



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου του Cu(II) με παράγωγο κουρκουμίνης.
Μελέτη αλληλεπίδρασης με CT- DNA και *in vitro* αξιολόγηση της βιολογικής
δράσης.**

**ΙΩΑΝΝΑ ΡΟΥΠΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ Ε.Κ.Π.Α.**

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΪΟΣ 2015

Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου του Cu(II) με παράγωγο κουρκουμίνης. Μελέτη της αλληλεπίδρασης με CT- DNA και *in vitro* αξιολόγηση της βιολογικής δράσης.

ΙΩΑΝΝΑ ΡΟΥΠΑ

A.M.: 81301

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Κων/νος Μεθενίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κων/νος Μεθενίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Χ.-Α. Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Μαρίνα Σαγνού, Ερευνήτρια Γ', ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 26/05/2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός ενός παραγώγου της κουρκουμίνης (4,4'-((1E,1'E)-(1-(πυριδιν-2-υλ)-1H-πυραζολο-3,5-διυλ)δι(εθεν-2,1-διυλ))δι(2-μεθοξυφαινολη)), η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου του Cu(II) με αυτόν τον υποκαταστάτη, η αλληλεπίδρασή τους με το CT-DNA και η μελέτη της κυτταροτοξικότητάς τους στην καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB 231 (καρκίνος του μαστού) και U251 (γλοιοβλάστωμα).

Στο καινοτόμο αυτό παράγωγο η ομάδα της β-δικετόνης του μορίου της κουρκουμίνης αντικαταστάθηκε από την ομάδα του πυριδινο-υποκατεστημένου πυραζολίου στοχεύοντας τόσο στην πιθανή βελτίωση ιδιοτήτων του φυσικού προϊόντος όπως της χαμηλής διαλυτότητας και σταθερότητας στο νερό, σε όξινο και ουδέτερο pH, της χαμηλής εκλεκτικότητας και βιοδιαθεσιμότητάς του, όσο και στην δυνατότητα πρόσδεσης μετάλλων για τη δημιουργία συμπλόκων. Το νέο αυτό παράγωγο της κουρκουμίνης συντέθηκε με επιτυχία και χρησιμοποιήθηκε σαν NN υποκαταστάτης στη σφαίρα συναρμογής για τη δημιουργία συμπλόκου με το Χαλκό (II). Πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός τόσο του υποκαταστάτη όσο και του συμπλόκου με τη βοήθεια των ακόλουθων φασματοσκοπικών τεχνικών: μάζας (MS), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (^1H , 2D), φθορισμού, υπέρυθρης (IR) και τέλος υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Το μεταλλικό ιόν του χαλκού (II) συμπλέχτηκε με τον υποκαταστάτη μέσω των αζώτων της πυριδινικής και πυραζολικής ομάδας, σχηματίζοντας έτσι έναν πολύ σταθερό πενταμελή δακτύλιο. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των ενώσεων αυτών με το CT-DNA με τη βοήθεια κυκλικού διχρωϊσμού (CD), φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), φθορισμού, ιξωδομετρίας και καμπυλών θερμικής μετουσίωσης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν την ικανότητα τόσο του υποκαταστάτη όσο και του συμπλόκου να αλληλεπιδρά με το DNA, το καθένα με διαφορετικό τρόπο, και με το σύμπλοκο να εμφανίζει σημαντικά ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το DNA σε σχέση με τον υποκαταστάτη. Τέλος, αξιολογήθηκε και η *in vitro* βιολογική τους δράση, σε δυο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, MDA-MB 231 και U251. Τα πρώτα βιολογικά αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά και υποδηλώνουν τόσο τον υποκαταστάτη όσο και το σύμπλοκο ως έναν πολλά υποσχόμενο παράγοντα για τη μείωση του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοανόργανη Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κουρκουμίνη, παράγωγα κουρκουμίνης, χαλκός, DNA, αντικαρκινική δράση.

Abstract

In the current thesis, the characterization of a new curcumin derivative (4, 4'-((1E, 1'E)-(1-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazole-3,5-diyl)bis(ethene-2,1-diyl))bis(2-methoxyphenol)) and the synthesis and the characterization of the corresponding copper (II) complex were described. We also studied their DNA-binding properties with a range of techniques, as well as the *in vitro* cytotoxicity studies against human cancer cell lines MDA-MB 231 (human breast) and U251 (glioblastoma).

In this innovative derivative, the group of β -diketone of curcumin was replaced by the moiety of the pyridine-substituted pyrazole, aiming both at the improvement of the natural product's properties, such as the low solubility and stability in water at acidic and neutral pH, its low selectivity and bioavailability, and the ability of the complexation with metals. This new derivative of curcumin was synthesized successfully and it was used as a NN ligand in the coordination sphere of the copper complex. The characterization of both the ligand and the corresponding complex was carried out using a variety of techniques such as: mass (MS), nuclear magnetic resonance (NMR (^1H , 2D)), infrared (IR), ultraviolet-visible (UV-Vis) and emission spectroscopy. The metal center coordinates through the nitrogen of the pyridine and pyrazole group creating a stable five-membered chelate ring. Subsequently, their interaction with CT-DNA was studied using circular dichroism, UV-Vis and emission spectroscopy, viscosity measurements and thermal denaturation studies. The results of this study indicate the ability of the ligand and the complex to interact with DNA, each one with a different mode of binding, with a stronger DNA interaction with the complex than the ligand. *In vitro* cytotoxicity studies against MDA-MB 231 and U251 were determined using MTT assay. The results are very interesting and encouraging for both of the tested compounds suggesting as a promising agent for the reduction of tumor cell population.

SUBJECT AREA: Bioinorganic Chemistry

KEYWORDS: curcumin, curcumin's derivatives, copper, DNA, anticancer activity.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	27
Η ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΗΣ	27
1.1 Η κουρκουμίνη	27
1.2 Βιολογικές δράσεις της κουρκουμίνης και των κουρκουμινοειδών	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	38
ΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ	38
2.1 Γενικά για το ρόλο των μεταλλικών συμπλόκων στην Ιατρική.....	38
2.2 Γενικά χαρακτηριστικά του χαλκού (Cu) και των συμπλόκων του	40
2.3 Τα σύμπλοκα του χαλκού και οι βιολογικές τους δράσεις	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	46
ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΩΝ.....	46
3.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	46
3.2 Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance)	47
3.3 Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)	49
3.4 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	50
3.5 Φθορισμομετρία (Fluorescence)	50
3.6 Κυκλική Βολταμμετρία (Cyclic Voltammetry, CV)	51
3.7 Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD).....	51
3.8 Ιξωδομετρία (Viscosimetry)	52
3.9 Προσδιορισμός σημείου τήξεως (T_m).....	53
3.10 Δοκιμασία MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium)	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	56
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ- ΟΡΓΑΝΑ –ΜΙΚΡΟΣΥΣΚΕΥΕΣ- ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	56

4.1 Αντιδραστήρια.....	56
4.2 Όργανα – Μικροσυσσκευές.....	56
4.3 Μεθοδολογία - Παρασκευή διαλυμάτων	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	66
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ 4,4'-((1E,1'E)- (1-(πυριδιν-2-υλ)-1H-πυραζολο-3,5-διυλ)δι(εθεν-2,1-διυλ))δι(2- μεθοξυφαινολη)	66
5.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός του 4,4'-((1E,1'E)-1-(πυριδιν-2-υλ)-1H-πυραζολο-3,5-διυλ)δι(εθεν-2,1-διυλ))δι(2-μεθοξυφαινολη) (curcu4)	66
5.2 Χαρακτηρισμός της curcu4.....	66
5.2.1 Φασματοσκοπία Μάζας (Mass Spectrometry, MS)	66
5.2.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	68
5.2.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)	69
5.2.4 Φασματοσκοπία Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis).....	70
5.2.5 Φθορισμομετρία (Fluorescence)	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	78
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ Cu(II) ΜΕ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ ΤΗΝ curcu4.....	78
6.1 Σύνθεση του συμπλόκου του Cu(II) με την curcu4, c1.....	78
6.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου του Cu(II) με την curcu4.....	80
6.2.1 Φασματοσκοπία Μάζας (Mass Spectrometry, MS)	80
6.2.2. Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR)	81
6.2.3 Φασματοσκοπία IR.....	83
6.2.4 Φασματοσκοπία UV-Vis	85
6.2.5 Φθορισμομετρία	94

6.2.6 Κυκλική Βολταμμετρία (Cyclic Voltammetry, CV)	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	100
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ curcu4 ΚΑΙ ΤΟΥ c1 ΜΕ ΤΟ CT-DNA	100
7.1 Φασματοσκοπία UV-Vis.....	100
7.1.1 Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση της curcu4 και του c1	100
7.1.2 Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης (T_m).....	102
7.2 Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD)	104
7.3 Φθορισμομετρία (Fluorescence)	106
7.4 Ιξωδομετρία (viscosity).....	109
7.5 Συζήτηση	110
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	111
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ curcu4 ΚΑΙ ΤΟΥ c1 ΣΤΙΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ MDA-MB 231 ΚΑΙ U251	111
8.1 Δοκιμασία MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium)	111
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	114
Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια	117
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	118
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	119
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ	122
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	124

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Απομόνωση, εκχύλιση και δομή της κουρκουμίνης. Η κουρκουμίνη βρίσκεται σε χάπια, παστίλιες και κρέμες. Ο βασικός μεταβολιτής της κουρκουμίνης είναι η τετραϋδροκουρκουμίνη (άσπρο χρώμα).....	27
Σχήμα 2: Δομή (α) κουρκουμίνης, (β) απομεθοξικουρκουμίνη,.....	28
Σχήμα 3: Η δομή της κουρκουμίνης και η ισορροπία με την ενολική της μορφή.	28
Σχήμα 4: Δομή (α) βανιλίνης, (β) φερουλικό οξύ, (γ) φερουλόυλο μεθάνιο, (δ) βανιλλικό οξύ, (ε) φερουλική αλδεΐδη, (ζ) 4-βινυλογουαϊακόλη, (η) p-υδροξοβενζαλδεΐδη και (θ) p-υδροξοβενζοϊκό οξύ.	29
Σχήμα 5: Δομή (α) παράγωγο κουρκουμίνης με ισοξαζόλιο και (β) παράγωγο κουρκουμίνης με πυραζόλιο.	30
Σχήμα 6: Δομές παραγώγων κουρκουμίνης (1)-(6).....	31
Σχήμα 7: Δομές διαφόρων κουρκουμινολιδίων A-E.	32
Σχήμα 8: Φάρμακα που εγκρίθηκαν κατά τη διάρκεια 2005-2010.....	33
Σχήμα 9: Αποδεδειγμένες βιολογικές δράσεις κουρκουμίνης.	36
Σχήμα 10: Δομή παραγώγου κουρκουμίνης που ενισχύει τη μνήμη.	37
Σχήμα 11: Δομή συμπλόκου του Cu (II) με τη ciprofloxacin.....	43
Σχήμα 12: Φαινόμενο Zeeman για ένα σύστημα με $S = \frac{1}{2}$ σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0	48
Σχήμα 13: Φάσματα CD για τις πιθανές διαμορφώσεις του DNA. Δεξιά εμφανίζεται πίνακας με τα μήκη κύματος των εμφανιζόμενων ταινιών.....	52
Σχήμα 14: Τυπική πορεία τήξης του DNA.....	54
Σχήμα 15: Αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη μέσω ενζύμων αναγωγάσης.	55
Σχήμα 16: Δομή του υποκαταστάτη (curcu4).	66
Σχήμα 17: Φάσμα MS για την curcu4 σε διαλύτη μεθανόλη.	67
Σχήμα 18: Το φάσμα IR για την curcu4.....	68
Σχήμα 19: Φάσμα NMR για την curcu4 σε διαλύτη μεθανόλη (CD_3OD) σε εύρος: 0-9 ppm και 6,7-8,7 ppm (σε μεγέθυνση).	69
Σχήμα 20: Φάσμα $^1H-^1H$ COSY για την curcu4.....	69
Σχήμα 21: Το φάσμα UV – Vis της curcu4 στην περιοχή 270-600 nm σε διάφορους διαλύτες καθώς και στην περιοχή 200-600 nm σε διαλύτη μεθανόλη και μεθανόλη-νερό, $\theta=25^\circ C$	73
Σχήμα 22: Φάσμα UV-Vis curcu4 (α) σε pH=6,06-12,59, (γ) σε pH=0,57-5,92, (β) διάγραμμα $A=f(pH)$ από δεδομένα (α), (δ) διάγραμμα $A=f(pH)$ από δεδομένα (γ).	75
Σχήμα 23: Φάσμα φθορισμού της curcu4 σε μεθανόλη.....	77
Σχήμα 24: Σύνθεση του συμπλόκου του Cu(II) με την curcu4.....	78
Σχήμα 25: Θεωρητικοί υπολογισμοί για την απόσταση O-H για (α) την curcu4 και (β) το c1.....	79
Σχήμα 26: Φάσμα MS για το c1 σε διαλύτη μεθανόλη.....	80
Σχήμα 27: Φάσμα X-band EPR (α) από 0-5000 G και (β) σε μεγέθυνση για το c1.....	81
Σχήμα 28: Φάσμα IR για το c1.....	83
Σχήμα 29: Φάσμα UV-Vis του c1 σε διαλύτη DMSO σε περιοχή (α) 500-1100 nm και (β) 270-600 nm.	85
Σχήμα 30: Φάσμα UV-Vis Vis για λόγους $[Cu]/[Curcu4] = 0, 0,3, 0,5, 1, 2$ και 20, σε διαλύτη μεθανόλη στους $25^\circ C$	87

Σχήμα 31: (α) Φάσμα UV-Vis του c1 προσθέτοντας διάλυμα NaOH (β) Φάσμα UV-Vis του c1 προσθέτοντας διάλυμα HCl (γ), (δ) διάγραμμα απορροφήσεων από τα (α), (β) αντίστοιχα συναρτήσει του pH.	88
Σχήμα 32: (α) Φάσμα UV-Vis για τα διαλύματα Cu(II)-curcu4 (β) διάγραμμα απορροφήσεων συναρτήσει του όγκου του διαλύματος του Cu(II) από δεδομένα του (α).	90
Σχήμα 33: Φάσμα UV-Vis Cu(II)-curcu4 σε διαλύτη μεθανόλη σε θερμοκρασίες 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C.	91
Σχήμα 34: Διάγραμμα $\ln K_f$ συναρτήσει του $1/T$	93
Σχήμα 35: Φάσμα εκπομπής και διέγερσης για το c1 σε διαλύτη μεθανόλη	94
Σχήμα 36: Φάσμα φθορισμού curcu4 με προσθήκη ιόντων Cu(II), $\lambda_{ex}=330$ nm.	95
Σχήμα 37: Διάγραμμα % μείωσης του φθορισμού συναρτήσει της [Cu(II)].	96
Σχήμα 38: (α) Διάγραμμα $F_0/F=f([Cu^{2+}])$, (β) Διάγραμμα $1/(F_0-F)=f(1/[Cu^{2+}])$	97
Σχήμα 39: Κυκλικά βολταμμογραφήματα των (α) $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ και (β) c1 σε MeOH (3 mM). Φέρων ηλεκτρολύτης: $KClO_4$ (0,5 M), ηλεκτρόδιο εργασίας: ηλεκτρόδιο δίσκου Pt, ηλεκτρόδιο αναφοράς: Ag/AgCl, ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s.	98
Σχήμα 40: Φάσμα UV-Vis: (α) DNA-curcu4 (β) DNA-c1.	100
Σχήμα 41: Διάγραμμα μεταβολής του λόγου $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ σε συνάρτηση της [DNA] στο σύστημα (α) DNA-curcu4 και (β) DNA-c1.	101
Σχήμα 42: Φάσμα CD (α) για το DNA-curcu4 και (β) για το DNA-c1.	105
Σχήμα 43: (α) Φάσμα φθορισμού για το DNA-EtBr (β) διάγραμμα της έντασης φθορισμού στα 600 nm συναρτήσει της [DNA] από δεδομένα του (α), $\lambda_{ex}=526$ nm.	106
Σχήμα 44: Φάσμα φθορισμού (α) DNA-EtBr-Curcu4 και (β) DNA-EtBr-c1, $\lambda_{ex}=526$ nm.	106
Σχήμα 45: Διάγραμμα της έντασης του φθορισμού του συστήματος DNA-EtBr-c1 συναρτήσει του λόγου R ($R=[c1]/[DNA-EtBr]$).	107
Σχήμα 46: Φάσμα φθορισμού (α) DNA-Curcu4, $\lambda_{ex}=330$ nm (β) DNA-c1, $\lambda_{ex}=344$ nm και (γ) διάγραμμα έντασης φθορισμού συναρτήσει του λόγου R ($R=[DNA]/[c1]$).	108
Σχήμα 47: Διάγραμμα ιξωδομετρίας για τη σειρά: DNA-curcu4 (μαύρη γραμμή) και DNA-c1 (κόκκινη γραμμή).	109
Σχήμα 48: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας.	112

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Φυσικά προϊόντα ως φάρμακα, δραστική ουσία, κατηγορία φαρμάκων και ασθένειες που καταπολεμούν.	34
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά του χαλκού.	40
Πίνακας 3: Οξειδωτικές καταστάσεις και στοιχειομετρία του χαλκού.	42
Πίνακας 4: Τα βασικότερα θραύσματα της curcu4 σε διαλύτη μεθανόλη.	67
Πίνακας 5: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR της ουσίας curcu4.	68
Πίνακας 6: Πίνακας χημικών μετατοπίσεων της curcu4 σε διαλύτη CD ₃ OD (σε παρένθεση και με πλάγια παρουσιάζεται η χημική πολλαπλότητα J)	70
Πίνακας 7: Τα μήκη κύματος στα μέγιστα των απορροφήσεων ($\lambda_{\max}$), οι συντελεστές απορροφητικότητας (ϵ) και οι αποδόσεις των ταινιών του φάσματος UV-Vis.	74
Πίνακας 8: Μήκη κύματος εκπομπής για την curcu4 σε $\lambda_{\text{exc}}=330$ nm.	77
Πίνακας 9: Τα κυριότερα θραύσματα του c1.	80
Πίνακας 10: Αποτελέσματα EPR.	82
Πίνακας 11: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR της ουσίας c1.	84
Πίνακας 12: Οι ταινίες απορρόφησης του c1.	86
Πίνακας 13: Τιμές pK _a για curcu4 και c1.	89
Πίνακας 14: Οι σταθερές σχηματισμού K _f (L·mol ⁻¹) και σε παρένθεση τα lnK _f σε μεθανόλη στις διάφορες θερμοκρασίες.	93
Πίνακας 15: Ηλεκτροχημικά δεδομένα για Cu(ClO ₄) ₂ ·6H ₂ O και c1.	98
Πίνακας 16: Τα σημεία τήξης, τα ΔT_m και η %h _r στα 258 nm σε διάφορους λόγους R τόσο για την curcu4 όσο και για το c1.	103
Πίνακας 17: Τιμές IC ₅₀ (μM)± την τυπική απόκλιση.	113

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, Ανόργανη Χημεία και Τεχνολογία. Το θέμα της παρούσας εργασίας εντάσσεται στην Ανόργανη Χημεία, μελετώντας σύμπλοκα και ειδικότερα στην Βιοανόργανη Χημεία, μελετώντας τη βιολογική δράση βιοανόργανων ενώσεων. Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε κατ' εξοχήν στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, του Τμήματος Χημείας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του ΕΚΠΑ, υπό τη συνεχή επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Μεθενίτη. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για όλα όσα μου έμαθε αυτό το χρονικό διάστημα, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη στήριξή του ανά πάσα στιγμή και γενικά για την άψογη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Παραβατού, Ερευνήτρια Β' στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Ερευνών, Ενέργειας και Ασφάλειας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, και στο εργαστήριο αυτό πραγματοποιήθηκαν τα βιολογικά πειράματα, για τη συνεχή βοήθεια της για την επιτυχή ολοκλήρωση των βιολογικών πειραμάτων και για τη στήριξή της όλο το χρονικό διάστημα που ήμουν στο εργαστήριό της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτωρ κα. Βαρβάρα Μαυροειδή, για την πολύτιμη βοήθειά της στα βιολογικά πειράματα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, την Δρ. Μαρία Πελεκάνου, Ερευνήτρια Α', στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος στο εργαστήριο της οποίας έγινε η σύνθεση του υποκαταστάτη μου από την Δρ. Σαγνού Μαρίνα και την Δρ. Αλεξίου Πολυξένη. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Μαρίνα Σαγνού, Ερευνήτρια Γ', στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, για τη βοήθειά της σε διάφορα πειραματικά ζητήματα και που δέχθηκε να είναι μέλος της τριμελούς μου επιτροπής καθώς και την καθηγήτρια Χ. Α. Μητσοπούλου που είναι μέλος της τριμελούς μου επιτροπής.

Επιπλέον, Θα ήθελα να ευχαριστήσω το λέκτορα καθηγητή, κ. Χρυσσανθόπουλο Αθανάσιο, για τη βοήθειά του στους θεωρητικούς υπολογισμούς για την απόδοση των κορυφών στα φάσματα UV-Vis, την επίκουρη καθηγήτρια κα. Παρασκευοπούλου Πατρίνα για την βοήθειά της στα κυκλικά βολταμμογραφήματα, τον Δρ. Καπλάνη Μιχαήλ για τη μεγάλη βοήθειά του σε επιστημονικά ζητήματα και τη συνεχή στήριξή του,

αλλά και όλους στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας για το φιλικό και ευχάριστο κλίμα όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου που με στήριξαν τόσο πολύ και σε αυτή τη φάση της ζωής μου.

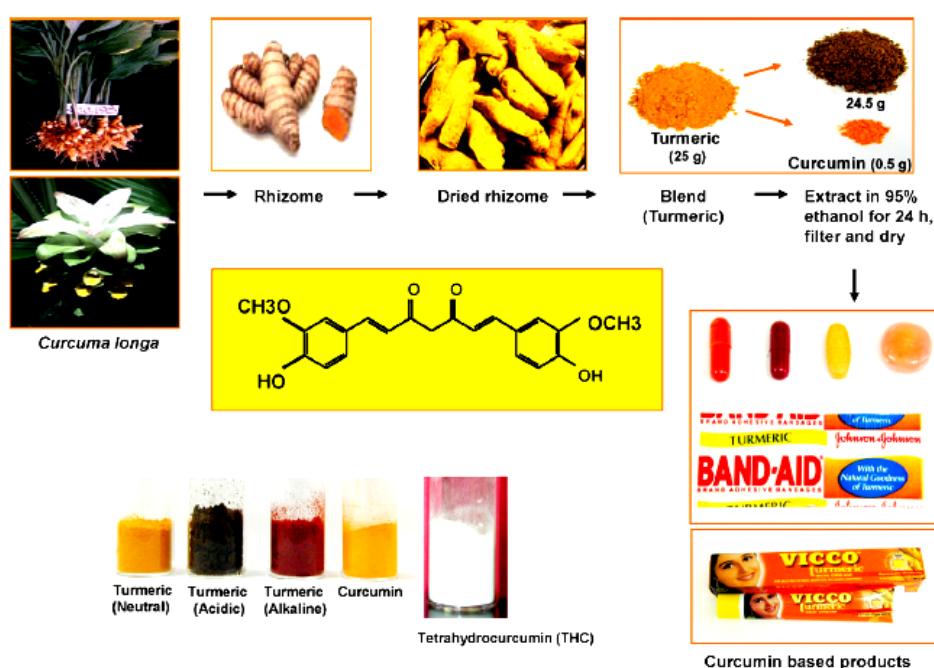
Η ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ, 2007-2013».

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΗΣ

1.1 Η κουρκουμίνη

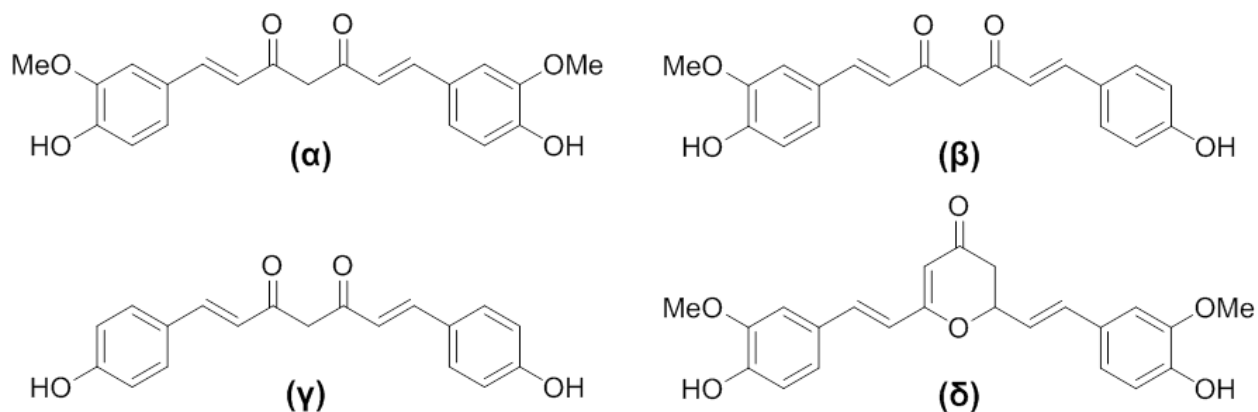
Η κουρκουμίνη ((1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione, δισ-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ)-1,6-διεν-3,5-διόνη, $C_{21}H_{20}O_6$) είναι μια κίτρινη χρωστική που παραλαμβάνεται από το ρίζωμα του φυτού *Curcuma longa* και άλλων *Curcuma spp.* Η κουρκουμίνη είναι μια δισ-ακόρεστη-α,β-δικετόνη και χρησιμοποιείται ως χρωστική, ως πρόσθετο στα τρόφιμα, αλλά και σε χάπια, παστίλιες κλπ (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Απομόνωση, εκχύλιση και δομή της κουρκουμίνης. Η κουρκουμίνη βρίσκεται σε χάπια, παστίλιες και κρέμες. Ο βασικός μεταβολιτής της κουρκουμίνης είναι η τετραϋδροκουρκουμίνη (άσπρο χρώμα) [1].

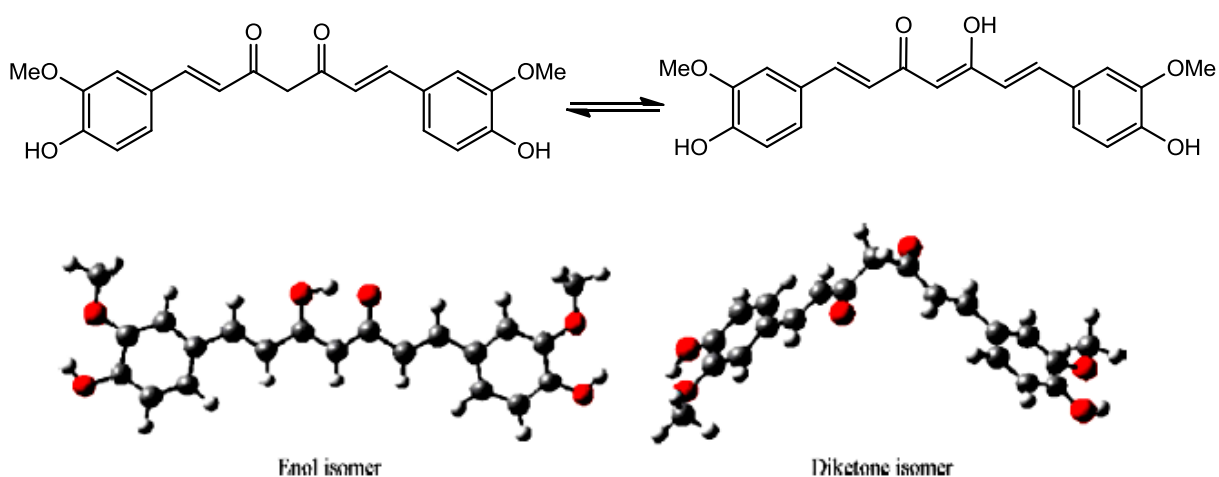
Τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα αναφέρονται με τον όρο κουρκουμίνη στο φυσικό εκχύλισμα που όμως αποτελείται από μείγμα τριών δομικά σχετιζόμενων κουρκουμινοειδών: της κουρκουμίνης-1 (σε ποσοστό 77%), της απομεθοξικουρκουμίνης (σε ποσοστό 17%) και της δισ-απομεθοξικουρκουμίνης (σε ποσοστό 3%), οι δομές των οποίων φαίνονται στο Σχήμα 2. Αυτές οι ενώσεις ανήκουν στην ομάδα των διάρρυλο-επτανονοειδών. Ένα λιγότερο γνωστό κουρκουμινοειδές είναι η

κυκλοκουρκουμίνη η οποία απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Kiuchi. Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί αξιόλογες βιολογικές δράσεις αυτού του φυσικού παραγώγου. (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Δομή (α) κουρκουμίνης, (β) απομεθοξικουρκουμίνης, (γ) δις-απομεθοξικουρκουμίνης (δ) κυκλοκουρκουμίνης.

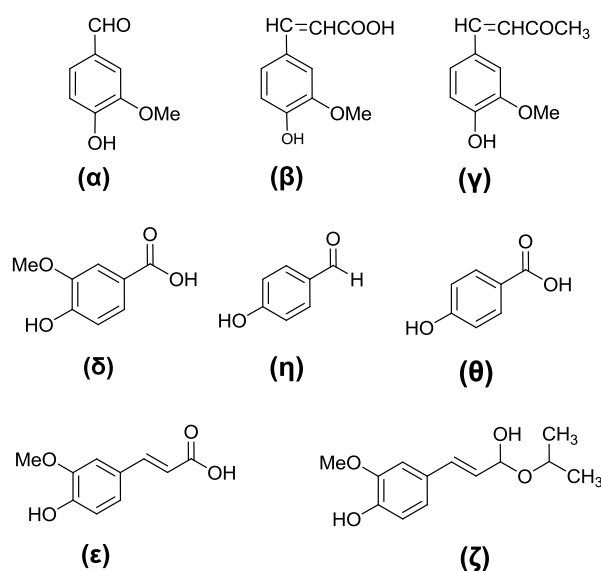
Η κουρκουμίνη έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό σε όξινο και ουδέτερο pH, ενώ σε βασικό περιβάλλον είναι διαλυτή αλλά υδρολύεται άμεσα, ενώ είναι διαλυτή σε πολικούς και μη πολικούς οργανικούς διαλύτες, όπως ακετόνη, διμεθυλοσουλφοξείδιο και αιθανόλη [2]. Η κουρκουμίνη βρίσκεται σε ισορροπία με το ενολικό της ταυτομερές (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Η δομή της κουρκουμίνης και η ισορροπία με την ενολική της μορφή.

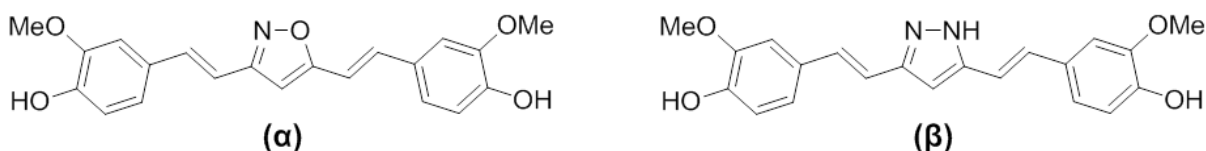
Η β-κετο μορφή της κουρκουμίνης κυριαρχεί σε όξινα και βασικά υδατικά διαλύματα καθώς και στην κυτταρική μεμβράνη. Σε pH 3-7 η κουρκουμίνη δρα ως ισχυρός δότης Η. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στην κετο-μορφή η σύνδεση των μεθοξυφαινολικών δακτυλίων μέσω των επτά ατόμων άνθρακα, τα οποία περιέχουν ένα ενεργοποιημένο άτομο άνθρακα, και οι δεσμοί C-H σε αυτόν τον άνθρακα είναι πολύ ασθενείς εξαιτίας του απεντοπισμού του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων των γειτονικών οξυγόνων. Αντίθετα, σε pH 8, η ενολική μορφή της αλυσίδας των επτά ατόμων άνθρακα κυριαρχεί, και η κουρκουμίνη συμπεριφέρεται κυρίως ως δότης ηλεκτρονίων, με έναν μηχανισμό πιο τυπικό για την δράση των φαινολικών αντιοξειδωτικών [3]. Η κουρκουμίνη είναι ασταθής σε βασικό pH, και αποσυντίθεται μέσα σε 30 λεπτά στο trans-6-(4'-υδροξυ-3'-μεθοξυφαινυλ)-2,4-διοξο-5-εξανόλη, σε φερουλικό οξύ, φερουλομεθάνιο και βανιλίνη (Σχήμα 4). Υπό όξινες συνθήκες, η αποσύνθεση της κουρκουμίνης είναι πιο αργή, με λιγότερο από το 20% να αποσυντίθεται σε 1 ώρα [3].

Η κουρκουμίνη σε διάλυμα δεν είναι σταθερή παρουσία φωτός αλλά διασπάται δίνοντας ως κύριο προϊόν την ένωση με μοριακό τύπο $C_{12}H_{18}O_6$ το οποίο ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας. Τα προϊόντα διάσπασης της κουρκουμίνης μπορεί να είναι η βανιλίνη, το φερουλικό οξύ, το φερουλόυλο μεθάνιο, το βανιλικό οξύ, η φερουλική αλδεΐδη, η 4-βινυλογουαϊάκόλη, η p-υδροξοβενζαλδεΐδη και το p-υδροξοβενζοϊκό οξύ. (βλ. Σχήμα 4) [2].



Σχήμα 4: Δομή (α) βανιλίνης, (β) φερουλικό οξύ, (γ) φερουλόυλο μεθάνιο, (δ) βανιλικό οξύ, (ε) φερουλική αλδεΐδη, (ζ) 4-βινυλογουαϊάκόλη, (η) p-υδροξοβενζαλδεΐδη και (θ) p-υδροξοβενζοϊκό οξύ.

Σύμφωνα με μεγάλο αριθμό βιβλιογραφικών αναφορών και όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια το μόριο της κουρκουμίνης έχει συνδεθεί με πολλές και ενδιαφέρουσες θεραπευτικές δράσεις για μια πλειάδα ασθενειών, όπως διάφοροι τύποι καρκίνου, η νόσος Αλτσχάιμερ και άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, η ψωρίαση, αυτοάνοσα νοσήματα κλπ, ωστόσο οι κλινικές μελέτες περιορίζονται εξαιτίας της χαμηλής της διαλυτότητας σε φυσιολογικές συνθήκες. Η ενολική μορφή βρέθηκε να είναι υπεύθυνη για τη ραγδαία αποικοδόμηση της ένωσης σε διάλυμα. Για να αυξηθεί η σταθερότητα και η διαλυτότητα της κουρκουμίνης συντέθηκαν παράγωγα στα οποία η ομάδα της δικετόνης αντικαταστάθηκε από ομάδα ισοξαζολίου ή πυραζολίου (Σχήμα 5). Τα παράγωγα αυτά της κουρκουμίνης είναι πολύ σταθερά σε φυσιολογικό pH [4].

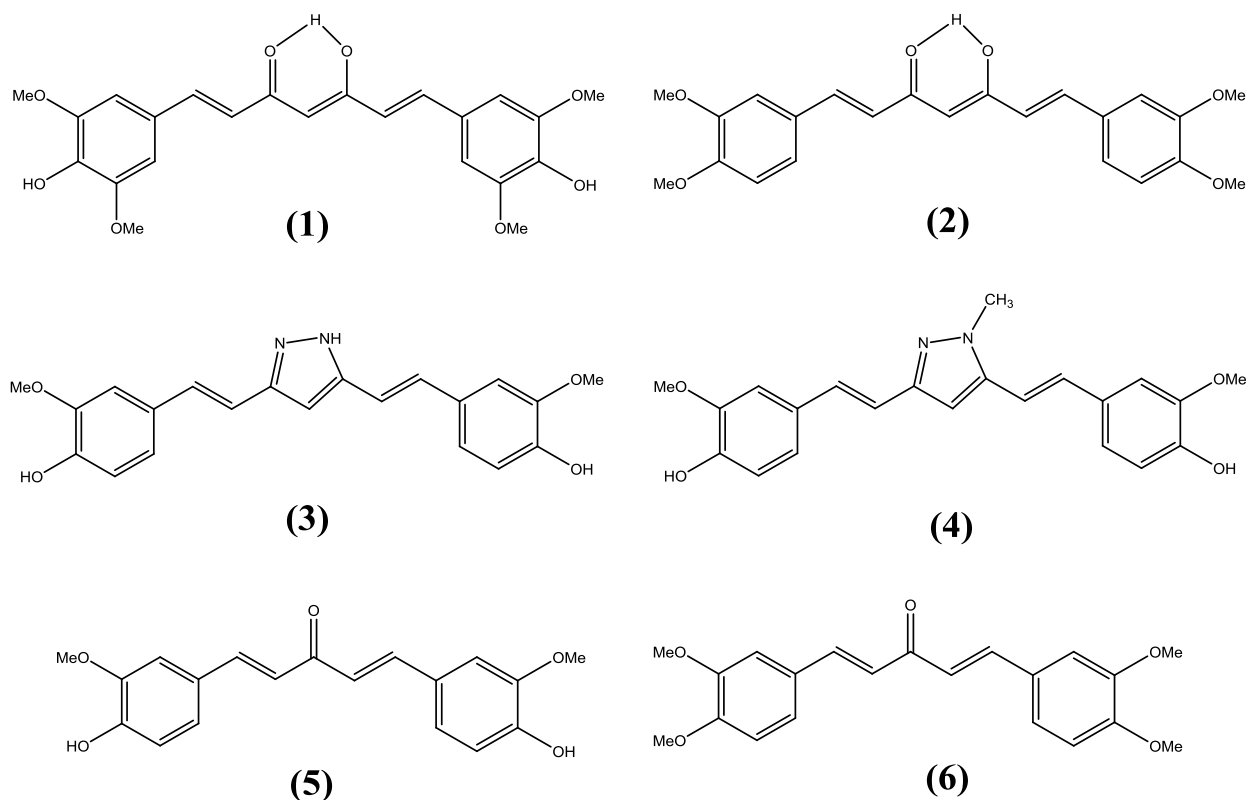


Σχήμα 5: Δομή (α) παράγωγο κουρκουμίνης με ισοξαζόλιο και (β) παράγωγο κουρκουμίνης με πυραζόλιο.

Τα ανάλογα αυτά της κουρκουμίνης έχουν μειωμένη ηλεκτροφιλία διατηρώντας την αντιπολλαπλασιαστική δράση των καρκινικών κυττάρων και αποτελούν πολλά υποσχόμενους στόχους για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων [5].

Ένας επιπλέον περιοριστικός παράγοντας για την κλινική εφαρμογή της είναι ότι εμφανίζει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα με αποτέλεσμα να χρειάζονται πολύ μεγάλες χορηγούμενες ποσότητες για την επιθυμητή θεραπευτική δράση. Τέλος, αποτελεί ένα πολυδύναμο βιοδραστικό μόριο με πολλές παράλληλες θεραπευτικές δράσεις και πολλούς παράλληλους θεραπευτικούς στόχους. Η συγκεκριμένη ιδιότητα έχει χαρακτηριστεί σαν «δίκτοπο μαχαίρι» μια που κάποιες από τις παράλληλες μοριακές δράσεις της κουρκουμίνης μπορεί να είναι και ανταγωνιστικές μεταξύ τους. Πολλά παράγωγα έχουν συντεθεί για να βελτιώσουν τις ιδιότητες του φυσικού προϊόντος (βελτίωση εκλεκτικότητας, βιοδιαθεσιμότητας και σταθερότητας). Το μόριο της κουρκουμίνης μπορεί δομικά να αναχθεί σε τρία τμήματα: 1) στους αρωματικούς δακτυλίους οι οποίοι συνδέονται 2) μέσω των ολεφινικών δεσμών και ενώνονται με μια 3) β-δικετόνη. Οι ολεφινικοί διπλοί δεσμοί, οι οποίοι είναι πολύ σημαντικοί για την

δραστικότητα της κουρκουμίνης θεωρούνται ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα σε δύο δομικά στοιχεία «κλειδιά» για αυτό και δεν συνηθίζεται να τροποποιούνται. Αντ' αυτού έχουν γίνει πολλές συνθετικές προσπάθειες για την αλλαγή των αρωματικών δακτυλίων και των υποκαταστατών τους καθώς και για την τροποποίηση του δικετονικού συστήματος. Αυτή η προσπάθεια γίνεται για να μελετηθεί η σχέση δομής-δραστικότητας σε διάφορους μοριακούς στόχους[6].

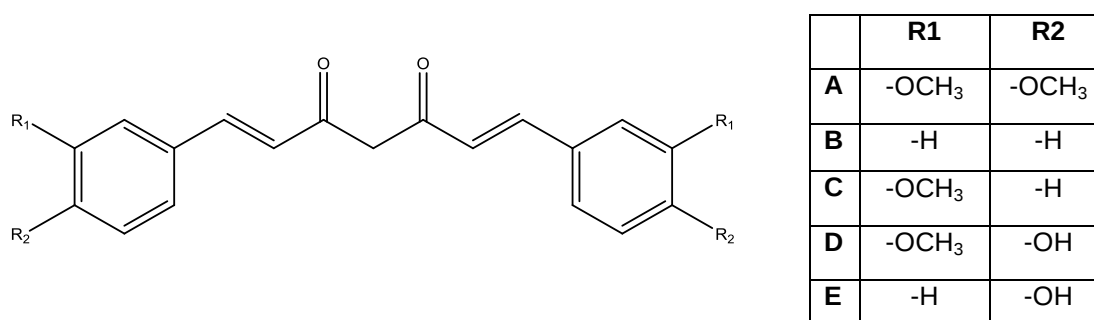


Σχήμα 6: Δομές παραγώγων κουρκουμίνης (1)-(6).

