. Η κβαντική απόδοση του φωτοευαισθητοποιητή κατά την αποδιέγερση να αντιστοιχεί στην ενέργεια που απαιτείται για το μετάβαση του O<sub>2</sub> από τριπλή σε απλή κατάσταση.<sup>(50)</sup>

Φορείς σκουαραϊνών<sup>(65)</sup>

Ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στη χρήση των *σκουαραϊνικών χρωστικών* ως φωτοευαισθητοποιητές σε βιολογικά συστήματα σχετίζεται με την ευκολία του σκουαραϊνικού δακτυλίου να υφίσταται εύκολα πυρηνόφιλη προσβολή η οποία τελικά οδηγεί στην απώλεια των φωτο-φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των σκουαραϊνικών ενώσεων.<sup>(53)</sup> Ενώ, παράλληλα ένα, ακόμα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό γνώρισμα που εμφανίζουν οι ενώσεις αυτές είναι το γεγονός ότι δημιουργούν συσσωματώματα σε υδατικό περιβάλλον προκαλώντας επιπλοκές κατά την διάρκεια των βιολογικών εφαρμογών.<sup>(66)</sup>

Όλα τα παραπάνω αντιμετωπίζονται αποτελεσματικά με τη χρήση κατάλληλων φορέων, οι οποίοι όχι μόνο βελτιώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα του φωτοευαισθητοποιητή αλλά και τον προστατεύουν από τη πυρηνόφιλη προσβολή. Δύο συστήματα, τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενώς ως φορείς των σκουαραϊνών είναι οι αλβουμίνες του ορού του ανθρώπου (HSA) και αντίστοιχα των βοοειδών (BSA) καθώς και η β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD).

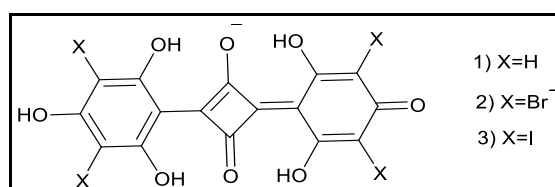
Οι αλβουμίνες του ορού είναι πρωτεΐνες μεταφοράς, οι οποίες διευκολύνουν τη βιοδιαθεσιμότητα και τη μεταφορά διαφόρων υποκαταστατών σε συγκεκριμένους στόχους μέσα στο σώμα. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των αλβουμινών είναι ότι διαθέτουν πολλές περιοχές πρόσδεσης υποκαταστατών. Όμως παρατηρείται ότι μόνο όταν οι σκουαραϊνικές ενώσεις συμπλεχτούν στη θέση πρόσδεσης II, μπορούν να εμφανίσουν ιδιότητες που τους επιτρέπουν να δράσουν ως φωτοευαισθητοποιητές (εικόνα 32).



*Εικόνα 32 Σχηματική αναπαράσταση της επιλεκτικής αλληλεπίδρασης της αλβουμίνης με σκουαραϊνικές ενώσεις*

Ένα από τα πιο αξιόλογα χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν οι αλβουμίνες ως μεταφορείς των σκουαραϊνών είναι το γεγονός ότι αυξάνουν τη διάρκεια ζωής της διεγερμένης τριπλής κατάστασης γεγονός που αποδίδεται στο ότι περιορίζουν τη περιστροφική ελευθερία των φωτοευαίσθητοποιητών λόγω μικροενθυλάκωσης και εκ τούτου, προκαλείται βραδύτερη απενεργοποίηση της διεγερμένης κατάστασης.

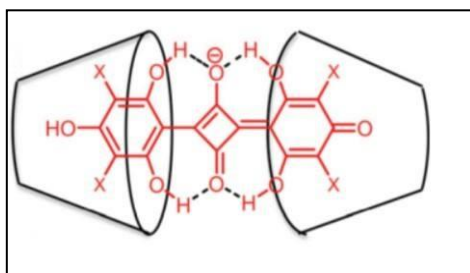
Παράδειγμα πρόσδεσης 3 σκουαραϊνικών ενώσεων σε δυο διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης στην ανθρώπινη αλβουμίνη. Οι ενώσεις που μελετήθηκαν είναι οι:



Μόνο όταν οι παραπάνω σκουαραϊνικές ενώσεις προσδεθούν στη θέση II παρουσιάζουν χαρακτηριστικά που αξιοποιεί η φωτοδυναμική θεραπεία.