Στην ένωση (1) (βλ.Σχήμα 6) όπου έχει προστεθεί μια επιπλέον μεθόξυ ομάδα παρατηρήθηκε μία μικρή μείωση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα [6]. Όταν η υδροξυλομάδα αντικαταστάθηκε από τη μεθόξυ ομάδα (ένωση 2, Σχήμα 6) αυξήθηκε η σταθερότητα της κουρκουμίνης σε βασικές συνθήκες καθώς και σε συνθήκες με pH 7,2, ενώ παρατηρήθηκε και αύξηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα [6]. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι υπήρξε αύξηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της κουρκουμίνης όταν η ομάδα της δικετόνης αντικαταστάθηκε με την ομάδα του πυραζολίου (ένωση 3, Σχήμα 6) ενώ όταν συντέθηκε η ένωση 4 (βλ.Σχήμα 6) με N-μεθυλίωση της ένωσης 3 η

αντιπολλαπλασιαστική δράση μειώθηκε [6]. Η ένωση 5 (βλ. Σχήμα 6), η οποία έχει την ίδια υποκατάσταση στους αρωματικούς δακτυλίους με την κουρκουμίνη εμφανίζει ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση από ότι η κουρκουμίνη. Στην κουρκουμίνη, οι 4-υδροξυλομάδες είναι μεταβολικά ενεργές και προστατεύοντας αυτές τις λειτουργικές ομάδες ενισχύεται η αντιπολλαπλασιαστική δράση των σχηματιζόμενων παραγώγων. Ωστόσο, στις ενώσεις όπου υπάρχει το πενταδιένιο και αντί για την υδροξυλομάδα υπάρχει η μεθύλυ ομάδα (ένωση 6, Σχήμα 6) δεν παρατηρήθηκε κάποια αύξηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης του παραγώγου. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι ο μηχανισμός δράσης είναι διαφορετικός σε αυτήν την περίπτωση ή ότι είναι λειτουργικό ένα διαφορετικό μεταβολικό μονοπάτι [6]. Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει άμεση εξάρτηση δομής-δράσης όπου ακόμα και με μικρές αλλαγές στη δομή, η δράση μπορεί να αλλάξει σημαντικά.

Επιπροσθέτως, έχουν γίνει μελέτες και για τα ακόλουθα παράγωγα (Σχήμα 7).

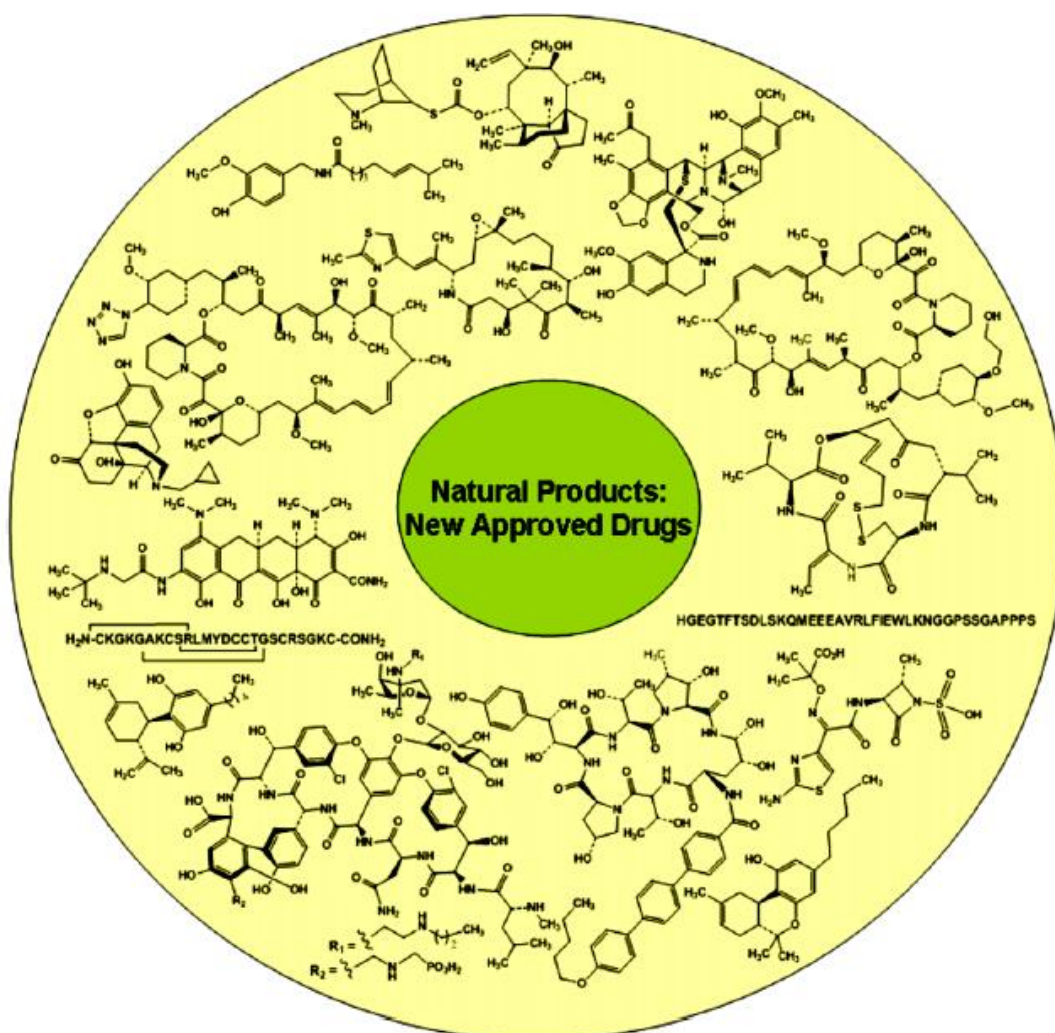


Σχήμα 7: Δομές διαφόρων κουρκουμινοειδών A-E.

Όλα τα παραπάνω παράγωγα κουρκουμίνης είναι πιο σταθερά ως προς την υδρολυτική αποικοδόμηση σε διαλύματα κυκλοδεξτρίνης από ότι η κουρκουμίνη [7]. Αντίθετα, βρέθηκε βάσει φωτοχημικών μελετών ότι η κουρκουμίνη γενικά είναι πιο σταθερή σε σχέση με τα παράγωγά της. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ελεύθερες υδροξυλομάδες στους αρωματικούς δακτυλίους είναι απαραίτητες για την εμφανιζόμενη φωτοχημική δράση της κουρκουμίνης και των παραγώγων της. Καθοριστικό ρόλο για την αντιοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης παίζει και το γεγονός ότι η κουρκουμίνη μπορεί να βρίσκεται σε δυο μορφές την κετο και την ενολική μορφή [7].

1.2 Βιολογικές δράσεις της κουρκουμίνης και των κουρκουμινοειδών

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η κουρκουμίνη είναι ένα φυσικό προϊόν και κρίνεται σκόπιμο να αναφέρουμε γενικά τη σημασία των φυσικών προϊόντων στην Ιατρική [8-13]. Τις τελευταίες δυο δεκαετίες τα φυσικά προϊόντα χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάπτυξη φαρμάκων από διάφορες φαρμακευτικές εταιρείες [8]. Πάνω από 100 νέα φάρμακα βρίσκονται σε κλινική φάση, ιδιαίτερα για την καταπολέμηση του καρκίνου και των λοιμώξεων. Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν τα ενεργά συστατικά στα φάρμακα αυτά. Αξίζει να σημειωθεί ότι από το 1981 έως το 2007 σχεδόν τα μισά φάρμακα που έχουν παραχθεί βασίζονται σε φυσικά προϊόντα. Τα φυσικά προϊόντα μπορεί να προέρχονται από φυτά, μικρόβια και ζώα (βλ. Σχήμα 8) [9].



Σχήμα 8: Φάρμακα που εγκρίθηκαν κατά τη διάρκεια 2005-2010 [10].

Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται ενδεικτικά τα φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων κατά την περίοδο 2005-2010 και για ποιες ασθένειες χρησιμοποιούνται [10].

Πίνακας 1: Φυσικά προϊόντα ως φάρμακα, δραστική ουσία, κατηγορία φαρμάκων και ασθένειες που καταπολεμούν.

Χρονολογία	Γενική ονομασία (εμπορικό όνομα)	Δραστική ουσία	Κατηγορία	Ασθένεια
2005	Fumagillin (Flisint)	Fumagillin	NPs	Αντιπαρασιτικό
2005	Tigecycline (Tygacil)	Tetracycline	Semi-synthetic NP	Αντιβακτηριακό
2006	Exenatide (Byetta)	Exenatide-4	NP	Διαβήτη
2006	Anidulafungin (Eraxis/Ecalta)	Echinocandin	Semi-Synthetic NP	Αντιμυκητιακό
2007	Trabectedin (Yondelis)	Trabectedin	NP	Ογκολογία
2008	Methylnaltrexone (Relistor)	Naltrexone	Semi-Synthetic NP	Πόνος
2009	Romidepsin (Istodax)	Romidepsin	NP	Ογκολογία
2010	Monobactam aztreonam (Cayston)	Aztreonam	Semi-synthetic NP	Αντιβακτηριακό

Συνεπώς, γίνεται κατανοητό ότι τα φυσικά προϊόντα συμβάλλουν όλο και πιο πολύ στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων για την καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών.

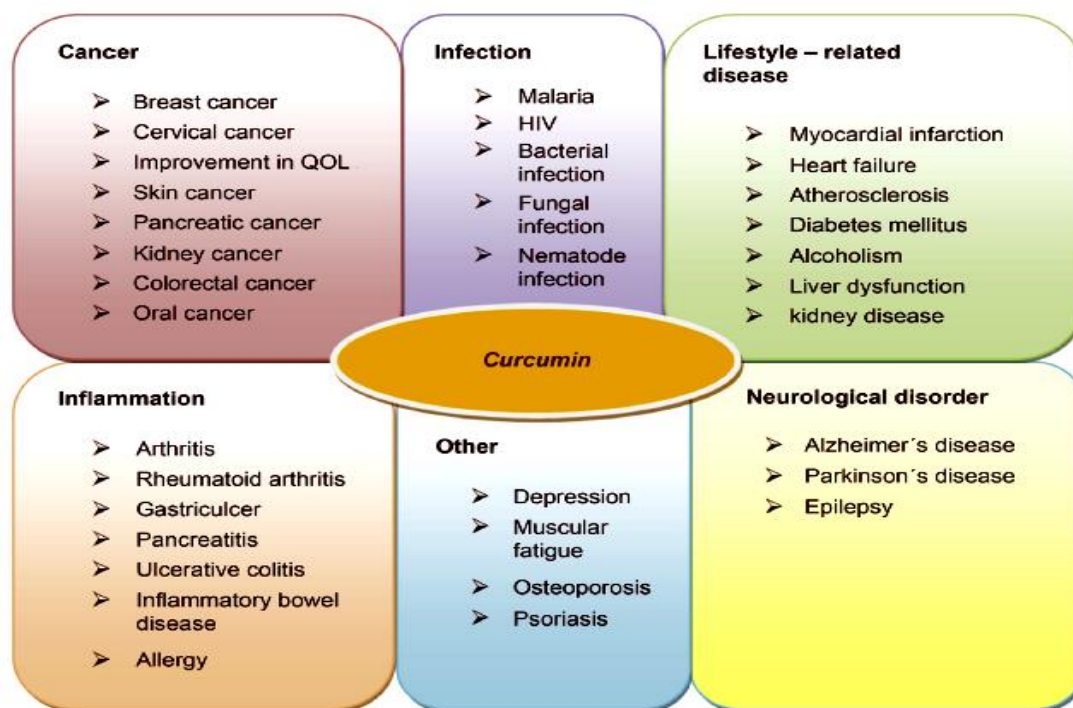
Τόσο η κουρκουμίνη όσο και τα κουρκουμινοειδή εμφανίζουν πολύ ενδιαφέρουσες και πολύ υποσχόμενες βιολογικές δράσεις και χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση πολλών και διαφόρων ασθενειών. Εκτός, βέβαια από τη θεραπευτική δράση της κουρκουμίνης, η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται ως χρωστική και για άρωμα στις παρασκευές πολλών φαγητών καθώς και ως τονωτικό [14, 15]. Ο κουρκουμάς ή κιτρινόριζα, επιστημονική ονομασία *Curcuma longa* ή *Curcuma domestica*, είναι ένα ριζωματοειδές πολυετές φυτό της οικογένειας των Ζιγγιβεροειδών, το οποίο

αναμειγνύεται με άλλες φυσικές ενώσεις όπως το υδροξείδιο του ασβεστίου (Ca(OH)_2 , slaked lime) και έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία τραυμάτων, φλεγμονών και καρκινικών όγκων [14].

Ο κουρκουμάς είχε χρησιμοποιηθεί ευρέως και ως φάρμακο στην Κίνα. Η βιοδραστική ένωση του κουρκουμά είναι η κουρκουμίνη. Η κουρκουμίνη εμφανίζει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες [16-21]. Επιπλέον, η κουρκουμίνη προστατεύει από νευρολογικές διαταραχές, αναστέλλει την λιπιδική υπεροξειδάση σε διάφορους ιστούς, ρυθμίζει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων π.χ. καταλάση, και λειτουργεί ως «αναστολέας», (scavenger) για τις ενεργά είδη οξυγόνου (ROS). Είναι επίσης γνωστό ότι χρησιμοποιείται ευρέως η κουρκουμίνη για την αντιμετώπιση ασθενειών που προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες, για την αντιμετώπιση της νόσου του Alzheimer [22], της σκλήρυνσης κατά πλάκας, της νόσου του Parkinson, της επιληψίας και άλλων νευρολογικών διαταραχών που πιθανώς σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες [23].

Επιπλέον, έχουν γίνει αρκετές αναφορές και για την χρήση της κουρκουμίνης στη φωτοδυναμική θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, διότι μπορεί και παράγει το οξυγόνο στην απλή κατάσταση (singlet oxygen) το οποίο οδηγεί στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων [24].

Όπως έγινε φανερό και από τα παραπάνω τόσο η κουρκουμίνη όσο και τα παράγωγά της εμφανίζουν πλήθος βιολογικών δράσεων. Το Σχήμα 9 είναι ενδεικτικό της πληθώρας των βιολογικών δράσεων της κουρκουμίνης [25].

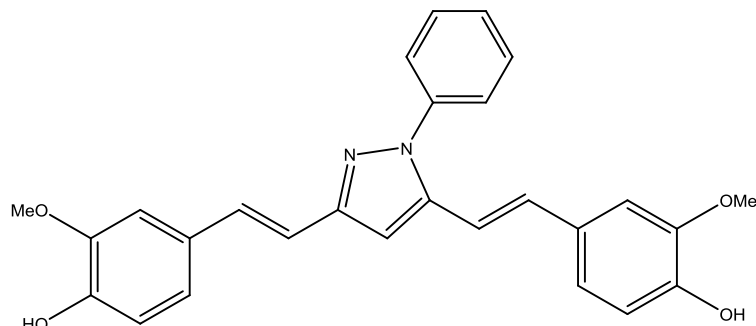


Σχήμα 9: Αποδεδειγμένες βιολογικές δράσεις κουρκουμίνης [25].

Έχει επίσης αναφερθεί ότι έχει την ικανότητα να αναστέλλει την τελομεράση κατά τη μίτωση των καρκινικών κυττάρων ή προκαλεί απόπτωση αυτών [26, 27]. Πολύ ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι η κουρκουμίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως «κοκτέιλ» φαρμάκων μαζί με το αντικαρκινικό φάρμακο doxorubicin, με σκοπό να μειώσει την καρδιακή τοξικότητα της doxorubicin [28, 29]. Επίσης, η κουρκουμίνη έχει βρεθεί να αναστέλλει την έκφραση των p-γλυκοπρωτεϊνών οι οποίες λειτουργούν ως αντλίες για να απομακρύνουν το αντικαρκινικό φάρμακο από την ενδοκυττάρια περιοχή [30, 31].

Σημαντικές βιολογικές δράσεις έχουν βρεθεί και για τα παράγωγα της κουρκουμίνης. Ορισμένα από τα παράγωγα της κουρκουμίνης εμφανίζουν ίδιες, παρόμοιες ή ακόμα και καλύτερες βιολογικές δράσεις σε σχέση με το αρχικό μόριο. Για παράδειγμα, το παράγωγο που φαίνεται στο Σχήμα 10 βρέθηκε να ενισχύει τη μνήμη διότι ενισχύει τη δράση Ca^{2+} /καλμοδουλίνης που είναι εξαρτώμενη με την πρωτεϊνική κινάση II (CaMKII). Η CaMKII παίζει καθοριστικό ρόλο στη μακροχρόνια ενδυνάμωση (LTP) και στη μνήμη. Το παράγωγο της κουρκουμίνης βρέθηκε να ενισχύει και την LTP καθώς και τη μνήμη [22, 32, 33]. Επίσης, ένα πυραζόλο παράγωγο της κουρκουμίνης έχει βρεθεί ότι αποκαθιστά την ομοιόσταση της μεμβράνης μετά από εγκεφαλικό τραύμα [34].

Επιπρόσθετα, τα κουρκουμινοειδή και παράγωγά τους έχουν εμφανίσει σημαντικά αποτελέσματα σε μελέτες με συστήματα της νόσου του Alzheimer, όπου ένας πιθανός μηχανισμός σχετίζεται με την ικανότητα των μορίων αυτών να δεσμεύουν μέταλλα.



Σχήμα 10: Δομή παραγώγου κουρκουμίνης που ενισχύει τη μνήμη.

Τα κουρκουμινοειδή έχουν και αντιοξειδωτική δράση η οποία πιθανών να οφείλεται στην ομάδα του υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο [35]. Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί ότι η απομεθόξυ κουρκουμίνη και η δις-απομεθόξυ κουρκουμίνη (βλ. Σχήμα 2 β, γ) εμφανίζουν αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση [36].

Παράγωγα της κουρκουμίνης όπου η ομάδα της δικετόνης έχει αντικατασταθεί με την ομάδα του ισοξαζολίου ή του πυραζολίου (βλ. Σχήμα 5) βρέθηκαν να μην είναι τόσο δεκτικά στην πυρηνόφιλη προσθήκη προς σχηματισμό απομονώσιμων συζευγμένων προϊόντων, οδηγώντας σε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και σε προ-αποπτωτικά αποτελέσματα σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος HA22T/VGH [37]. Επιπλέον, ανάλογα κουρκουμίνης έχουν εμφανίσει αντιφλεγμονώδη [38], αντιμικροβιακή [39] καθώς και αντιβακτηριακή δράση (παράγωγο κουρκουμίνης με σουλφοναμίδη) [40]. Τέλος, σημαντική βιολογική δράση παρουσιάζει η κουρκουμίνη κατά τη σύμπλεξή της με μέταλλα μεταπτώσεως όπως αντικαταθλιπτική, αντιβακτηριακή, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση [41-44].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

2.1 Γενικά για το ρόλο των μεταλλικών συμπλόκων στην Ιατρική

Η Βιοανόργανη χημεία εξετάζει το ρόλο των μετάλλων στη βιολογία και περιλαμβάνει τη μελέτη των φυσικών φαινομένων όπως π.χ. τη συμπεριφορά των μεταλλοπρωτεϊνών που περιέχουν μέταλλα που δεν είναι ουσιώδη στην ιατρική ή την τοξικολογία. Πολλές βιολογικές διεργασίες όπως η αναπνοή, εξαρτώνται από μόρια που εμπίπτουν στη σφαίρα της ανόργανης χημείας [45]. Η βιοανόργανη χημεία ασχολείται με στοιχεία κύριων ομάδων όπως Na, K, Mg, Ca αλλά και με τα μέταλλα μεταπτώσεως όπως V, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, και Zn. Αυτά τα στοιχεία παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ζωή, διότι συνδέονται με οργανικά μόρια και πρωτεΐνες. Τα μέταλλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Τα βαρέα μέταλλα όπως Hg, Cd, As και Pb συχνά θεωρούνται ως μέρος της βιοανόργανης χημείας και χρησιμοποιούνται στην ιατρική. Επίσης, διαγνωστικοί παράγοντες όπως το Gd στην MRI και σύμπλοκες ενώσεις του ραδιενεργού ^{99m}Tc αποτελούν μέταλλα που χρησιμοποιούνται στην Ιατρική [46]. Η Βιοϊατρική Ανόργανη Χημεία προσφέρει την δυνατότητα σχεδιασμού νέων θεραπευτικών και διαγνωστικών παραγόντων καθώς και την κατανόηση διαφόρων ασθενειών που δεν έχουν διερευνηθεί. Ιατρικές εφαρμογές των μετάλλων έχουν βρεθεί 5000 χρόνια πριν. Η ανάπτυξη της μοντέρνας ανόργανης χημείας, ξεκίνησε από την ανακάλυψη του cisplatin [47].

Ο Erlich εισήγαγε τα μέταλλα στην ιατρική τον 20^ο αιώνα χρησιμοποιώντας ένωση του αρσενικού, τη Salvarsan, για τη θεραπεία της σύφιλης. Ανόργανα φάρμακα, όπως ενώσεις του λευκοχρύσου, του χρυσού, του λιθίου και του βισμούθιου χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου, της αρθρίτιδας, της κατάθλιψης και του έλκους αντίστοιχα και αποτελούν μέρος της μοντέρνας φαρμακοποιίας [48]. Όπως έγινε αντιληπτό και από τα παραπάνω χρησιμοποιούνται ευρέως τα μέταλλα στην Ιατρική. Γενικά, ενώσεις που περιέχουν μεταλλικά ιόντα αποτελούν πολύτιμα εργαλεία στην ιατρική είτε ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες είτε ως διαγνωστικοί παράγοντες.

Για παράδειγμα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σύμπλοκες ενώσεις των μετάλλων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το cis-platin. Την ανακάλυψη του cis-platin έχουν ακολουθήσει

πολλές προσπάθειες για σχεδιασμό νέων αντικαρκινικών μεταλλικών συμπλοκών ώστε να βελτιώσουν την κλινική εικόνα και να μειωθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες. Τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες, ένας μεγάλος αριθμός μεταλλικών συμπλόκων έχουν ερευνηθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και μερικά από αυτά βρίσκονται ήδη σε κλινικές μελέτες. Κάποια από αυτά τα σύμπλοκα είναι του λευκοχρύσου (Pt^{II} και Pt^{IV}), του ρουθηνίου (Ru^{II} (NAMI-A, NKP-1339) και Ru^{III}), του χρυσού (Au^I και Au^{III}) και του τιτανίου(Ti^{IV}) τα οποία είναι τα πιο μελετημένα. Βέβαια, μελέτες έχουν γίνει και με άλλα μέταλλα όπως του ροδίου, ιριδίου, γαλλίου (KP46) και παλλαδίου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι σύμπλοκα διαφόρων μετάλλων παρουσιάζουν και άλλες πολύ ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Συνεπώς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία πληθώρας ασθενειών όπως: την καταπολέμηση χρόνιας ή οξείας φλεγμονής (π.χ. σύμπλοκα του $Cu(II)$ Bis(salicylato)copper(II), ενώσεις του χρυσού (I) $[Au(CN)_2]^-$), τη θεραπεία μολύνσεων (π.χ σύμπλοκα του νικελίου (II), του αργύρου (I), του μολυβδενίου (VI) MoO_3 και του βολφραμίου WO_3), για την απεικόνιση και την διάγνωση (π.χ. Gd^{3+} στην MRI, ενώσεις του ^{99m}Tc ως διαγνωστικός παράγοντας, σύμπλοκα του Ru^{2+} - Os^{2+} που περιέχουν πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες χρησιμοποιούνται για την εκλεκτική κυτταρική πρόσληψη και τη χρώση ειδικής κατηγορίας βιομορίων (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες) καθώς και για πολλές άλλες ασθένειες όπως π.χ. κατάθλιψη (Li_2CO_3), στη φωτοδυναμική θεραπεία (πορφυρινικά σύμπλοκα μετάλλων) κλπ [49].

Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται ταχύτατα η μελέτη τόσο βιοδραστικών μορίων (bio functional molecules) όσο και των συμπλόκων αυτών με μέταλλα μεταπτώσεως. Τα βιοδραστικά μόρια δρουν στοχευμένα και αλληλεπιδρούν με βιομόρια, αναστέλλοντας τις βιοχημικές ή βιοφυσικές διεργασίες που σχετίζονται με τα βιομόρια. Ο στόχος της σύμπλεξης των βιοδραστικών μορίων με τα μέταλλα μεταπτώσεως είναι η βελτίωση της υπάρχουσας βιολογικής δράσης των βιοδραστικών μορίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας ενώσεων αποτελούν τα μεταλλοαντιβιοτικά (Zn^{2+} -Bleomycin, Co^{2+} -bacitracin, Co^{2+} - Streptonigrin) [50]. Παράδειγμα βιοδραστικής ένωσης αποτελεί και η κουρκουμίνη, το παράγωγο της οποίας μελετήθηκε ευρέως στην παρούσα εργασία καθώς και το αντίστοιχο σύμπλοκο με το χαλκό (II).

Τα ανόργανα στοιχεία διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στις βιολογικές και βιοϊατρικές διεργασίες, και είναι η απόδειξη ότι πολλές οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην ιατρική δεν έχουν αμιγώς οργανική λειτουργία δράσης, κάποιες ενεργοποιούνται ή βιομετασχηματίζονται από μεταλλικά ιόντα συμπεριλαμβανομένων των

μεταλλοενζύμων, ενώ άλλες έχουν άμεση ή έμμεση επίδραση στο μεταβολισμό των μεταλλικών ιόντων [51].

Η αλληλεπίδραση του DNA με σύμπλοκα των μετάλλων μεταπτώσεως παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας των ποικίλων εφαρμογών τους στη θεραπεία του καρκίνου και στη μοριακή βιολογία [52].

2.2 Γενικά χαρακτηριστικά του χαλκού (Cu) και των συμπλόκων του

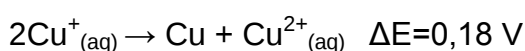
Ο χαλκός είναι ένα από τα στοιχεία μεταπτώσεως, ανήκει στην 4^η περίοδο του Περιοδικού Πίνακα και στην 11^η ομάδα. Η ηλεκτρονιακή του δομή είναι: [Ar]3d¹⁰4s¹. Ο χαλκός επειδή ως μέταλλο είναι χημικώς αδρανές για αυτό βρίσκεται στη φύση ως αυτοφυές [53]. Ο χαλκός παίζει καθοριστικό ρόλο σε όλους τους ζώντες οργανισμούς ως ιχνοστοιχείο γιατί αποτελεί το βασικό συστατικό του ενζύμου της οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Μερικά χαρακτηριστικά του χαλκού συνοψίζονται στον Πίνακα 2 [54].

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά του χαλκού.

Ιδιότητα		Cu
Ατομικός Αριθμός		29
Αριθμός Φυσικών Ισοτόπων		2
Ατομικό βάρος		63,546(3)
Ηλεκτρονιακή Απεικόνιση		[Ar]3d ¹⁰ 4s ¹
Ηλεκτραρνητικότητα		1,9
Ατομική ακτίνα (ppm)		128
Οξειδωτικές Καταστάσεις		+1, +2, +3, +4
Ενέργεια Ιοντισμού (kJ/mol)	1^η	745,3
Ενέργεια Ιοντισμού (kJ/mol)	2^η	1957,3
Ενέργεια Ιοντισμού (kJ/mol)	3^η	3577,6
Σημείο Τήξης (°C)		1083
Σημείο Βρασμού(°C)		2570
Ενθαλπία Τήξης (ΔH_{fus} (kJ/mol))		13,0
Ενθαλπία εξάτμισης (ΔH_{vap}(kJ/mol))		307(±6)
Ενθαλπία μονοατομικού μορίου (ΔH_{monoatomicgas}(kJ/mol))		337(±6)
Πυκνότητα (20°C) (g/cm³)		8,95
Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (20°C) (μohmcm)		1,673

Ο χαλκός είναι ευρέως διαδεδομένος στη φύση ως μέταλλο, στα σουλφίδια, στα χλωρίδια κ.τ.λ.

Οι συνήθεις οξειδωτικές καταστάσεις του χαλκού είναι η +2 και η +1. Ο Cu(I) έχει δομή d^{10} και ο Cu(II) d^9 . Στην πρώτη δηλαδή περίπτωση τα d τροχιακά είναι πλήρως κατειλημμένα και συνεπώς ο Cu(I) είναι διαμαγνητικός, και επειδή δεν υπάρχει δυνατότητα d-d μετάπτωσης, είναι άχρωμος. Αντίθετα, ο Cu(II) έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο είναι δηλαδή διαμαγνητικός, και επειδή σε αυτήν την περίπτωση υπάρχει δυνατότητα d-d μεταπτώσεων, τα χρώματα των ενώσεων του χαλκού είναι κυανό ή πράσινο ανάλογα με την ένωση. Το ιόν $Cu^+_{(aq)}$ είναι ασταθές και πολύ γρήγορα αυτοοξειδοανάγεται:



Όμως έχουν βρεθεί και αρκετά σύμπλοκα του Cu(I) που είναι σταθερά.

Το ιόν του Cu(II) έχει κυανό χρώμα και είναι πολύ πιο σταθερό από το Cu(I) διότι λόγω των δυο θετικών φορτίων έχει αυξημένη ενέργεια υδάτωσης [53]. Οι οξειδωτικές καταστάσεις του χαλκού και η στοιχειομετρία των πιθανών του συμπλόκων συνοψίζονται στον Πίνακα 3 [55].

Πίνακας 3: Οξειδωτικές καταστάσεις και στοιχειομετρία του χαλκού.

Οξειδωτική κατάσταση	Αριθμός ένταξης	Γεωμετρία	Παραδείγματα
$\text{Cu}^{\text{I}}, d^{10}$	2	Γραμμική	Cu_2O , KCuO , CuCl_2^-
	3	Επίπεδη	$\text{K}[\text{Cu}(\text{CN})_2]$
	4 ^a	Τετραεδρική	CuI , $[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{3-}$
	4	Επίπεδη παραμορφωμένη	CuL^c
	5	sp	$[\text{CuLCO}]^c$
$\text{Cu}^{\text{II}}, d^9$	3	Επίπεδη Τριγωνική	$\text{Cu}_2(\mu\text{-Br})_2\text{Br}_2$
	4 ^{a,b}	Τετραεδρική (Παραμορφωμένη)	$\text{Cs}_2[\text{CuCl}_4]$
	4 ^{a,b}	Τετραγωνική	CuO , $[\text{Cu}(\text{py})_4]^{2+}$
	6 ^{a,b}	Παραμορφωμένη Οκταεδρική	$\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2^d$, CuCl_2
	5	tbp	$[\text{Cu}(\text{bipy})_2\text{I}]^+$, $[\text{CuCl}_5]^{2-}$
	5	sp	$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_5]^{2+e}$
	6	Οκταεδρική	$\text{K}_2\text{Pb}[\text{Cu}(\text{NO}_2)_6]$
	7	Πενταγωνική διπυραμίδα	$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{dps})]^{2+f}$
	8	Παραμορφωμένο δωδεκάεδρο	$\text{Ca}[\text{Cu}(\text{CO}_2\text{Me})_4] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
$\text{Cu}^{\text{III}}, d^8$	4	Τετραγωνική	KCu_2O
	6	Οκταεδρική	K_3CuF_6

^a Η πιο συνηθισμένη οξειδωτική κατάσταση. ^b Αυτές οι 3 περιπτώσεις δεν διακρίνονται συχνά.

^c L= ένας μακροκυκλικός ανιοντικός υποκαταστάτης N4, ^d [78]

^e Σε $\text{K}[\text{Cu}(\text{NH}_3)_5](\text{PF}_6)_3$, ^f dps = 2,6-διακετυλοπυριδίνη-δισ(σεμικαρβαζόνης).

2.3 Τα σύμπλοκα του χαλκού και οι βιολογικές τους δράσεις

Τα σύμπλοκα του χαλκού έχουν αποδεδειγμένες ευεργετικές βιολογικές δράσεις για τους οργανισμούς [55].

Ο χαλκός είναι το τρίτο στοιχείο σε αφθονία στο ανθρώπινο σώμα, μετά από τον ψευδάργυρο και το σίδηρο. Παίζει σημαντικό ρόλο για τη δράση πολλών ενζύμων που καταλύουν πολλές σημαντικές αντιδράσεις. Συνήθως τα ενεργά κέντρα των ενζύμων περιέχουν χαλκό (II) αλλά έχουν γίνει αναφορές ότι περιέχεται και ο χαλκός (I) [55].

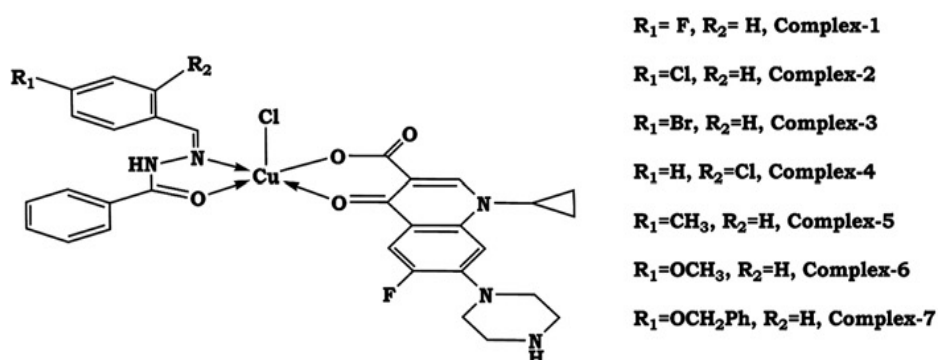
Επιπλέον, τα σύμπλοκα του $\text{Cu}(\text{II})$ έχουν έντονα μελετηθεί σε σχέση με τις ενδιαφέρουσες βιολογικές τους δράσεις σε μοντέλα διαφόρων ασθενειών.

Έχει βρεθεί ότι σύμπλοκο του χαλκού (II) με το μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (NSAID), diclofenac, εμφανίζει υψηλή δραστηριότητα έναντι καρκινικών

κυτταρικών σειρών. Το diclofenac δεν εμφάνισε κυτταροτοξικότητα σε καρκινικές σειρές ενώ το σύμπλοκο με το χαλκό ($[\text{Cu}(\text{diclofenac})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) εμφάνισε υψηλή κυτταροτοξικότητα *in vitro* σε κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος, SW620 και HT29 [56].

Επιπλέον, ο χαλκός (II) έχει εμπλακεί σε μελέτες που στοχεύουν στην ανάδειξη πιθανών θεραπειών της ασθένειας του Parkinson διότι έχει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την N-τελική περιοχή της αλφα-συνουκλείνης που σχετίζεται με το νευροεκφυλισμό του Parkinson, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέταλλα τα οποία εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια για την εν λόγω περιοχή [57].

Επιπροσθέτως, σύμπλοκα του χαλκού (II) έχουν αντιβακτηριακή δράση, όπως για παράδειγμα τα σύμπλοκα αυτά με το φθοροκινολονο- αντιβακτηριακό φάρμακο (ciprofloxacin) και ένα ετεροκυκλικό υποκαταστάτη με άτομο δότη άζωτο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το σύμπλοκο έχει πολύ καλύτερη αντιβακτηριακή δράση από το αρχικό αντιβακτηριακό φάρμακο [58]. Αντιβακτηριδιακή δράση έναντι των Gram-θετικών (*Staphylococcus aureus*) και Gram-αρνητικών βακτηρίων, καθώς και άλλων βακτηρίων έχει εμφανίσει και το σύμπλοκο του χαλκού (II) με υποκαταστάτη 1,10-φαινανονθρολίνη (A) και το 1S, 2S ή 1R, 2R- διαμμινοκυκλοεξάνιο (B) σχηματίζοντας σύμπλοκο τύπου $[\text{M}(\text{A})(\text{B})]^{2+}$ [59]. Επίσης, σύμπλοκο του χαλκού(II) με τη ciprofloxacin και βάσεις Schiff με άτομα δότες άζωτο και οξυγόνο έχουν αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή δράση (βλ. Σχήμα 11) [60]. Βέβαια, αντιβακτηριακή δράση έχουν εμφανίσει και άλλα σύμπλοκα του χαλκού (II) [61-63].



Σχήμα 11: Δομή συμπλόκου του Cu (II) με τη ciprofloxacin.

Σύμπλοκα του χαλκού (II) με ποικίλους υποκαταστάτες έχουν παρουσιάσει και πολύ ενδιαφέρουσα αντιοξειδωτική [64], αντιμυκητιακή και αντικαρκινική δράση, όπως για παράδειγμα σύμπλοκα του χαλκού με υποκαταστάτη ετεροκυκλικές θειοσεμικαρβαζόνες ή βάσεις Schiff [65-68]. Γίνεται φανερό και από τα παραπάνω, μελέτες για τη βιολογική δράση συμπλόκων του χαλκού (II) έχουν γίνει και με υποκαταστάτες κάποια προϋπάρχοντα φάρμακα για τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους ή ακόμα και την εμφάνιση νέων βιολογικών δράσεων, αλλά και με νέους υποκαταστάτες που έχουν εμφανίσει κάποια βιολογική δράση ή όχι, μελετώντας και σε αυτήν την περίπτωση τις νέες ενδιαφέρουσες δράσεις. Βέβαια, πολύ σημαντικές και υποσχόμενες βιολογικές δράσεις έχουν βρεθεί και μελετηθεί κατά τη σύμπλεξη του χαλκού (II) με την κουρκουμίνη. Το σύμπλοκο του χαλκού (II) με την κουρκουμίνη έχει εμφανίσει αντιμικροβιακή δράση. Μελέτες που έγιναν για την αντιμικροβιακή δράση τόσο του υποκαταστάτη όσο και του συμπλόκου έδειξαν ότι καλύτερη δράση έναντι των βακτηρίων και των μυκήτων εμφανίζει το σύμπλοκο [69]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι σύμπλοκο του χαλκού (II) με την κουρκουμίνη μπορεί και λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό. Αυτό επιτυγχάνεται γιατί το σύμπλοκο δρα ως «αναστολέας» (scavenger) των ελεύθερων ριζών [70,71]. Την ίδια αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει το σύμπλοκο του χαλκού (II) είτε έχει στοιχειομετρία 1:1 είτε 1:2 (Cu:κουρκουμίνη). Ωστόσο, η μελέτη της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) με τη δοκιμασία της ξανθίνης και της οξειδάσης της ξανθίνης έδειξε ότι το σύμπλοκο 1:1 είναι 10 φορές πιο αποτελεσματικό στη μίμηση της SOD από ότι το σύμπλοκο 1:2, καθώς επίσης και πιο αποτελεσματικό στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδάσης στα λιποσώματα. Όμως, και στα δυο σύμπλοκα η ταχύτητα μεταφοράς ηλεκτρονίου και ατόμου του υδρογόνου μέσω ριζών, καθώς και η παραγωγή φαινοξυλικών ριζών ήταν όμοια με την κουρκουμίνη [71]. Άλλη μια από τις ασθένειες που μελετάται σε σχέση με τη βιολογική δράση των συμπλόκων της κουρκουμίνης με χαλκό (II) είναι η νόσος του Alzheimer. Η κουρκουμίνη εμφανίζει θεραπευτικές ιδιότητες για το Alzheimer εξαιτίας της υψηλής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας καθώς και λόγω της σύμπλεξής της με τα στοιχεία μεταπτώσεως. Η χαμηλή δοσολογία της κουρκουμίνης ήταν ασφαλής για την αντιμετώπιση αυτής της νόσου και λειτουργούσε συνεργιστικά με το χαλκό με αποτέλεσμα την καλύτερη καταστροφή των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Σε υψηλή δοσολογία, ωστόσο, η κουρκουμίνη μπορεί να διευκολύνει το χαλκό (II) να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες και να επιδεινώσει τη νευρική δυσλειτουργία. Συνεπώς, θα πρέπει να λαμβάνεται πολύ σοβαρά υπόψη.

Επίσης, το σύμπλοκο του χαλκού (II) με την κουρκουμίνη έχει εμφανίσει σημαντική αντικαρκινική δράση [72, 73]. Κυτταροτοξικές μελέτες φανερώνουν ότι το IC₅₀ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, HeLa και MCF-7, που προέκυψε από την δοκιμασία MTT ήταν αρκετά μικρότερες όταν το σύμπλοκο ακτινοβολήθηκε [73].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΩΝ

3.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια τεχνική που ανιχνεύει τον προσανατολισμό των πυρηνικών spin σε ένα μαγνητικό πεδίο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της τρισδιάστατης δομής ενός μορίου. Μπορεί να εφαρμοστεί σε συγκεκριμένους πυρήνες, του υδρογόνου, ^1H , του άνθρακα ^{13}C , του αζώτου ^{15}N , του φθορίου ^{19}F και του φωσφόρου ^{31}P . Η θεωρία για το NMR είναι παρόμοια με το EPR, αλλά η εγκατάσταση είναι πολύ διαφορετική για τεχνικούς λόγους. Το NMR βασίζεται σε μια διαδικασία «χαλάρωσης» (relaxation) όπου η ακτινοβολία ραδιοσυχνότητας διεγείρει το μόριο σε μια διεγερμένη κατάσταση και αυτό το οποίο μετράται είναι η επιστροφή (η «χαλάρωση») του μορίου στη θεμελιώδη κατάσταση. Το παροδικό σήμα υπεισέρχεται ένα μετασχηματισμό Fourier για να δώσει τελικά το φάσμα NMR. Από τα πειράματα NMR μπορούν να προσδιοριστούν τέσσερις παράμετροι: η χημική μετατόπιση (δ), η ένταση των κορυφών (I), οι χρόνοι χαλάρωσης και η σταθερά σύζευξης. Τα σύγχρονα όργανα NMR μπορούν να αποδώσουν το συντονισμό σε πολλά πρωτόνια ακόμα και σε αρκετά μεγάλα μόρια όχι μόνο επειδή οι μαγνήτες μπορούν και παράγουν πολύ υψηλά πεδία (μέχρι και 900 mHz) αλλά και εξαιτίας της ανάπτυξης των πολυδιάστατων τεχνικών NMR. Το φάσμα NMR δυο διαστάσεων, ή φάσμα ομοπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^1H COSY (correlation spectroscopy, COSY) και το φάσμα NOESY, βοηθούν στον προσδιορισμό των «γειτονικών» ατόμων. Αυτό γίνεται διότι με το COSY μελετώνται τα πρωτόνια που βρίσκονται σε γειτονικά άτομα ενώ με το φάσμα NOESY μπορούν να ανιχνευθούν δυο πρωτόνια που βρίσκονται σε απόσταση περίπου 0,5 nm το ένα με το άλλο, επειδή το ένα επηρεάζει το spin του άλλου [74]. Βέβαια, υπάρχουν και άλλες κατηγορίες φασμάτων NMR όπως ετεροπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) που συσχετίζει τα πρωτόνια με τους άνθρακες που παρουσιάζουν σύζευξη κατά μήκος ενός απλού δεσμού. Το HSQC είναι ιδανικό για την μελέτη ενώσεων που δίνουν πολύπλοκα φάσματα, με κορυφές πολύ κοντά η μία στην άλλη. Επίσης, το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) συσχετίζει τα πρωτόνια με τους άνθρακες που παρουσιάζουν σύζευξη κατά μήκος δύο ή τριών χημικών δεσμών.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φάσματα $^1\text{H-NMR}$, 2D-NMR και $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$.

3.2 Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance)

Με τη φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance (EPR) ή Electron Spin Resonance (ESR)) μελετώνται ενώσεις που περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, όπως παραμαγνητικά σύμπλοκα ή ελεύθερες ρίζες. Το EPR αποτελεί μια πολύ χρήσιμη τεχνική που βοηθάει στον προσδιορισμό της δομής των ενώσεων. Για να παρατηρηθεί φάσμα EPR μιας ένωσης, η ύπαρξη ασύζευκτων ηλεκτρονίων αποτελεί αναγκαία συνθήκη αλλά όχι και ικανή. Για τις ενώσεις των στοιχείων μεταπτώσεως συχνά συμβαίνει αυτό, λόγω της αλληλεπίδρασης των spin της παραμαγνητικής ένωσης. Για να εμφανιστεί όμως και σε αυτήν την περίπτωση φάσμα EPR θα πρέπει να μειωθούν οι αλληλεπιδράσεις αυτές μεταξύ των spin, και αυτό επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση της παραμαγνητικής ένωσης σε έναν κρύσταλλο διαμαγνητικού υλικού της ίδιας δομής σε μικρή συγκέντρωση. Η παρατήρηση του φάσματος EPR γίνεται συχνά σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες π.χ. θερμοκρασία υγρού αζώτου ή υγρού ηλίου. Η παρουσίαση των φασμάτων EPR γίνεται με καταγραφή της εντάσεως απορροφήσεως ως συνάρτηση του μαγνητικού πεδίου, αλλά πολλές φορές και με την πρώτη παράγωγο της καμπύλης αυτής [75, 76].

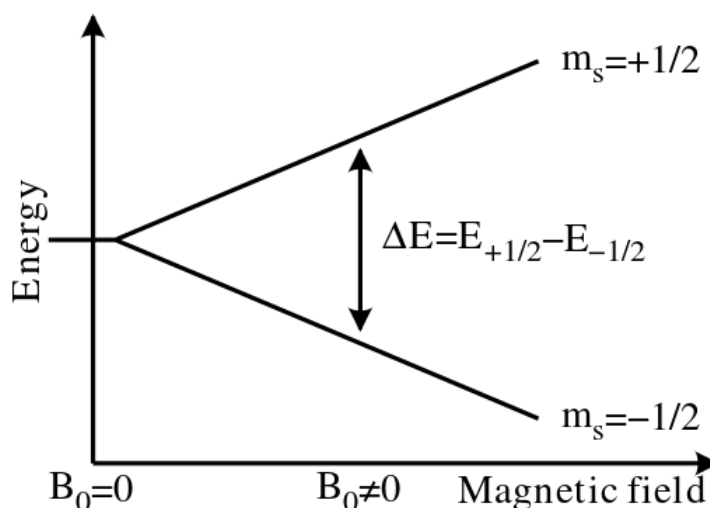
Οι ενεργειακές διαφορές που εξετάζονται με το EPR είναι αυτές κυρίως που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση των ασύζευκτων ηλεκτρονίων του δείγματος με ένα στατικό μαγνητικό πεδίο B_0 που παράγεται από έναν ηλεκτρομαγνήτη ή έναν υπεραγώγιμο μαγνήτη. Τυπικές τιμές του B_0 στο EPR είναι μεταξύ 0,1 T και 5 T (φαινόμενο Zeeman). Η μαγνητική ροπή του ηλεκτρονίου κβαντίζεται και μπορεί να πάρει διακριτές τιμές παρουσία μαγνητικού πεδίου B_0 . Η ενεργειακή διαφορά αυτών των καταστάσεων είναι ανάλογη του B_0 . Η ενέργεια μεταξύ αυτών των καταστάσεων δίνεται για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο από τη σχέση $\Delta E = h\nu = g_e\beta_e B_0$, όπου $\beta_e = 9,27402 \cdot 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$, η μαγνητόνη του Bohr και $g_e = 2,00232$ (παράγοντας χωρίς διαστάσεις για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο). Ο g είναι ένας αναλογικός παράγοντας – συχνά εξαρτώμενος από το προσανατολισμό του μορίου – που σχετίζεται με την ηλεκτρονική απεικόνιση του ιόντος ή της ρίζας που εξετάζεται. Η τιμή του παράγοντα g αποτελεί μία από τις κυριότερες πληροφορίες του EPR. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του ασυζεύκτου

ηλεκτρονίου και πυρηνικών spin ονομάζεται υπέρλεπτη σύζευξη, (hyperfine coupling), και εξαρτάται επίσης από τον προσανατολισμό. Αυτή είναι η δεύτερη κύρια πληροφορία που προκύπτει από ένα πείραμα EPR. Προσφέρει πληροφορία για την ηλεκτρονική πυκνότητα των πυρήνων, τον αριθμό των ισοδυνάμων πυρήνων που συζεύγνυται με το ηλεκτρόνιο και την υπέρ- υπέρλεπτη υφή (αλληλεπίδραση spin του παραμαγνητικού κέντρου με το πυρηνικό spin των γειτονικών πυρήνων) [75, 76]. Επιπλέον αλληλεπιδράσεις που επηρεάζουν το φάσμα EPR είναι ο διαχωρισμός μηδενικού πεδίου (zero-field splitting) για συστήματα με $S > 1/2$, η τετραπολική πυρηνική αλληλεπίδραση (nuclear quadrupole interaction) εξαιτίας μιας τετραπολικής ροπής για πυρήνα με $I > 1/2$, και η πυρηνική αλληλεπίδραση Zeeman (nuclear Zeeman interaction).

Οι ενέργειες των δύο καταστάσεων του spin χαρακτηρίζονται από τους κβαντικούς αριθμούς του spin $m_S = \pm 1/2$,

$$E(m_S) = g_e \cdot B_0 \cdot m_S$$

Ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο ενεργειακών καταστάσεων ονομάζεται ηλεκτρονική αλληλεπίδραση Zeeman (electron Zeeman interaction, EZI) και είναι ανάλογη του μεγέθους του B_0 , (βλ. Σχήμα 12). Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο καταστάσεων Zeeman δίνονται από τη σχέση $\Delta E = E(m_S = +1/2) - E(m_S = -1/2) = g_e \beta_e B_0 / h$ (σε Hz).



Σχήμα 12: Φαινόμενο Zeeman για ένα σύστημα με $S = 1/2$ σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 .

Η σύζευξη μεταξύ του ηλεκτρονικού και πυρηνικού spin οδηγεί σε διάσχιση κάθε ηλεκτρονικής κατάστασης spin. Η ακτινοβολήση με μικροκύματα έχει ως αποτέλεσμα τις

μεταπτώσεις μεταξύ των σταθμών με βάση τους εξής κανόνες επιλογής: $\Delta m_s = \pm 1$ και $\Delta m_l = 0$.

3.3 Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Η φασματοσκοπία UV-Vis χρησιμοποιεί φως στην περιοχή του ορατού και στις κοντινές περιοχές (near-UV και near-IR). Η απορρόφηση στην ορατή περιοχή σχετίζεται με το χρώμα των μορίων. Η απορρόφηση αφορά τις μεταπτώσεις από τη θεμελιώδη στη διεγερμένη κατάσταση [77]. Οι μεταπτώσεις μεταξύ διαφόρων ενεργειακών καταστάσεων είναι αποτέλεσμα απορρόφησης ενέργειας στην υπεριώδη, ορατή, και για πολλά σύμπλοκα των μετάλλων μεταπτώσεως, στη near-υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Μόρια που περιέχουν π-ηλεκτρόνια ή μη-δεσμικά ηλεκτρόνια απορροφούν ενέργεια στην περιοχή του υπεριώδους ή του ορατού φωτός για να διεγείρουν αυτά τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερα αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά. Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι, που ανιχνεύουν τις ηλεκτρονικές μεταπτώσεις μπορούν να παρέχουν λεπτομερείς πληροφορίες για τις ηλεκτρονικές και μαγνητικές ιδιότητες τόσο του μεταλλικού ιόντος όσο και των υποκαταστατών [77].

Οι εφαρμογές της φασματοσκοπίας UV-Vis είναι πολλές και διακρίνονται σε: αναλυτικές και δομικές. Οι αναλυτικές εφαρμογές περιλαμβάνουν: τους φωτομετρικούς ποσοτικούς προσδιορισμούς, τον προσδιορισμό του πλήθους των συστατικών-απορροφητών σε συστήματα με πολλά συστατικά, τον προσδιορισμό των σταθερών ισορροπίας συστημάτων με πολλά συστατικά και τις φωτομετρικές κινητικές μελέτες. Οι δομικές εφαρμογές περιλαμβάνουν: τον προσδιορισμό στοιχείων της δομής των απορροφητών και την ερμηνεία φασμάτων. Για παράδειγμα, η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους βοηθάει πάρα πολύ για τον προσδιορισμό της δομής των μεταλλικών συμπλόκων. Με τη μέθοδο UV-Vis μπορούν να προσδιοριστούν τα ακόλουθα: με ποιο/α άτομο/α συμπλέκεται το μέταλλο μελετώντας τις κορυφές που μετατοπίζονται κατά τη σύμπλεξη και την ένταση των κορυφών, τη στοιχειομετρία του συμπλόκου εφαρμόζοντας τη μέθοδο συνεχών μεταβολών, JOB, τη σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου, την εξαγωγή θερμοδυναμικών μεγεθών καθώς επίσης μπορούμε να πάρουμε πολύ σημαντικές πληροφορίες για την αλληλεπίδραση των μεταλλικών συμπλόκων με το DNA (τιτλοδότηση, καμπύλες θερμικής μετουσίωσης).

3.4 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Infrared Spectroscopy) δίνει πληροφορίες για τις μοριακές ταλαντώσεις που συμβαίνουν σε ένα μόριο. Η ενέργεια της ακτινοβολίας IR δεν είναι κατάλληλη για να προκαλέσει διέγερση ηλεκτρονίων, όπως στο UV. Είναι όμως κατάλληλη για να ανιχνεύσει δονήσεις δεσμών. Στα πολυατομικά μόρια τα άτομα κινούνται γύρω από τη θέση ισορροπίας τους είτε μέσω δονήσεων τάσης (συμμετρική, ασύμμετρη) είτε μέσω δονήσεων κάμψης (επί του επιπέδου, εκτός επιπέδου). Καταγραφή των διερχομένων ακτινοβολιών σχηματίζει το φάσμα απορρόφησης. Η ένταση μιας ταινίας IR εξαρτάται από τον τύπο της δόνησης και από τη διαφορά ηλεκτραρνητικότητας μεταξύ των ατόμων που συμμετέχουν στο δεσμό. Οι περισσότερες πληροφορίες μπορούν να διεξαχθούν από την περιοχή $1.400-4.000\text{ cm}^{-1}$ σ' ένα φάσμα IR. Από ένα φάσμα IR μπορούν αν ληφθούν πληροφορίες για τις λειτουργικές ομάδες μιας ένωσης με τελικό στόχο τον προσδιορισμό της δομής της.

3.5 Φθορισμομετρία (Fluorescence)

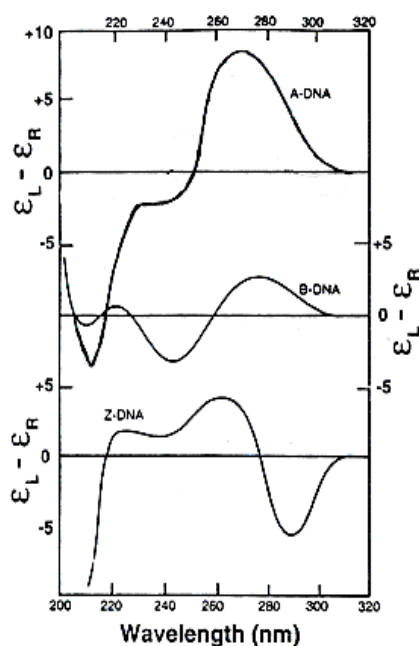
Ο φθορισμός και ο φωσφορισμός αποτελούν ειδικές κατηγορίες της φωταύγειας. Κατά τη διέγερση απορροφάται ένα φωτόνιο, και τα απορροφούμενα είδη μεταπίπτουν σε μια ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση. Η εκπομπή των φωτονίων συνοδεύει την αποδιέγερση και καλείται φωτοφωταύγεια (φθορισμός, φωσφορισμός), και αποτελεί το πιο πιθανό φυσικό φαινόμενο κατά την αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη. Ο φθορισμός συμβαίνει όταν η μετάπτωση στη θεμελιώδη κατάσταση πραγματοποιείται από διεγερμένη απλή κατάσταση ενώ όταν η αποδιέγερση πραγματοποιείται από διεγερμένη τριπλή κατάσταση συμβαίνει φωσφορισμός. Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος φθορισμού λαμβάνεται το φάσμα διέγερσης (excitation) και το φάσμα εκπομπής (emission) [78]. Με τη βοήθεια φασμάτων φθορισμού μπορεί να προσδιορισθεί για παράδειγμα, η σταθερά σπόσβεσης Stern-Volmer (K_{sv}), να προσδιορισθεί πώς επιδρά το μέταλλο στο φθορισμό του υποκαταστάτη (π.χ. μείωση του φθορισμού του υποκαταστάτη κατά τη σύμπλεξη με το μέταλλο, quenching), να προσδιορισθεί η σταθερά σχηματισμού συμπλόκων και η σταθερά σύνδεσης μικρών μορίων με το DNA, καθώς επίσης αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την εξαγωγή πληροφοριών για τον τρόπο αλληλεπίδρασης μεταλλικών συμπλόκων με το DNA.

3.6 Κυκλική Βολταμμετρία (Cyclic Voltammetry, CV)

Κατά την κυκλική βολταμμετρία πραγματοποιείται γραμμική σάρωση του δυναμικού εργασίας ως προς το χρόνο και ύστερα από κάποια τιμή δυναμικού που έχουμε θέσει γίνεται αναστροφή της σάρωσης. Το βολταμογράφημα αποτελεί τη γραφική παράσταση του ρεύματος (i) στο ηλεκτρόδιο εργασίας συναρτήσει του εφαρμοζόμενου δυναμικού (E), $i=f(E)$. Η μεταφορά μάζας γίνεται μόνο λόγω διάχυσης [79]. Από ένα κυκλικό βολταμογράφημα μπορούμε να συμπεράνουμε το μηχανισμό μιας αντίδρασης, αν το φαινόμενο της οξειδωσης ή αναγωγής μιας χημικής ένωσης είναι αντιστρεπτό ή όχι, να προσδιορίσουμε τον αριθμό οξειδωσης για παράδειγμα του μετάλλου σε ένα σύμπλοκο κλπ.

3.7 Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD)

Τα χειρόμορφα μόρια μπορούν να διαχωρίσουν το δεξιόστροφο από το αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως. Η διαφορετική απορρόφηση του αριστερόστροφου και του δεξιόστροφου πολωμένου φωτός (λόγω διαφορετικού συντελεστή απόσβεσης) καλείται κυκλικός διχρωϊσμός [74]. Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη μελέτη αλληλεπίδρασης του DNA τόσο με τον υποκαταστάτη όσο και με το σύμπλοκο. Οι πουρινικές και οι πυριμιδινικές βάσεις στα νουκλεϊνικά οξέα είναι υπεύθυνες για τα φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους καθώς επίσης και για το διχρωϊκό σήμα. Η οπτική τους ενεργότητα οφείλεται στο σάκχαρο που βρίσκεται στο C1' της δεοξυριβόζης. Οι ταινίες του φάσματος CD είναι είτε θετικές είτε αρνητικές [80, 81]. Το στοίβαγμα των αρωματικών βάσεων επηρεάζει άμεσα τη μορφή των φασμάτων CD. Λόγω των υδρόφιλων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στο μόριο του DNA καθώς και λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βάσεων μέσω των π-ηλεκτρονίων το μόριο του DNA υιοθετεί ελικοειδή δομή. Οι ηλεκτρονικές μεταπτώσεις των βάσεων (χρωμοφώρων) μπορούν και αλληλεπιδρούν δίνοντας έτσι ισχυρά διχρωϊκά σήματα. Ανάλογα με τη διαμόρφωση του DNA (A-, B-, ή Z-) λαμβάνεται και διαφορετικό φάσμα CD, όπως αυτό γίνεται αντιληπτό και στο Σχήμα 13.



Διαμόρφωση DNA	Μήκος κύματος ταινιών (nm)
A-	180, 186, 210, 270, 300 (μηδέν)
B-	180, 186, 245, 258 (μηδέν), 275
Z-	184 (μηδέν), 190-195, 260, 290

Σχήμα 13: Φάσματα CD για τις πιθανές διαμορφώσεις του DNA. Δεξιά εμφανίζεται πίνακας με τα μήκη κύματος των εμφανιζόμενων ταινιών.

Συνεπώς, από το φάσμα CD μπορεί να γίνει και διαχωρισμός των διαφορετικών διαμορφώσεων του DNA. Η σχεδόν ανάστροφη μορφή του φάσματος Z-DNA σε σχέση με το φάσμα για το B-DNA αποτέλεσαν την πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη της αριστερόστροφης έλικας [82, 83].

Βέβαια, η μόνη περίπτωση όπου μπορεί να εμφανίσει διχρωϊκό σήμα ένα μόριο το οποίο δεν είναι χειρόμορφο είναι όταν συνδεθεί με ένα χειρόμορφο μόριο (οπτικά ενεργό), λόγω του φαινομένου εξ' επαγωγής κυκλικού διχρωϊσμού (Induced Circular Dichroism, ICD) [80, 84]. Σε αυτό το φαινόμενο στηριχθήκαμε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του υποκαταστάτη και του συμπλόκου (μη χειρόμορφα μόρια) με το DNA (χειρόμορφο μόριο).

3.8 Ιξωδομετρία (Viscosimetry)

Η ιξωδομετρία είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των νουκλεϊνικών οξέων, τη μελέτη των επιδράσεων των διαλυτών στη μεγάλου μήκους δομή και διαμόρφωσή τους καθώς και στην ακαμψία τους [80, 85-92]. Η ιξωδομετρία αποτελεί βασικό εργαλείο για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του DNA με μικρά μόρια (αύξηση ιξώδους είναι ενδεικτικό για παρεμβολή του μορίου μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA, μείωση ιξώδους είναι ενδεικτικό για δέσμευση μορίων

στις αύλακες του DNA κοκ). Το σχετικό ιξώδες των νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$\eta = \frac{t - t_0}{t_0}$$

όπου t ο χρόνος (sec) ροής του κάθε διαλύματος και t_0 ο χρόνος του διαλύτη. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων γίνονται τρεις διαφορετικές μετρήσεις, οι οποίες δεν διαφέρουν περισσότερο από 0,3 sec και τελικός χρόνος λαμβάνεται ο μέσος όρος.

Η αύξηση του μήκους της έλικας του DNA υπολογίζεται από τα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με την προσεγγιστική σχέση:

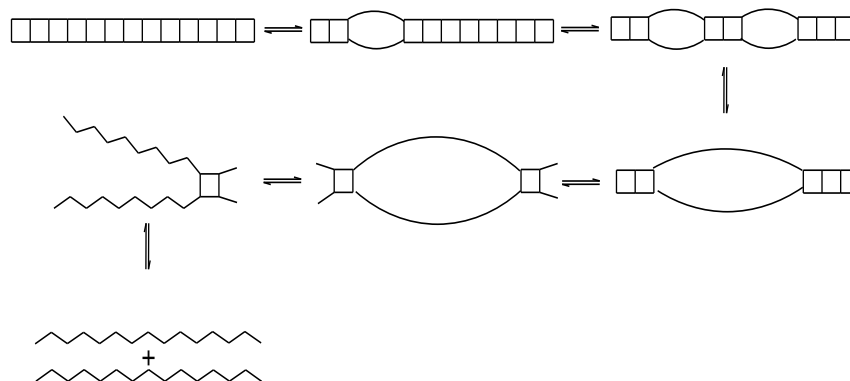
$$\left(\frac{L}{L_0} \right) = \left(\frac{\eta}{\eta_0} \right)^{1/3} = \frac{(t - t_0)^{1/3}}{(t_{DNA} - t_0)^{1/3}}$$

όπου L , L_0 το περιμετρικό μήκος του ραβδόμορφου DNA, παρουσία και απουσία του φαρμάκου αντίστοιχα, η , η_0 τα εσωτερικά ιξώδη (για τις πολύ αραιές συγκεντρώσεις του πειράματος κατά προσέγγιση ίσα με τα ανηγμένα ιξώδη) παρουσία και απουσία του φαρμάκου αντίστοιχα, t , t_{DNA} και t_0 είναι οι χρόνοι ροής των διαλυμάτων DNA παρουσία του φαρμάκου, του διαλύματος DNA απουσία φαρμάκου και του διαλύτη (ρυθμιστικό διάλυμα) αντίστοιχα. Η B- μορφή του DNA υιοθετεί τη δομή μιας σχετικά δεξιόστροφης έλικας διαμέτρου 23,7Å και συνεπώς μακροσκοπικά μπορεί να θεωρηθεί ως ράβδος.

3.9 Προσδιορισμός σημείου τήξεως (T_m)

Ο προσδιορισμός σημείου τήξεως είναι μια επιπλέον βοηθητική μέθοδος για τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης του DNA με μικρά μόρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα μόνο από μια μέθοδο για αυτό το λόγο είναι απαραίτητο να εφαρμοστούν πολλές μέθοδοι για ένα ασφαλές συμπέρασμα. Ως σημείο τήξης ή θερμοκρασία τήξης (T_m) του DNA ορίζεται η θερμοκρασία εκείνη κατά την οποία έχει καταστραφεί το ήμισυ της ελικοειδούς δομής. Η μελέτη της τήξης του DNA γίνεται μετρώντας την απορρόφηση στα 260 nm αυξανόμενης της θερμοκρασίας. Η καμπύλη της απορρόφησης συναρτήσει της θερμοκρασίας καλείται καμπύλη τήξης και είναι σιγμοειδής [80, 93]. Μεγαλύτερο T_m έχουν οι δίκλωνες αλυσίδες με περισσότερα ζεύγη βάσεων G-C αντί για A-T, διότι τα ζεύγη βάσεων G-C συνδέονται με τρεις δεσμούς υδρογόνου αντί για δυο στα ζεύγη βάσεων A-T. Ένα μόριο DNA μπορεί να αρχίσει να

τήκεται είτε από το άκρο είτε από το μέσο της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Πρώτα αρχίζουν να τήκονται οι περιοχές που είναι πλούσιες σε A-T [94]. Σχηματικά, μια τυπική πορεία τήξης του DNA παρουσιάζεται στο Σχήμα 14.



Σχήμα 14: Τυπική πορεία τήξης του DNA.

Από τις καμπύλες τήξεως με βάση την παρακάτω σχέση μπορεί να προσδιορισθεί και η επί τοις εκατό υπερχρωμικότητα (% h_r) που είναι ενδεικτική για την καθαρότητα και τη φυσικότητα του DNA:

$$\%h_r = 100 \frac{A_\tau - A_\alpha}{A_\tau}$$

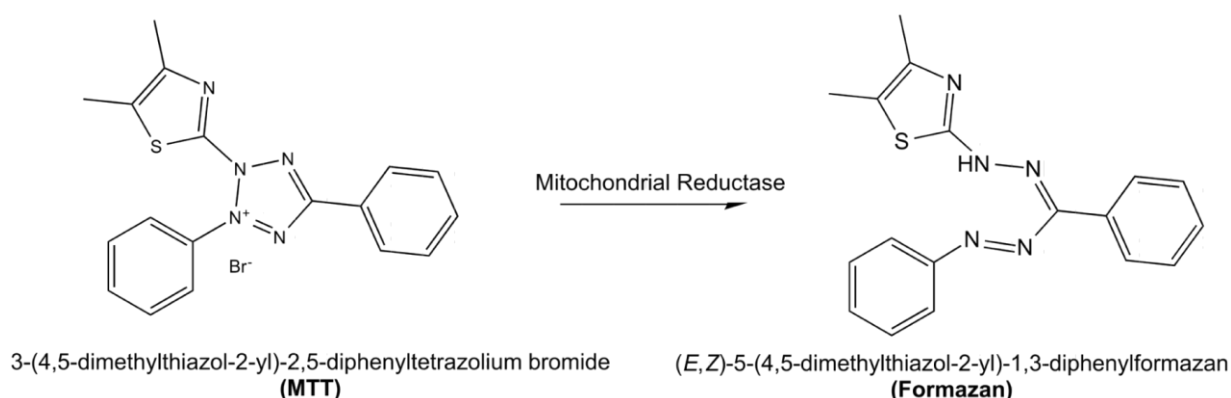
όπου: A_α είναι η αρχική απορρόφηση του διαλύματος (της διπλής έλικας δηλαδή) και A_τ είναι η απορρόφηση του διαλύματος για κάθε θερμοκρασία.

Όπως, αναφέρθηκε και παραπάνω το T_m είναι ενδεικτικό του τρόπου αλληλεπίδρασης του DNA με μικρά μόρια. Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με το αν το μόριο σταθεροποιεί, αποσταθεροποιεί ή δεν επιδρά στη σταθερότητα της διπλής έλικας του DNA αναμένεται αύξηση, μείωση ή καμία μεταβολή του T_m .

3.10 Δοκιμασία MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium)

Η δοκιμασία MTT είναι μια χρωματομετρική δοκιμασία που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας φαρμάκων σε βιολογικά συστήματα/κυτταρικές σειρές. Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει την ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό άλας του τετραζολίου (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) σε αδιάλυτο ίζημα φορμαζάνης. Τα άλατα τετραζολίου

λαμβάνουν ηλεκτρόνια από οξειδωμένα υποστρώματα ή κατάλληλα ένζυμα NADPH και NADH. Η μέθοδος MTT σχετίζεται με την κυτταρική αναπνοή. (Σχήμα 15) [95, 96].



Σχήμα 15: Αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη μέσω ενζύμων αναγωγάσης.

Οι μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης που σχηματίζονται ύστερα από τέσσερις ώρες επώασης με το διάλυμα του MTT στα κύτταρα, διαλύονται σε έναν οργανικό διαλύτη (π.χ. DMSO, ισοπροπανόλη). Ύστερα από τη διάλυση των κρυστάλλων φορμαζάνης μετράται η απορρόφηση (OD) σε ένα φασματοφωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος (test wavelength) 540 nm και ως μήκος κύματος αναφοράς (reference wavelength) 620 nm. Μετά τις μετρήσεις απορρόφησης από το φασματοφωτόμετρο ELISA πραγματοποιείται η κατασκευή της καμπύλης του ποσοστού της απορρόφησης με βάση το αρχικό πρότυπο (ως 100% της απορρόφησης θεωρούμε την απορρόφηση όταν δεν έχει προστεθεί καμία ένωση στις κυτταρικές σειρές) συναρτήσει του λογαρίθμου των διαφόρων συγκεντρώσεων του προτεινόμενου φαρμάκου και προσδιορίζεται το IC₅₀. Το IC₅₀ αντιστοιχεί στη συγκέντρωση εκείνη του φαρμάκου όπου έχει μειωθεί κατά 50% η απορρόφηση. Η μέθοδος MTT που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας (cytotoxicity), σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τον κυτταρικό θάνατο καθώς και με την ενζυματική δράση. Τα πλεονεκτήματα της δοκιμασίας MTT συγκριτικά με άλλες παρόμοιες δοκιμασίες είναι ότι απαιτείται λιγότερος χρόνος, είναι φθηνότερη μέθοδος συγκριτικά με άλλες και λόγω της χρήσης του φασματοφωτομέτρου σάρωσης ELISA επιτρέπεται ταυτόχρονα η μέτρηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων [97-101].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ- ΟΡΓΑΝΑ –ΜΙΚΡΟΣΥΣΚΕΥΕΣ- ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Αντιδραστήρια

- **δισ-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ)-1,6-διεν-2-πυράζολο-3-πυριδίνη:** ένα παράγωγο της κουρκουμίνης το οποίο παραχωρήθηκε από το εργαστήριο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών της Δρ. Πελεκάνου του ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ.
- **$\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:** Alfa Aesar GmbH & Co KG.
- **CH_3OH :** SIGMA ALDRICH, 99.8%
- **CD_3OD :** euriso top, 99.8% σε D
- **$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$:** Carlo Erba Reagents
- **H_2O :** από τη συσκευή απιονισμένου ύδατος Milli-Q plus της Millipore
- **DMSO:** Carlo Erba Reagents
- **$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:** Merck
- **KH_2PO_4 :** Merck
- **NaCl:** PENTA
- **KBr:** Merck
- **Calf Thymus DNA:** ίνες φυσικού DNA από θύμο αδένες βοοειδούς type II, μετά νατρίου άλας, 42%
- **Medium (D-MEM):** Biochem AG
- **Θρυψίνη-EDTA:** Biochem AG
- **FBS:** PAA Laboratories
- **L-Γλουταμίνη:** PAA Laboratories
- **Πενικιλίνη:** Biochem AG
- **Στρεπτομυκίνη:** Biochem AG
- **MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide):** Applichem

4.2 Όργανα – Μικροσυσσκευές

- **Φασματοφωτόμετρο UV-Vis CARY 3E:** συνδεδεμένο με H/Y και κυκλοφορητή ύδατος στο θερμοστατούμενο πολλαπλό υποδοχέα κυψελίδων, Varian
- **Φασματοφωτόμετρο CD J 715:** spectropolarimeter, Jasco Corp
- **pH-μετρο Xenon:** ηλεκτρόδιο λευκοχρύσου RUSSEL CMAWL/3.7/180

- **Ψηφιακός Αναλυτικός Ζυγός ADAM:** ± 0.1 mg
- **Μικροπιπέτες:** 'Precision Variable-Volume Pipettes' i) 100-1000 μL High Tech. Lab., ISO 9001 και ii) 10-100 μL , Hamilton, ISO 9001
- **Κυψελίδα UV-Vis:** από χαλαζία, οπτικής διαδρομής 1 cm
- **Κυψελίδες NMR:** NMR tubes, SDS, διαμέτρου 5 mm και μήκους 178 mm
- **Φασματοφωτόμετρο NMR:** 300 MHz, Varian
- **Φασματοφωτόμετρο HITACHI:** U-2000, Spectrophotometer
- **Ιξωδόμετρο:** SI Analytics CK 300
- **EPR:** Bruker ESP 380E
- **Φασματοφωτόμετρο IR:** IRAffinity-1, Shimadzu
- **CV:** ποτενσιοστάτη τύπου AFCBP1, Pine Instrument Company
- **Φθορισμόμετρο λάμπας Xe:** Shimadzu Spectrofluorophotometer RF-5301PC
- **Φασματοφωτόμετρο ELISA:** Sirio S Seac RADIM-Group Diachel ELISA plate reader

4.3 Μεθοδολογία - Παρασκευή διαλυμάτων

A) Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη

Ο χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη (παράγωγο κουρκουμίνης, curcu4) έγινε με τη βοήθεια των ακόλουθων μεθόδων: Φασματοσκοπίας μάζας, Φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H -NMR, ^1H - ^1H -NMR-COSY), Φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και φθορισμομετρίας.

Φασματοσκοπία Μάζας (MS)

Το φάσμα μάζας λήφθηκε στον υποκαταστάτη σε φασματοφωτόμετρο μάζας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη του φάσματος αυτού είναι μεθανόλη.

Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Για το χαρακτηρισμό του υποκαταστάτη λήφθηκε φάσμα IR σε δισκίο με KBr.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Λήφθηκε φάσμα ^1H -NMR και φάσμα ^1H - ^1H COSY, σε διάλυμα συγκέντρωσης 15 μM , σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη, CD_3OD και στους 25 $^\circ\text{C}$.

Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Παρασκευάστηκαν διαλύματα της curcu4 σε διαλύτες μεθανόλη, μεθανόλη-νερό 1-1, DMF και DMSO συγκεντρώσεων 28,3·μM, 18,8·μM, 20,0 μM και 18,8·μM αντίστοιχα. Για τα συγκεκριμένα παρασκευασθέντα διαλύματα λήφθηκαν φάσματα UV-Vis στην περιοχή 270-600 nm και 200-600 nm (σε διαλύματα με διαλύτη μεθανόλη και μεθανόλη-νερό) και σε θερμοκρασία 25 °C. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα με $b = 1\text{ cm}$.

Ο προσδιορισμός του pKa για την curcu4 πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας UV-Vis. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν 2 σειρές διαλυμάτων όπου στη μία σειρά προστίθετο συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος NaOH και στην άλλη σειρά καθορισμένη ποσότητα διαλύματος HCl έτσι ώστε η περιοχή των τιμών του pH να είναι από 0,57 έως 12,59. Τα διαλύματα της curcu4 τα οποία παρασκευάστηκαν και στις 2 σειρές είχαν όγκο 10 mL και συγκέντρωση 11,3·μM. Η ρύθμιση του pH έγινε με διαδοχική προσθήκη διαλύματος NaOH (0,0104 M ή 0,104 M) για εύρος τιμών pH=6,06-12,59 ή διαλύματος HCl (0,01 M ή 0,1 M ή 1M) για pH=0,57-5,92 (Οι αρχικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων του NaOH και του HCl ποικίλλουν, για να επιτυγχάνεται αλλαγή του pH κατά την διαδοχική προσθήκη αυτών με ελάχιστη μεταβολή του τελικού όγκου του μεθανολικού διαλύματος της curcu4 ($V_{\text{tel}} = 10\text{ mL}$). Ελήφθησαν φάσματα στην περιοχή 200-600 nm, στους 25° C, με κυψελίδα οπτικής διαδρομής $b = 1\text{ cm}$.

Φθορισμομετρία

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σε διαλύματα της curcu4 σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 0,567 μM. Το μήκος κύματος διέγερσης της curcu4 είναι 330 nm (excitation wavelength) και μετρήθηκε ο φθορισμός της από τα 350-600 nm και το μήκος κύματος διέγερσης από 250-400 nm.

B) Χαρακτηρισμός του συμπλόκου

Ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου του Cu (II) με την curcu4, **c1**, πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες τεχνικές: Φασματοσκοπία Μάζας, Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR), Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), Κυκλική Βολταμμετρία και Φθορισμομετρία.

Φασματοσκοπία Μάζας

Για το c1 λήφθηκε φάσμα μάζας σε διαλύτη μεθανόλη στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού

Στο σύμπλοκο **c1**, λήφθηκε φάσμα X-band EPR. Το φάσμα αυτό λήφθηκε σε φασματοφωτόμετρο, ακτινοβολώντας το, με ακτινοβολία συνεχούς κύματος (continuous wave, CW), σε θερμοκρασία υγρού ηλίου (15K), με συχνότητα 9,42 GHz.

Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Το φάσμα IR του **c1** λήφθηκε σε παστίλια αυτού με KBr ύστερα από εφαρμογή πίεσης 10 τόνων.

Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Παρασκευάστηκε διάλυμα του **c1** σε DMSO συγκέντρωσης 345 μM , και λήφθηκε φάσμα UV-Vis σε περιοχή 500-1100 nm, καθώς και διαλύματα του **c1** σε διαλύτες DMSO, μεθανόλη, μεθανόλη-νερό=1-1, σε συγκεντρώσεις 18,8 μM , 28,3 μM , 18,8 μM αντίστοιχα και λήφθηκε φάσμα UV-Vis σε εύρος μήκος κύματος 270-600 nm.

Αναμιγνύοντας διαλύματα curcu4 και Cu(II) ίδιας αρχικής συγκέντρωσης 113 μM , σε διαλύτη μεθανόλη, παρασκευάσαμε διαλύματα τελικού όγκου 4 mL σε διάφορους λόγους R ($R = [\text{curcu4}]/[\text{Cu(II)}]$). Η τελική συγκέντρωση της curcu4 παρέμενε σταθερή σε όλα τα διαλύματα και ίση με 28,3 μM . Στα διαλύματα αυτά λήφθηκαν φάσματα UV-Vis.

Για το **c1** προσδιορίστηκε το pK_a παρασκευάζοντας μεθανολικά διαλύματά του σταθερής συγκέντρωσης και ίσης με 11,3 μM , μεταβάλλοντας το pH σε εύρος τιμών 0,17-12,64, προσθέτοντας αντίστοιχα συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος HCl ή διαλύματος NaOH.

Εφαρμόζοντας τη μέθοδο Job σε σειρά διαλυμάτων curcu4-Cu(II) προσδιορίστηκε η στοιχειομετρία του σχηματιζόμενου συμπλόκου (**c1**) σε μεθανολικό διάλυμα. Έτσι, παρασκευάστηκε μία σειρά μεθανολικών διαλυμάτων curcu4 (x mL, αρχικής συγκέντρωσης 113 μM) όπου σε κάθε διάλυμα γινόταν προσθήκη ($1-x$, mL, αρχικής συγκέντρωσης 113 μM), τελικού όγκου 1 mL, έτσι ώστε το άθροισμα των τελικών συγκεντρώσεων τόσο του υποκαταστάτη όσο και του μετάλλου να παραμένει σταθερό. Για να επιτευχθεί αυτό, στα παρασκευασθέντα διαλύματα λήφθηκε φάσμα UV-Vis, σε περιοχή μήκους κύματος 600-200 nm (περιοχή απορρόφησης της curcu4).

Για το σχηματιζόμενο σύμπλοκο **c1** προσδιορίστηκε και η σταθερά σχηματισμού (K_f). Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε μια σειρά 17 μεθανολικών διαλυμάτων τελικής συγκέντρωσης υποκαταστάτη ίση με 28,3 μM , προσθέτοντας συγκεκριμένο όγκο

μεθανολικού διαλύματος $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R = [\text{Cu}(\text{II})]/[\text{curcu4}]$). Στα διαλύματα αυτά λήφθηκε φάσμα UV-Vis, από 600-200 nm, με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm, σε θερμοκρασίες 20, 25, 30, 35, 40°C.

Φθορισμομετρία

Στο σύμπλοκο που συνθέσαμε, c1, μετρήθηκε η ένταση φθορισμού του, σε διάλυμά του συγκέντρωσης 60 μM , σε διαλύτη μεθανόλη.

Επίσης, για να διερευνήσουμε κατά πόσο ο Cu(II) επηρεάζει το φθορισμό της curcu4 κατά τη συμπλοκοποίησή του, παρασκευάστηκε μια σειρά 12 μεθανολικών διαλυμάτων, όπου η τελική συγκέντρωση της curcu4 παρέμενε σταθερή και ίση με 11,3 μM . Στα διαλύματα αυτά προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα μεθανολικού διαλύματος Cu(II) για να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R = [\text{Cu}(\text{II})]/[\text{curcu4}]$). Στη σειρά των 12 διαλυμάτων λήφθηκε φάσμα φθορισμού. Το μήκος κύματος διέγερσης (excitation wavelength) ήταν 330 nm.

Κυκλική βολταμμετρία

Παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, και συμπλόκου c1 συγκέντρωσης 3 mM, χρησιμοποιώντας ως φέροντα ηλεκτρολύτη KClO_4 συγκέντρωσης 0,5 M. Ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο δίσκου λευκοχρύσου (Pt), ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε Ag/AgCl και ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο σύρμα λευκοχρύσου, και η ταχύτητα σάρωσης ήταν 100 mV/s.

Γ) Μελέτη της αλληλεπίδρασης με DNA

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης της curcu4 και του c1 με το DNA πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες μεθόδους: φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) (scatchard, καμπύλες θερμικής μετουσίωσης), κυκλικό διχρωϊσμό, φθορισμομετρία και ιξωδομετρία.

Παρασκευή διαλύματος DNA

Η παρασκευή του διαλύματος DNA, που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, απαιτεί αρχικά την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων για το DNA και έπειτα την παρασκευή του ίδιου του διαλύματος του DNA.

- **Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων**

i) **Παρασκευή αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--K}_2\text{HPO}_4$.** Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 1,7867 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και αραιώνονται με απιονισμένο νερό

milli-Q σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα Α). Έπειτα ζυγίζονται 0,9073 g K_2HPO_4 και αραιώνονται ομοίως με νερό milli-Q σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα Β). Εν συνεχεία αναμιγνύονται 58,7 mL του διαλύματος Α και 41,3 mL του διαλύματος Β σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζεται το αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα $Na_2HPO_4-K_2HPO_4$, το οποίο έχει $pH \approx 7$ και μετριέται κάθε φορά πριν τη χρήση του.

ii) Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10. Παρασκευάζεται με 1:10 αρραίωση του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $Na_2HPO_4-K_2HPO_4$. Δηλαδή, μεταφέρονται 10 mL του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $Na_2HPO_4-K_2HPO_4$ σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται με απιονισμένο νερό milli-Q.

iii) Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10 με Na^+ , 0,1 M σε NaCl. Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 0,5844 g NaCl και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Η φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή είτε με το παραπάνω παρασκευασθέν ρυθμιστικό διάλυμα DNA 1:10, είτε προστίθενται σε αυτήν 10 mL του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $Na_2HPO_4-K_2HPO_4$ και το υπόλοιπο συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό milli-Q.

- **Παρασκευή διαλύματος DNA και υπολογισμός της συγκέντρωσής του.**

i) Ζυγίζονται περίπου 5 mg ινών φυσικού DNA θύμου αδένος βοοειδούς και προστίθενται σε αυτά 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10 με Na^+ . Το διάλυμα τοποθετείται σε φιαλίδιο και αφήνεται για μία νύκτα σε ήπια ανάδευση στο σκοτάδι. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι το διάλυμα του DNA πρέπει να φυλάσσεται από το ηλιακό φως.

ii) Το παραπάνω πυκνό διάλυμα του DNA αραιώνεται σε αναλογία 1:20 παίρνοντας κάθε φορά τις κατάλληλες ποσότητες πυκνού διαλύματος και ρυθμιστικού, ανάλογα με την ποσότητα που θέλουμε να παρασκευάσουμε π.χ. αναμιγνύουμε 0,1 mL του διαλύματος DNA και 1,9 mL του ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10. Ενώ, για τις baselines χρησιμοποιούμε το εξής διάλυμα: 0,1 mL του ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10 με Na^+ , 0,1 M σε NaCl και 1,9 mL του ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10. Ο συντελεστής απορρόφησης του DNA στα 258 nm είναι $\epsilon=6.600$ και μετρώντας την απορρόφηση υπολογίζεται κάθε φορά η συγκέντρωση του διαλύματος DNA.

Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της curcu4 και του c1 με το DNA παρασκευάστηκαν 2 σειρές μεθανολικών διαλυμάτων, μια για την curcu4 και μια για το c1, διατηρώντας σταθερή είτε τη συγκέντρωση της curcu4 είτε τη συγκέντρωση του c1 και ίσες με 11,3 μM , και μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του DNA έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[\text{DNA}]/[\text{curcu4}]$, $R=[\text{DNA}]/[\text{c1}]$). Σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε τελικά η ποσότητα [μεθανολικό διάλυμα curcu4 ή c1 + μεθανόλη] να παραμένει σταθερό και ίσο με 2% v/v. Τα διαλύματα αυτά παρέμειναν για επώαση 24 h. Στα διαλύματα αυτά, λήφθηκαν φάσματα UV-Vis, από 600-200 nm, σε θερμοκρασία 25°C.

Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης

Παρασκευάστηκαν 2 σειρές διαλυμάτων (curcu4-DNA και c1-DNA) στις οποίες η τελική συγκέντρωση του DNA παρέμενε σταθερή και ίση με 100 μM σε τελικό όγκο 8 mL και μεταβαλλόταν η συγκέντρωση της curcu4 ή του c1 έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[X]/[\text{DNA}]$, X:curcu4 ή c1). Σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε τελικά η ποσότητα [μεθανολικό διάλυμα curcu4 ή c1 + μεθανόλη] να παραμένει σταθερό και ίσο με 2% v/v. Τα διαλύματα επωάστηκαν 24 h στους 25 °C. Οι μετρήσεις της απορρόφησης έγιναν σε μήκος κύματος 260 nm και σε εύρος θερμοκρασιών 25 έως 95 °C, όπου ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας ήταν 0,5 °C/min.

Κυκλικός Διχρωϊσμός

Για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής παρασκευάστηκαν 2 σειρές διαλυμάτων (curcu4-DNA και c1-DNA) σταθερής συγκέντρωσης DNA και ίσης με 100 μM . Οι τελικές συγκεντρώσεις τόσο της curcu4 όσο και του c1 ποίκιλλαν (0, 2 μM – 28 μM) ανάλογα με τον επιθυμητό λόγο R ($R=[X]/[\text{DNA}]$, X:curcu4 ή c1). Σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε τελικά η ποσότητα [μεθανολικό διάλυμα curcu4 ή c1 + μεθανόλη] να παραμένει σταθερό και ίσο με 2% v/v. Τα διαλύματα αυτά επωάστηκαν για 24 h. Το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού λήφθηκε σε περιοχή 600-200 nm, στους 25°C.

Φθορισμομετρία

Άλλη μια τεχνική που εφαρμόστηκε για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των ενώσεων μας (curcu4 και c1) με το DNA είναι η φθορισμομετρία μέσω πειραμάτων

ανταγωνισμού με το βρωμιούχο αιθίδιο. Αρχικά, θα πρέπει να βρούμε σε ποια αναλογία $[DNA]/[EtBr]$ υπάρχει κορεσμός του DNA με το EtBr. Για να πραγματοποιηθεί αυτό παρασκευάστηκε μια σειρά διαλυμάτων DNA-EtBr, στην οποία παρέμεινε σταθερή η τελική συγκέντρωση του EtBr και ίση με 3,125 μM σε τελικό όγκο 8 mL και μεταβαλλόταν η συγκέντρωση του DNA έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[DNA]/[EtBr]$). Σε αυτήν την περίπτωση δεν πραγματοποιήθηκε επώαση των διαλυμάτων DNA-EtBr. Ως μήκος κύματος διέγερσης επιλέχθηκε 526 nm για να μετρηθεί η ένταση φθορισμού του EtBr. Αφού βρέθηκε ο κορεσμός του DNA με το EtBr σε αναλογία $[DNA]/[EtBr]=8/1$ (βλ. §7.3), παρασκευάστηκαν 2 σειρές διαλυμάτων (DNA-EtBr-curcu4 και DNA-EtBr-c1) διατηρώντας σταθερή την αναλογία $[DNA]/[EtBr]$ (όπου η τελική συγκέντρωση του DNA ήταν ίση με 25 μM και η τελική συγκέντρωση του EtBr ήταν ίση με 3,125 μM) και μεταβαλλόταν η συγκέντρωση της curcu4 ή του c1 έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[X]/[DNA-EtBr]$, X: curcu4, c1). Σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε τελικά η ποσότητα [μεθανολικό διάλυμα curcu4 ή c1 + μεθανόλη] να παραμένει σταθερό και ίσο με 2% v/v. Τα διαλύματα αυτά παρέμειναν για επώαση 24 h.

Επιπροσθέτως, μετρήθηκε ο φθορισμός σε 2 σειρές διαλυμάτων DNA-curcu4 και DNA-c1 χωρίς την προσθήκη σε αυτήν την περίπτωση του κλασικού παρεμβολέα EtBr. Στα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για να μετρηθεί ο φθορισμός παρέμεινε σταθερή η συγκέντρωση της curcu4 ή του c1 και ίση με 10 μM και μεταβαλλόταν η συγκέντρωση του DNA έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[DNA]/[X]$, X: curcu4, c1). Τα διαλύματα αυτά επώαστηκαν για 24 h και μετρήθηκε ο φθορισμός. Τα μήκη κύματος διέγερσης (excitation wavelength) επιλέχθηκαν ανάλογα με το που εμφανίζει μέγιστο μήκος κύματος η ταινία απορρόφησης της curcu4 ή του c1 στο φάσμα UV-Vis.

Ιξωδομετρία

Για να υπολογιστεί το ιξώδες του DNA παρουσία της curcu4 και του c1 παρασκευάστηκαν 2 σειρές διαλυμάτων (DNA-curcu4 και DNA-c1) σταθερής τελικής συγκέντρωσης DNA ίσης με 10 μM , και μεταβαλλόμενης τελικής συγκέντρωσης της curcu4 ή του c1 σε κάθε διάλυμα έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[X]/[DNA]$, X: curcu4 ή c1). Σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε τελικά η ποσότητα [μεθανολικό διάλυμα curcu4 ή c1 + μεθανόλη] να παραμένει σταθερό και ίσο με 2% v/v. Τα διαλύματα αυτά παρέμειναν για επώαση 24 h και μετά πραγματοποιήθηκε το πείραμα ιξωδομετρίας.

Δ) Μελέτες κυτταροτοξικότητας (Μέθοδος MTT)

Οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε D-MEM θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 100 U/ml πενικιλίνης, 100 μg/mL στρεπτομυκίνης και 2 mM γλουταμίνη. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία και επωάζονται στους 37 °C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα και 5% CO₂. Η αποκόλληση των κυττάρων από τα τρυβλία γίνεται με χρήση 0,05% θρυψίνη-EDTA.

Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώνονται σε κλίβανο αποστείρωσης πριν την χρήση τους και τα πειράματα έλαβαν χώρα μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής με βάση το πρωτόκολλο αποφυγής μόλυνσεων.

Για να μελετηθεί η κυτταροτοξικότητα των ενώσεων (αρχική κουρκουμίνη, curcu4 και c1) πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα και το κάθε δείγμα τοποθετείται εις τετραπλούν. Σε κάθε ένα από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα ακολουθείται η εξής διαδικασία: την πρώτη μέρα σπέρνονται ~ 4000 κύτταρα/100 μL καλλιεργητικού υλικού σε κάθε φρεάτιο ενός πλακιδίου κυτταροκαλλιεργειών 96 φρεατίων. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h στους 37 °C. Την δεύτερη μέρα, αφαιρείται η ποσότητα του παλιού θρεπτικού υλικού των κυττάρων από κάθε φρεάτιο και προστίθενται 100 μL διαλυμάτων της αρχικής κουρκουμίνης ή της curcu4 ή του c1, σε εύρος συγκεντρώσεων από 100μM-0,1μM. Οι προαναφερθείσες ενώσεις αρχικά διαλύονται σε DMSO και με κατάλληλες αραιώσεις στο θρεπτικό υλικό DMEM προκύπτουν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις διαλυμάτων οι οποίες τοποθετούνται στο πλακίδιο με τα σπαρμένα κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η τελική συγκέντρωση του DMSO στα διαλύματα δεν πρέπει να ξεπερνά το 0,5% καθώς το DMSO σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι τοξικό για τα κύτταρα. Σε 4-8 φρεάτια προστίθενται 100 μL θρεπτικού υλικού χωρίς να προστεθεί καμιά ένωση, για να το έχουμε ως δείγμα αναφοράς (control). Τα πλακίδια τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο στους 37 °C. Μετά από 3 μέρες επώασης αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται σε κάθε φρεάτιο 100 μL διαλύματος MTT (1 mg/mL στο θρεπτικό υλικό DMEM) και τα κύτταρα επωάζονται με το διάλυμα αυτό για 4 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης σχηματίζονται μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης. Μετά το πέρας των τεσσάρων ωρών αφαιρείται το διάλυμα MTT και προστίθενται 100 μL ισοπροπανόλης για να διαλυθούν οι σχηματιζόμενοι μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης. Αφού βεβαιωθούμε για την διάλυση των κρυστάλλων ύστερα από καλή ανάδευση του πλακιδίου, μετράται η απορρόφηση του διαλύματος με φασματοφωτόμετρο ELISA READER σε μήκος κύματος 540 nm.

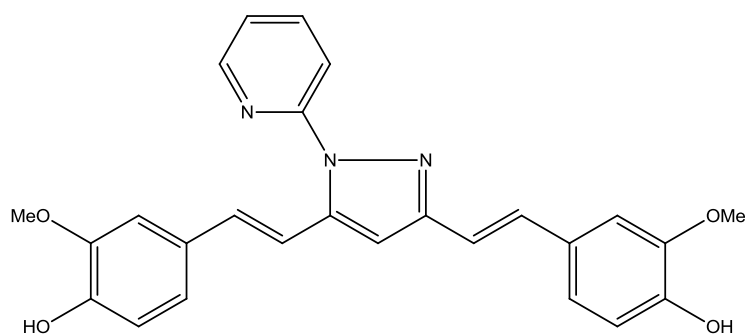
Επίσης, μετράται η απορρόφηση στα 620 nm ως υπόβαθρο και αφαιρείται. Υπολογίζεται το % της απορρόφησης του κάθε δείγματος αναφορικά με το δείγμα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αναλύονται με την βοήθεια του προγράμματος PRISM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ 4,4'-((1E,1'E)-(1-(πυριδιν-2-υλ)-1H-πυραζολο-3,5-διυλ)δι(εθεν-2,1-διυλ))δι(2-μεθοξυφαινολη)

5.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός του 4,4'-((1E,1'E)-(1-(πυριδιν-2-υλ)-1H-πυραζολο-3,5-διυλ)δι(εθεν-2,1-διυλ))δι(2-μεθοξυφαινολη) (curcu4)

Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός νέου παραγώγου της κουρκουμίνης, όπου αντικαταστάθηκε η δικέτο-ομάδα της κουρκουμίνης με την ομάδα του πυραζόλο-πυριδίνης. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι πηγαίνουμε σε μια κατηγορία φαρμακοφόρου με άτομα δότες άζωτα και όχι οξυγόνα όπως στην περίπτωση της κουρκουμίνης. Η σύνθεση του 4,4'-((1E,1'E)-(1-(πυριδιν-2-υλ)-1H-πυραζολο-3,5-διυλ)δι(εθεν-2,1-διυλ))δι(2-μεθοξυφαινολη) που θα αναφέρεται για λόγους συντομίας **curcu4**, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Δρ. Πελεκάνου στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος από την Δρ. Σαγνού και την Δρ. Αλεξίου [βλ. Παράρτημα Ι]. Η δομή του υποκαταστάτη φαίνεται στο Σχήμα 16.

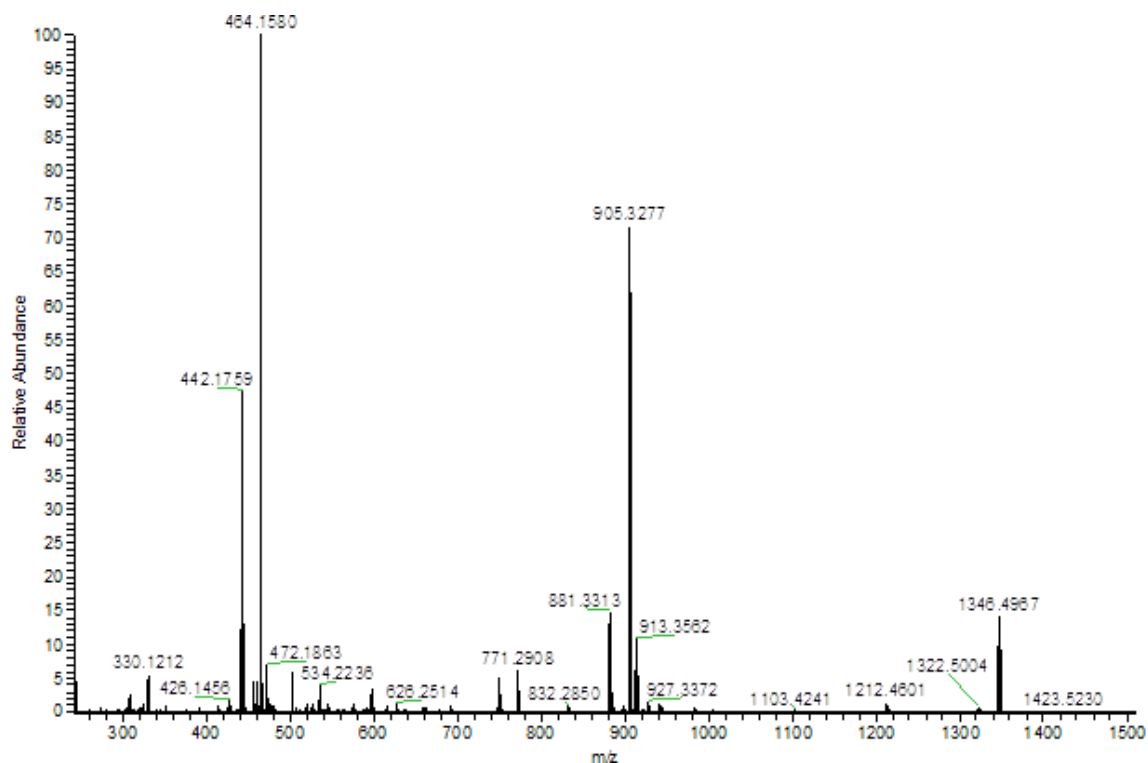


Σχήμα 16: Δομή του υποκαταστάτη (curcu4).

5.2 Χαρακτηρισμός της curcu4

5.2.1 Φασματοσκοπία Μάζας (Mass Spectrometry, MS)

Το φάσμα MS με θετικό ιονισμό, για την curcu4 φαίνεται στο Σχήμα 17.



Σχήμα 17: Φάσμα MS για την curcu4 σε διαλύτη μεθανόλη.

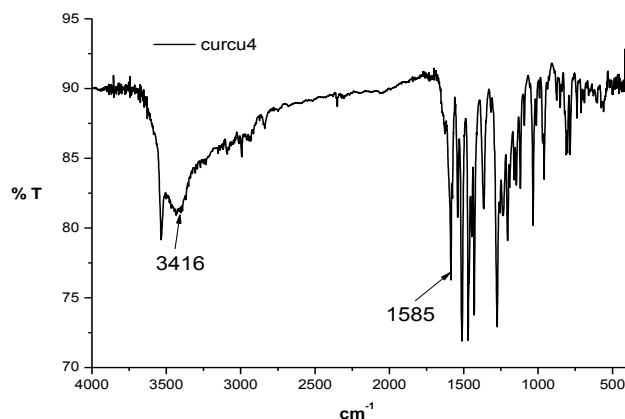
Από το φάσμα ESI-MS(m/z) με θετικό ιονισμό, προκύπτει ότι το κύριο θραύσμα είναι το $[C_{26}H_{24}N_3O_4]^+$ ($[M+H]^+$), με m/z ίσο με 442,17. Τα βασικότερα θραύσματα του φάσματος MS συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Τα βασικότερα θραύσματα της curcu4 σε διαλύτη μεθανόλη.

	Formula	Theoretical	Experimental	Delta ppm
$[M+H]^+$	$C_{26}H_{24}O_4N_3$	442,1761	442,1759	-0,572
$[M+Na]^+$	$C_{26}H_{23}O_4N_3Na$	464,1581	464,1580	-0,177
$[2M+Na]^+$	$C_{52}H_{46}O_8N_6Na$	905,3269	905,3277	0,891
$[3M+Na]^+$	$C_{78}H_{69}O_{12}N_9Na$	1346,4958	1346,4967	0,676

5.2.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)

Το φάσμα IR για την curcu4 φαίνεται στο Σχήμα 18.



Σχήμα 18: Το φάσμα IR για την curcu4.

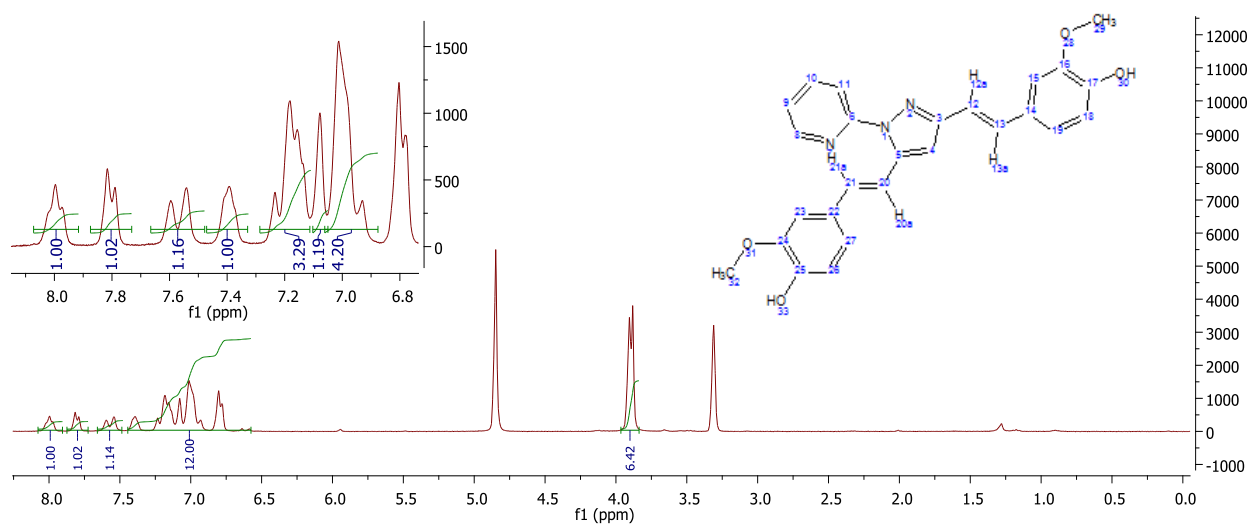
Από το παραπάνω φάσμα IR μπορούμε να εντοπίσουμε τις χαρακτηριστικές και αναμενόμενες κορυφές για τον υποκαταστάτη. Οι σημαντικότερες ταινίες του φάσματος IR της curcu4 φαίνονται στον Πίνακα 5 [102].

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR της ουσίας curcu4.

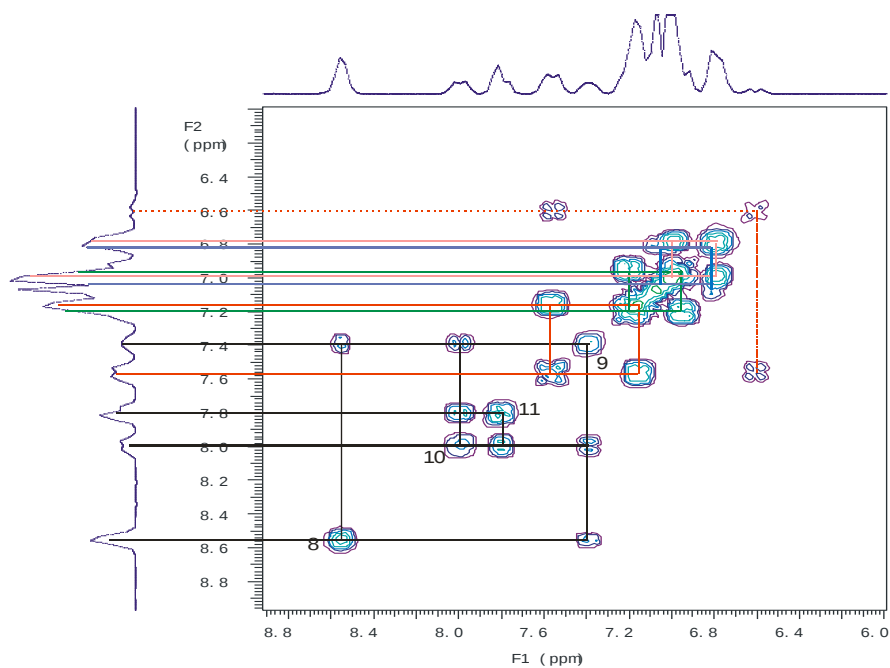
Κυματαριθμός, cm^{-1}	Απόδοση
3416	δόνηση τάσης δεσμού O-H
1585	δόνηση τάσης δεσμού C-N
1541, 1510, 1472, 1448, 1430, 959	δονήσεις τάσεως αρωματικού δακτυλίου 2-μονοϋποκατεστημένης πυριδίνης
1278	δόνηση τάσης δεσμών φαινολικών C-O
1032	δόνηση τάσης δεσμών Μεθόξυ C-O
878, 850, 739	δόνηση τάσης δεσμών αρωματικών C-H, 1,2,4-τριϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου

5.2.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

Τα φάσματα ^1H -NMR και ^1H - ^1H NMR COSY παρουσιάζονται στο Σχήμα 19 και στο Σχήμα 20 αντίστοιχα.



Σχήμα 19: Φάσμα NMR για την curcu4 σε διαλύτη μεθανόλη (CD_3OD) σε εύρος: 0-9 ppm και 6,7-8,7 ppm (σε μεγέθυνση).



Σχήμα 20: Φάσμα ^1H - ^1H COSY για την curcu4.

Με βάση το παραπάνω φάσμα ^1H NMR (Σχήμα 19) καθώς και από το φάσμα δύο διαστάσεων ^1H - ^1H NMR COSY (Σχήμα 20), έγινε η απόδοση των κορυφών της curcu4 που συνοψίζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Πίνακας χημικών μετατοπίσεων της curcu4 σε διαλύτη CD_3OD (σε παρένθεση και με πλάγια παρουσιάζεται η χημική πολλαπλότητα J)

Πρωτόνια	δ , ppm	Πρωτόνια	δ , ppm
H-4	7,01 (s)	H-12a, H-13a 7,56 (d) 7,16 (d) (16,39) H-20a, H-21a 7,20 (d) 6,96 (d) (16,56)	
H-8	8,55 (d) (3,62)	H-15, H-23 7,08 (s) 7,16 (s)	
H-9	7,40 (dd) (3,6(2), 7,1(7))	H-19, H-26 6,99 (d) 6,78(d) (7,666) H-18, H-27 7,04 (d) 6,82 (d) (7,89)	
H-10	8,00 (dd) (7,1(7), 8,1(7))	H-29, H-32 3,90 (s) 3,88(s)	
H-11	7,80 (d) (8,15)	H-30, H -33 Δεν παρατηρούνται	

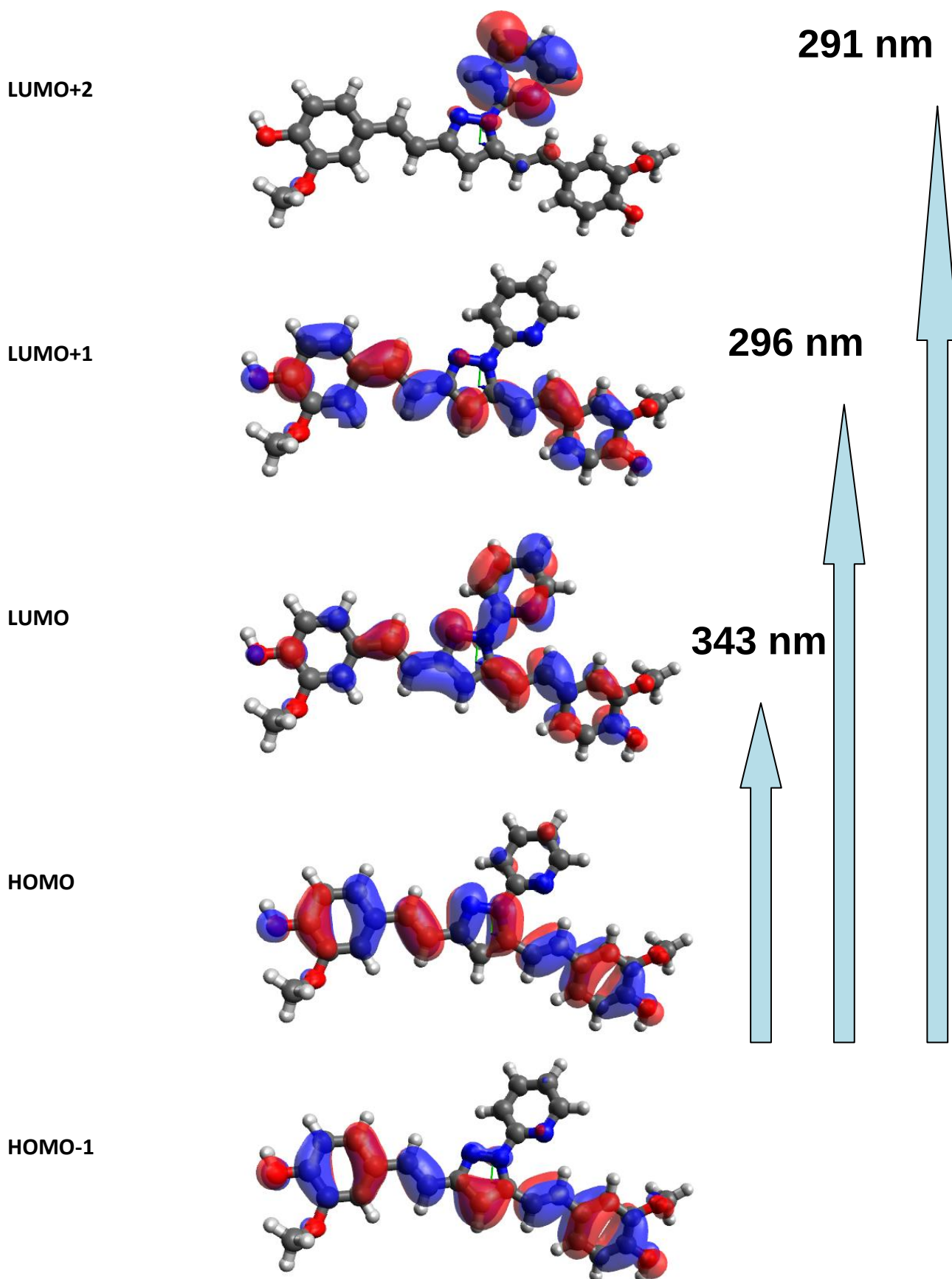
5.2.4 Φασματοσκοπία Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)

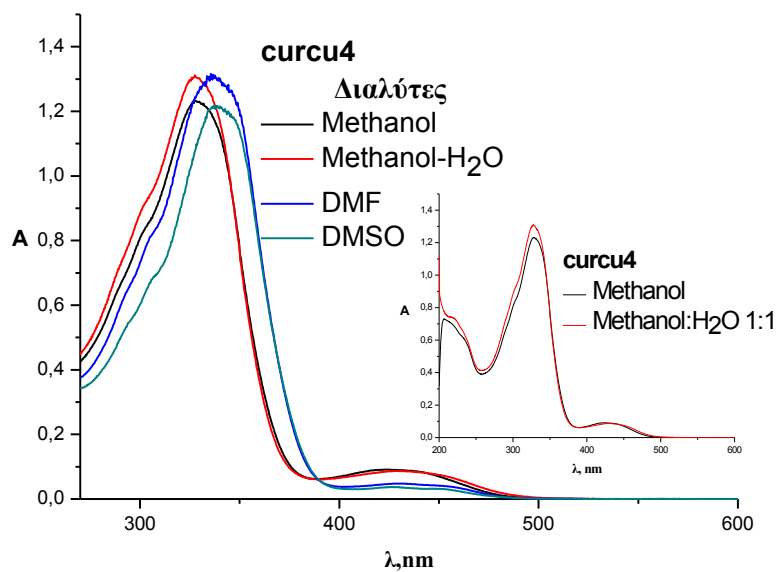
Άλλη μια τεχνική που εφαρμόστηκε για το χαρακτηρισμό της curcu4 είναι η φασματοσκοπία UV-Vis. Η απόδοση των κορυφών στα φάσματα UV-Vis πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια θεωρητικών υπολογισμών.

Η υπολογιστική μελέτη διεξήχθη με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Gaussian, έκδοση 09 [103]. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν σε πολυεπεξεργαστικό σύστημα με 24 CPUs και λειτουργικό UNIX/LINUX. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται ακολούθως βασίζεται στη θεωρία συναρτησιακού πυκνότητας (DFT/B3LYP) [104-106] και το σύνολο βάσης που

χρησιμοποιήθηκε ήταν το TZVP [107, 108]. Αυτά ισχύουν για όλους τους θεωρητικούς υπολογισμούς που αναφέρονται στην παρούσα εργασία.

Θεωρητικά, για το μόριο της curcu4 αναμένονται κορυφές στο UV-Vis στα ακόλουθα μήκη κύματος (nm):





Σχήμα 21: Το φάσμα UV – Vis της curcu4 στην περιοχή 270-600 nm σε διάφορους διαλύτες καθώς και στην περιοχή 200-600 nm σε διαλύτη μεθανόλη και μεθανόλη-νερό, $\theta=25^{\circ}\text{C}$.

Οι κορυφές οι οποίες παρατηρούνται σε όλους τους διαλύτες (βλ. Σχήμα 21) εμφανίζονται συνοπτικά στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Τα μήκη κύματος στα μέγιστα των απορροφήσεων ($\lambda_{\max}$), οι συντελεστές απορροφητικότητας (ϵ) και οι αποδόσεις των ταινιών του φάσματος UV-Vis.

Διαλύτης	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Απόδοση
Μεθανόλη	217, 236	24,7, 20,9	-
	287(sh)	22,3	HOMO $\rightarrow$ LUMO+1,
	300(sh)	30,0	HOMO $\rightarrow$ LUMO+2
	328	43,2	HOMO $\rightarrow$ LUMO
	421, 440	3,2, 3,0	-
Μεθανόλη:H₂O 1:1	221, 232	39,0, 34,7	
	287(sh)	36,7	HOMO $\rightarrow$ LUMO+2
	300(sh)	47,7	HOMO $\rightarrow$ LUMO+1
	328	69,4	HOMO $\rightarrow$ LUMO
	427, 450	4,6, 4,0	
DMSO	291(sh),	27,6,	HOMO $\rightarrow$ LUMO+2
	305(sh)	36,3	HOMO $\rightarrow$ LUMO+1
	338	64,7	HOMO $\rightarrow$ LUMO
	426, 452	2,0, 1,7	-
DMF	292(sh),	33,1,	HOMO $\rightarrow$ LUMO+2
	304(sh)	42,7	HOMO $\rightarrow$ LUMO+1
	335	69,2	HOMO $\rightarrow$ LUMO
	430, 456	2,5, 2,0	-

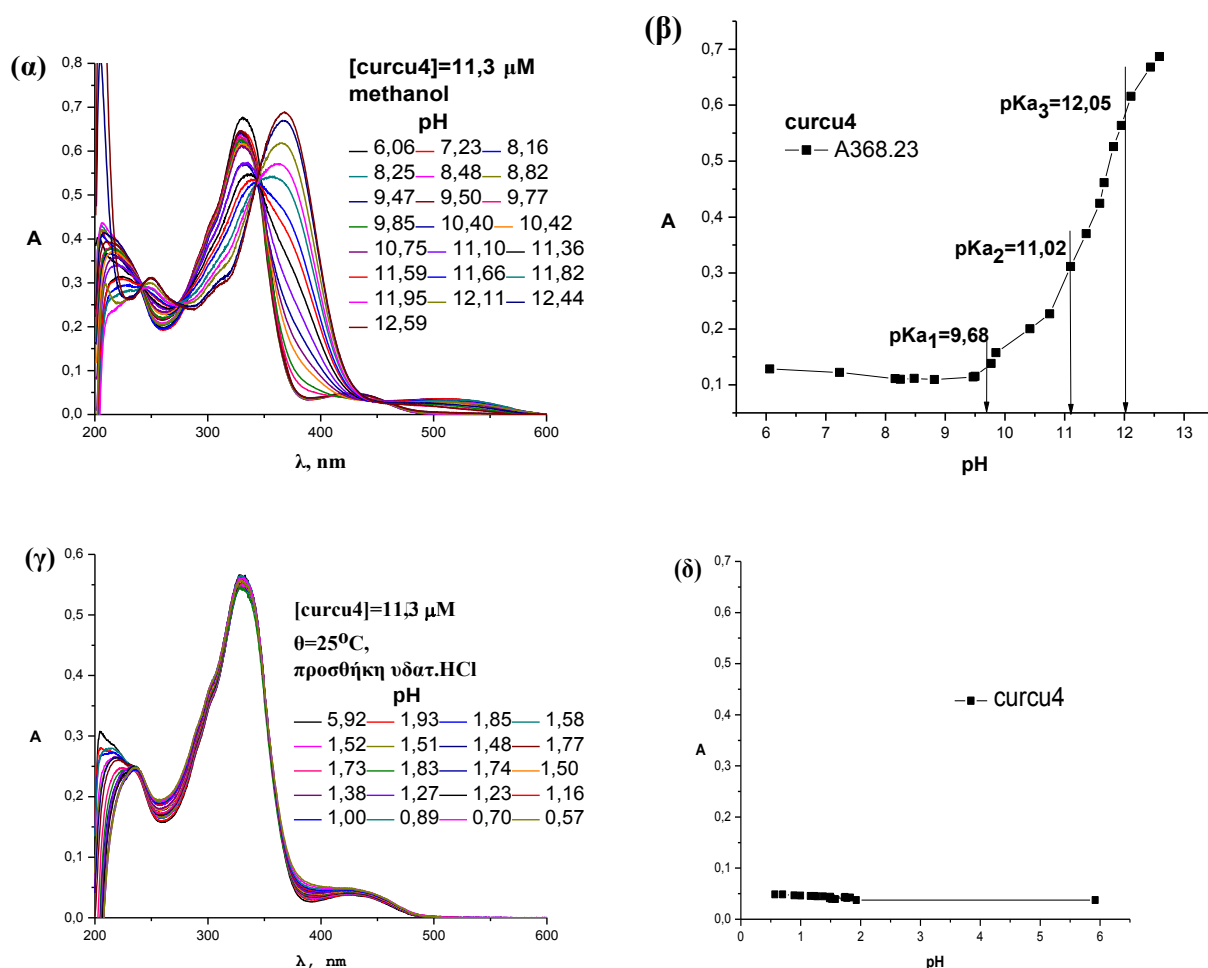
Η απόδοση των κορυφών στον Πίνακα 7 πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια θεωρητικών υπολογισμών.

Όπως γίνεται αντιληπτό ο διαλύτης επηρεάζει την κορυφή με την μέγιστη ένταση. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη η κορυφή αυτή μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (327 nm $\rightarrow$ 338 nm, από μεθανόλη $\rightarrow$ DMF) εμφανίζοντας έτσι ένα θετικό διαλυτοχρωμικό φαινόμενο. Ο διαλυτοχρωμισμός είναι ένα φαινόμενο

που εξαρτάται από την πολικότητα των διαλυτών αλλά και από άλλους παράγοντες, όπως στην περίπτωση πρωτικών διαλυτών, από τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ διαλύτη και διαλυμένης ουσίας και τη δυνατότητα να δρουν ως δότες ή δέκτες δεσμού υδρογόνου. Στην περίπτωση της curcu4 εμφανίζεται θετικός διαλυτοχρωμισμός, που σημαίνει ότι η διπολική ροπή της διεγερμένης κατάστασης είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της θεμελιώδους [102, 109-120].

5.2.4.1 Προσδιορισμός pK_a της curcu4

Ο προσδιορισμός της pK_a curcu4 πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων UV-Vis που φαίνονται στο Σχήμα 22.



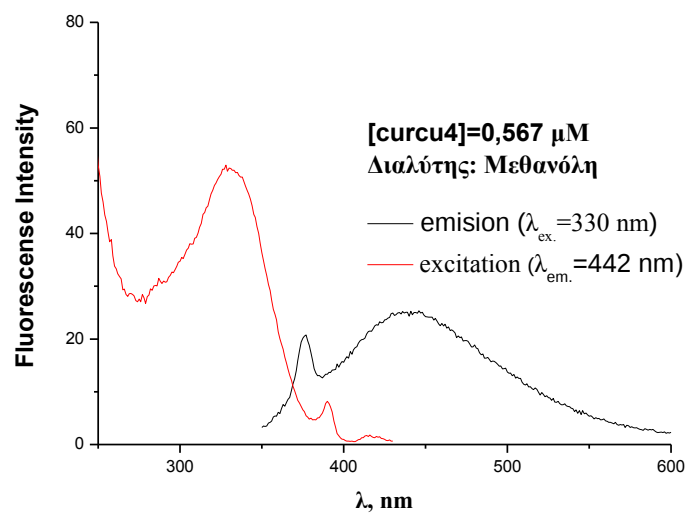
Σχήμα 22: Φάσμα UV-Vis curcu4 (α) σε pH=6,06-12,59, (γ) σε pH=0,57-5,92, (β) διάγραμμα $A=f(\text{pH})$ από δεδομένα (α), (δ) διάγραμμα $A=f(\text{pH})$ από δεδομένα (γ).

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 22 (α), καθώς γίνεται προσθήκη υδατικού διαλύματος NaOH και αυξάνεται το pH παρατηρούμε στο φάσμα UV-Vis της curcu4 την ύπαρξη ισοσβεστικού σημείου. Συνεπώς, συμπεραίνουμε ότι υπάρχει ισορροπία μεταξύ δύο κυρίως μοριακών ειδών και συγκεκριμένα υπάρχει ισορροπία μεταξύ της ιοντισμένης μορφής της curcu4 και της μη ιοντισμένης μορφής της. Επιπλέον, παρατηρείται μετατόπιση κατά 38 nm σε μεγαλύτερα μήκη κύματος της κορυφής στα 330 nm λόγω ιοντισμού της curcu4. Για να προσδιορισθεί το pK_a της curcu4 αρκεί να γίνει ένα διάγραμμα της απορρόφησης στα 368 nm της curcu4 συναρτήσει του pH (βλ. Σχήμα 21 β). Τα pK_a που προκύπτουν για την curcu4 λόγω ιοντισμού των δύο υδροξυλίων είναι $pK_{a2}=11,02$ και $pK_{a3}=12,05$ οι οποίες είναι συγκρίσιμες με τις τιμές pK_a για την κουρκουμίνη [118-125] και πιθανώς λόγω της πυριδίνης είναι $pK_{a1}=9,68$ [126-129].

Κατά την προσθήκη υδατικού διαλύματος HCl δεν παρατηρείται κάποιο ισοσβεστικό σημείο ούτε κάποια αξιόλογη μετατόπιση των ταινιών απορρόφησης της curcu4. Το διάγραμμα απορρόφησης στα 330 nm της curcu4 συναρτήσει του pH παρουσιάζεται στο Σχήμα 22 (δ), όπου παρατηρείται αύξηση της έντασης της απορρόφησης στα 427 nm καθώς μειώνεται το pH. Βέβαια, από το διάγραμμα αυτό δεν προσδιορίζεται κάποια τιμή pK_a της curcu4, αφού η καμπύλη που προκύπτει είναι ευθεία γραμμή και όχι σιγμοειδής καμπύλη.

5.2.5 Φθορισμομετρία (Fluorescence)

Μια άλλη τεχνική που εφαρμόστηκε για το χαρακτηρισμό της curcu4 είναι η φθορισμομετρία. Το φάσμα εκπομπής και διέγερσης της curcu4 σε μεθανόλη παρουσιάζονται στο Σχήμα 23 και στον Πίνακα 8 συνοψίζονται τα μήκη κύματος εκπομπής της curcu4 στο συγκεκριμένο διαλύτη.



Σχήμα 23: Φάσμα φθορισμού της curcu4 σε μεθανόλη.

Πίνακας 8: Μήκη κύματος εκπομπής για την curcu4 σε $\lambda_{ex.}$ =330 nm.

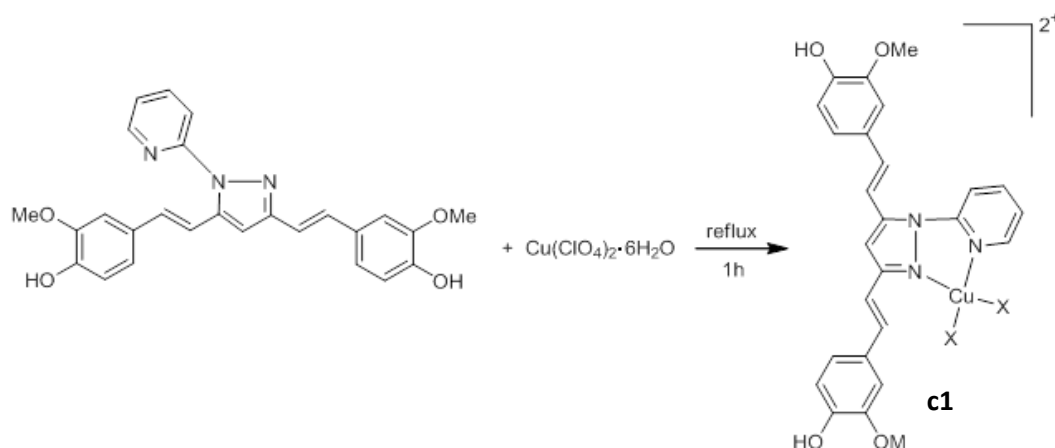
Ένωση	Μήκος κύματος εκπομπής, nm
Curcu4	375, 442

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ Cu(II) ΜΕ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ ΤΗΝ curcu4

6.1 Σύνθεση του συμπλόκου του Cu(II) με την curcu4, **c1**

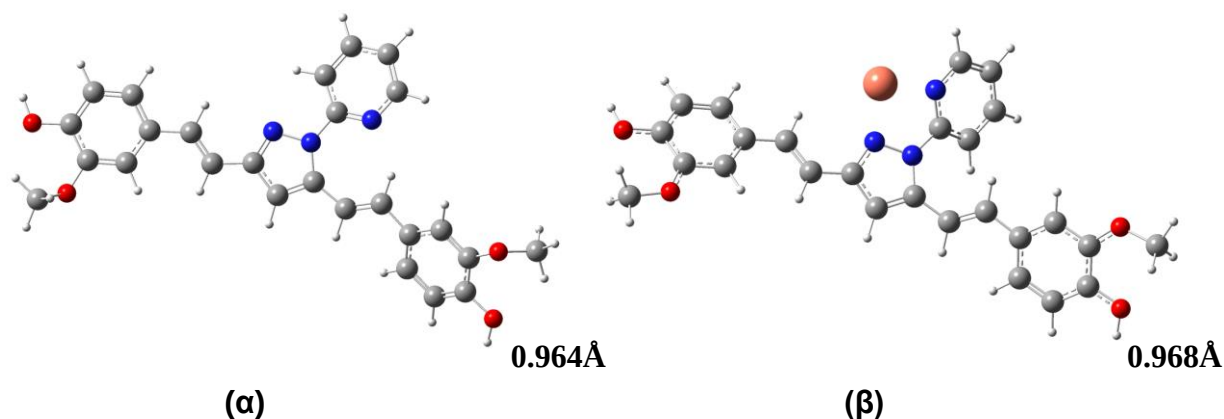
Η σύνθεση του επιθυμητού συμπλόκου πραγματοποιήθηκε ως εξής: σε μια σφαιρική φιάλη των 100 mL διαλύθηκαν 100,0 mg (0,22 mmol) της curcu4 σε 5 mL αιθανόλης σε σταθερή θερμοκρασία 60°C και προστέθηκε σε αυτό 5 mL αιθανολικού διαλύματος $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (81,5 mg (0,22 mmol) $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Πραγματοποιήθηκε θέρμανση με αναρροή στους 60°C για 1 ώρα, όπου καταβυθίστηκε καφέ στερεό. Ύστερα, έγινε διήθηση του καφέ στερεού και έκπλυσή του με κρύα αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 48%. Η σύνθεση του προαναφερόμενου συμπλόκου φαίνεται και σχηματικά στο Σχήμα 24.