Εκτός από τις αλβουμίνες του ορού, ένας άλλος αποτελεσματικός φορέας των σκουαραϊνικών ενώσεων είναι οι κυκλοδεξτρίνες (CDs), (κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες με υδρόφοβες κοιλότητες). Πιο συγκεκριμένα η β-κυκλοδεξτρίνη είναι ιδανικός φορέας επειδή σχηματίζει σύμπλοκα συστήματα εγκλεισμού σε αναλογία 1:2 (εικόνα 33), βελτιώνοντας ουσιαστικά τη διαλυτότητα των ενώσεων και ταυτόχρονα αποτρέποντας τη δημιουργία

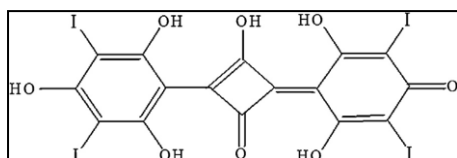
συσσωματωμάτων ενώ παράλληλα εξασφαλίζει και την προστασία των φωτοευαίσθητοποιητών από πυρηνόφιλη προσβολή από τις θειόλες και τις γλουταθειόνες, ενώσεις που απαντώνται στα βιολογικά συστήματα. <sup>(65)</sup>



Εικόνα 323 Σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης με σκουαραΐνη (65)

*In vivo* μελέτη της αντικαρκινικής δράσης των σκουαραϊνών και εφαρμογές στη φωτοδυναμική θεραπεία <sup>(57), (65)</sup>

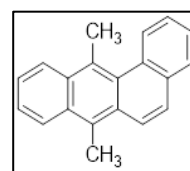
Μια από τις πιο αξιόλογες εφαρμογές στη φωτοδυναμική θεραπεία σε ζωντανούς οργανισμούς πραγματοποιήθηκε το 2008 όπου μελετήθηκε η δράση του δις 3,5-διιωδο-2,4,6-τριυδροξυφαινυλο σκουαραΐνης (εικόνα 34).



Εικόνα 32 δις 3,5-διιωδο-2,4,6-τριυδροξυφαινυλο σκουαραΐνη (57)

Το πείραμα αυτό περιλάμβανε τη μελέτη της αντικαρκινικής δράσης αυτής της ένωσης σε ποντίκια, που στα οποία είχε προκληθεί καρκίνος του δέρματος. Ο σχεδιασμός των κλινικών δοκιμών βασίστηκε στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων σε λευκούς-αλμπίνο ποντικούς με τη χρήση του 7,12-διμέθυλο-βενζανθρακένιο (DMBA) που φαίνεται στην εικόνα 35.

Στην συνέχεια ακολούθησε η αξιολόγηση της δράσης της σκουαραϊνικής ένωσης στη φωτοδυναμική θεραπεία των καρκινικών όγκων του δέρματος.



Εικόνα 33 DMBA

Τα ποντίκια ταξινομήθηκαν σε πέντε ομάδες (εικόνα 36):

1<sup>η</sup> ομάδα: υγιή ποντίκια, ομάδα ελέγχου

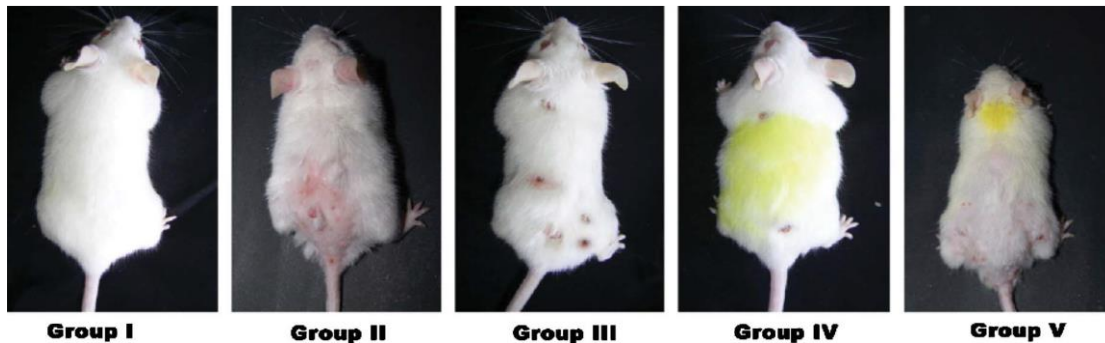
2<sup>η</sup> ομάδα: ποντίκια που έχουν καρκινικούς όγκους μεγαλύτερα των 2.00nm σε διάμετρο

3<sup>η</sup> ομάδα: ποντίκια που έχουν καρκινικούς όγκους μεγαλύτερα των 2.00nm σε διάμετρο μαζί με σκουαραϊνική χρωστική 12,5mg/kg

4<sup>η</sup> ομάδα: ποντίκια που έχουν καρκινικούς όγκους μεγαλύτερα των 2.00nm σε διάμετρο και σκουαραϊνική χρωστική 12,5mg/kg ενώ έχουν υποστεί φωτοδυναμική θεραπεία με έκθεση σε φως (120J/cm<sup>2</sup> μετά το πέρας

εικοσιτετράωρου από την εισαγωγή της χρωστικής). Εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας επί 14 ημέρες.