Σχήμα 24: Σύνθεση του συμπλόκου του Cu(II) με την curcu ...

Λόγω απουσίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων τα X δεν μπορούν να καθοριστούν με βεβαιότητα, αλλά πιθανολογείται ότι τα X είναι μόρια νερού ή μόρια διαλύτη. Τα X δεν είναι υπερχλωρικά ιόντα διότι στο φάσμα IR οι δονήσεις τάσης του Cl-O (βλ. §6.2.2) δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη μετατόπιση με βάση βιβλιογραφικές τιμές υπερχλωρικών ιόντων που λειτουργούν ως αντισταθμιστικά ιόντα και δεν συμπλέκονται με το μέταλλο. Το σύμπλοκο αυτό είναι διαλυτό σε DMSO ενώ έχει περιορισμένη διαλυτότητα σε μεθανόλη. Το σύμπλοκο για λόγους συντομίας θα αναφέρεται ως **c1**.

Για το **c1** και την curcu4 πραγματοποιήθηκαν θεωρητικοί υπολογισμοί και βρέθηκε ότι η συμπλοκοποίηση επηρεάζει την απόσταση O-H στον αρωματικό δακτύλιο του υποκαταστάτη, όπως αυτό φαίνεται στο Σχήμα 25, οπότε αναμένεται να επηρεάζονται και τα pK_a της curcu4, το οποίο εξετάζεται παρακάτω.



Σχήμα 25: Θεωρητικοί υπολογισμοί για την απόσταση O-H για (α) την curcu4 και (β) το c1.

Από τους θεωρητικούς υπολογισμούς προέκυψε ότι το μήκος δεσμού του δεσμού O-H του αρωματικού δακτυλίου είναι διαφορετικό στην περίπτωση του c1 (βλ. Σχήμα 25 β) απ' ότι στην περίπτωση της curcu4 (βλ. Σχήμα 25 α). Το μήκος δεσμού του O-H της φαινολικής υδροξυλομάδας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης του βαθμού συζυγίας που αναπτύσσεται στο μόριό μας. Η διαφορά του μήκους του δεσμού O-H οφείλεται στο γεγονός ότι το ηλεκτρονιακό νέφος του οξυγόνου στην περίπτωση του c1 είναι περισσότερο μετατοπισμένο προς το σκελετό της curcu4, συμμετέχοντας έτσι περισσότερο στο συζυγιακό σύστημα του μορίου, απ' ότι στην περίπτωση της curcu4. Κάτι ανάλογο έχει παρατηρηθεί συγκρίνοντας τα 1:1 σύμπλοκα του Zn(II) ή Cu(II) με την φυσική κουρκουμίνη [191], όπου στο σύμπλοκο του Zn(II) παρατηρήθηκε μείωση του μήκους του δεσμού αυτού, ενώ στο αντίστοιχο σύμπλοκο του Cu(II) αύξηση. Η διαφορά αυτή αποδόθηκε στην διαφορετική γεωμετρία των συμπλόκων.

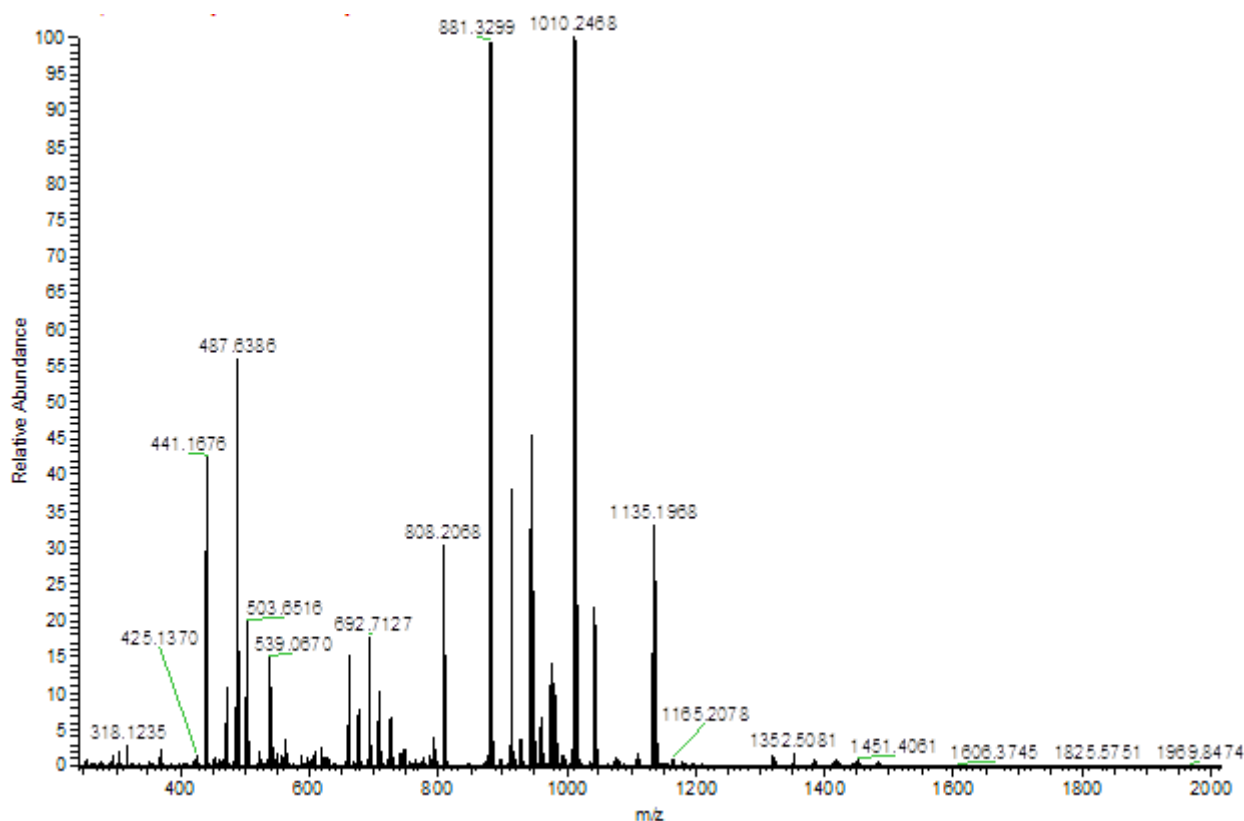
Σύμφωνα με τα παραπάνω, αναμένεται το πρωτόνιο του φαινολικού υδροξυλίου να αποσπάται ευκολότερα στην περίπτωση του συμπλόκου, c1. Αυτό βέβαια θα μελετηθεί πειραματικά και παρακάτω υπολογίζοντας το pK_a στην περίπτωση του συμπλόκου. Επίσης, αξίζει να παρατηρήσουμε ότι κατά τη συμπλοκοποίηση του Cu(II) με την curcu4 μέσω των αζώτων της πυριδινικής και πυραζολικής ομάδας της, παρατηρείται

απεντοπισμός των ηλεκτρονίων στους διπλούς δεσμούς της πυραζολικής ομάδας με αποτέλεσμα να μην είναι σαφής η ύπαρξη απλού ή διπλού δεσμού στην πυραζολική ομάδα του υποκαταστάτη κατά τη συμπλοκοποίηση.

6.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου του Cu(II) με την curcu4

6.2.1 Φασματοσκοπία Μάζας (Mass Spectrometry, MS)

Το φάσμα μάζας του συμπλόκου παρουσιάζεται στο Σχήμα 26.



Σχήμα 26: Φάσμα MS για το c1 σε διαλύτη μεθανόλη.

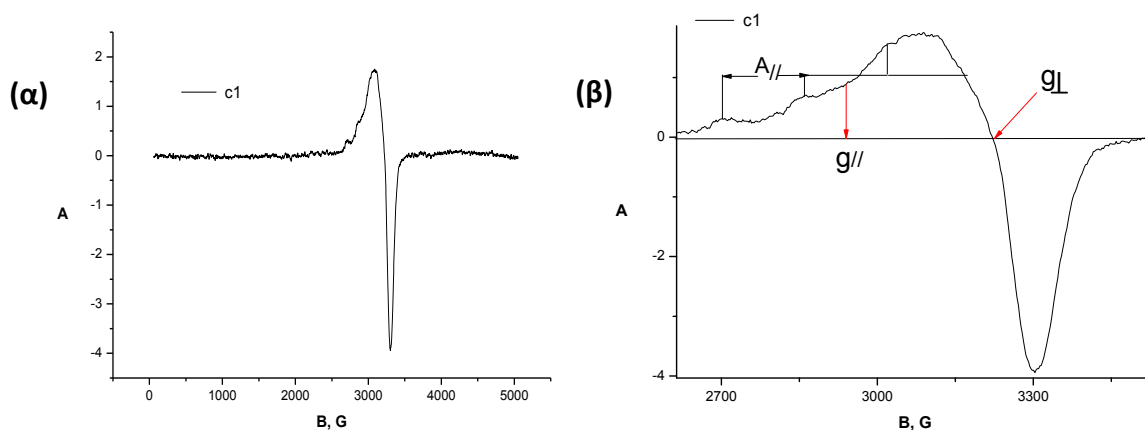
Το κυριότερο θραύσμα του c1 φαίνεται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Τα κυριότερα θραύσματα του c1.

	Formula	Theoretical	Experimental	Delta ppm
$[M]^+$	C ₂₆ H ₂₃ Cu N ₃ O ₄ Cl	539,0670	539,0668	0,350

6.2.2. Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR)

Το φάσμα EPR για το c1 παρουσιάζεται στο Σχήμα 27.



Σχήμα 27: Φάσμα X-band EPR (α) από 0-5000 G και (β) σε μεγέθυνση για το c1.

Για την ανάλυση του φάσματος EPR θα χρειαστούμε τις ακόλουθες σχέσεις:

$$E = h\nu = g\mu_B B \rightarrow g = \frac{h\nu}{\mu_B B}, \quad G = (g_{||} - 2)/(g_{\perp} - 2) \quad (\text{εξίσωση Hathaway [130]}), \quad f = \frac{g_{||}}{A_{||}},$$

$$\alpha^2 = (A_{||}/0,036) + (g_{||} - 2,0023) + 3/7(g_{\perp} - 2,0023) + 0,04 \quad (\text{εξίσωση Kivelson-Neiman [130, 131]}),$$

$$K_{||}^2 = (g_{||} - 2,0023) \cdot E_{d-d}/8\lambda_0, \quad K_{\perp}^2 = (g_{\perp} - 2,0023) \cdot E_{d-d}/2\lambda_0, \quad K_{||} = \alpha^2 \cdot \beta^2, \quad K_{\perp} = \alpha^2 \cdot \gamma^2,$$

Όπου: h : η σταθερά Planck και ίση με $6,62606957 \cdot 10^{-34}$ J·s, ν : η συχνότητα του πεδίου (s^{-1}) και ίση με $9,41675504 \cdot 10^9$ s^{-1} , μ_B : η μαγνητόνη Bohr και ίση με $9,27400968 \cdot 10^{-24}$ J·T $^{-1}$, B : η ένταση του μαγνητικού πεδίου σε Tesla, $K_{||}$, $K_{\perp}$: παράμετροι τροχιακής μείωσης (orbital reduction factors), E_{d-d} : η ενέργεια της d-d μετάπτωσης στο σύμπλοκο c1, λ_0 : τη σταθερά σύζευξης spin-orbit ενός ηλεκτρονίου για το ελεύθερο ιόν και ίση με 828 cm $^{-1}$, α^2 , β^2 , γ^2 : παράμετροι που σχετίζονται με την ομοιοπολικότητα του εντός επιπέδου σ-δεσμού, και του εντός και εκτός επιπέδου π-δεσμού αντίστοιχα.

Από την ανάλυση του φάσματος EPR και με τη χρήση των παραπάνω εξισώσεων προέκυψαν τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στον Πίνακα 10.

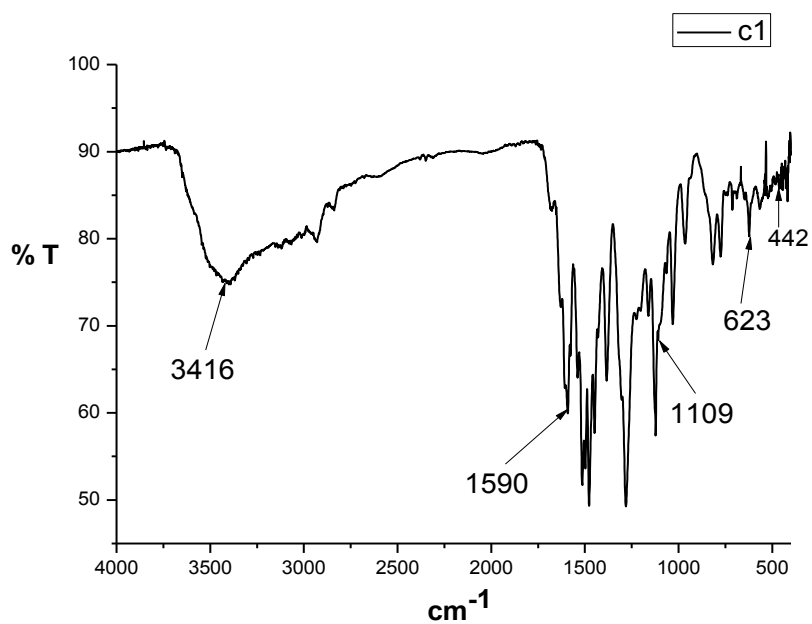
Πίνακας 10: Αποτελέσματα EPR.

	$g_{//}$	$g_{\perp}$	$A_{//} \cdot 10^4 (\text{cm}^{-1})$	G	f(cm)	$K_{//}$	$K_{\perp}$	α^2	β^2	γ^2
c1	2,280	2,090	172	3,11	132,43	0,827	0,938	0,836	0,984	-1

Από ένα φάσμα EPR μπορούμε να βγάλουμε πολλά συμπεράσματα για την δομή του υπό μελέτη συμπλόκου. Όπως γίνεται αντιληπτό και από τον Πίνακα 10 το $g_{//}$ και το $g_{\perp}$ έχουν τιμές κοντά στο 2 με το $g_{//} > g_{\perp}$ οπότε η γεωμετρία του συμπλόκου προτείνεται να είναι επίπεδη παραμορφωμένη τετραγωνική. Επειδή το $g_{//} > g_{\perp} > 2,0023$ συμπεραίνουμε ότι το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο του Cu(II) είναι εντοπισμένο στο τροχιακό $d_{x^2-y^2}$. Επιπλέον, επειδή το $g_{//} < 2,3$ συμπεραίνουμε ότι ο δεσμός μετάλλου-υποκαταστάτη έχει περισσότερο ομοιοπολικό χαρακτήρα. Η τιμή του $A_{//}$ είναι σχετικά μεγάλη και αυτό είναι ενδεικτικό της σύμπλεξης του μετάλλου μέσω των αζώτων και όχι για παράδειγμα μέσω των οξυγόνων όπου θα παρατηρούνταν χαμηλότερες τιμές του $A_{//}$. Ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει από την ανάλυση του φάσματος EPR είναι ότι δεν σχηματίζονται διμερή διότι δεν παρατηρείται κάποιο σήμα σε $g=4$. Επιπροσθέτως, επειδή ο παράγοντας $G < 4$ συμπεραίνουμε ότι υπάρχει κάποια διαμοριακή αλληλεπίδραση και αυτό πιθανώς να οφείλεται σε «πακετάρισμα» των μορίων λόγω της επίπεδης τετραγωνικής γεωμετρίας που υιοθετούν. Εξαιτίας της τιμής του παράγοντα f ($f=132,43$ cm) που ανήκει στην κλίμακα 90-140 και να πλησιάζει την τιμή 140 συμπεραίνεται και πάλι ότι η γεωμετρία του συμπλόκου είναι παραμορφωμένη επίπεδη τετραγωνική [131-134]. Επιπλέον, σημαντικές πληροφορίες μπορούμε να πάρουμε για τους π-δεσμούς του συμπλόκου του χαλκού από τις τιμές των $K_{//}$ και $K_{\perp}$. Πιο συγκεκριμένα, επειδή το $K_{//} < K_{\perp}$ οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι οι π-δεσμοί στο σύμπλοκο είναι εντός επιπέδου. Τέλος, επειδή όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι τιμές των α^2 , β^2 , γ^2 σχετίζονται με την ομοιοπολικότητα των σ-και π-δεσμών, μπορούμε να συμπεράνουμε για τη φύση των δεσμών ότι οι σ-δεσμοί εντός επιπέδου στο σύμπλοκο έχουν περισσότερο ομοιοπολικό χαρακτήρα απ' ότι ιοντικό διότι το $\alpha^2 < 1$, ενώ οι π-δεσμοί εντός επιπέδου έχουν περισσότερο ιοντικό χαρακτήρα διότι η τιμή του β^2 πλησιάζει την τιμή 1. Γενικά, στον καθαρό σ-ομοιοπολικό δεσμό η τιμή της παραμέτρου α^2 είναι μικρότερη του 0,5 ενώ όσο η τιμή αυτή προσεγγίζει την μονάδα τόσο περισσότερο ιοντικό χαρακτήρα έχει ο δεσμός [130, 131, 135].

6.2.3 Φασματοσκοπία IR

Το φάσμα IR που λήφθηκε για το c1 παρουσιάζεται στο Σχήμα 28.



Σχήμα 28: Φάσμα IR για το c1.

Οι αποδόσεις των ταινιών του φάσματος IR του **c1** (βλ. Σχήμα 28) συνοψίζονται στον Πίνακα 11 [101, 136-142].

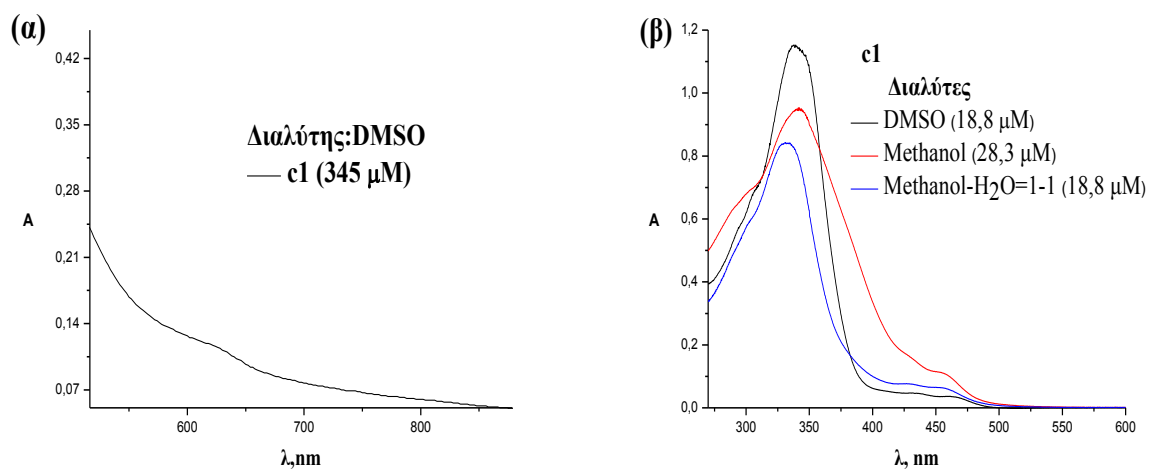
Πίνακας 11: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR της ουσίας c1.

Κυματαριθμός, cm^{-1}		
curcu4	c1	Απόδοση
3416	3419	δόνηση τάσης δεσμού O-H
1585	1590	δόνηση τάσης δεσμού C=N
1541, 1510, 1472, 1448, 1430, 959	1536, 1496, 1479, 1447, 1429, 963	δονήσεις τάσεως C=C αρωματικού δακτυλίου 2- μονοϋποκατεστημένης πυριδίνης
1278	1279	δόνηση τάσης δεσμών φαινολικών C-O
1032	1030	δόνηση τάσης δεσμών Μεθόξυ C-O
850, 878, 739	845, 869, 740	δόνηση τάσης δεσμών αρωματικών C-H, 1,2,4-τριϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου
-	623, 1109	Δόνηση τάσης δεσμού Cl-O
-	442	Δόνηση τάσης δεσμού Cu-N

Το φάσμα IR επιβεβαιώνει ότι ο Cu (II) συμπλέκεται με την curcu4 μέσω των 2 αζώτων (της πυριδίνης και του πυραζολίου). Αυτό γίνεται αντιληπτό διότι οι ταινίες που επηρεάζονται περισσότερο αφορούν το δεσμό C=N και C=C τόσο της πυριδίνης όσο και του πυραζολίου, καθώς επίσης και επειδή εμφανίζεται κορυφή που αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού Cu-N. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι τα υπερχλωρικά ανιόντα δρουν ως αντισταθμιστικά και δεν συμπλέκονται στο σύμπλοκο διότι οι δονήσεις τάσης του δεσμού Cl-O δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη μετατόπιση σε σχέση με τα ελεύθερα υπερχλωρικά ανιόντα [136-142].

6.2.4 Φασματοσκοπία UV-Vis

Άλλη μία τεχνική που εφαρμόστηκε για το χαρακτηρισμό του **c1** είναι η φασματοσκοπία UV-Vis. Τα φάσματα UV-Vis για το c1 παρουσιάζονται στο Σχήμα 29.



Σχήμα 29: Φάσμα UV-Vis του c1 σε διαλύτη DMSO σε περιοχή (α) 500-1100 nm και (β) 270-600 nm.

Στον Πίνακα 12 συνοψίζονται οι κορυφές του **c1** στο φάσμα UV-Vis.

Πίνακας 12: Οι ταινίες απορρόφησης του c1.

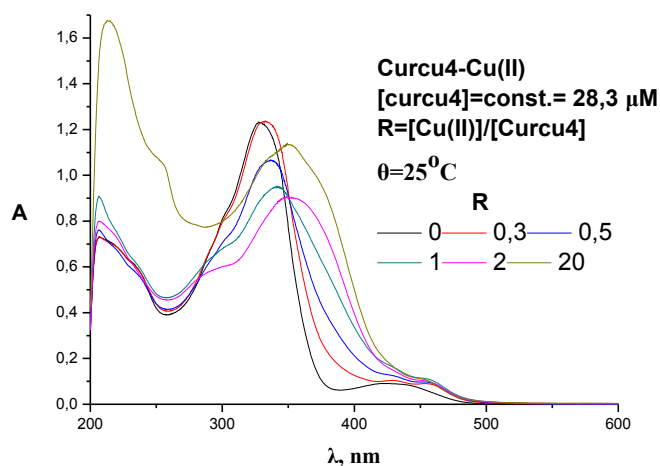
Διαλύτης	λ , nm	$\epsilon \cdot 10^{-3}$, $M^{-1}cm^{-1}$	Θεωρητικά αναμενόμενα λ , nm
DMSO	628	0,341	637,76
	293 (sh), 305 (sh)	30,2, 36,0	-
	339	61,2	336,26
	433, 464	2,5, 1,9	409,91, 475,43
Μεθανόλη	287 (sh), 301 (sh)	33,1, 36,1	-
	342	33,7	336,26
	427, 455	5,9, 3,9	409,91, 475,43
Μεθανόλη-H ₂ O 1-1	288 (sh), 300 (sh)	24,5, 30,6	-
	332	44,7	336,26
	427, 456	4,1, 3,4	409,91, 475,43

Από τον Πίνακα 12 συμπεραίνουμε ότι η πολικότητα του διαλύτη και σε αυτήν την περίπτωση όπως και στην περίπτωση της curcu4 επηρεάζει άμεσα την ένταση των κορυφών καθώς και το μήκος κύματος της ταινίας απορρόφησης. Συνεπώς, εμφανίζεται το φαινόμενο του διαλυτοχρωμισμού και συγκεκριμένα παρατηρείται θετικό διαλυτοχρωμικό φαινόμενο όπως και στην περίπτωση της curcu4 [102, 109-119]. Επίσης, γίνεται αντιληπτό ότι η κορυφή του υποκαταστάτη (~333 nm) η οποία μετατοπίζεται αισθητά (έως και ~10 nm) κατά τη συμπλοκοποίηση με το χαλκό (II) αφορά όλο το συζυγιακό σύστημα μαζί με την ομάδα του πυραζολίου και της πυριδίνης στο μόριο του υποκαταστάτη, σύμφωνα με τους θεωρητικούς υπολογισμούς. Συνεπώς, ενισχύεται η άποψη ότι η συμπλοκοποίηση του χαλκού (II) με την curcu4 γίνεται μέσω των δύο αζώτων (της πυριδίνης και του πυραζολίου).

Με τη βοήθεια θεωρητικών υπολογισμών βρέθηκαν τα τροχιακά που συμμετέχουν σε κάθε μετάπτωση (βλ. Παράρτημα II).

6.2.4.1 Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του συμπλόκου c1 στην περιοχή απορρόφησης του υποκαταστάτη (200-600 nm).

Τα φάσματα UV-Vis που λήφθηκαν για το c1 παρουσιάζονται στο Σχήμα 30.

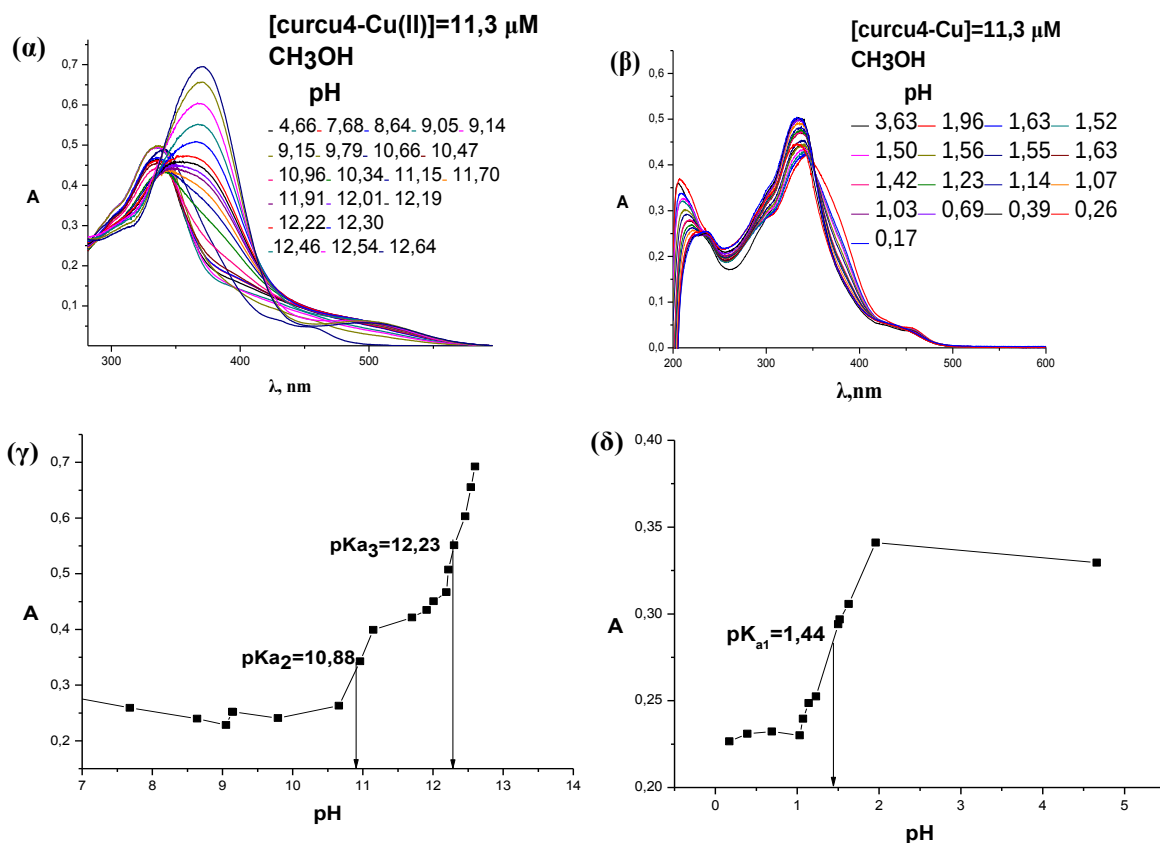


Σχήμα 30: Φάσμα UV-Vis για λόγους $[Cu]/[Curcu4] = 0, 0,3, 0,5, 1, 2$ και 20 , σε διαλύτη μεθανόλη στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Από το Σχήμα 30 γίνεται αντιληπτό ότι όσο αυξάνεται η ποσότητα του διαλύματος των ιόντων του Cu(II) το μέγιστο της απορρόφησης (330 nm) της curcu4 μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (red shift), (από $330\text{ nm} \rightarrow 352\text{ nm}$) με ταυτόχρονη μείωση της έντασής της καθώς και εμφάνιση ώμου στα 377 nm . Επομένως, και σε αυτήν την περίπτωση γίνεται κατανοητό ότι η σύμπλεξη των ιόντων Cu(II) με την curcu4 επηρεάζει αισθητά την ταινία απορρόφησης στα $\sim 330\text{ nm}$ που όπως προαναφέρθηκε αυτή η ταινία απορρόφησης αφορά όλο το συζυγιακό σύστημα στο μόριο του υποκαταστάτη καθώς και την ομάδα του πυραζολίου και της πυριδίνης της curcu4. Αυτό βέβαια είναι λογικό, εφόσον η συμπλοκοποίηση των ιόντων του χαλκού με την curcu4 γίνεται μέσω των αζώτων της πυριδινικής και πυραζολικής ομάδας της curcu4.

6.2.4.2 Προσδιορισμός pK_a του c1

Τα φάσματα τα οποία λήφθηκαν για τον προσδιορισμό pK_a της curcu4 κατά τη συμπλοκοποίησή της με το Cu(II) , παρουσιάζονται στο Σχήμα 31.



Σχήμα 31: (α) Φάσμα UV-Vis του **c1** προσθέτοντας διάλυμα NaOH (β) Φάσμα UV-Vis του **c1** προσθέτοντας διάλυμα HCl (γ), (δ) διάγραμμα απορροφήσεων από τα (α), (β) αντίστοιχα συναρτήσεως του pH.

Στο παραπάνω φάσμα UV-Vis για το **c1** παρατηρούμε την ύπαρξη ενός ψεύδο-ισοσβεστικού σημείου καθώς και ενός ισοσβεστικού σημείου. Επομένως, γίνεται αντιληπτό και σε αυτήν την περίπτωση, όπως και στην περίπτωση της curcu4, ότι υπάρχει ισορροπία μεταξύ δυο κυρίως μοριακών ειδών και συγκεκριμένα υπάρχει ισορροπία μεταξύ της ιοντισμένης και μη ιοντισμένης μορφής της curcu4 κατά τη σύμπλεξή της με το Cu(II). Επίσης, παρατηρείται η δημιουργία νέας κορυφής στα 370 nm, καθώς επίσης και στα 498 nm. Από το φάσμα αυτό κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα της απορρόφησης στα 370 nm συναρτήσεως του pH (βλ. Σχήμα 31 γ) όπου προσδιορίζονται τα pK_{a2}=10,88 και pK_{a3}=12,23 στην περίπτωση του **c1**. Κάτι αντίστοιχο έγινε και με προσθήκη υδατικού διαλύματος HCl. Σε αυτήν την περίπτωση, η ταινία απορρόφησης στα 337 nm παρουσίασε μια μετατόπιση κατά 7 nm προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (red shift). Από το φάσμα αυτό προέκυψε ένα διάγραμμα της απορρόφησης στα 330 nm συναρτήσεως του pH και προσδιορίστηκε ότι το pK_{a1}= 1,44

στην περίπτωση του **c1**. Οι τιμές pKa για την curcu4 και το c1 συνοψίζονται στον Πίνακα 13.

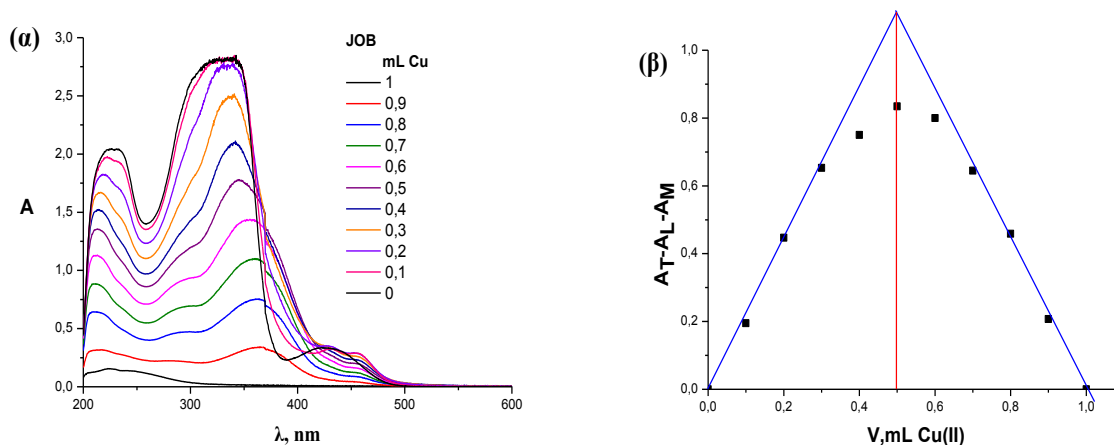
Πίνακας 13: Τιμές pKa για curcu4 και c1.

Ένωση	pKa		
Curcu4	9,68,	11,02,	12,05
C1	1,44,	10,88,	12,23

Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι η συμπλοκοποίηση επηρεάζει αρκετά τα pK_a του υποκαταστάτη. Η σημαντικότερη διαφορά βέβαια είναι για το pK_{a1} του οποίου η τιμή μειώνεται πάρα πολύ. Αυτό είναι αναμενόμενο γιατί αυτό το pK_{a1} αντιστοιχεί στην πυριδίνη [143-148] και ο χαλκός (II) συμπλοκοποιείται και μέσω του αζώτου της πυριδίνης της curcu4, οπότε είναι λογικό να το επηρεάσει τόσο πολύ. Επιπλέον, παρατηρείται ότι το pK_{a2} (pK_{a2}=10,88), που αφορά την αποπρωτονίωση του φαινολικού υδροξυλίου στο μόριο της curcu4, στην περίπτωση του **c1** μειώνεται ελαφρώς συγκριτικά με την curcu4 (pK_{a2}=11,02), οπότε συμπεραίνεται ότι γίνεται πιο όξινο το πρωτόνιο του συγκεκριμένου υδροξυλίου και απομακρύνεται πιο εύκολα. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία και με τους θεωρητικούς υπολογισμούς όπου η απόσταση του δεσμού O-H κατά τη συμπλοκοποίηση με το Cu(II) στο μόριο της curcu4 αυξάνεται ελαφρώς, οπότε αναμένεται να απομακρύνεται και πιο εύκολα το εν λόγω πρωτόνιο στην περίπτωση του συμπλόκου (βλ. §6.1).

6.2.4.3 Εύρεση στοιχειομετρίας συμπλόκου σε διάλυμα- Μέθοδος Job

Η μέθοδος Job χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της στοιχειομετρίας του συμπλόκου. Η στοιχειομετρία του συμπλόκου προσδιορίζεται από το διάγραμμα της απορρόφησης σε ένα μήκος κύματος, όπου απορροφά το σχηματιζόμενο σύμπλοκο και δεν απορροφούν ούτε το μέταλλο ούτε ο υποκαταστάτης, συναρτήσεως του όγκου του υποκαταστάτη που περιέχεται σε κάθε διάλυμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε μήκος κύματος 389,54 nm. Τα φάσματα UV-Vis που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση της στοιχειομετρίας του συμπλόκου παρουσιάζονται στο Σχήμα 32.



Σχήμα 32: (α) Φάσμα UV-Vis για τα διαλύματα Cu(II)-curcu4 (β) διάγραμμα απορροφήσεων συναρτήσει του όγκου του διαλύματος του Cu(II) από δεδομένα του (α).

Στο Σχήμα 32 παρουσιάζεται η καμπύλη συνεχών μεταβολών (διάγραμμα μεθόδου Job) στα 389,54 nm. Οι απορροφήσεις (A) είναι διορθωμένες ως προς την απορρόφηση της curcu4 στα συγκεκριμένα λ, σύμφωνα με τη σχέση:

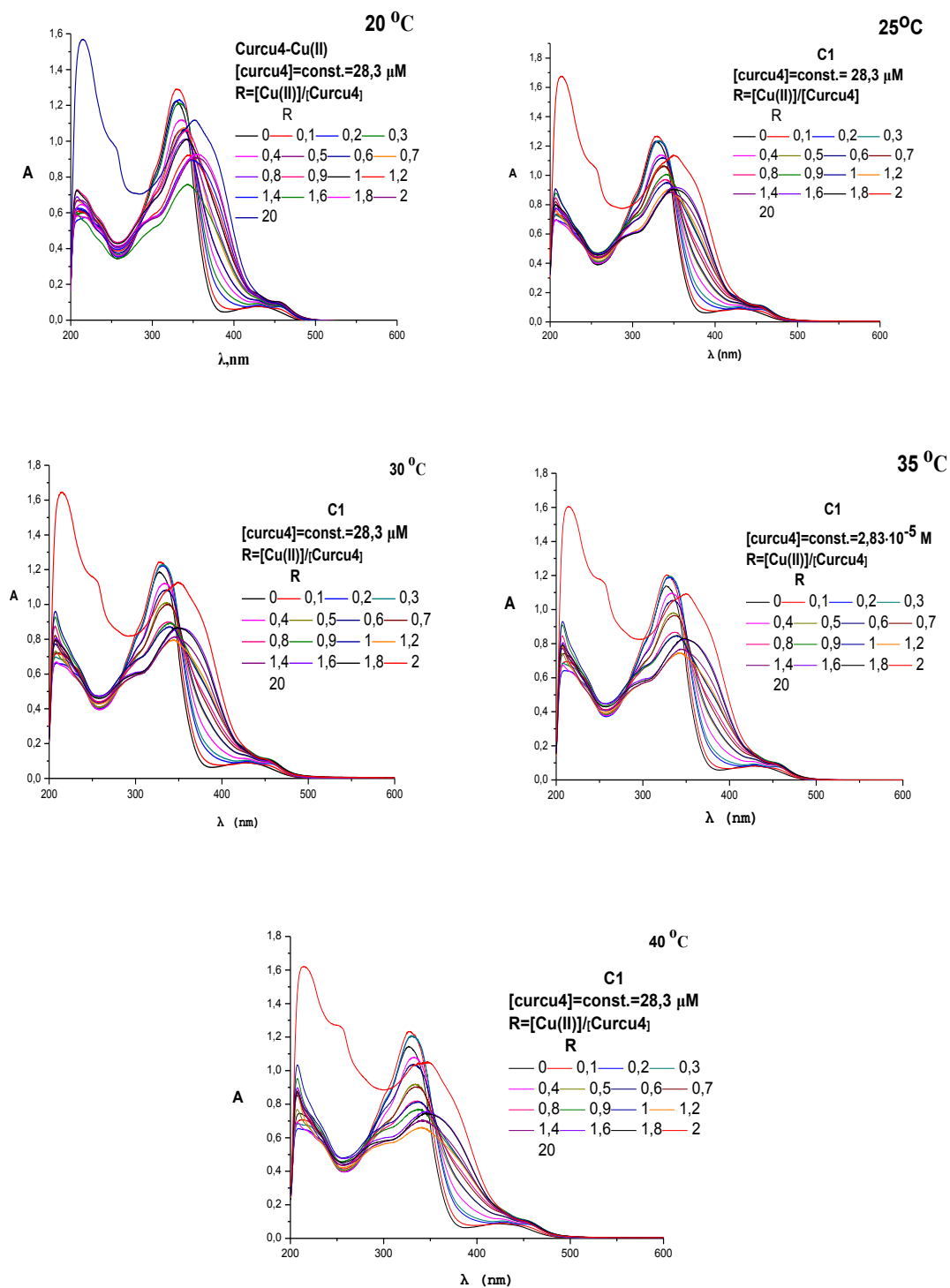
$$A_{\lambda \text{corr.}} = A_{\lambda} - (A_{oL} \times V_L / V_{oL})$$

Όπου **$A_{\lambda \text{corr.}}$** Η διορθωμένη τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος λ, **A_{λ}** η απορρόφηση του διαλύματος στο μήκος κύματος λ, **A_{oL}** η απορρόφηση στο μήκος κύματος λ του διαλύματος που περιέχει μόνο τον υποκαταστάτη L, **V_L** ο όγκος του διαλύματος του υποκαταστάτη που αναμίχθηκε με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος του μετάλλου ώστε να σχηματιστεί διάλυμα τελικού όγκου **$V_{oL} = V_L + V_M$** .

Όπως γίνεται κατανοητό και από το διάγραμμα (βλ. Σχήμα 32 β) η στοιχειομετρία του σχηματιζόμενου συμπλόκου είναι 1:1. Συνεπώς, ο Cu(II) συμπλέκεται με ένα μόριο curcu4 και όπως εξηγήθηκε και παραπάνω η σύμπλεξη γίνεται μέσω των 2 αζώτων του (της πυριδίνης και του πυραζολίου).

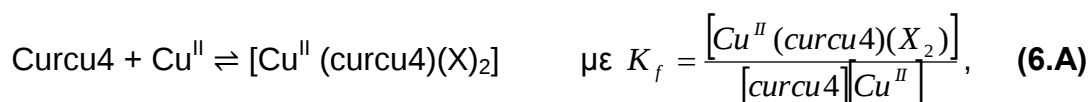
6.2.4.4 Προσδιορισμός σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου Cu(II)-curcu4

Ο προσδιορισμός της σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου έγινε με την βοήθεια των φασμάτων που παρουσιάζονται στο Σχήμα 33.



Σχήμα 33: Φάσμα UV-Vis Cu(II)-curcu4 σε διαλύτη μεθανόλη σε θερμοκρασίες 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C.

Η ισορροπία που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



Όπου $[\text{curcu4}]$, $[\text{Cu(II)}]$ και $[\text{Cu}^{\text{II}} (\text{curcu4})(\text{X})_2]$ οι συγκεντρώσεις της μη συμπλεγμένης curcu4, των μη συμπλεγμένων ιόντων Cu(II) και του συμπλόκου στο διάλυμα αντίστοιχα.

Η ολική απορρόφηση στα 352 nm, $(A_{352})_{\text{ολ}}$, είναι το άθροισμα των απορροφήσεων της ελεύθερης $[\text{curcu4}]$ και του συμπλεγμένου $[\text{Cu}^{\text{II}} (\text{curcu4})(\text{X})_2]$, αφού τα ιόντα Cu(II) δεν απορροφούν στη περιοχή αυτή.

Έτσι ισχύει:

$$A_{352} = \varepsilon_L \cdot [\text{curcu4}] \cdot b + \varepsilon_{\text{CuL}} \cdot [\text{Cu}(\text{curcu4})(\text{X})_2] \cdot b \quad (6.B)$$

Όπου ε_L και ε_{CuL} οι συντελεστές απορροφητικότητας στα 352 nm των curcu4 και του συμπλόκου αντίστοιχα και b η οπτική διαδρομή της κυψελίδας μέτρησης που στην περίπτωση μας ισούται με 1 cm.

Η τιμή του ε_L υπολογίζεται από την μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος με λόγο $r = [\text{Cu}]/[\text{curcu4}]_{\text{T}}=0/1$, όπου $[\text{curcu4}]_{\text{T}}=28,3 \mu\text{M}$. Υποθέτουμε ότι η απορρόφηση στα 352 nm για το φάσμα που έχει ληφθεί σε διάλυμα με μεγάλη περίσσεια Cu(II), $r=1/R = [\text{Cu}]/[\text{curcu4}]=20/1$ οφείλεται μόνο στο σύμπλοκο curcu4/Cu^{II}, αφού όλη η ποσότητα της curcu4 θα έχει συμπλεχθεί. Τότε η $[\text{Cu}^{\text{II}} (\text{curcu4})(\text{X})_2] = 28,3 \mu\text{M}$ και υπολογίζεται έτσι η τιμή του συντελεστή απορροφητικότητας του συμπλόκου ε_{CuL} .

Η ολική (αναλυτική) συγκέντρωση της curcu4 δίνεται από τη σχέση:

$$[\text{curcu4}]_{\text{T}} = [\text{curcu4}] + [\text{Cu}^{\text{II}} (\text{curcu4})(\text{X})_2] = 28,3 \mu\text{M}, \quad (6.Γ)$$

Η ολική (αναλυτική) συγκέντρωση των ιόντων Cu^{II} δίνεται από τις σχέσεις:

$$[\text{Cu}^{\text{II}}]_{\text{T}} = r \times 2,83 \times 10^{-5} M \quad (6.Δ)$$

$$[\text{Cu}^{\text{II}}]_{\text{T}} = [\text{Cu}^{\text{II}}] + [\text{Cu}^{\text{II}} (\text{curcu4})(\text{X})_2], \quad (6.Ε)$$

Λύνοντας τη σχέση 6.Γ ως προς $[\text{curcu4}]$ και αντικαθιστώντας την τιμή αυτή στη σχέση 6.Β υπολογίζεται κάθε φορά η συγκέντρωση του $[\text{Cu}^{\text{II}} (\text{curcu4})(\text{X})_2]$ από τα φάσματα του Σχήματος 31 μετρώντας την απορρόφηση στα 352 nm. Γνωρίζοντας τις

τιμές της $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{curcu4})(\text{X})_2]$, από τις σχέσεις **6.Δ** και **6.Ε** υπολογίζουμε τη συγκέντρωση των $[\text{Cu}(\text{II})]$.

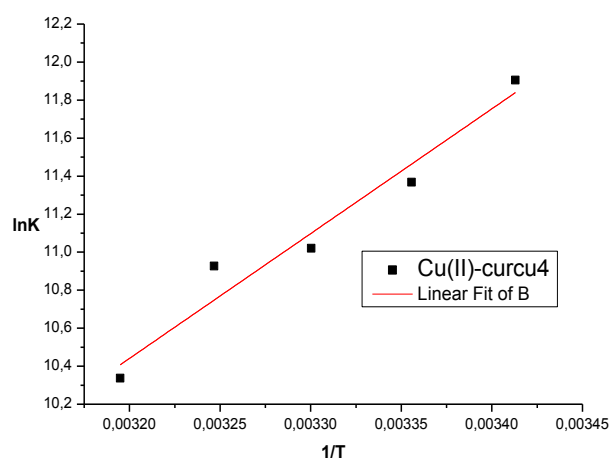
Οι σταθερές σχηματισμού K_f , που υπολογίζονται από την εξίσωση **6.Α**, για το σύμπλοκο του $\text{Cu}(\text{II})$ με στοιχειομετρία $\text{Cu}(\text{II}):\text{curcu4}=1:1$, σε διαλύτη μεθανόλη και σε διάφορες θερμοκρασίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Οι σταθερές σχηματισμού K_f ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$) και σε παρένθεση τα $\ln K_f$ σε μεθανόλη στις διάφορες θερμοκρασίες.

Θερμοκρασία	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
	$14,81\cdot 10^4$	$8,65\cdot 10^4$	$6,11\cdot 10^4$	$5,56\cdot 10^4$	$3,09\cdot 10^4$
	(11,9)	(11,37)	(11,02)	(10,93)	(10,34)

Οι τιμές των K_f και $\ln K_f$ είναι συγκρίσιμες με τις τιμές αντίστοιχων $\text{M}:\text{L}=1:1$ συμπλόκων του $\text{Cu}(\text{II})$ που συναντώνται στη βιβλιογραφία [140-144]. Παρατηρούμε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας οι τιμές των K_f μειώνονται, που σημαίνει ότι η ισορροπία **6.Α** είναι εξώθερμη.

Μπορούμε έτσι να υπολογίσουμε τα θερμοδυναμικά μεγέθη ΔG° , ΔS , ΔH με τη βοήθεια του διαγράμματος $\ln K_f=f(1/T)$ (βλ. Σχήμα 34), όπου K_f , είναι οι σταθερές σχηματισμού που προέκυψαν πειραματικά όπως παρουσιάστηκαν και παραπάνω και T οι αντίστοιχες θερμοκρασίες που λήφθηκαν τα φάσματα UV-Vis.



Σχήμα 34: Διάγραμμα $\ln K_f$ συναρτήσει του $1/T$.

Οι σχέσεις οι οποίες χρειάζονται για τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών μεγεθών είναι οι ακόλουθες:

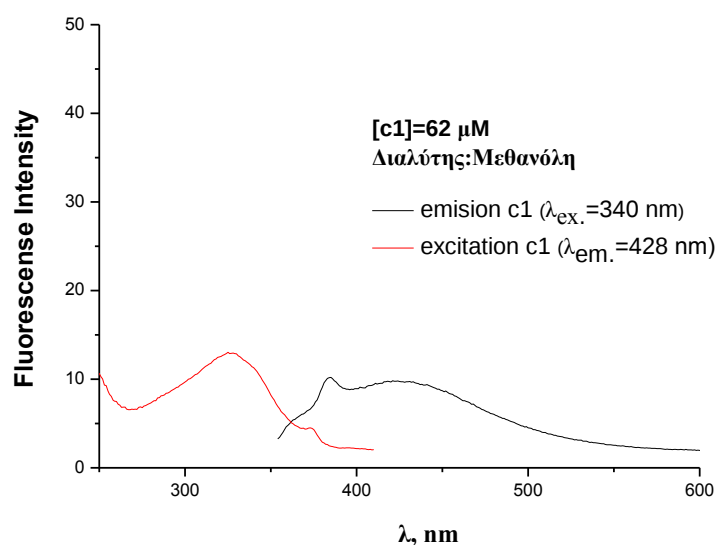
$$\ln K_f = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \text{ (6.ΣΤ)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \text{ (6.Ζ)}$$

Συνεπώς, από το παραπάνω διάγραμμα και με τη βοήθεια της σχέσης **(6.ΣΤ)** προκύπτει ότι $\Delta H = -54,59 \text{ kJ/mol}$, $\Delta S = -88,00 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ και χρησιμοποιώντας τη σχέση **(6.Ζ)** προκύπτει ότι $\Delta G^\circ = -28,37 \text{ kJ/mol}$. Συνεπώς, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η αντίδραση σχηματισμού του συμπλόκου είναι μια αυθόρμητη και εξώθερμη αντίδραση, εφόσον ΔG° και ΔH έχουν αρνητικές τιμές αντίστοιχα.

6.2.5 Φθορισμομετρία

Το φάσμα εκπομπής και διέγερσης του c1 σε διαλύτη μεθανόλη παρουσιάζεται στο Σχήμα 35.



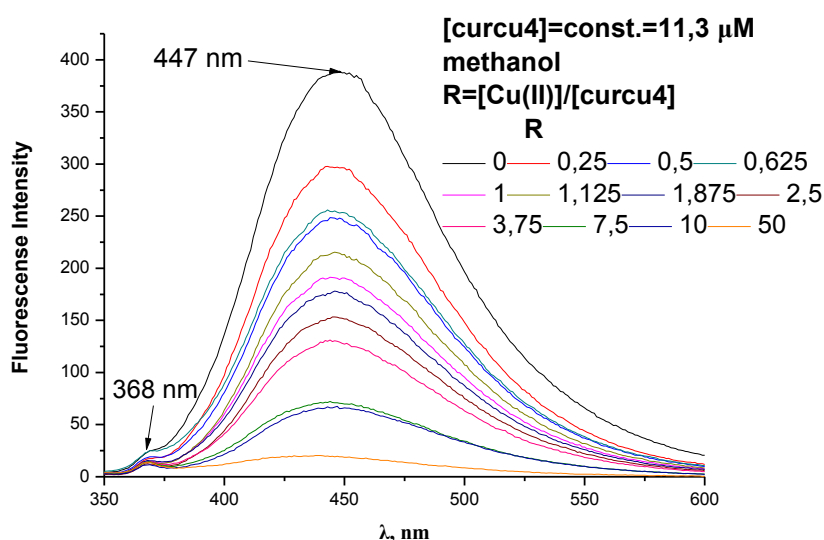
Σχήμα 35: Φάσμα εκπομπής και διέγερσης για το c1 σε διαλύτη μεθανόλη

$\lambda_{\text{ex.}}=340 \text{ nm.}$

Όπως προκύπτει από το φάσμα φθορισμού, το c1 εμφανίζει 2 μήκη κύματος εκπομπής (emission wavelength) στα 397 και στα 426 nm. Είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε ότι το διάλυμα μεθανόλης του συμπλόκου c1 χρειάστηκε να

παρασκευαστεί σε συγκέντρωση δεκαπλάσια από αυτήν του υποκαταστάτη curcu4 για να μετρηθεί μόλις η μισή ένταση φθορισμού.

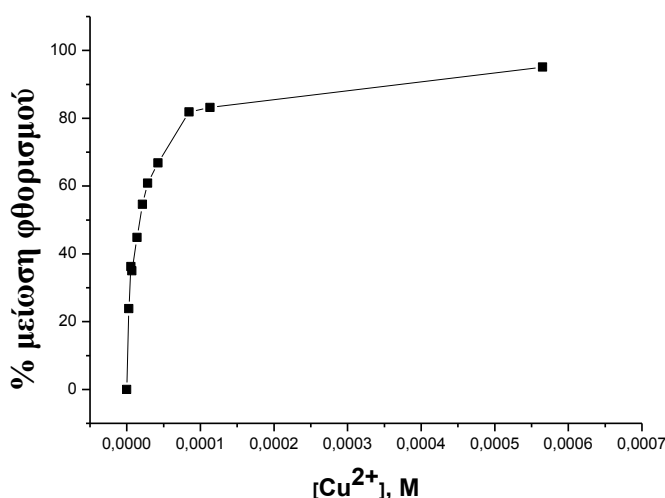
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η μεταβολή στο φθορισμό της curcu4 κατά τη συμπλοκοποίησή της παρουσία αυξανόμενης ποσότητας ιόντων Cu(II).



Σχήμα 36: Φάσμα φθορισμού curcu4 με προσθήκη ιόντων Cu(II), $\lambda_{\text{ex.}}=330$ nm.

Από το παραπάνω φάσμα φθορισμού που προέκυψε κατά τη μελέτη αυτή (βλ. Σχήμα 36), παρατηρούμε ότι η ένταση φθορισμού της curcu4 μειώνεται καθώς αυξάνεται η ποσότητα του διαλύματος του Cu(II), ενώ δεν παρατηρείται ιδιαίτερη μετατόπιση των μηκών κύματος εκπομπής προς υψηλότερα ή χαμηλότερα μήκη κύματος. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, το σχηματιζόμενο σύμπλοκο εμφανίζει δραματικά ασθενέστερη ένταση φθορισμού σε σχέση με τον αρχικό υποκαταστάτη curcu4. Κατά συνέπεια, είναι αναμενόμενο η προσθήκη ιόντων Cu(II) να οδηγούν σε αποσβέση του φθορισμού στο διάλυμα της αντίδρασης. Η μείωση της έντασης του φθορισμού της curcu4 γίνεται καλύτερα αντιληπτή στο Σχήμα 37. Γενικά, υπάρχουν 3 είδη απόσβεσης του φθορισμού, η στατική (static), η δυναμική (dynamic) και η φαινόμενη (apparent). Η απόσβεση (quenching) των ιόντων Cu(II) στο φθορισμό της curcu4 μπορεί να είναι ή στατική ή δυναμική, εξαιτίας της γραμμικής σχέσης του F_0/F συναρτήσει της συγκέντρωσης των ιόντων χαλκού (Cu^{2+}) (Σχήμα 38 α). Στη στατική απόσβεση (static

quenching) σχηματίζεται ένα μη φθορίζον σύμπλοκο ανάμεσα στο φθοροφόρο και τον αποσβέστη (quencher). Η αλληλεπίδραση του φθοροφόρου με τον αποσβέστη έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης εκπομπής και το ασύμπλεκτο φθοροφόρο φθορίζει κανονικά. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αποσβέστη, επηρεάζεται η ένταση εκπομπής αλλά όχι ο χρόνος ζωής εκπομπής επειδή υπάρχουν περισσότερες αλληλεπιδράσεις. Στην περίπτωση δυναμικής απόσβεσης (dynamic quenching), όλα τα μόρια του φθοροφόρου συγκρούονται με τα μόρια του αποσβέστη κατά τη διάρκεια της διέγερσης. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αποσβέστη (quencher) επηρεάζεται και η ένταση εκπομπής και ο χρόνος ζωής της εκπομπής. Συνήθως, στη δυναμική απόσβεση το μήκος κύματος του φθοροφόρου στο φάσμα απορρόφησης παραμένει αμετάβλητο. Στην περίπτωση του δικού μας συμπλόκου το μήκος κύματος απορρόφησης μεταβάλλεται (βλ. Σχήμα 30). Συνεπώς, υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να συμβαίνει στατική απόσβεση (static quenching) [149-157], αν και για να καταλήξουμε με σιγουριά στο είδος της απόσβεσης θα πρέπει να γίνει εκτενέστερη μελέτη.



Σχήμα 37: Διάγραμμα % μείωσης του φθορισμού συναρτήσει της [Cu(II)].

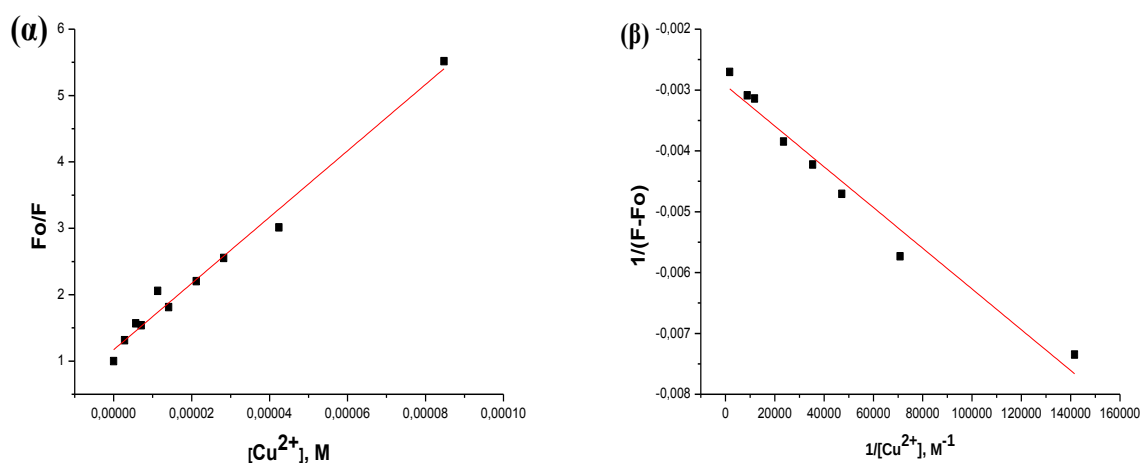
Επιπλέον, από τα φάσματα φθορισμού (βλ. Σχήμα 36) μπορεί να προσδιορισθεί η σταθερά Stern-Volmer (K_{sv}) και η σταθερά K_f χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες σχέσεις [155-167]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Cu^{2+}], \text{ (6.H) Stern-Volmer}$$

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{\{K_f (F_{\max} - F_0)[Cu^{2+}]\} + 1} \cdot \frac{1}{(F_{\max} - F_0)}, \quad (6.9)$$

Benesi-Hildebrand

Όπου: F_0 : η ένταση του φθορισμού στο διάλυμα μόνο της curcu4 ($R=0$), F : η ένταση φθορισμού των διαλυμάτων curcu4-Cu(II) στους διάφορους λόγους R . Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι η συνεισφορά του νεοσχηματιζόμενου συμπλόκου στις τιμές φθορισμού που μετρούνται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης θεωρείται αμελητέα, λαμβάνοντας υπόψη τις παρατηρήσεις σχετικά με την ένταση και τη συγκέντρωση των δύο ενώσεων. K_{sv} : η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer, K_f : η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου, c_1 , $F_{\max}$: η μέγιστη ένταση του φθορισμού σε διάλυμα curcu4-Cu(II). Συνεπώς, κατασκευάζοντας ένα διάγραμμα F_0/F συναρτήσει της $[Cu(II)]$ μπορούμε να προσδιορίσουμε την K_{sv} , η οποία θα ισούται με τη κλίση της ευθείας που θα προκύψει (βλ. (6.H)). Τη σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου, c_1 μπορούμε να την υπολογίσουμε μέσω του διαγράμματος $1/(F-F_0)$ συναρτήσει του $1/[Cu^{2+}]$.

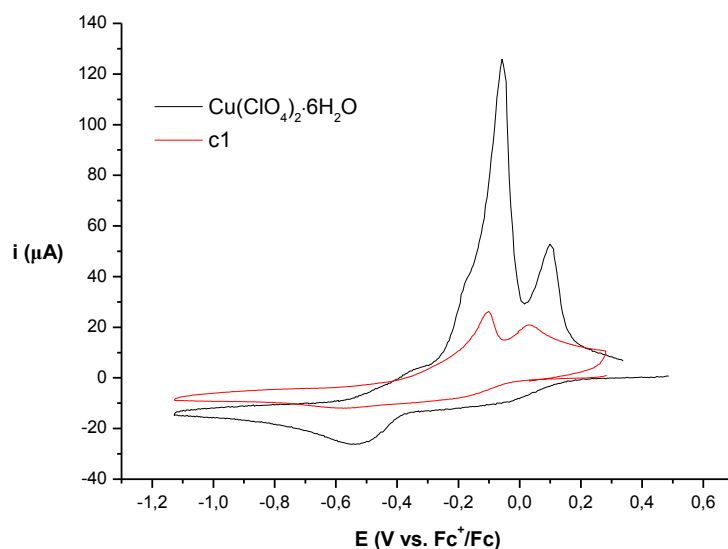


Σχήμα 38: (α) Διάγραμμα $F_0/F=f([Cu^{2+}])$, (β) Διάγραμμα $1/(F_0-F)=f(1/[Cu^{2+}])$.

Από το διάγραμμα του Σχήματος 38 (α) και χρησιμοποιώντας τη σχέση (6.H) προκύπτει ότι $K_{sv}=5,00 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ και από το διάγραμμα του Σχήματος 38 (β) και χρησιμοποιώντας τη σχέση (6.Θ) προκύπτει ότι $K_f=8,72 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

6.2.6 Κυκλική Βολταμετρία (Cyclic Voltammetry, CV)

Για να επιβεβαιωθεί ότι δεν αλλάζει ο αριθμός οξείδωσης του Cu(II) κατά τη σύμπλεξη του με την curcu4, αλλά και για να βρεθούν τα δυναμικά ανόδου και καθόδου για το χαρακτηρισμό του συμπλόκου. Τα κυκλικά βολταμμογραφήματα φαίνονται στο Σχήμα 39 και οι τιμές των δυναμικών στον Πίνακα 15.



Σχήμα 39: Κυκλικά βολταμμογραφήματα των (α) $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και (β) c1 σε MeOH (3 mM). Φέρων ηλεκτρολύτης: KClO_4 (0,5 M), ηλεκτρόδιο εργασίας: ηλεκτρόδιο δίσκου Pt, ηλεκτρόδιο αναφοράς: Ag/AgCl, ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s.

Πίνακας 15: Ηλεκτροχημικά δεδομένα για $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και c1.

	$E_{p,c}$ (mV)	$E_{p,a}$ (mV)
$\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-25, -521	-61, 99
c1	-148, -515	-106, 15

Από το παραπάνω κυκλικό βολταμμογράφημα συμπεραίνουμε ότι ο χαλκός (II) δεν αλλάζει οξειδωτική κατάσταση κατά τη σύμπλεξη του με την curcu4, παραμένει δηλαδή χαλκός (II). Οι οξειδώσεις και οι αναγωγές συνδέονται μεταξύ τους και το φαινόμενο

αυτό δεν είναι αντιστρεπτό. Κατά την αναγωγή του Cu(I) σε Cu(0) , ο Cu(0) εναποτίθεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας για αυτό παρατηρείται μη φαρανταϊκό ρεύμα. Επιπλέον, παρατηρείται κατά τη σύμπλεξη μετατόπιση των δυναμικών $E_{p,c}$ και $E_{p,a}$.

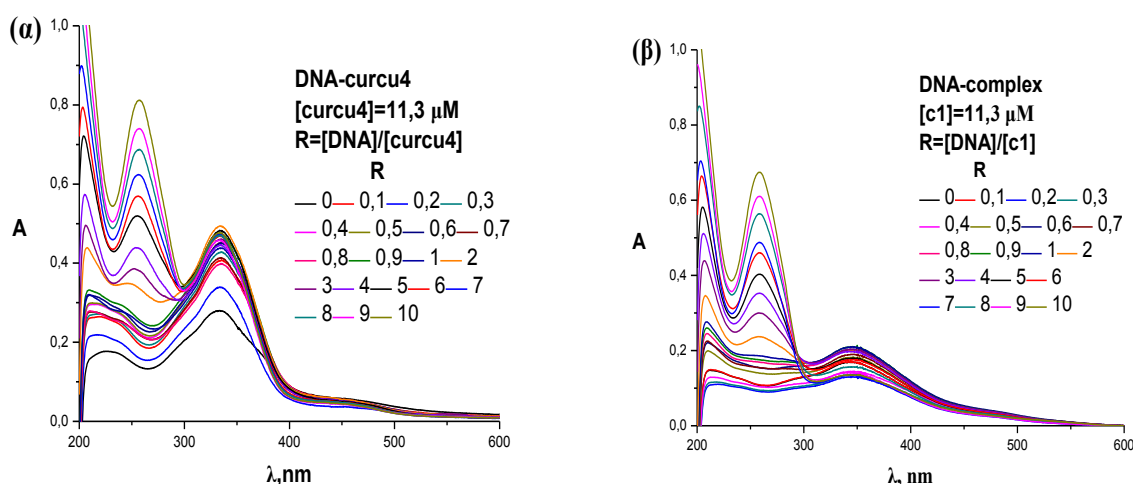
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ curcu4 ΚΑΙ ΤΟΥ c1 ΜΕ ΤΟ CT-DNA

7.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

7.1.1 Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση της curcu4 και του c1

Μια τεχνική για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση τόσο της curcu4 όσο και του c1 με το DNA είναι μέσω της φασματοσκοπίας UV-Vis [168-173]. Συγκεκριμένα, εκτός από το να καταλάβουμε αν υπάρχει οποιαδήποτε αλληλεπίδραση των ενώσεών μας με το DNA μας ενδιαφέρει να εξετάσουμε και πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδρασή τους μελετώντας τη σταθερά σύνδεσης των ενώσεων μας με το DNA (K_b) μέσω φασμάτων UV-Vis (βλ. Σχήμα 40) εφαρμόζοντας τη μέθοδο Scatchard.

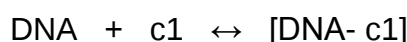
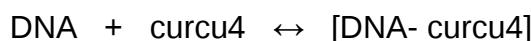


Σχήμα 40: Φάσμα UV-Vis: (α) DNA-curcu4 (β) DNA-c1.

Όπως γίνεται φανερό από το φάσμα UV-Vis του συστήματος DNA-curcu4 (βλ. Σχήμα 40 (α)) η ένταση της ταινίας απορρόφησης στα ~333 nm παρουσιάζει μια συνεχή αύξηση όσο προστίθεται ποσότητα DNA, σε αντίθεση με το σύστημα DNA-c1 (βλ. Σχήμα 40 (β)) όπου παρουσιάζει αύξηση η ένταση της ταινίας απορρόφησης στα ~343 nm για μικρούς λόγους R ($R=[DNA]/[c1]$), ενώ για μεγάλους λόγους παρατηρείται μείωση της έντασής της (υποχρωμισμός). Επομένως, γίνεται ξεκάθαρη η διαφορετική

αλληλεπίδραση της curcu4 και του c1 με το DNA. Συνήθως, η παρεμβολή οδηγεί σε μείωση έντασης στην ταινία απορρόφησης της με ταυτόχρονη μετατόπισή της σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, υπό μελέτη ένωσης με προσθήκη διαλύματος DNA [174].

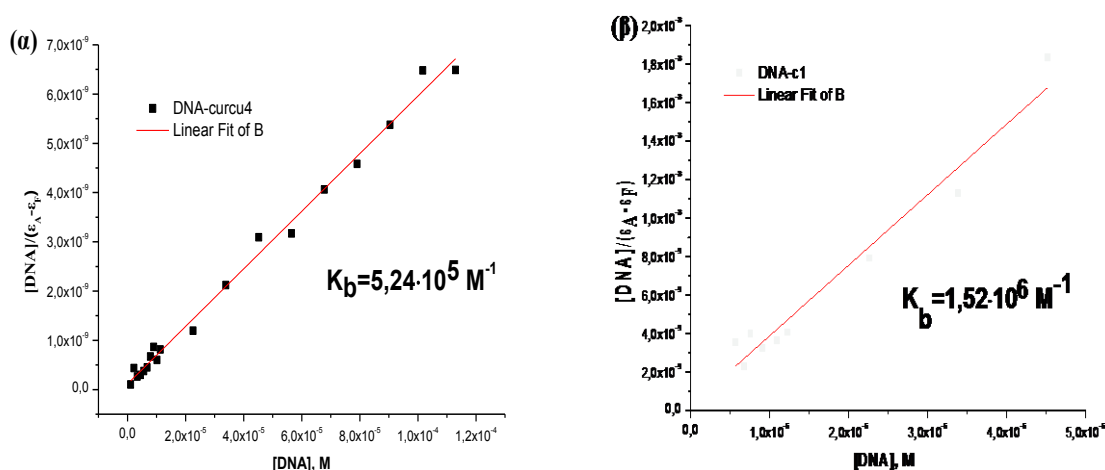
Από τα φάσματα του Σχήματος 40 μπορεί να υπολογισθεί η σταθερά σύνδεσης K_b της curcu4 και του c1 με το DNA, που αντιστοιχούν στις ισορροπίες:



Χρησιμοποιώντας τη σχέση:

$$\frac{[DNA]}{(\varepsilon_A - \varepsilon_F)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon_B - \varepsilon_F)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_B - \varepsilon_F)} \quad (7.1)$$

Όπου ε_F , ε_B και ε_A είναι οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος του μη δεσμευμένου (ελεύθερου) συστήματος (curcu4 ή c1), του δεσμευμένου με το DNA και του διαλύματος που περιέχει το μίγμα τους. Στο Σχήμα 41 παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου $[DNA]/(\varepsilon_A - \varepsilon_F)$ σε συνάρτηση της $[DNA]$ στα 332 και 343 nm για την curcu4 και το c1, αντίστοιχα.



Σχήμα 41: Διάγραμμα μεταβολής του λόγου $[DNA]/(\varepsilon_A - \varepsilon_F)$ σε συνάρτηση της $[DNA]$ στο σύστημα (α) DNA-curcu4 και (β) DNA-c1.

Από τα διαγράμματα του Σχήματος 41 και με χρήση της Σχέσης (7.1) προκύπτει ότι για το σύστημα DNA-curcu4 η K_b είναι $5,24 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ενώ για το σύστημα DNA-c1 η K_b είναι ίση με $1,52 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Συνεπώς, γίνεται ξεκάθαρο ότι η σύνδεση του συμπλόκου, c1, με το DNA είναι ισχυρότερη από τη σύνδεση της curcu4 με το DNA, αφού η K_b στο σύστημα DNA-c1 είναι κατά 2,9 φορές μεγαλύτερη από την K_b του συστήματος DNA-c1. Η ισχυρότερη αυτή σταθερά σύνδεσης στην περίπτωση του συμπλόκου μπορεί να οφείλεται στο θετικό φορτίο του συμπλόκου (+2) ή/και στον ισχυρότερο τρόπο αλληλεπίδρασης του συμπλόκου, c1 με το DNA.

7.1.2 Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης (T_m)

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης της curcu4 και του c1 με το DNA πραγματοποιήθηκε και με τη βοήθεια των καμπυλών θερμικής μετουσίωσης [169]. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις καμπύλες θερμικής μετουσίωσης (βλ. Παράρτημα III) συνοψίζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16: Τα σημεία τήξης, τα ΔT_m και η % h_r στα 258 nm σε διάφορους λόγους R τόσο για την curcu4 όσο και για το c1.

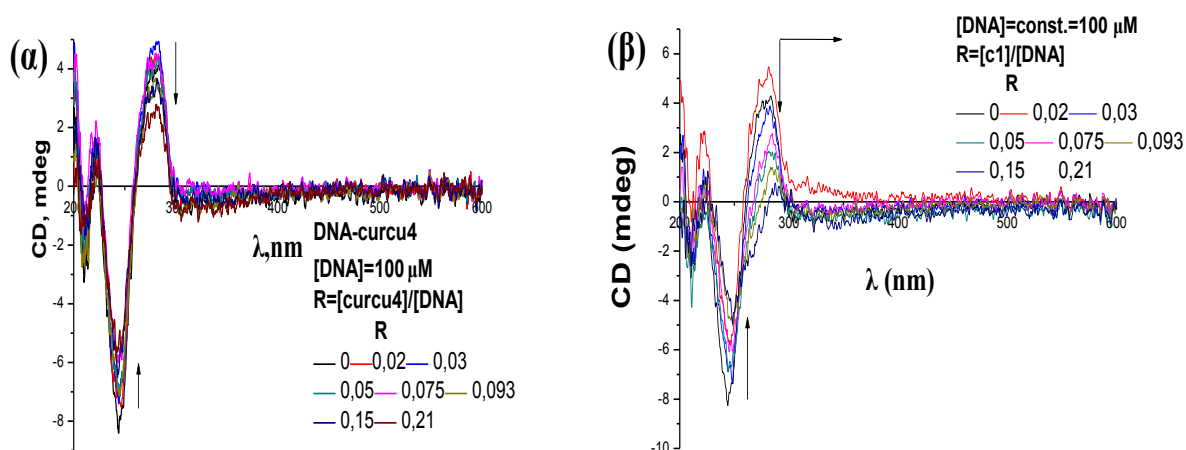
curcu4				
R=[curcu4]/[DNA]	T_m	ΔT_m	%h_r	Εύρος θερμοκρασιών Καμπυλών T_m, °C
0	68,17 (±0,44)	0	32,00	20,71
0,02	69,35 (±0,20)	0,87	30,93	20,19
0,05	68,84 (±0,25)	0,36	31,84	20,38
0,09	69,42 (±0,93)	0,93	28,32	20,69
0,15	68,43 (±0,15)	-0,05	24,26	20,29
0,21	69,93 (±0,10)	1,445	23,73	22,06
R=[c1]/[DNA]	c1			
0,02	69,98 (±0,11)	1,49	32,64	20,53
0,03	71,71 (±0,08)	3,22	34,40	26,11
0,05	73,66 (±0,00)	5,18	31,57	28,67
0,09	78,06 (±0,27)	9,58	31,88	30,72
0,15	82,14 (±0,47)	13,65	29,44	30,20
0,21	83,65 (±0,11)	15,16	24,07	30,71

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 16, το σημείο τήξης του DNA δεν επηρεάζεται αισθητά με την διαδοχική προσθήκη της curcu4 σε αντίθεση με το c1 όπου η αύξηση του σημείου τήξεως του DNA είναι θεαματική και το ΔT_m φτάνει και τους 15 °C. Παρατηρώντας τα ΔT_m , έχουμε μια πρώτη ένδειξη ότι η curcu4 δεν αλληλεπιδρά με το DNA μέσω κλασικής παρεμβολής ή μέσω της μικρής αύλακας σε αντίθεση με την περίπτωση του c1 που αυτό δεν μπορεί να αποκλειστεί διότι παρατηρούνται θεαματικές μεταβολές των σημείων τήξεως, ενώ αποκλείεται η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση [175]. Συνεπώς, αυτή η αύξηση του σημείου τήξεως του DNA είναι ενδεικτική για το ότι το c1 σταθεροποιεί τη δομή του DNA, ενώ αυτό δεν συμβαίνει στην περίπτωση της curcu4. Αντίθετα, και στα δυο συστήματα (DNA-curcu4, DNA-c1) παρατηρείται μείωση

της % υπερχρωμικότητας του DNA καθώς γίνεται προσθήκη διαλυμάτων curcu4 ή c1, για να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R. Γενικά, όσο μειώνεται η % υπερχρωμικότητα τόσο μειώνονται και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων του DNA, είτε λόγω της παρεμβολής ενός μορίου μεταξύ τους, είτε λόγω φαινομένων προ-μετουσίωσης (pre-melting effects). Στα δικά μας υπό μελέτη συστήματα, DNA-curcu4 και DNA-c1 η αλληλεπίδραση μεταξύ των βάσεων εξασθενεί κατά την αλληλεπίδραση του DNA με τις ενώσεις μας, και αυτό γίνεται φανερό από τη μείωση της % υπερχρωμικότητας. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η διαφορετική αλληλεπίδραση του συμπλόκου c1, σε σχέση με τον υποκαταστάτη curcu4, φαίνεται επίσης και από το διαφορετικό εύρος θερμοκρασιών στο οποίο αλλάζει κλίση η καμπύλη T_m . Στην περίπτωση του συστήματος DNA-curcu4, το εύρος θερμοκρασιών σε όλους τους λόγους R ($R=[\text{curcu4}]/[\text{DNA}]$), παραμένει περίπου σταθερό στους $\sim 20^\circ\text{C}$. Αντίθετα, στην περίπτωση του συστήματος DNA-c1 το εύρος θερμοκρασιών που αλλάζει κλίση η καμπύλη T_m , αυξάνεται συνεχώς και από $\sim 20^\circ\text{C}$ που είναι το εύρος για το DNA χωρίς την προσθήκη κάποιας ένωσης (curcu4 ή c1) φτάνει τους $\sim 30^\circ\text{C}$ με την προσθήκη διαλύματος του συμπλόκου c1. Η αύξηση του εύρους θερμοκρασιών φανερώνει τη μη ομοιόμορφη τήξη του DNA. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η ένωση μας, στη συγκεκριμένη περίπτωση το σύμπλοκο c1, συμβάλλει στο να ξεδιπλώνουν κάποιες περιοχές του DNA γρηγορότερα και άλλες πιο αργά, είτε γιατί παρεμβάλλεται στα ζεύγη βάσεων του DNA είτε λόγω διαφόρων μεταβολών που μπορεί να του προκαλεί, και να παρουσιάζεται αυτή η αλλαγή στην τήξη του DNA. Η διαφορά στα σημεία τήξεως μεταξύ του DNA-curcu4 και DNA-c1 είναι δικαιολογημένη λόγω της διαφοράς τους στον τρόπο αλληλεπίδρασης καθώς και λόγω της ισχυρότερης σύνδεσης του c1 με το DNA (βλ. §7.1.1 μεγαλύτερη η K_b του c1 με το DNA από ότι η curcu4).

7.2 Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD)

Ο κυκλικός διχρωϊσμός αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές τεχνικές για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των μορίων με το DNA [172].

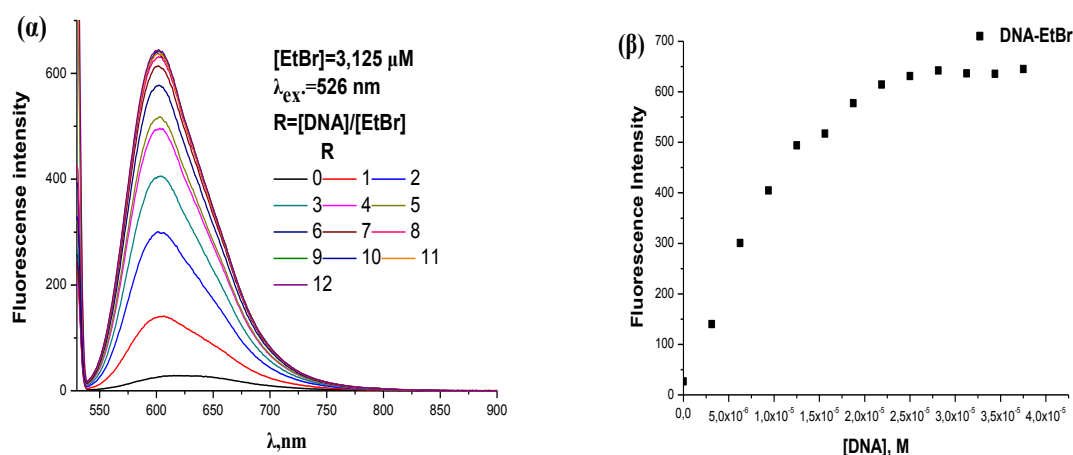


Σχήμα 42: Φάσμα CD (α) για το DNA-curcu4 και (β) για το DNA-c1.

Από τα παραπάνω φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού (βλ. Σχήμα 42) γίνεται άμεσα εμφανές ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA είναι εντελώς διαφορετική σε σχέση με την αλληλεπίδραση του υποκαταστάτη με το DNA. Στην περίπτωση της curcu4 η κορυφή στα 243 nm που σχετίζεται με την ελικότητα του DNA παρουσιάζει μια μικρή μείωση στην έντασή της όπως και η κορυφή στα 280 nm, η οποία σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζευγών βάσεων της διπλής έλικας του DNA. Στο σύστημα DNA-curcu4, η B-δομή του DNA παραμένει και δεν αλλάζει η διαμόρφωσή του σε άλλες μορφές. Αυτές οι συμπεριφορές δεν είναι ενδεικτικές για την κλασική παρεμβολή ή την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση [171, 172]. Στην περίπτωση του συστήματος DNA-c1 παρατηρείται θεαματική μείωση της έντασης και των δυο κορυφών (243 και 280 nm) με την κορυφή στα ~280 nm σχεδόν να εξαφανίζεται αφού πρώτα έχει μετατοπιστεί κατά 7 nm στους μεγάλους λόγους. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρείται και μετατόπιση του σημείου αλλαγής. Αυτές οι μεταβολές στο φάσμα CD είναι ενδεικτικές για τη C-μορφή του DNA. Δηλαδή, σε αυτήν την περίπτωση έχουμε μετάπτωση της B-δομής του DNA σε C-μορφή. Η μετάπτωση αυτή γίνεται σταδιακά και όχι απότομα όπως η μετάπτωση της B-δομής στην A-δομή [172, 173]. Επομένως, και τα πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού ενισχύεται η άποψη ότι το c1 δεν αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με το DNA [178, 179].

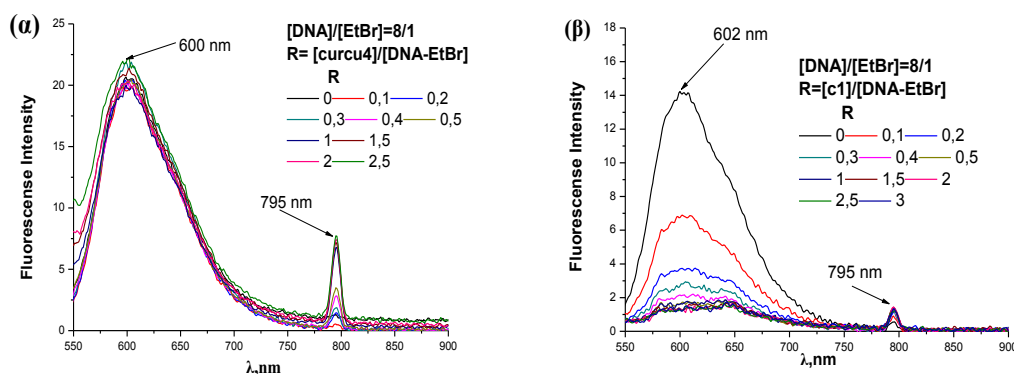
7.3 Φθορισμομετρία (Fluorescence)

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το βρωμιούχο αιθίδιο ως ένωση «αναφορά» για να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση των ενώσεων μας με το DNA. Το EtBr είναι ένα επίπεδο μόριο που γενικά δε φθορίζει έντονα αλλά η ένταση φθορισμού του αυξάνεται όταν αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής [175, 176]. Τα φάσματα φθορισμού παρουσιάζονται στο Σχήμα 43.