5<sup>η</sup> ομάδα: ποντίκια που έχουν καρκινικούς όγκους μεγαλύτερα των 2.00nm σε διάμετρο και σκουαραϊνική χρωστική 12,5mg/kg ενώ έχουν υποστεί φωτοδυναμική θεραπεία με έκθεση σε φως (120J/cm<sup>2</sup> μετά το πέρας εικοσιτετράωρου από την εισαγωγή της χρωστικής). Εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας επί 90 ημέρες.



Εικόνα 34 Οι 5 ομάδες ποντικών του πειράματος (65)

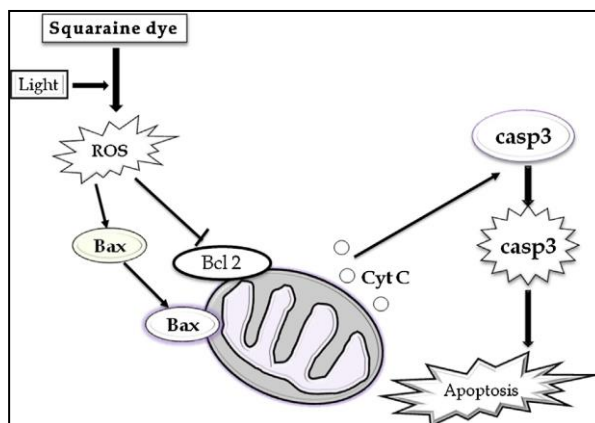
Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) επάγει κυτταροτοξικές επιδράσεις λόγω της φωτογήρανσης των υποκυτταρικών οργανιδίων και βιομορίων, οι οποίες αποκαλύπτουν τη θέση δράσης του φωτοευαισθητοποιητή. Οι βασικότεροι παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να καθορίσουν τους κυτταρικούς στόχους του φωτοευαισθητοποιητή είναι ο τρόπος χορήγησης, αλλά και η χημική φύση του φωτοευαισθητοποιητή.

Τα αποτελέσματα της μελέτης της εργασίας αυτής αποκάλυψαν ότι η δις 3,5-διωδο-2,4,6-τριυδροξυφαινουλο σκουαραϊνή εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων του καρκινικού όγκου σε μεγαλύτερο ποσοστό, ενώ μικρές συγκεντρώσεις ανιχνεύεται και στο κυττοσόλιο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η σκουαραϊνική χρωστική δεν συσσωρεύεται στο πυρηνικό κλάσμα γεγονός που υποδεικνύει ότι ο πυρήνας δεν επηρεάζεται από τη παρουσία της σκουαραϊνης, οπότε αποφεύγεται η γονιδιωματική αστάθεια. Η παρουσία του φωτοευαισθητοποιητή ως επί το πλείστον στα μιτοχόνδρια επάγει αποπτωτική βλάβη στα καρκινικά κύτταρα, και ως εκ τούτου αποδεικνύεται ότι οι σκουαραϊνικές ενώσεις μπορούν να διεγείρουν την απόπτωση. (65)

Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυττοσόλιο αποτελεί μέτρο βλάβης της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το κυτόχρωμα c είναι μια χαρακτηριστική πρωτεΐνη που υπάρχει στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Οποιαδήποτε ζημιά ή μεταβολή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, έχει σαν αποτέλεσμα τη διαρροή του κυτοχρώματος c προς το κυττοσόλιο.



Η απόπτωση είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία κατανάλωσης ενέργειας (εικόνα 37) που οδηγεί στο κυτταρικό θάνατο και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των υδρολυτικών ενζύμων όπως είναι οι κασπάσες, οι πρωτεάσες και οι ενδονουκλεάσες (ένζυμα που σχετίζονται άμεσα με το κυτταρικό θάνατο). Η απώλεια του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού και η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο



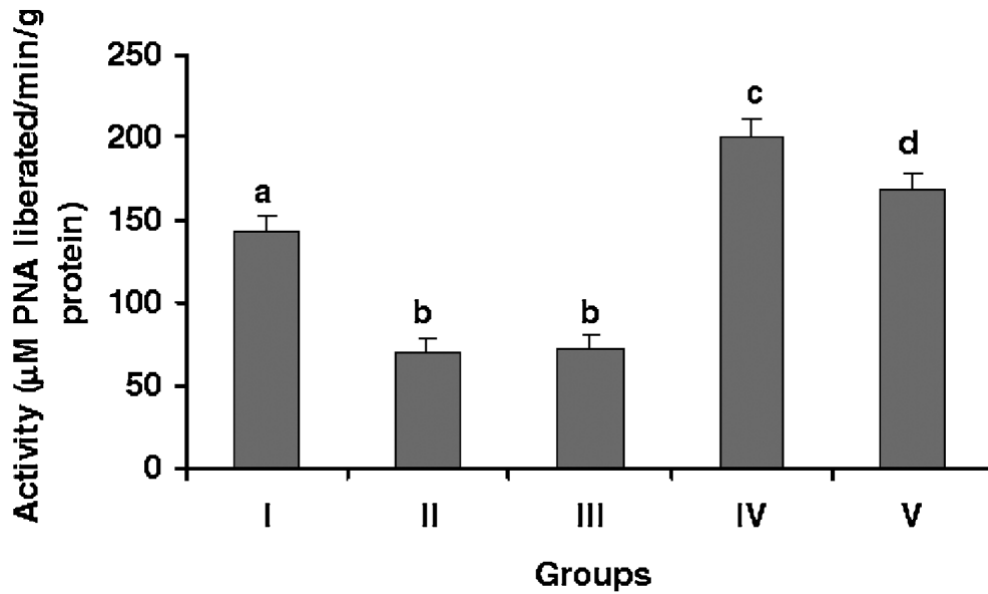
*Εικόνα 35 Μηχανισμός κυτταρικής απόπτωσης με επίδραση στο μιτοχόνδριο-Διαγραμματική αναπαράσταση ενεργοποίησης προ αποπτωτικών πρωτεϊνών (57)*

κυτταρόπλασμα οδηγεί σε ένα καταρράκτη βιολογικών αντιδράσεων οι οποίες τελικά οδηγούν στο κυτταρικό θάνατο. Αρχικά, δεσμεύεται η Araf-1 (Apoptotic protease activating factor 1-Αποπτωτικός παράγοντας ενεργοποίησης πρωτεάσης 1) και η προκασπάση-9 για να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο πρωτεΐνης που ονομάζεται αποπτωσώμα, το οποίο στη συνέχεια διασπάται και μετατρέπεται στη κασπάση-9. Ακολούθως η κασπάση-9 ενεργοποιεί την προκασπάση-3 και τελικά με μια σειρά μηχανισμών και αντιδράσεων που ακολουθούν έχουμε ενεργοποίηση των υδρολυτικών ενζύμων κυρίως της οικογένειας των κασπασών αλλά και των Bcl-2 και Bax πρωτεϊνών τα οποία οδηγούν στην διάσπαση κυτταρικών συστατικών, και τελικά στο κυτταρικό θάνατο.

Οι κασπάσες είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών κυστεΐνης που ενεργοποιούνται κατά τη φάση εκτέλεσης της αποπτωτικής διαδικασίας και είναι υπεύθυνες για την πυροδότηση των διαδικασιών που προκαλούν το κυτταρικό θάνατο. Οι κασπάσες διασπούν επιλεγμένες ομάδες βασικών πρωτεϊνών όπως είναι οι πρωτεΐνες των κινασών, των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών κλπ. Η υπερβολική παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) που επάγουν οι φωτοευαίσθητοποιητές μπορούν να ενεργοποιήσουν την ενδογενή οδό απόπτωσης.

Η ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού ρυθμίζεται από τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Οι Bcl-2 πρωτεΐνες μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο ομάδες: προ-αποπτωτικά μέλη που προωθούν την απόπτωση (π.χ. Bad και Bax) και αντι-αποπτωτικά μέλη που εμποδίζουν την απόπτωση (π.χ. bcl-x L Bcl-w και Bcl-2). Στην ενδογενή οδό, ενεργοποιούνται ορισμένα προ-αποπτωτικά μέλη όπως η πρωτεΐνη Bax η οποία μετατοπίζεται από το κυτοσόλιο προς το εξωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η Bax σχηματίζει ένα κανάλι πρωτεϊνών εντός της μιτοχονδριακής μεμβράνης το οποίο αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης και προάγει την απελευθέρωση ορισμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, κυρίως του κυτοχρώματος c. Η απελευθέρωση