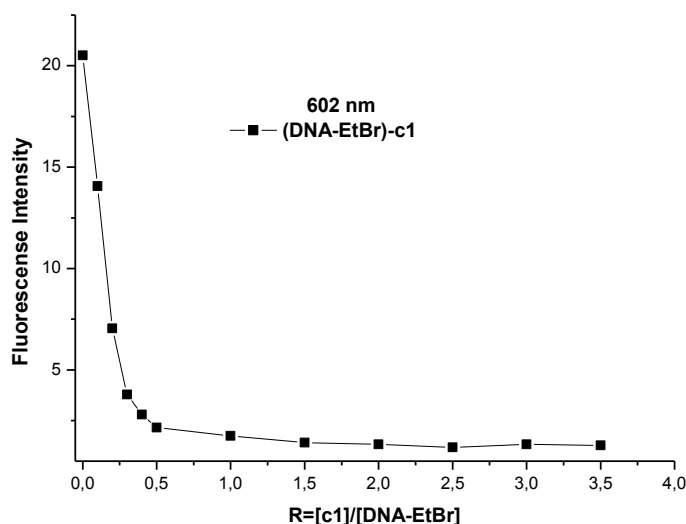
Σχήμα 43: (α) Φάσμα φθορισμού για το DNA-EtBr (β) διάγραμμα της έντασης φθορισμού στα 600 nm συναρτήσει της [DNA] από δεδομένα του (α), $\lambda_{ex}=526$ nm.

Από το παραπάνω διάγραμμα (Σχήμα 43 β) προέκυψε ότι σε αναλογία $[DNA]/[EtBr]=8/1$ το DNA έχει κορεστεί πλήρως με το EtBr.



Σχήμα 44: Φάσμα φθορισμού (α) DNA-EtBr-Curcu4 και (β) DNA-EtBr-c1, $\lambda_{ex}=526$ nm.

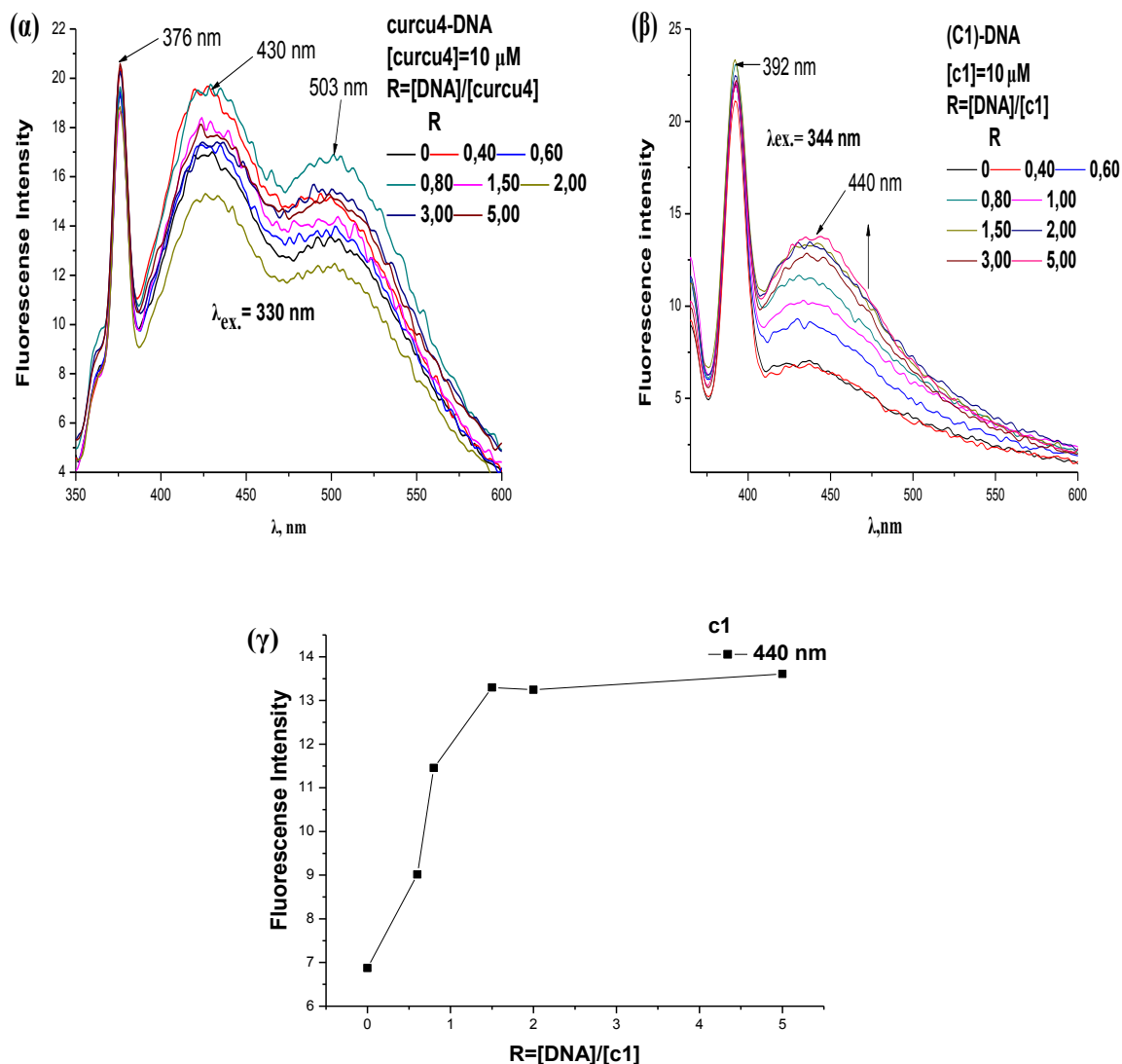
Η διαφορετική αλληλεπίδραση της curcu4 με το DNA σε σχέση με την αλληλεπίδραση του c1 με αυτό, γίνεται αντιληπτή και από το Σχήμα 44. Αν εστιάσουμε στο φθορισμό του EtBr που εκπέμπεται στα ~600 nm, διαπιστώνουμε ότι στην περίπτωση που γίνεται προσθήκη διαλύματος της curcu4 δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα ο φθορισμός του συστήματος DNA-EtBr. Αντίθετα, παρατηρούμε ότι όταν προστίθεται διάλυμα c1 σε διάλυμα που περιέχει DNA/EtBr = 8/1, ο φθορισμός του DNA-EtBr στα ~600 nm εμφανίζει αισθητή μείωση στην έντασή του. Η μείωση του φθορισμού γίνεται καλύτερα αντιληπτή και στο διάγραμμα του Σχήματος 45.



Σχήμα 45: Διάγραμμα της έντασης του φθορισμού του συστήματος DNA-EtBr-c1 συναρτήσει του λόγου R ($R=[c1]/[DNA-EtBr]$).

Η μείωση της έντασης φθορισμού μπορεί να συμβεί είτε γιατί το c1 διώχνει το EtBr μέσα από το DNA και δρα το ίδιο ως παρεμβολέας, ουσιαστικά δρα ανταγωνιστικά το c1 στο EtBr κατά την αλληλεπίδρασή του με το DNA (αυτό βέβαια προϋποθέτει το c1 να συνδέεται πιο ισχυρά με το DNA από ότι το EtBr) είτε γιατί δημιουργείται ένα νέο «σύμπλοκο» DNA-EtBr-c1, που δεν φθορίζει τόσο έντονα όσο το αρχικό «σύμπλοκο» DNA-EtBr, είτε γιατί συνδέεται το c1 με το EtBr και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του φθορισμού [177-186]. Βέβαια, λαμβάνοντας υπόψη, τα σημεία τήξεως και τον κυκλικό διχρωϊσμό είναι πιθανότερη η εκδοχή το c1 να εισέρχεται με κάποιο τρόπο στο εσωτερικό του DNA.

Επιπροσθέτως, μετρήθηκε ο φθορισμός σε 2 σειρές διαλυμάτων DNA-curcu4 και DNA-c1 χωρίς την προσθήκη σε αυτήν την περίπτωση του κλασικού παρεμβολέα EtBr.



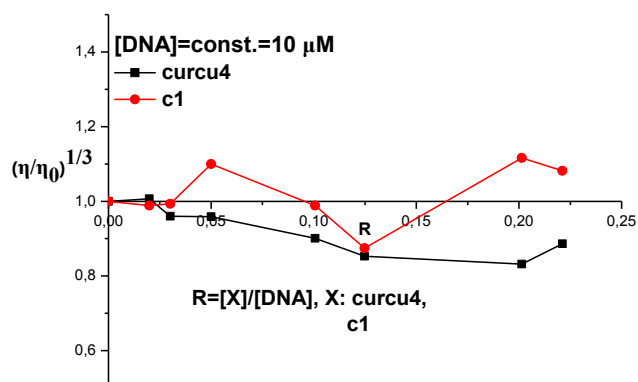
Σχήμα 46: Φάσμα φθορισμού (α) DNA-Curcu4, $\lambda_{ex.} = 330 \text{ nm}$ (β) DNA-c1, $\lambda_{ex.} = 344 \text{ nm}$ και (γ) διάγραμμα έντασης φθορισμού συναρτήσει του λόγου R ($R = [DNA]/[c1]$).

Από τα παραπάνω φάσματα φθορισμού (βλ. Σχήμα 46) δεν παρατηρούμε κάποια «μονότονη» αύξηση ή μείωση του φθορισμού στην περίπτωση του συστήματος DNA-curcu4 σε αντίθεση με το σύστημα DNA-c1 όπου παρατηρείται μονότονη αύξηση της έντασης του φθορισμού. Τα μήκη κύματος εκπομπής για το σύστημα DNA-curcu4 που προκύπτουν είναι $\lambda_{em.} = 376, 430$ και 503 nm και για το σύστημα DNA-c1 είναι $\lambda_{em.} = 382$

και 440 nm. Στο Σχήμα 43 (γ) γίνεται καλύτερα αντιληπτό ότι η αύξηση φθορισμού του c1 με την προσθήκη διαλύματος DNA είναι συνεχής και σταθεροποιείται στους μεγάλους λόγους R ($R=[\text{DNA}]/[\text{c1}]$). Η αύξηση αυτή του φθορισμού στο σύστημα DNA-c1 μοιάζει με την περίπτωση που παραμένει σταθερή η συγκέντρωση του EtBr και προσθέτουμε διαδοχικά διάλυμα DNA και αυξάνεται ο φθορισμός του EtBr.

7.4 Ιξωδομετρία (viscosity)

Άλλη μια τεχνική που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεών μας (curcu4 και c1) με το DNA είναι η ιξωδομετρία [168, 169, 187]. Το ιξώδες και για τα 2 υπό μελέτη συστήματα (DNA-curcu4 και DNA-c1) παρουσιάζεται στο Σχήμα 47.



Σχήμα 47: Διάγραμμα ιξωδομετρίας για τη σειρά: DNA-curcu4 (μαύρη γραμμή) και DNA-c1 (κόκκινη γραμμή).

Από το Σχήμα 47 παρατηρείται σταδιακή μείωση του ιξώδους του DNA κατά την προσθήκη διαλύματος της curcu4. Η μείωση αυτή του ιξώδους υποδηλώνει τη μείωση του περιμετρικού μήκους του DNA κατά την αλληλεπίδραση της curcu4 με αυτό. Γενικά, η μείωση του ιξώδους του DNA δεν είναι ενδεικτική για αλληλεπίδραση μικρών μορίων με το DNA μέσω παρεμβολής ή ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης. Η μείωση του ιξώδους πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η curcu4 προκαλεί κάμψη του DNA κατά την αλληλεπίδρασή του με αυτό.

7.5 Συζήτηση

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα ιξωδομετρίας για την αλληλεπίδραση της curcu4 με το DNA, τη μέθοδο Scatchard ($K_b=5,24 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), τις καμπύλες θερμικής μετουσίωσης (περίπου σταθερά T_m , μείωση της υπερχρωμικότητας, σταθερό εύρος θερμοκρασιών αλλαγής καμπύλης T_m), τον κυκλικό διχρωϊσμό (όχι κάποια αξιόλογη μεταβολή στη δομή του DNA), τη φθορισμομετρία (δεν επιδρά στο σύστημα DNA-EtBr, όχι ιδιαίτερα χαρακτηριστική μεταβολή της έντασης του φθορισμού του DNA-curcu4 και μετατόπιση του μήκους κύματος εκπομπής) καθώς και της ιξωδομετρίας (μείωση ιξώδους) ο τρόπος αλληλεπίδρασης της curcu4 με το DNA που προτείνεται είναι μέσω της αύλακας, προκαλώντας κάμψη στη διπλή έλικα του DNA, χωρίς όμως να μεταβάλλει τη B-δομή του. Αντίθετα, στην περίπτωση του c1 το ιξώδες του DNA μειώνεται μέχρι λόγο $R=0,13$ και παρουσιάζει αύξηση για μεγάλους λόγους. Συνεπώς, και με αυτήν την τεχνική συμπεραίνεται ότι το c1 δεν δρα όπως η curcu4 αλλά ανεξάρτητα από αυτήν. Η συμπεριφορά αυτή του ιξώδους δεν δικαιολογεί κλασική παρεμβολή ή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, όπου θα αναμενόταν συνεχής αύξηση ή καμία ιδιαίτερη μεταβολή του ιξώδους αντίστοιχα [187-190]. Συμπερασματικά, ύστερα από την εφαρμογή πληθώρας τεχνικών για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του c1 με το DNA, τη μέθοδο Scatchard ($K_b=1,52 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$), τις καμπύλες θερμικής μετουσίωσης (θεαματική αύξηση των T_m , μείωση της υπερχρωμικότητας, αύξηση του εύρους θερμοκρασιών αλλαγής καμπύλης T_m), τον κυκλικό διχρωϊσμό (μετάπτωση από τη B→C δομή του DNA), τη φθορισμομετρία (μείωση της έντασης του φθορισμού του συστήματος DNA-EtBr, μονότονη αύξηση της έντασης του φθορισμού DNA-c1) καθώς και της ιξωδομετρίας (μείωση ιξώδους μέχρι λόγο $R=0,13$ και αύξηση αυτού για μεγάλους λόγους) ο τρόπος αλληλεπίδρασης του c1 με το DNA που προτείνεται είναι η μερική παρεμβολή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

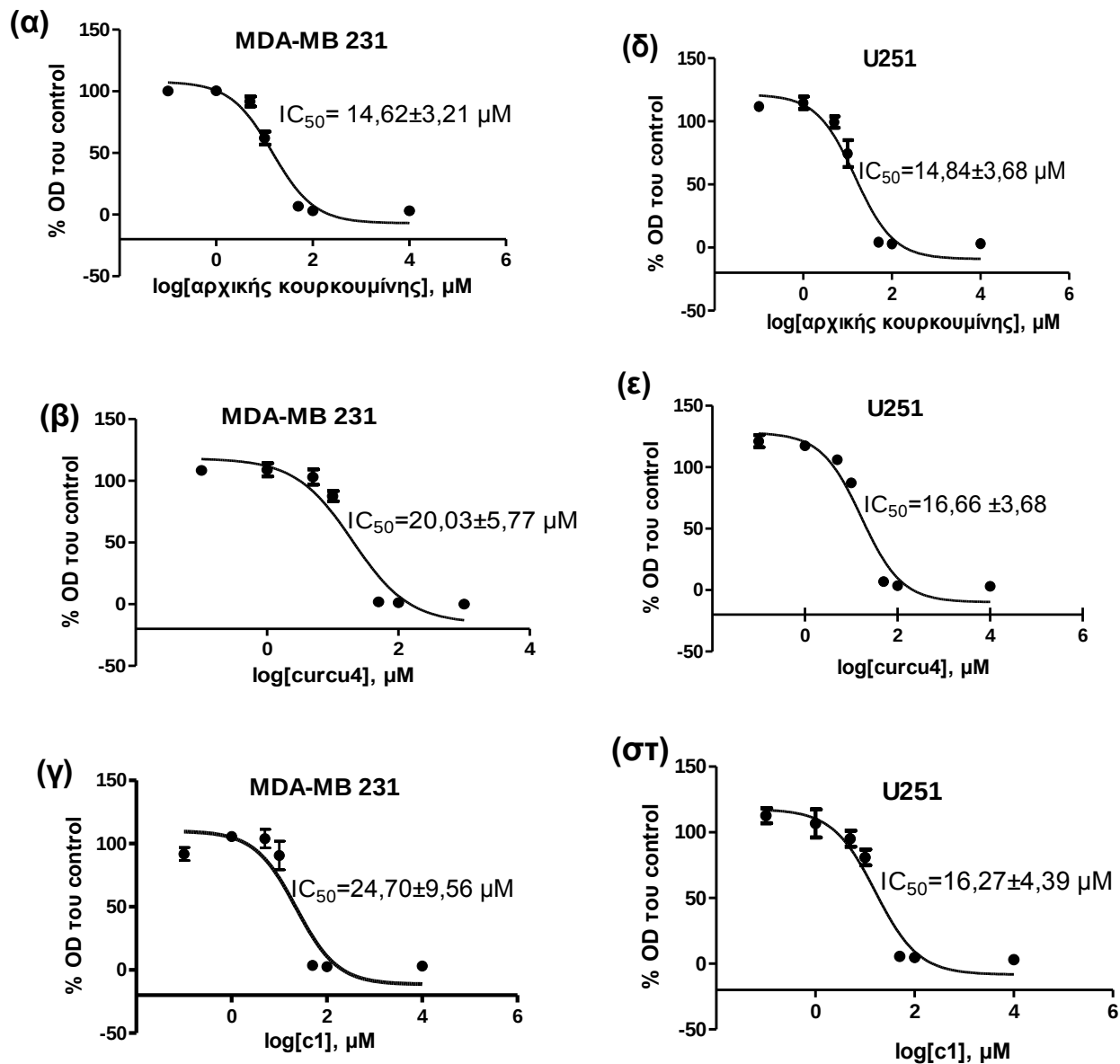
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ curcu4 ΚΑΙ ΤΟΥ c1 ΣΤΙΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ MDA-MB 231 ΚΑΙ U251

Εκτός από τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό, και την αλληλεπίδραση με το CT-DNA της curcu4 και του c1, διερευνήθηκε και η κυτταροτοξικότητά τους στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές MDA-MB 231 (καρκίνος του μαστού) και U251 (γλοιοβλάστωμα) από την κυτταρική τράπεζα του ερευνητικού κέντρου Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Ερευνών, Ενέργειας και Ασφάλειας, υπό τη συνεχή επίβλεψη της Ερευνήτριας Β', κ. Μαρίας Παραβατού, με τη δοκιμασία MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium).

8.1 Δοκιμασία MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium)

Οι καμπύλες που προέκυψαν και για τις 2 κυτταρικές σειρές παρουσιάζονται στο Σχήμα 48. Στον άξονα χ παρουσιάζεται η λογάριθμος της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος.

Η τιμή IC_{50} είναι η συγκέντρωση στην οποία μειώνεται κατά 50% η απορρόφηση.



Σχήμα 48: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας.

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} που προέκυψαν για τις 2 κυτταρικές σειρές. Οι τιμές αυτές παρουσιάζονται ως η μέση τιμή IC_{50} (μM) $\pm$ την τυπική απόκλιση, που προέκυψαν ύστερα από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

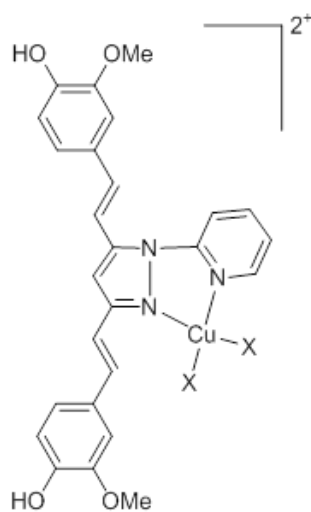
Πίνακας 17: Τιμές IC₅₀ (μM)± την τυπική απόκλιση.

Παράγωγα	MDA-MB 231	U251
Αρχική κουρκουμίνη	14,62±3,21	14,84 ±3,68
curcu4	20,03±5,77	16,66 ±3,68
c1	24,70±9,56	16,27 ±4,39

Από τον Πίνακα 17 φαίνεται ότι τα παράγωγα της κουρκουμίνης είναι περισσότερο τοξικά στην νευρικής προέλευσης κυτταρική σειρά U251 απ' ότι στην MDA-MB 231, όμως στατιστικά η διαφορά δεν είναι σημαντική. Γενικά, η κυτταροτοξικότητα είναι περίπου η ίδια τόσο μεταξύ της curcu4 και του c1, όσο και της αρχικής κουρκουμίνης με τις 2 προαναφερθέντες ενώσεις και στις 2 καρκινικές κυτταρικές σειρές. Αυτά τα πρώτα βιολογικά αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά σε μία προοπτική σύνθεσης νέων παραγώγων, σταθερότερων της φυσικά απαντώμενης κουρκουμίνης, που θα έχει ως στόχο την βελτίωση της κυτταροτοξικότητας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα διπλωματική εργασία προέκυψαν αρκετά συμπεράσματα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός νέου παραγώγου της κουρκουμίνης, δισ-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ)-1,6-διεν-2-πυράζολο-3-πυριδίνη, στον ΕΚΕΦΕ Δημόκριτο, στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, στο εργαστήριο της Δρ. Πελεκάνου, από τη Δρ. Σαγνού και Δρ. Αλεξίου, που ως άτομα δότες έχει άζωτα και όχι μόνο οξυγόνα όπως διαθέτει η αρχική κουρκουμίνη, αλλάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη δοτική ικανότητα του φαρμακοφόρου, δρώντας ως N-N υποκαταστάτης και όχι ως O-O όπως δρα η αρχική κουρκουμίνη. Ο υποκαταστάτης αυτός, αναφερόμενος ως curcu4 χαρακτηρίστηκε πλήρως και βρέθηκε ότι φθορίζει έντονα και παρουσιάζει θετικό διαλυτοχρωμικό φαινόμενο. Από τον χαρακτηρισμό της curcu4 προέκυψαν και οι τιμές pK_a σε διαλύτη μεθανόλη με $pK_{a1}=9,68$, $pK_{a2}=11,02$ και $pK_{a3}=12,05$, όπου η pK_{a2} και η pK_{a3} οφείλονται στην αποπρωτονίωση των 2-OH στους 2 αρωματικούς δακτυλίους της curcu4 και η pK_{a1} πιθανολογείται ότι αντιστοιχεί στην αποπρωτονίωση της πυριδίνης στο μόριο της curcu4. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η συμπλοκοποίηση του χαλκού (II) με το παράγωγο της κουρκουμίνης (curcu4), δισ-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ)-1,6-διεν-2-πυράζολο-3-πυριδίνη. Η συμπλοκοποίηση αυτή, όπως αποδείχτηκε από τη φασματοσκοπία UV-Vis και IR, γίνεται μέσω των αζώτων της πυριδινικής και πυραζολικής ομάδας του υποκαταστάτη σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1. Η προτεινόμενη παραμορφωμένη επίπεδη τετραγωνική δομή του νέου αυτού συμπλόκου που προκύπτει με τη βοήθεια των προαναφερθέντων τεχνικών (Φασματοσκοπία EPR, IR, UV-Vis και κυκλική βολταμμετρία) είναι η ακόλουθη:



Όπου X μπορεί να είναι μόρια νερού ή μόρια διαλύτη. Επίσης, βρέθηκε ότι η συμπλοκοποίηση επηρεάζει άμεσα τα pK_a του υποκαταστάτη και ιδιαίτερα το pK_{a1} που αντιστοιχεί στο pK_a της πυριδίνης, το οποίο είναι λογικό διότι η συμπλοκοποίηση της curcu4 με το χαλκό(II) γίνεται μέσω των αζώτων της πυριδινικής και πυραζολικής ομάδας του μορίου της curcu4. Τα pK_a μετά τη συμπλοκοποίηση είναι τα εξής: $pK_{a1}=1,44$, $pK_{a2}=10,88$ και $pK_{a3}=12,23$. Μέσω της φασματοσκοπίας UV-Vis μελετήθηκαν και τα θερμοδυναμικά μεγέθη του συμπλόκου και προέκυψαν για το σύμπλοκο c1 τα ακόλουθα: $\Delta H=-54,59$ kJ/mol, $\Delta S=-88,00$ J/mol·K, $\Delta G^{\circ}=-28,37$ kJ/mol. Συνεπώς, η αντίδραση σχηματισμού του c1 είναι μια αυθόρμητη ($\Delta G^{\circ}<0$), εξώθερμη ($\Delta H<0$) αντίδραση και οδηγεί σε μείωση της εντροπίας ($\Delta S<0$). Επιπροσθέτως, προσδιορίστηκε και η σταθερά σχηματισμού του c1, σε θερμοκρασίες 20, 25, 30, 35 και 40 °C, σε διαλύτη μεθανόλη και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα.

Θερμοκρασία	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
	$14,81 \cdot 10^4$	$8,65 \cdot 10^4$	$6,11 \cdot 10^4$	$5,56 \cdot 10^4$	$3,09 \cdot 10^4$
	(11,9)	(11,37)	(11,02)	(10,93)	(10,34)

Από το χαρακτηρισμό του c1 μέσω φθορισμομετρίας προέκυψε η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer, $K_{sv}=5,00 \cdot 10^4$ M⁻¹ και η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου στους 25°C, $K_f=8,72 \cdot 10^4$ M⁻¹, η τιμή της οποίας έρχεται σε συμφωνία και με την τιμή της K_f που είχε προσδιοριστεί και φασματοφωρομετρικά ($K_f=8,65 \cdot 10^4$ M⁻¹). Επιπλέον, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε και η αλληλεπίδραση της curcu4 και του c1 με το CT-DNA. Από όλες τις παραπάνω τεχνικές που παρουσιάστηκαν εκτενώς παραπάνω για τη μελέτη αυτής της αλληλεπίδρασης, προέκυψε ότι η curcu4 αλληλεπιδρά με το DNA μέσω αύλακας, προκαλώντας κάμψη στη διπλή έλικα του DNA χωρίς όμως να μεταβάλλει τη B-δομή του. Το c1 προκαλεί μεγάλη σταθεροποίηση της διπλής έλικας του DNA και μεταβάλλει τη B-δομή του DNA σε C-μορφή και ο πιθανότερος τρόπος αλληλεπίδρασης είναι η μερική παρεμβολή. Τέλος, έγινε και *in vitro* μελέτη τριών ενώσεων (αρχική κουρκουμίνη, curcu4 και c1), στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές MDA-MB 231 (καρκίνος του μαστού) και U251 (γλοιοβλάστωμα). Τα αποτελέσματα της βιολογικής μελέτης (μέση τιμή IC₅₀±τυπική απόκλιση) συνοψίζονται στον παρακάτω Πίνακα.

Παράγωγα	MDA-MB 231	U251
Αρχική κουρκουμίνη	14,62±3,21	14,84 ±3,68
curcu4	20,03±5,77	16,66 ±3,68
c1	24,70±9,56	16,27 ±4,39

Από τον παραπάνω Πίνακα φαίνεται ότι τα παράγωγα της κουρκουμίνης είναι πιο κυτταροτοξικά στην νευρικής προέλευσης κυτταρική σειρά U251 απ' ότι στην MDA-MB 231, όμως στατιστικά η διαφορά δεν είναι σημαντική. Γενικά, η κυτταροτοξικότητα είναι περίπου η ίδια τόσο μεταξύ της curcu4 και του c1, όσο και της αρχικής κουρκουμίνης με τις 2 προαναφερθέντες ενώσεις και στις 2 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Αυτά τα πρώτα βιολογικά αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά σε μία προοπτική σύνθεσης νέων παραγώγων, σταθερότερων της φυσικά απαντώμενης κουρκουμίνης, που θα έχει ως στόχο την βελτίωση της κυτταροτοξικότητας.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι με τη σύνθεση του νέου παραγώγου της κουρκουμίνης και του αντίστοιχου συμπλόκου του χαλκού (II) καταφέραμε να βελτιώσουμε τη σταθερότητα της κουρκουμίνης, χωρίς όμως να επηρεάσουμε τη σημαντική αντικαρκινική της δράση, όπως γίνεται αντιληπτό και από τη βιολογική μελέτη που πραγματοποιήθηκε.

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

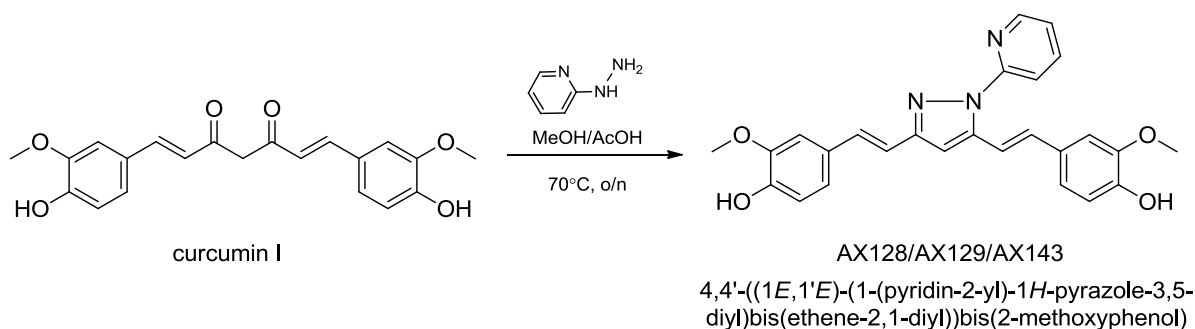
MRI	Magnetic Resonance Imaging
CD	Circular Dichroism
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
UV-Vis	UltraViolet-Visible
IR	Infrared
NP	Natural Product
LTP	Long Term Potential
NSAID	Non Steroidal Anti-Inflammatory Drug
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
DNA	DeoxyRibonucleic Acid
CV	Cyclic Voltammetry
A-T	Adenine-Thymine
G-C	Guanine-Cytocine
MTT	methyl-thiazolyl-tetrazolium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMF	Dimethylformamide
KBr	Kaliumbromid
CT-DNA	CalfThymous-DeoxyRibonucleicAcid
EtBr	Ethidium Bromide
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
PBS	Phosphate Buffered Saline
FBS	Fetal Bovine Serum

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Οργανική σύνθεση νέου πυρίδινου-πυραζολικού αναλόγου της κουρκουμίνης Ι

Το εμπορικά διαθέσιμο μείγμα κουρκουμινολιδών αποτελείται από κουρκουμίνη Ι (78%), δι-μεθοξυ κουρκουμίνη ή κουρκουμίνη ΙΙ (13-15%) και δις-δεμεθοξυ κουρκουμίνη ή κουρκουμίνη ΙΙΙ (2%). Πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των τριών κουρκουμινολιδών μέσω μιας βραδείας διαδικασίας flash χρωματογραφία στήλης, με τη χρήση χλωροφορμίου ως μέσου έκλουσης και παραλήφθηκε καθαρή κουρκουμίνη Ι.

Για τη σύνθεση του επιθυμητού αναλόγου /ligand και τη δημιουργία του επιθυμητού δακτυλίου πυρραζολίου στο 1,3-δικετονικό τμήμα της κουρκουμίνης Ι πραγματοποιήθηκε αντίδραση συμπύκνωσης με την 2-υδραζινο-πυριδίνη σε περίσσεια (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Συνθετικό σχήμα του πυρίδινου-πυραζολικού αναλόγου της κουρκουμίνης Ι.

4,4'-((1E,1'E)-(1-(πυριδιν-2-υλ)-1H-πυραζολο-3,5-διυλ)δι(εθεν-2,1-διυλ))δι(2-μεθοξυφαινολη): 0,527g (1,4 mmol) της κουρκουμίνης Ι διαλύονται σε 10ml οξικού οξέος. Προς διευκόλυνση της διάλυσης προστίθεται ελάχιστη ποσότητα μεθανόλης (4-5 σταγόνες). Στη συνέχεια διαλύονται 0,468g (4,3 mmol, 3 eq) 2-υδραζινο-πυριδίνης στην ελάχιστη ποσότητα οξικού οξέος/μεθανόλης και το δεύτερο διάλυμα προστίθεται στο πρώτο. Το μείγμα της αντίδρασης υπό έντονη ανάδευση και ατμόσφαιρα N₂ θερμαίνεται στους 70°C και η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μείγμα αποχύνεται σε νερό-πάγο και το σχηματιζόμενο ίζημα που παραλαμβάνεται ανακρυσταλλώνεται από διχλωρομεθάνιο/εξάνιο για να δώσει 0,537g του επιθυμητού προϊόντος ως κιτρινωπό στερεό. α=88,3%.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Θεωρητικά αναμενόμενα λ, nm	Τροχιακά που συμμετέχουν στη μετάπτωση (Πιθανότητα*, f)
637,76	130A ->131A (0,18609) 922B ->928B (0,81801) 927B ->929B (0,38109)
475,43	127A ->131A (0,17981) 129A ->131A (0,51414) 129A ->134A (0,10243) 130A ->132A (0,10165) 920B ->928B (0,20915) 921B ->928B (0,19206) 926B ->933B (0,12811) 927B ->928B (0,13178) 927B ->929B (0,24188) 927B ->931B (0,18387)
409,91	127A ->131A (0,25322) 127A ->134A (0,10870) 129A ->132A (0,65112) 916B ->928B (0,16798) 926B ->929B (0,10426) 927B ->931B (0,18176)
336,26	124A ->131A (0,15451) 125A ->131A (0,21048) 125A ->135A (0,12571) 129A ->133A (0,11924) 129A ->134A (0,50999) 130A ->134A (0,24085) 130A ->135A (0,10278) 910B ->928B (0,12328) 911B ->928B (0,12211) 913B ->928B (0,12985) 920B ->930B (0,12050) 922B ->929B (0,13728)

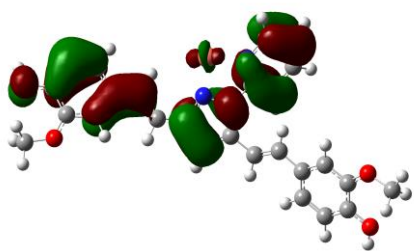
*Σε παρένθεση φαίνεται η πιθανότητα να συμβεί η εν λόγω μετάπτωση.

Αριθμός alpha spin-τροχιακών κατειλημμένων με ένα e spin 1/2, 130 κατειλημμένα, αριθμός alpha τροχιακών μη κατειλημμένων 668 virtual, Συνολικά =798. Ομοίως για τα beta. Αριθμός beta spin-τροχιακών κατειλημμένων με ένα e spin -1/2, 129 κατειλημμένα, Αριθμός beta τροχιακών μη κατειλημμένων 669 virtual, συνολικά= 798. ΣΥΝΟΛΙΚΑ: alpha+beta= 1596

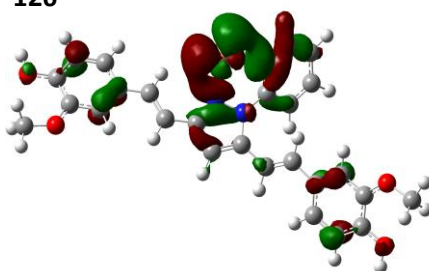
Το HOMO τροχιακό του A και B είναι το 130A και 927B αντίστοιχα, ενώ το LUMO τροχιακό του A και B είναι το 131A και 928B, αντίστοιχα. Τα τροχιακά που αναφέρονται στον παραπάνω Πίνακα, φαίνονται σχηματικά παρακάτω.

ALPHA

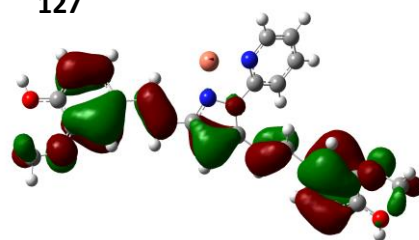
125



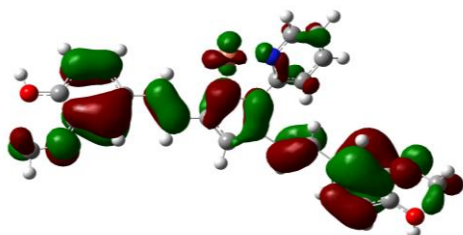
126



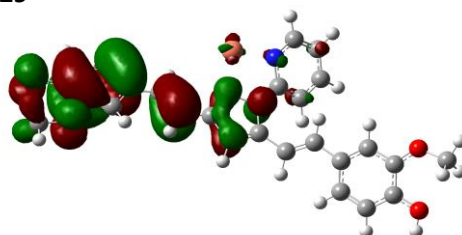
127



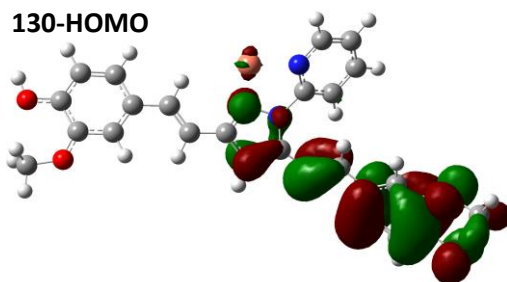
128



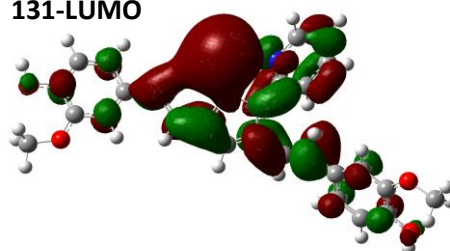
129



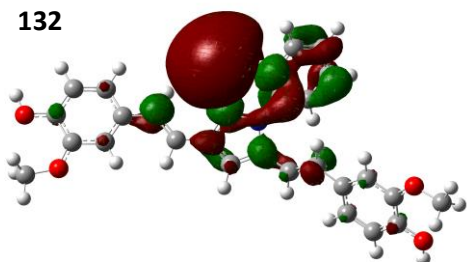
130-HOMO



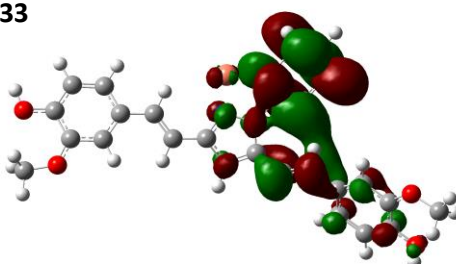
131-LUMO



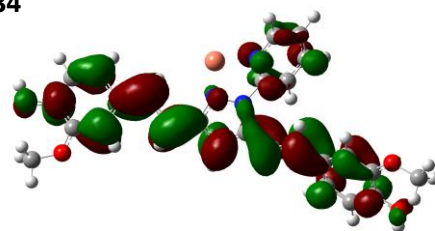
132



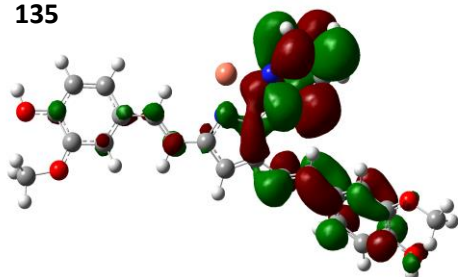
133



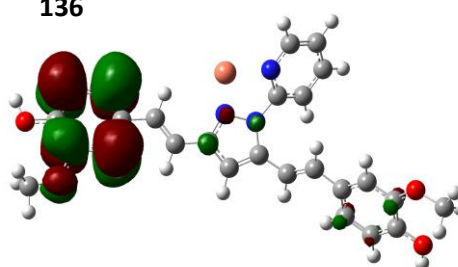
134



135

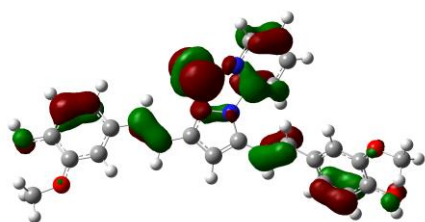


136

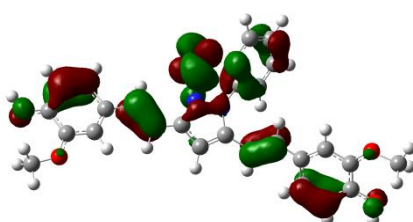


BETA

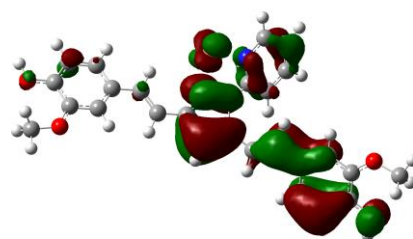
920



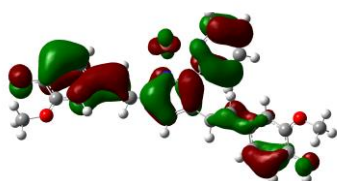
921



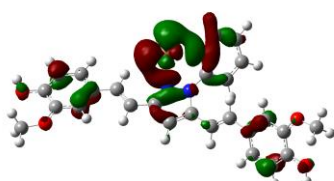
922



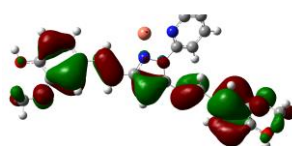
923



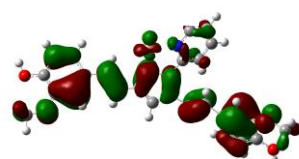
924



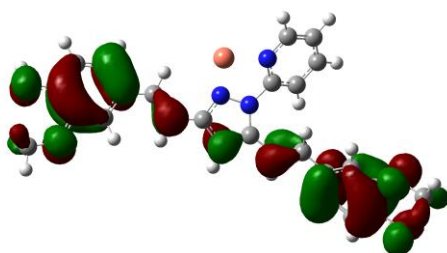
925



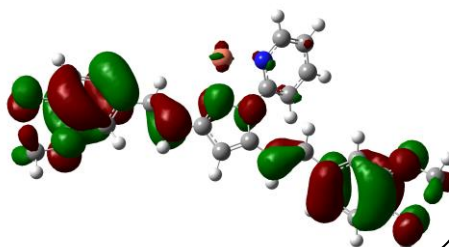
926



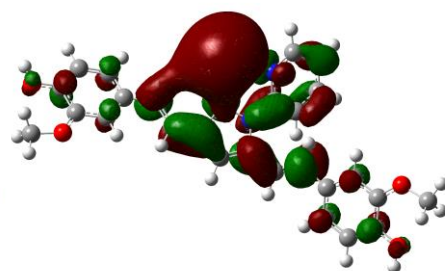
927-HOMO



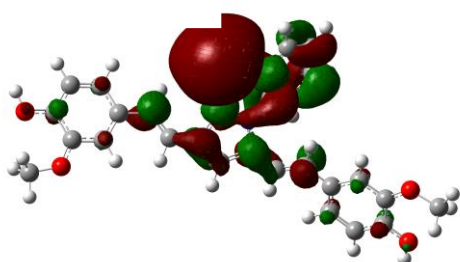
928-LUMO



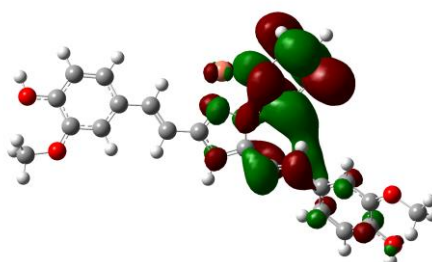
929



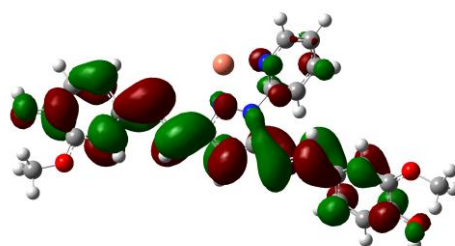
930



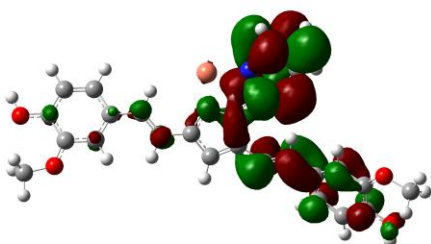
931



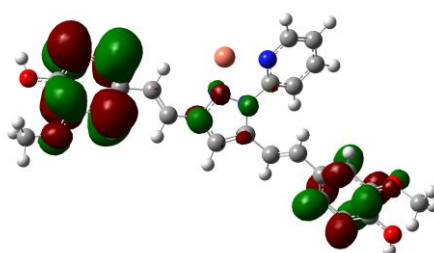
932



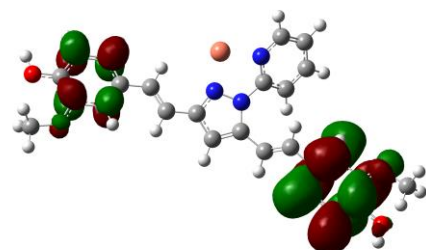
933



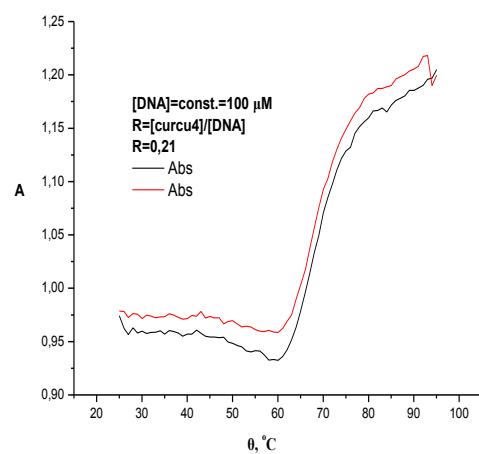
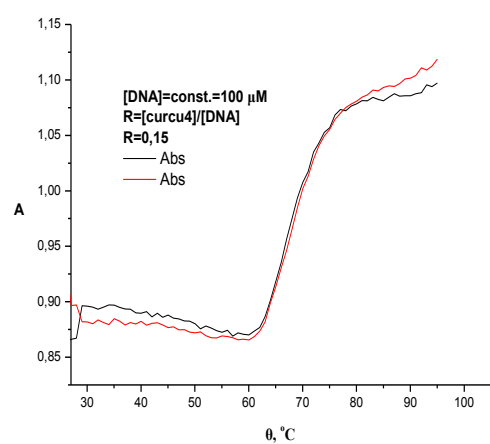
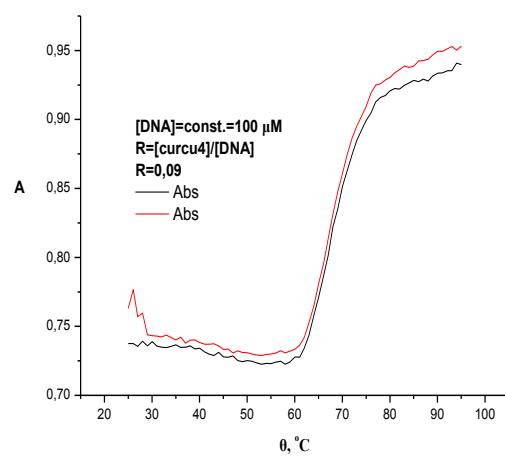
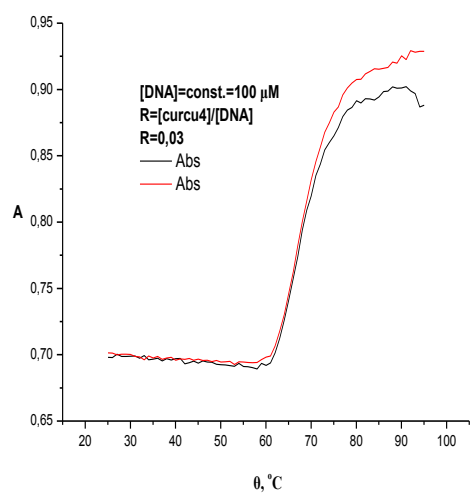
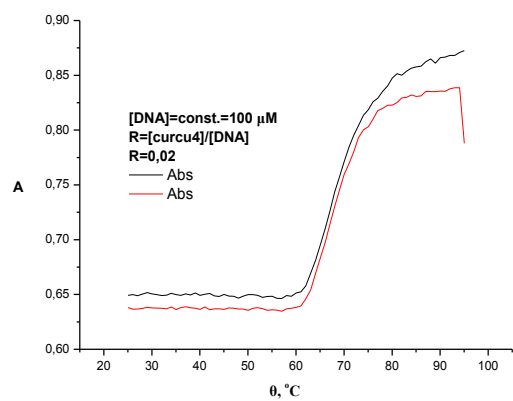
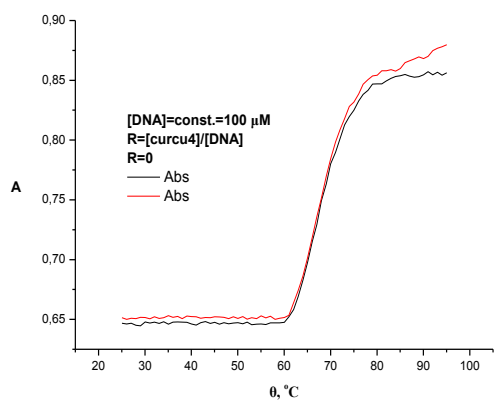
934