του κυτοχρώματος c στο κυττοσόλιο οδηγεί στο σχηματισμό ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος που ονομάζεται αποπτωσώμα, το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών 2,3,6,7 και 8.<sup>(57)</sup>



Εικόνα 36 Δραστικότητα κασπάσης-3 στις ομάδες I-IV δύο βδομάδες μετά από εφαρμογή της PDT (57)



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) R. West, D. L. Powell. "New Aromatic Anions. Molecular Orbital Calculations on Oxygenated Anions", *Organical and biological Chemistry*, **1963**, 2577-2579.
- (2) K. S. Lee, J. J. Kweon, I. H. Oh, C. E. Lee, "Polymorphic phase transition and thermal stability in squaric acid (H<sub>2</sub>C<sub>4</sub>O<sub>4</sub>)", *J.Phys.Chem.Solids*, **2012**, 72, 890-895.
- (3) R. Ghiasi, M. Monajjem, "Theoretical study of interaction of alkaline earth metal with C<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (-2) and C<sub>4</sub>S<sub>2</sub> (-4): structure, electronic properties and aromaticity", *Journal of Sulfur Chemistry*, **2007**, 28, 537-546.
- (4) K. Y. Law "Organic photoconductive materials: recent trends and developments", *JACS Chem. Review*, **1993**, 93,457-464.
- (5) Y. Zhang, X. Yue, B. Kim, Sheng Yao, M. V. Bondar, K. D. Belfield, "Bovine Serum Albumin Nanoparticles with Fluorogenic Near-IR Emitting Squaraine Dyes", *ACS Appl. Mater. Interf*, **2013**, 5, 8710-8717.
- (6) K. Y. Law, F. C. Bailey, "Squaraine Chemistry. Synthesis and Characterization of Squaraine Dyes Having Self-Organizing Properties" *Dyes and Pigments*, **1992**, 20, 25-40.
- (7) R. Bonnett, M. Motevalli, J. Siu, "Squaraines based on 2-arylpyrroles", *Tetrahedron*, 2004, 60, 8912-8918.
- (8) K. Srinivas, Ch. Prabhakar, C. Lavanya Devi, K. Yesudas, K. Bhanuprakash, V. Jayathirtha Ra, "Enhanced Diradical Nature in Oxyallyl Derivatives Leads to Near Infra Red Absorption: A Comparative Study of the Squaraine and Croconate Dyes Using Computational Technique", *J. Phys. Chem*, **2007**, A, 111, 3378-3386.
- (9) Z. Yan, Sh. Guang, X. Su, H. Xu, "Near-Infrared Absorbing Squaraine Dyes for Solar Cells: Relationship between Architecture and Performance", *J. Phys. Chem. C*, **2012**, 116, 8894-8900.
- (10) Ch. Prabhakar, K. Yesudas, G. K. Chaitanya, S. Sitha, K. Bhanuprakash, V. J. Rao, "Near-Infrared Absorption in Symmetric Squarylium and Croconate Dyes: A Comparative Study Using Symmetry-Adapted Cluster-Configuration Interaction Methods", *J. Phys. Chem. A*, **2005**, 109, 8604-8616.

- (11) Ch. Prabhakar, G. K. Chaitanya, S. Sitha, K. Bhanuprakash, V. J. Ra, "Role of the Oxyallyl Substructure in the Near Infrared (NIR) Absorption in Symmetrical Dye Derivatives: A Computational Study", *J. Phys. Chem. A*, **2005**, 109, 2614-2622.
- (12) K. Y. Law, F. C. Bailey, "Squaraine Chemistry. Effect of N-pyrrolidino Substitution on the Synthesis and Solid State Properties of Squaraines", *Dyes and Pigments*, **1993**, 21, 1-21.
- (13) H. Meier, R. Petermann, J. Gerold. "Bathochromic or hypsochromic effects via the extension of conjugation: a study of stilbenoid squaraines", *Chem. Commun*, **1999**, 977–978.
- (14) R. W. Bigelow, "An MNDO and CNDO/S(S + DES CI) study on Structural and electronic properties of a model squaraine dye and related cyanine", *J.Chem.Phys*, **1986**, 107, 159-174.
- (15) K. Y. Law, "Squaraine Chemistry. Effects of Structural Changes on the Absorption and Multiple Fluorescence Emission of Bis[ 4-(dimethylamino)phenyl]squaraine and Its Derivatives", *J. Phys. Chem*, **1987**, 91, 5184-5193.
- (16) L. Ebersson, "Generation and Spectroscopic Characterization of Two Persistent Radical Cations from Bis [4-(dimethylamino) phenyl]squaraine", *J. Phys. Chem*, **1994**, 98, 752-756.
- (17) K. L. Yee, "Squaraine chemistry. Design, synthesis and xerographic properties of a highly sensitive unsymmetrical fluorinated squaraine", *Chem. Mater*, **1992**, 4, 605-611.
- (18) J. Park, C. Barolo, F. Sauvage, N. Barbero, C. Benzi, P. Quagliotto, S. Coluccia, D. Di Censo, M. Graetzel, Md K. Nazeeruddin, G. Viscardi. "Symmetric vs. asymmetric squaraines as photosensitisers in mesoscopic injection solar cells: a structure–property relationship study", *Chem. Commun*, **2012**, 48, 2782–2784.
- (19) L. Beverina, R. Ruffo, M. M. Salamone, E. Ronchi, M. Binda, D. Natali, M. Sampietro. "Panchromatic squaraine compounds for broad band light harvesting electronic devices", *J. Mater. Chem*, **2012**, 22, 6704-6710.
- (20) H. Meier, R. Petermann, "NIR Absorbing Squaraines by Extension of the Conjugation with (Aminothiazolyl)ethenyl Groups", *Helv. Chim.Act*, **2004**, 87, 1109-1118.

- (21) Y. Hyodo, H. Nakazumi, Sh. Yagi, "Synthesis and light absorption/emission properties of novel squarylium dimers bearing a ferrocene spacer", *Dyes and Pigments*, **2002**, 54, 163–171.
- (22) The Influence of N-Alkyl Groups on the Properties of Squarylium Cyanine Dye. Lin Tong, Peng Bixian. 3, 1998, *Dyes Pigm.*, σσ. 201-209.
- (23) K. Y. Law, F. C. Bailey. "Squaraine Chemistry. Synthesis and Characterization of Squaraine Dyes Having Self-Organizing Properties", *Dyes and Pigments*, 1992, 20, 25-40.
- (24) R. Petermann, M. Tian, S. Tatsuura, M. Furuki, "Synthesis of new squaraine dyes for optical switches", *Dyes and Pigments*, 2003, 57, 43-54.
- (25) M. Tian, M. Furuki, I. Iwasa, Y. Sato, L. Sun Pu, S. Tatsuur, "Search for Squaraine Derivatives That Can Be Sublimed without Thermal Decomposition", *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 4370-4376.
- (26) M. J. Paterson, L. Blancafort, S. Wilsey, M. A. Robb, "Photoinduced Electron Transfer in Squaraine Dyes: Sensitization of Large Band Gap Semiconductors", *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 11431-11439.
- (27) J. J. McEwen, K. J. Wallace, "Squaraine dyes in molecular recognition and self-assembly", *Chem. Commun*, **2009**, 6339-6351.
- (28) I. A. Karpenko, M. Collot, L. Richert, Ch. Valencia, P. Villa, Y. Mély, M. Hibert, D. Bonnet, A. S. Klymchenko, "Fluorogenic squaraine dimers with polarity-sensitive folding as bright far-red probes for background-free bioimaging", *J. Am. Chem. Soc*, **2015**, 1-19.
- (29) P. Anees, S. Sreejith, A. Ajayaghosh, "Self-Assembled Near-Infrared Dye Nanoparticles as a Selective Protein Sensor by Activation of a Dormant Fluorophore", 136, 2014, *J. Am. Chem. Soc*, **2014**, 136, 13233–13239.
- (30) I. Ch.Wu, J. Yu, F. Ye, Y. Rong, M. E. Gallina, B. S. Fujimoto, Y. Zhang, Y. H. Chan, W. Sun, X. H. Zhou, Ch. Wu, D. T. Chiu, "Squaraine-Based Polymer Dots with Narrow, Bright Near-Infrared Fluorescence for Biological Applications", *J. Am. Chem. Soc*, **2014**, A-F.
- (31) B. Jin, X. Zhang, W. Zheng, X. Liu, J. Zhou, N. Zhang, F. Wang, D. Shanggua, "Dicyanomethylene-Functionalized Squaraine as a Highly Selective Probe for Parallel G Quadruplexes", *Anal. Chem*, **2014**, 86, 7063–7070.

- (32) F. F. An, Z. J. Deng, J. Ye, J. F. Zhang, Y. L. Yang, Ch. H. Li, C. J. Zheng, X. H. Zhan, "Aggregation-Induced Near-Infrared Absorption of Squaraine Dye in an Albumin Nanocomplex for Photoacoustic Tomography in Vivo", *JACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, 6, 17985–17992.
- (33) Sh. Y. Hsueh, Ch. Ch. Lai, Sh. H. Chiu, "Squaraine-Based Rotaxanes that Function as Visibly Active Molecular Switches", *Chem. Eur. J*, **2010**, 2997-3000.
- (34) L. Xue, B. L. Q. Fei, G. Feng, Y. Huan, Z. Shi, "Carboxylate-modified squaraine dye doped silica fluorescent pH nanosensors", *Nanotechnology*, **2010**, 21, 215502-215505.
- (35) V. Kumar, H. Rana, "Chromogenic and Fluorogenic Detection and Discrimination of Nerve Agents Tabun and Vx", *Chem. Commun*, **2015**, 51, 16490-16494.
- (36) J. Wu, E. Huo, Z. Wu, Z. Y. Lu, M. Xie, Q. Jiang, "Novel poly(flourene-alt-squaraine) derivatives having large coverage with solar spectrum", *e-Polymer*, **2007**, 1-10.
- (37) J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Máñez, J. Soto, "A selective chromogenic reagent for cyanide determination", *Chem. Comm*, 2002, 2248-2249.
- (38) J. V. Ros-Lis, M. D. Marcos, R. Martinez Manez, K. Rurack, J. Soto, "A Regenerative Chemodosimeter Based on Metal-Induced Dye Formation for the Highly Selective and Sensitive Optical Determination of Hg<sub>2</sub><sup>+</sup> Ion", *Angew. Chem. Int. Ed*, **2005**, 44, 4405-4407.
- (39) Y. S. Kim, K. Liang, K. Y. Law, D. G. Whittenff, "An Investigation of Photocurrent Generation by Squaraine Aggregates in Monolayer-Modified SnO<sub>2</sub> Electrodes", *J. Phys. Chem*, **1994**, 984-988.
- (40) K. Liang, K. Y. Law, D. G. Whitten," Synthesis, Characterization, Photophysics, and Photosensitization Studies of Squaraine-Bipyridinium Diads", 1997, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 540-546.
- (41) K. G. Thomas, K. J. Thomas, S. Das, M. V. George, D. Lid, P. V. Kamatbg, "Photochemistry of squaraine dyes Part 10. Excited-state properties and photosensitization behaviour of an IR sensitive cationic squaraine dye", *J. Chem. Soc Faraday Trans*, **1996**, 92(24), 4913-4916.

- (42) J. H. Delcamp, Y. Shi, J. H. Yum, T. Sajoto, E. Dell Orto, S. Barlow, M. K. Nazeeruddin, S. R. Marder, M. Graetzel, "The Role of p Bridges in High-Efficiency DSCs Based on Unsymmetrical Squaraines", *Chem. Eur. J.*, **2013**, 19 1819–1827.
- (43) J. H. Yum, P. Walter, S. Huber, D. Rentsch, T. Geiger, F. Nuesch, F. De Angelis, M. Graetzel, M. K. Nazeeruddin, "Efficient Far Red Sensitization of Nanocrystalline TiO<sub>2</sub> Films by an Unsymmetrical Squaraine Dye", *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10320-10321.
- (44) M. Matsui, K. Nagasaka, S. Tokunaga, "3-Aryl-4-hydroxycyclobut-3-ene-1,2-diones as sensitizers for TiO<sub>2</sub> solar cells", *Dyes and pigments*, **2003**, 58, 219-226.
- (45) J. H. Yum, S. J. Moon, R. Humphry-Baker, P. Walter, T. Geiger, F. Nuesch, M. Graetzel, M. K. Nazeeruddin, "Effect of coadsorbent on the photovoltaic performance of squaraine sensitized nanocrystalline solar cells", *Nanotechnology*, **2008**, 19, 1-6.
- (46) C. Fu, L. Lei, K. Sun, P. Xia, H. Yuan, D. Xiao, Z. Li, "Vis harvesting unsymmetrical squaraine dyes for dye sensitized solar cells", *Renewable energy*, **2012**, 38, 163-168.
- (47) T. Maeda, N. Shima, T. Tsukamoto, S. Yagi, H. Nakazumi, "Unsymmetrical squarylium dyes with π-extended heterocyclic components and their application to organic dye-sensitized solar cells", *Synthetic Metals*, **2011**, 161, 2481-2487.
- (48) J. Warnan, F. Buchet, Y. Pellegrin, E. Blart, F. Odobel, "Panchromatic Trichromophoric Sensitizer for Dye-Sensitized Solar Cells Using Antenna Effect", *Org. Lett.*, **2011**, 13, 3944-3947.
- (49) N. Barbero, S. Visentin, G. Viscardi, "The different kinetic behavior of two potential photosensitizers for PDT", 299, 2015, *J. Photochem. Pharm. A. Chem.*, **2015**, 299, 38-43.
- (50) L. Beverina, M. Crippa, M. Landenna, R. Ruffo, P. Salice, F. Silvestri, S. Versari, A. Villa, L. Ciaffoni, E. Collini, C. Ferrante, S. Bradamante, C. M. Mari, R. Bozio, G. A. Pagani, "Assessment of Water-Soluble π-Extended Squaraines as One and Two-Photon Singlet Oxygen Photosensitizers: Design, Synthesis, and Characterization", *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 1894-1902.

- (51) L. Beverina, A. Abbotto, M. Landenna, M. Cerminara, R. Tubino, F. Meinardi, S. Bradamante, G. A. Pagani, "New π-Extended Water-Soluble Squaraines as Singlet Oxygen Generators", *Org. Lett*, **2005**, 19(7), 4257-4260.
- (52) P. F. Santos, L. V. Reis, P. Almeida, A. S. Oliveira, L. F. Vieira-Ferreira, "Singlet oxygen generation ability of squarylium cyanine dyes", *J. Photochem. Photobiol. A. Chem*, **2003**, 160, 159–161.
- (53) J. M. Baumes, J. J. Gassensmith, J. Giblin, J. J. Lee, A. G. White, W. J. Culligan, W. M. Leevy, M. Kuno, B. D. Smith, "Storable, thermally activated, near-infrared chemiluminescent dyes and dye-stained microparticles for optical imaging", *Nature Chemistry*, **2010**, 2, 1025-1030.
- (54) S. Xiao, N. Fu, K. Peckham, B. D. Smith, "Efficient Synthesis of Fluorescent Squaraine Rotaxane Dendrimers", *Org. Lett*, **2010**, 1(12), 140-143.
- (55) A. D. Quartarolo, E. Sicilia, N. Russo, "On the Potential Use of Squaraine Derivatives as Photosensitizers in Photodynamic Therapy: A TDDFT and RICC2 Survey", *J. Chem. Theory Comput*, **2009**, 5, 1849-1857.
- (56) K. M. Shafeekh, M. S. Soumya, M. A. Rahim, A. Abraham, S. Das, "Synthesis and Characterization of Near-Infrared Absorbing Water Soluble Squaraines and Study of their Photodynamic Effects in DLA Live Cells", *PhotoChem. Photobiol*, **2014**, 585-595.
- (57) D. G. Devi, T.R. Cibir, D. Ramaiah, A. Abraham, "bis-(3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl) squaraine : A novel candidate in PDT for skin cancer model in vivo", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, **2008**, 92, 153-159.
- (58) B. Testa, S. D. Kramer, "The biochemistry of drug metabolism-an introduction .Part-5 Metabolism and BioActivity", *Chem. & Biodiver*, **2009**, 6, 591-684.
- (59) C. M. Cheng, Y. L. Lu, K. H. Chuang, W. C. Hung, J. Shiea, Y. C. Su, C. H. Kao, B. M. Chen, S. Roffler, T. L. Cheng, "Tumor targeting prodrug-activating bacteria for cancer therapy", *Canc. Gene Ther*, **2008**, 15, 394-401.
- (60) C. Mari, V. Pierroz, S. Ferrari, G. Gasser, "Combination of Ru (II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy", *Chem. Sci*, **2006**, 6, 2660-2686.
- (61) D. Crespy, K. Landfester, U. S. Schubert, A. Schiller, "Potential photoactivated metallapharmaceuticals : from active molecules to supported drugs", *Chem. Commun*, **2010**, 46(6), 6651-6662

- (62) H. Abrahamse, M. R. Hamblin, “New photosensitizers for photodynamic therapy”, *Biochem. J*, **2016**, 437, 347–364.
- (63) R. K. Pandey, M. M. Siegel, R. Tsao, J. H. McReynolds, T. J. Dougherty, “Fast atom bombardment mass spectral analyses of Photofrin II and its synthetic analogs”, *Biomed Environ Mass Spectrom*, **1990**, 19, 405-14.
- (64) Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman, «Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης», Αθήνα, **1997**, Εκδόσεις Κωσταράκης.
- (65) R. R. Avirah, D. T. Jayaram, N. Adarsh, D. Ramaiah, “Squaraine dyes in PDT: from basic design to in vivo demonstration”, 10, 2012, *Org. Biomol. Chem*, **2012**, 10, 911-920.