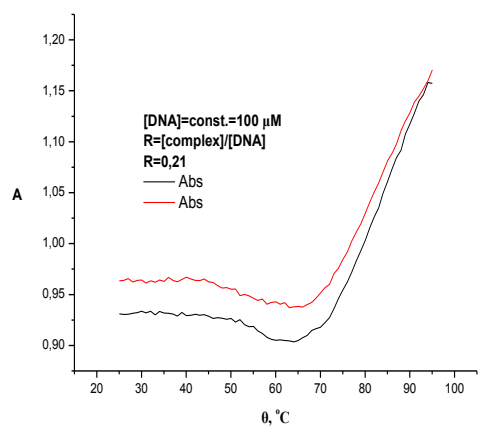
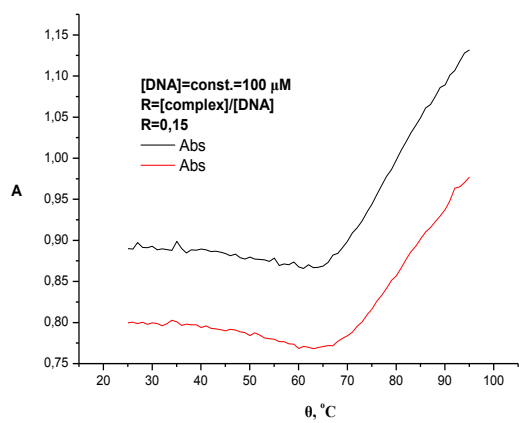
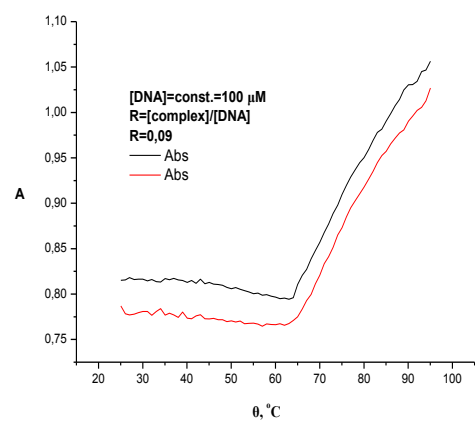
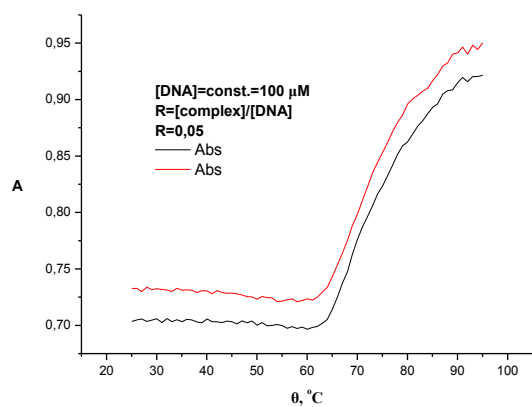
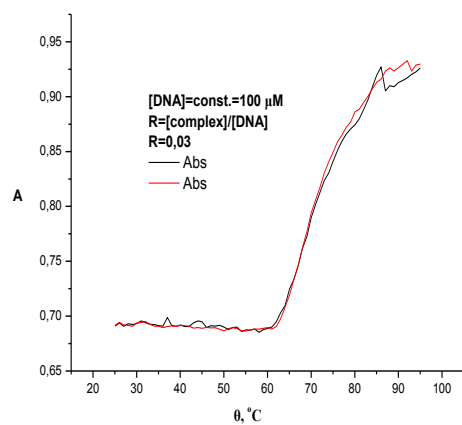
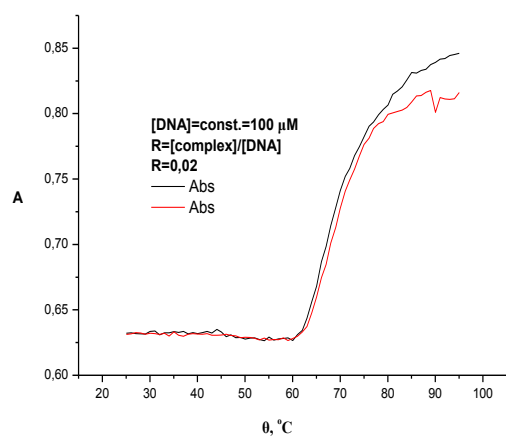


935



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ





ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. A. Goel, A. B. Kunnumakkara, B. B. Aggarwal, Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic, *Biochem. Pharmacol.*, 75, 2008, pp.787-809.
2. M. L.A.D Lestari, G. Indrayanto, Curcumin, *Profiles of Drug Subst., Excip., and Related Methodol.*, 39, 2014, pp. 113-198.
3. R.A. Sharma, A.J. Gescher, W.P. Steward, Curcumin: The story so far, *Europ. J. of Cancer*, 41, 2005, pp.1955–1968.
4. S. Chakraborti, G. Dhar, V. Dwivedi, A. Das, A. Poddar, G. Chakraborti, G. Basu, P. Chakrabarti, A. Surolia, B. Bhattacharyya, Stable and Potent Analogues Derived from the Modification of the Dicarbonyl Moiety of Curcumin, *Biochem.*, 52, 2013, pp. 7449-7460.
5. M. W. Amolins, L. B. Peterson , B. S. J. Blagg, Synthesis and evaluation of electron-rich curcumin analogues, *Bioorg. & Medic. Chem.*, 17, 2009, 360–367.
6. J. R. Fuchs, B.I Pandit, D. Bhasin, J. P. Etter, N. Regan, D. Abdelhamid, C. Li, J. Lin, P.-K. Li, Structure–activity relationship studies of curcumin analogues, *Bioorg. & Medic. Chem. Letters*, 19, 2009, 2065–2069.
7. M.A. Tomren, M. Másson, T. Loftsson, H. Hjorth Tønnesen, Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: Stability, activity and complexation with cyclodextrin, *Internat. J. of Pharmac.*, 338, 2007, 27–34.
8. G. Appendino, G. Fontana, F. Pollastro, *Natural Products Drug Discovery*, Elsevier Ltd., 2010.
9. A. L. Harvey, Natural Products in drug discovery, *Drug Discov. Today*, 13, 2008, pp.894-901.
10. B. B. Mishra, V. K. Tiwari, Natural Products: An evolving role in future drug discovery, *Eur. J. of Med. Chem.*, 46, 2011, pp.4769-4807.
11. G. M. Cragg, D. J. Newman, Natural products: A continuing source of novel drug leads, *Biochim. et Biophys. Acta*, 1830, 2013, pp.3670–3695.
12. D. M. Huryn, P. Wipf, *Natural Product Chemistry and Cancer Drug Discovery, Cancer Drug Design and Discovery, Second Edition*, 2014.
13. S. Nobili, D. Lippi, E. Witort, M. Donnini, L. Bausi, E. Mini, S. Capaccioli, Natural compounds for cancer treatment and prevention, *Pharmacol. Research*, 59, 2009, pp.365–378.

14. R.A. Sharma, A.J. Gescher, W.P. Steward, Curcumin: The story so far, *Europ. J. of Cancer*, 41, 2005, pp.1955–1968.
15. L. M. Mendonça, C. d. S. Machado, C. Cardoso Correia Teixeira, L. A. Pedro de Freitas, M. de Lourdes Pires Bianchi, L. M. Greggi Antunes, Curcumin reduces cisplatin-induced neurotoxicity in NGF-differentiated PC12 cells, *NeuroTox.*, 34, 2013, pp.205-211.
16. V. Kant, A. Gopal, N. N. Pathak, P. Kumar, S. K. Tandan, D. Kumar, Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats, *Intern. Immunopharmacol.*, 20, 2014, pp.322–330.
17. G.K. Jayaprakasha, L. Jaganmohan Rao, K.K. Sakariah, Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, *Food Chem.*, 98, 2006, pp.720–724.
18. J. Trujillo, Y. I. Chirino, E. Molina-Jijón, A. C. Andérica-Romero, E. Tapia, J. Pedraza-Chaverrí, Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings, *Redox Biol.*, 1, 2013, pp.448–456.
19. Y. Li, T. Zhang, Targeting cancer stem cells by curcumin and clinical applications, *Cancer Letters*, 346, 2014, pp.197–205.
20. Y. Yu, X. Zhang, L. Qiu, The anti-tumor efficacy of curcumin when delivered by size/charge changing multistage polymeric micelles based on amphiphilic poly(β -aminoester) derivatives, *Biomaterials*, 35, 2014, pp.3467-3479.
21. P. Anand, S. G. Thomas, A. B. Kunnumakkara, C. Sundaram, K. B. Harikumar, B. Sung, S. T. Tharakan, K. Misra, I. K. Priyadarsini, K. N. Rajasekharan, B. B. Aggarwal, Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature, *Biochem. Pharmacol.*, 76, 2008, pp.1590 – 1611.
22. E. Ferrari, R. Benassi, S. Sacchi, F. Pignedoli, M. Asti, M. Saladini, Curcumin derivatives as metal-chelating agents with potential multifunctional activity for pharmaceutical applications, *J. of Inorg. Biochem.*, 2014, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.06.002.
23. C.-J. Lin, W.-J. Liu, R.-R. Jiang, Z.-F. Jiang, H.-C. Huang, Dual effects of curcumin on neuronal oxidative stress in the presence of Cu(II), *Food and Chem. Tox.*, 49, 2011, pp.1578–1583.
24. K. I. Priyadarsini, Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells, *J. of Photochem. and Photobiol.*, 10, 2009, pp.81–95.

25. O. Naksuriya, S. Okonogi, R. M. Schiffelers, W. E. Hennink, Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment, *Biomater.* 35, 2014, pp.3365-3383.
26. C. Ramachandran, H. B. Fonseca, P. Jhabvala, E. A. Escalon, S. J. Melnick, Curcumin inhibits telomerase activity through human telomerase reverse transcriptase in MCF-7 breast cancer cell line *Cancer Letters*, 184, 2002, pp.1–6.
27. S.Chakraborty, U. Ghosh, N.P. Bhattacharyya, R.K. Bhattacharya, M. Roy, Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K-562 cells, *Mutation Research*, 596, 2006, pp.81–90.
28. Y. Sadzuka, M. Nagamine, T. Toyooka, Y. Ibuki, T. Sonobe, Beneficial effects of curcumin on antitumor activity and adverse reactions of Doxorubicin, *Intern. J. of Pharmac.*, 432, 2012, pp.42– 49.
29. J. Duana, H. M. Mansour, Y. Zhang, X. Deng, Y. Chen, J. Wang, Y. Pan, J. Zhao, Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and curcumin in chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *Internat. Journal of Pharmaceutics*, 426, 2012, pp.193– 201.
30. S. Anuchapreeda, P. Leechanachai, M.M. Smith, S.V. Ambudkar, P. Limtrakul, Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells, *Biochem. Pharmacol.*, 64, 2002, pp.573-582.
31. W. Chearwae, S. Anuchapreeda, K. Nandigama, S.V. Ambudkar, P. Limtrakul, Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I, II, and III purified from Turmeric powder, *Biochem. Pharmacol.*, 68, 2004, pp.2043– 2052.
32. K. Krishnankutty, V. D. John, Synthesis, Characterization, and Antitumour Studies of Metal Chelates of Some Synthetic Curcuminoids, *Synth. And React. In inorg. And Metal-Inorg. Chem.*, 33, 2003, pp. 343–358.
33. P. Maher, T. Akaishi, D. Schubert, K. Abe, A pyrazole derivative of curcumin enhances memory, *Neurobiol. of Aging*, 31, 2010, pp.706–709.
34. S. Sharma, Z. Ying, F. Gomez-Pinilla, A pyrazole curcumin derivative restores membrane homeostasis disrupted after brain trauma, *Experim. Neurol.*, 226, 2010, pp.191–199.
35. J. S. Wright, Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids, *J. of Molec. Structure (Theochem)*, 591, 2002, pp.207–217.

36. A.J. Ruby, G. Kuttan, K. Dinesh Babu, K.N. Rajasekharan, R. Kuttan, Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids, *Cancer Letters*, 94, 1995, pp.79-83.
37. M. Labbozzetta, R. Baruchello, P. Marchetti, M. C. Gueli, P. Poma, M. Notarbartolo, D. Simoni, N. D'Alessandro, Lack of nucleophilic addition in the isoxazole and pyrazole diketone modified analogs of curcumin; implications for their antitumor and chemosensitizing activities, *Chem.-Biol. Interact.*, 181, 2009, pp.29–36.
38. V. Kant, A. Gopal, N. N. Pathak, P. Kumar, S. K. Tandan, D. Kumar, Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats, *Internat. Immunopharmacol.*, 20, 2014, pp. 322–330.
39. G. Liang, S. Yang, H. Zhou, L. Shao, K. Huang, J. Xiao, Z. Huang, X. Li, Synthesis, crystal structure and anti-inflammatory properties of curcumin analogues, *Europ. J. of Medic. Chem.*, 44, 2009, pp.915-919.
40. O. A. Hamed, N. Mehdawi, A. Abu Taha, E. M. Hamed, M. A. Al-Nuri, A. S. Hussein, Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Curcumin Derivatives Containing Heterocyclic Moiety, *Iran. J. of Pharmac. Research*, 12 (1), 2013, pp.47-56.
41. J. Lal, S. K. Gupta, D. Thavaselvam, D. D. Agarwal, Biological activity, design, synthesis and structure activity relationship of some novel derivatives of curcumin containing sulfonamides, *Europ. J. of Medic. Chem.*, 64, 2013, pp.579-588.
42. M. S. Refat, Synthesis and characterization of ligational behavior of curcumin drug towards some transition metal ions: Chelation effect on their thermal stability and biological activity, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 105, 2013, pp.326–337.
43. X. Mei, D. Xu, S. Xu, Y. Zheng, S. Xu, Gastroprotective and antidepressant effects of a new zinc(II)–curcumin complex in rodent models of gastric ulcer and depression induced by stresses, *Pharmacol. Biochem. and Behavior*, 99, 2011, pp.66–74.
44. B. Balaji, K. Somyajit, B. Banik, G. Nagaraju, A. R. Chakravarty, Photoactivated DNA cleavage and anticancer activity of oxovanadium(IV) complexes of curcumin, *Inorg. Chim. Acta*, 400, 2013, pp.142–150.
45. S. J. Lippard, J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, 1994.

46. J Reedijk, Bioinorganic Chemistry, *Molec. Sciences and Chem. Engineering*, 2013, pp. 1-3.
47. C. Xin Zhang, S. J Lippard, New metal complexes as potential therapeutics, *Curr. Opinion in Chem. Biol.*, 7, 2003, pp.481–489.
48. S. P. Fricker, *Metal Compounds in Cancer Therapy*, Springer Science+Business Media Dordrecht, 1994.
49. B Lippert, Uses of Metal Compounds in Medicine, *Molec. Sciences and Chem. Engineering*, 2013, pp. 1-6.
50. Li-June Ming, Structure and Function of “Metalloantibiotics”, *Medic. Research Reviews*, 23, 2003, pp.697-762.
51. L. Ronconi, P. J. Sadler, Using coordination chemistry to design new medicines, *Coord. Chem. Rev.*, 251, 2007, pp.1633–1648.
52. Z.-H. Xu, X.-W. Zhang, W.-Q. Zhang, Y.-H. Gao, Z.-Z. Zeng, Synthesis, characterization, DNA interaction and antibacterial activities of two tetranuclear cobalt(II) and nickel(II) complexes with salicylaldehyde 2-phenylquinoline-4-carboxylhydrazone, *Inorg. Chem. Commun.*, 14, 2011, pp.1569–1573.
53. D. Palanimuthu, S. Vijay Shinde, K. Somasundaram, and A. G. Samuelson, In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Copper Bis(thiosemicarbazone) Complexes, *J. Med. Chem.*, 56, 2013, pp.722–734.
54. Δ. Κατάκης, Κ.Μεθενίτης, Χ.Μητσοπούλου, Γ. Πνευματικάκης, *Ανόργανη Χημεία Β΄, Τα Στοιχεία*, Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, 2002.
55. N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, Pergamon Press plc, Second Edition, Chapter 28, Great Britain, 1997.
56. F.A. Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillo, M.Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*, A Wiley-Interscience Publication, Sixth Edition, Part 3, 1999.
57. S. Sayen, A. Carlier, M. Tarpin, E. Guillon, A novel copper (II) mononuclear complex with the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Structural characterization and biological activity, *J. of Inorg. Biochem.*, 120, 2013, pp.39–43.
58. A. Binolfi, L. Quintanar, C. W. Bertoncini, C. Griesinger, C. O. Fernandez, Bioinorganic chemistry of copper coordination to alpha-synuclein: Relevance to Parkinson's disease, *Coord. Chem. Reviews*, 256, 2012, pp.2188– 2201.
59. M. N. Patel, H. N. Joshi, C. R. Patel, Cytotoxic, antibacterial, DNA interaction and superoxide dismutase like activities of sparfloxacin drug based copper(II) complexes

with nitrogen donor ligands, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 104, 2013, pp.48–55.

60. M. L. Beeton, J. R. Aldrich-Wright, A. Bolhuis, The Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Copper (II) Complexes, *J. of Inorg. Biochem.*, 2014, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.07.012.

61. M. N. Patel, C. R. Patel, H. N. Joshi, Synthesis, characterization and biological studies of mononuclear copper(II) complexes with ciprofloxacin and N, O donor ligands, *Inorg. Chem. Commun.*, 27, 2013, pp.51–55.

62. M. Gaber, N. A. El-Wakiel, H. El-Ghamry, S. K. Fathalla, Synthesis, spectroscopic characterization, DNA interaction and biological activities of Mn(II), Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes with [(1H-1,2,4-triazole-3-ylimino)methyl]naphthalene-2-ol, *J. of Molec. Struct.*, 2014, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.06.071>.

63. E. K. Efthimiadou, N. Katsaros, A. Karaliota, G. Psomas, Mononuclear copper(II) complexes with quinolones and nitrogen-donor heterocyclic ligands: Synthesis, characterization, biological activity and interaction with DNA, *Inorg. Chim. Acta*, 360, 2007, pp.4093–4102.

64. E. K. Efthimiadou, Y. Sanakis, M. Katsarou, C. P. Raptopoulou, A. Karaliota, N. Katsaros, G. Psomas, Neutral and cationic mononuclear copper(II) complexes with enrofloxacin: Structure and biological activity, *J. of Inorg. Biochem.*, 100, 2006, pp.1378–1388.

65. S. B. Etcheverry, E. G. Ferrer, L. Naso, D. A. Barrio, L. Lezama, T. Rojoc, P. A. M. Williams, Losartan and its interaction with copper (II): Biological effects, *Bioorg. & Medic. Chem.*, 15, 2007, pp.6418–6424.

66. A. E. Liberta, D.X. West, Antifungal and antitumor activity of heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes: current status, *Biomat.*, 5, 1992, pp.121-126.

67. G. M. Dulcevscaia, V. Ch. Kravtsov, F. Z. Macaev, G. G. Duca, E. P. Stingachi, S. I. Pogrebnoi, V. V. Boldescu, S. F. Clapco, J. P. Tiurina, A. A. Deseatnic-Ciloci, J. Lipkowski, S.-X. Liu, S. Decurtins, S. G. Baca, New copper (II) complexes with isoconazole: Synthesis, structures and biological properties, *Polyhedron*, 52, 2013, pp.106–114.

68. M. Belicchi Ferrari, F. Bisceglie, G. Pelosi, P. Tarasconi, R. Albertini, P. P. Dall-Aglio, S. Pinelli, A. Bergamo, G. Sava, Synthesis, characterization and biological activity

of copper complexes with pyridoxal thiosemicarbazone derivatives, X-ray crystal structure of three dimeric complexes, *J. of Inorg. Biochem.*, 98, 2004, pp.301–312.

69. L. Jia, J. Shi, Z.-h. Sun, F.-f. Li, Y. Wang, W.-n. Wu, Q. Wang, Synthesis, crystal structure, DNA-binding properties, cytotoxic and antioxidation activities of several ternary copper (II) complexes with a new reduced Schiff base ligand, *Inorg. Chim. Acta*, 391, 2012, pp.121–129.

70. T. Chandrasekar, N. Pravin, N. Raman, Biosensitive metal chelates from curcumin analogues: DNA unwinding and anti-microbial evaluation, *Inorg. Chem. Commun.*, 43, 2014, pp.45–50.

71. A. Barik, B. Mishra, L. Shen, H. Mohan, R.M. Kadam, S. Dutta, H.-Y. Zhang, K. Indira Priyadarsini, Evaluation of a new copper (II)–curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions, *Free Radic. Biol. & Medic.*, 39, 2005, pp.811 – 822.

72. A. Barik, B. Mishra, A. Kunwar, R. M. Kadam, L. Shen, S. Dutta, S. Padhye, A. K. Satpati, H.-Y. Zhang, K. Indira Priyadarsini, Comparative study of copper (II) curcumin complexes as superoxide dismutase mimics and free radical scavengers, *Europ. J. of Medic. Chem.*, 42, 2007, pp.431-439.

73. S. P. Verma, B. R. Goldin, Copper modulates activities of genistein, nitric oxide, and curcumin in breast tumor cells, *Biochem. and Biophys. Research Commun.*, 310, 2003, pp.104–108.

74. T. K. Goswami, S. Gadadhar, B. Gole, A. A. Karande, A. R. Chakravarty, Photocytotoxicity of copper(II) complexes of curcumin and N-ferrocenylmethyl-L-amino acids, *Europ. J. of Medic. Chem.*, 63, 2013, pp.800-810.

75. A. Abragam, B. Bleaney, B, Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions; Dover Publications Inc, New York, 1986.

76. N. M. Atherton, Principles of electron spin resonance; Ed; Ellis Horwood PTR Prentice Hall, 1993.

77. R. R. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry, A New Introduction to Molecular Structure and Function*, Second Edition, Elsevier, Amsterdam, 2012.

78. Skoog et al., *Principles of Instrumental Analysis*, Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 6th edition, 2007.

79. B. Valeur, *Molecular Fluorescence, Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001.

80. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc. 2001.
81. V.Bloomfield, D.Crothers, I.Jr.Tinoco, *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions*, University Science Books: California, USA, 2000, Chapter 12.
82. K.Nakanishi, N.Berova and W.Woody, *CircularDichroism: Principles and Application*,1994, 527-534, VCH, New York, NY.
83. V.I.Ivanov, L.E.Minchencova, A.K. Schyolkina, Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism, *Biopol.*, 12, 1973, pp.89.
84. C.A.Sprecher, W.A.Baase and W.C.Johnson, Conformation and circular dichroism of DNA, *Biopol.*, 18, 1979, pp.1009.
85. C.Bailly, C.O.Huigin, R.Houssin, P.Colson, C.Houssier, C.Rivallé, E.Bisagni, J.-P.Henichart, M.Waring, DNA-binding properties of a distamycin-ellipticine hybrid molecule, *Molec. Pharm.*, 41, 1992, pp.845-855.
86. A.Rajendran, B.Unni Nair, Unprecedented dual binding behaviour of acridine group of dye: A combined experimental and theoretical investigation for the development of anticancer chemotherapeutic agents, *Biochim.et Biophys. Acta*, 1760, 2006, pp.1794–1801.
87. B.Selvakumar, V.Rajendiran, P.U. Maheswari, H.Stoeckli-Evans, *J.Inorg.Bioch.*, Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper (II) complexes of iminodiacetic acid: The novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage, 100, 2006, pp.316–330.
88. CH.Zimmer, K.E. Reinert, G. Luck, U. Wähnert, G. Löber, H. Thrum, Interaction of the oligopeptide antibiotics netropsin and distamycin a with nucleic acids, *J. Mol. Biol.*, 58, 1971, pp.329-348.
89. K.E.Reinert, Adenosine thymidine cluster-specific elongation and stiffening of DNA induced by the oligopeptide antibiotic netropsin, *J. Mol. Biol.*, 72, 1972, pp.593-607.
90. V.Uma, M.Kanthimathi, T.Weyhermuller, B.Unni Nair, Oxidative DNA cleavage mediated by a new copper (II) terpyridine complex: Crystal structure and DNA binding studies, *J.Inorg.Bioch.* 99, 2005, pp.2299–2307.
91. J.L.Breslof, D.M.Brothers, DNA-ethidium reaction kinetics: Demonstration of direct ligand transfer between DNA binding sites, *J. Mol. Biol.*, 95, 1975, pp.103-123.

92. J.A.Bordelon, K.J.Feierabend, S.A.Siddiqui, L.L.Wright, J.T.Petty, *J. Phys. Chem. B.*, Viscometry and Atomic Force Microscopy Studies of the Interactions of a Dimeric Cyanine Dye with DNA, 106, 2002, pp.4838-4843.
93. A.Chouai, S.E.Wicke, C.Turro, J.Bacsa, K.R.Dunbar, D.Wang, R.P.Thummel, Ruthenium(II) Complexes of 1,12-Diazaperylene and Their Interactions with DNA, *Inorg. Chem.*, 44, 2005, pp.5996-6003.
94. L.Stryer, *Biochemistry*, 4th ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1995, ch.4&31.
95. Berridge MV, Herst PM, and Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, *Biotechnol. Annual Review*, 11, 2005, pp.127-152.
96. S. O'Hare, C.K Atterwill, *Methods in Molecular Biology, In Vitro toxicity testing protocols*, Volume 43, Humana Press Inc., 1995.
97. J. C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R. W. Horobin, A. Villanueva, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochem.*, 114, 2012, pp.785– 796.
98. K. Seidl, A. S. Zinkernagel, The MTT assay is a rapid and reliable quantitative method to assess *Staphylococcus aureus* induced endothelial cell damage, *J. of Microbiol. Methods*, 92, 2013, pp.307–309.
99. E. Ulukaya, F. Ozdikicioglu, A. Yilmaztepe Oral, M. Demirci, The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested, *Toxicol. in Vitro*, 22, 2008, pp.232–239.
100. D. Gerlier, N. Thomasset, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *J. of Immunol. Methods*, 94, 1986, pp.57-63.
101. B.C. Saravanan, C. Sreekumar, G.C. Bansal, D. Ray, J.R. Rao, A.K. Mishra, A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*, *Veterinary Parasitol.*, 113, 2003, pp.211–216.
102. G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts*, JOHN WILEY & SONS, LTD, Third Edition, 2001.
103. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro,

M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian 09, Revision A.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

104. A. D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.*, 98, 1993, pp. 5648.

105. P. J. Stephens, C. F. Devlin, M. J. Chabalowski, M. J. Frisch, Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields, *J. Phys. Chem.*, 98, 1994, pp. 11623-11627.

106. C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B*, 37, 1988, pp.785.

107. A. Schaefer, H. Horn, and R. Ahlrichs, "Fully optimized contracted Gaussian-basis sets for atoms Li to Kr," *J. Chem. Phys.*, 97, 1992, pp. 2571-2577.

108. A. Schaefer, C. Huber, and R. Ahlrichs, "Fully optimized contracted Gaussian-basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr," *J. Chem. Phys.*, 100, 1994, pp. 5829-35.

109. M. Caroli Rezende, A. Aracena, A general framework for the solvatochromism of pyridinium phenolate betaine dyes, *Chem. Physics Letters*, 558, 2013, pp.77–81.

110. N. Nagarajan, G. Vanitha, D. Arul Ananth, A. Rameshkumar, T. Sivasudha , R. Renganathan, Bioimaging, antibacterial and antifungal properties of imidazole-pyridine fluorophores: Synthesis, characterization and solvatochromism, *J. of Photochem. and Photobiol. B: Bio.*, 127, 2013,pp. 212–222.

111. F. Naderi, A. Farajtabar, F. Gharib, Solvatochromic and preferential solvation of fluorescein in some water-alcoholic mixed solvents, *J. of Molec. Liquids*, 190, 2014, pp.126–132.

112. S. Tripathy, P. Sarathi Guru, S. Dash, Solvatochromic behavior of some a-styrylpyridinium dyes, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectroscopy*, 125, 2014, pp.422–430.

113. M.C. Almandoz, M.I. Sancho, S.E. Blanco, Spectroscopic and DFT study of solvent effects on the electronic absorption spectra of sulfamethoxazole in neat and

binary solvent mixtures, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectroscopy*, 118, 2014, pp.112–119.

114. M. Gasiórowski, J. Typek, J. A. Soroka, M. J. Sawicka, E. K. Wroblewska, N. Guskos, G. Zolnierkiewicz, Spectroscopic and magnetic properties of solvatochromic complex of Cu^{2+} and novel 3H - indolium derivative, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 124, 2014, pp.300–307.

115. A. Kakanejadifard, F. Azarbani, A. Zabardasti, A. Rezayat, M. Ghasemian, S. Kakanejadifard, Spectroscopic and solvatochromism studies along with antioxidant and antibacterial activities investigation of 2-(2-mercaptophenylimino)methyl)-(phenyldiazenyl)phenol, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectroscopy*, 114, 2013, pp.404–409.

116. M. Ghasemian, A. Kakanejadifard, F. Azarbani, A. Zabardasti, S. Kakanejadifard, Spectroscopy and solvatochromism studies along with antioxidant and antibacterial activities investigation of azo–azomethine compounds 2-(2-hydroxyphenylimino)methyl)-4-phenyldiazenyl)phenol, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectroscopy*, 124, 2014, pp. 153–158.

117. H. Golchoubian, E. Rezaee, Synthesis, characterization and solvatochromism studies of two new mixed-chelate copper(II) complexes containing β -ketoamine and diamine ligands, *Polyhedron*, 55, 2013, pp. 162–168.

118. T.N. Ahip, P. R. Kamath, V. Kumar, A. V. Adhikari, New luminescent 2-methoxy-6-(4-methoxy-phenyl)-4-p-tolyl-nicotinonitrile: Synthesis, crystal structure, DFT and photophysical studies, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectroscopy*, 124, 2014, pp. 230–236.

119. S. Dhar, S. S. Roy, D. K. Rana, S. Bhattacharya, S. Bhattacharya, S. C. Bhattacharya, Tunable Solvatochromic Response of Newly Synthesized Antioxidative Naphthalimide Derivatives: Intramolecular Charge Transfer Associated with Hydrogen Bonding Effect, *J. Phys. Chem. A*, 115, 2011, pp. 2216–2224.

120. P. Nunes, N. V. Nagy, E.C.B.A. Alegria, A.J.L. Pombeiro, I. Correia, The solvation and redox behavior of mixed ligand copper (II) complexes of acetylacetonate and aromatic diimines in ionic liquids, *Inorg. Chim. Acta*, 409, 2014, pp. 465–471.

121. M. Bernabé-Pineda, M.T. Ramirez-Silva, M. Romero-Romo, E. González-Vergara, A. Rojas-Hernández, Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition, *Spectrochim. Acta A*, 60, 2004, pp. 1091–1097.

- 122.** M. Borsari, E. Ferrari, R. Grandi, M. Saladini, Curcuminoids as potential new iron chelating agents: spectroscopic, polarographic and potentiometric study on their Fe(III) complexing ability, *Inorg. Chim. Acta*, 328, 2002, pp. 61–68.
- 123.** S.V. Jovanovic, S. Steenken, C.W. Boone, M.G. Simic, H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1999, pp. 9677–9681.
- 124.** L. Shen, H.-F. Ji, Theoretical study on physicochemical properties of curcumin, *Spectrochim. Acta A*, 67, 2007, pp. 619–623.
- 125.** B. Tang, L. Ma, H.-Y. Wang, G.-Y. Zhang, Study on the supramolecular interaction of curcumin and β -cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2002, pp. 1355–1361.
- 126.** H.H. Tonnesen, J. Karlsen, Studies on curcumin and curcuminoids VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 180, 1985, pp. 402–404.
- 127.** D. D. Perrin, pKa Prediction for Organic Acids and Bases, B. Dempsey, E. P. Serjeant, Springer-Science+Business Media, B.V., 1981.
- 128.** I. I. Grandberg, G. K. Faizova, A. N. Kost, Comparative Basicities of Substituted Pyridines and Electronegativity, Series For Substituents in the Pyridine Series, *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii*, 2, 1966, pp. 561–566.
- 129.** M. Choudhary, R.N. Patel, S.P. Rawat, Synthesis, structural characterization, superoxide dismutase and antimicrobial activities studies of copper (II) complexes with 2-(E)-(2-(2-aminoethylamino) methyl)-4-bromophenol and (19E, 27E)-N1, N2-bis (phenyl (pyridine-2-yl)-methylene)-ethane-1, 2-diamine as ligands, *J. of Molec. Struct.*, 1070, 2014, pp.94–105.
- 130.** D. Kivelson, R. Neiman, ESR Studies on the Bonding in Copper Complexes, *J. Of Chem. Phys.*, 35, 1961, pp.149–155.
- 131.** V.P. Singh, S. Singh, D.P. Singh, P. Singh, K. Tiwari a, M. Mishra a, R.J. Butcher, Synthesis, spectral and single crystal X-ray diffraction studies on Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with o-amino acetophenone benzoyl hydrazone, *Polyhedron*, 56, 2013, pp. 71–81.
- 132.** V. P. Singh, S. Singh, D. P. Singh, K. Tiwari, M. Mishra, Synthesis, spectroscopic (electronic, IR, NMR and ESR) and theoretical studies of transition metal complexes with some unsymmetrical Schiff bases, *J. of Molec. Struct.*, 1058, 2014, pp. 71–78.

- 133.** G. A. van Albada, M. Ghazzali, K. Al-Farhan, E. Bouwman, J. Reedijk, Three new pyridine-2,6-dicarboxylate copper(II) compounds with coordinated pyridine-based ligands: Synthesis, characterisation and crystal structures, *Polyhedron*, 30, 2011, pp. 2690–2696.
- 134.** Z. Hnatejko, D. Kwiatek, G. Dutkiewicz, M. Kubicki, R. Jastrzb, S. Lis, Pyridine N-oxide complexes of Cu(II) ions with pseudohalides: Synthesis, structural and spectroscopic characterization, *Polyhedron*, 81, 2014, pp. 728–734.
- 135.** S. Moustafa Emam, I. El Tantawy El Sayed, N. Nassar, Transition metal complexes of neocryptolepine analogues. Part I: Synthesis, spectroscopic characterization, and in vitro anticancer activity of copper (II) complexes, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 138, 2015, pp. 942–953.
- 136.** Lech Chmurzyfiski, Acid-Base Equilibria of Substituted Pyridine, N-Oxides in Methanol, *J. of Solut. Chem.*, 21, 1992, pp.171-178.
- 137.** K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry Sixth Edition*, John Wiley & Sons, Inc, 2009.
- 138.** M. Boa, M. Valko, G. Kickelbick, M. urk, W. Linert, Cu(II) complexes with the new Schiff base ligands as a mono- and bis-condensation products of 2-pyridinecarboxaldehyde-N-oxide with diethylenetriamine, *Inorg. Chim. Acta*, 349, 2003, pp. 111- 122.
- 139.** Y. Chen, Y.-H. Zhang, L.-J. Zhao, ATR-FTIR spectroscopic studies on aqueous LiClO₄, NaClO₄, and Mg(ClO₄)₂ Solutions, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6, 2004, pp.537–542.
- 140.** T. Ghosh, S. Das, S. Pal, Bis(2-(1H-imidazol-2-yl)-pyridine)copper(II): Effects of counteranions on the molecular and supramolecular structures, *Polyhedron*, 29, 2010, pp.3074–3080.
- 141.** Z. Xi, F. Liu, Y. Zhou, W. Chen CuI/L (L=pyridine-functionalized 1,3-diketones) catalyzed C-N coupling reactions of aryl halides with NH-containing heterocycles, *Tetrahedron*, 64, 2008, pp.4254-4259.
- 142.** A. Kufelnicki, M. Woniczka, L. Checiska, M. Miernicka, E. Budzisz, Synthesis and structure of novel copper (II) complexes with pyrazole derived ligands and metal–ligand interaction in solution, *Polyhedron*, 26, 2007, pp.2589–2596.
- 143.** E. Budzisz, M. Miernicka, I.-P. Lorenz, P. Mayer, U. Krajewska, M. Rozalski, Synthesis and X-ray structure of platinum (II), palladium (II) and copper (II) complexes

with pyridine–pyrazole ligands: Influence of ligands' structure on cytotoxic activity, *Polyhedron*, 28, 2009, pp.637–645.

144. D. Kong, J. Reibenspies, J. Mao, A. Clearfield, A. E. Martell, Novel 30-membered octaazamacrocyclic ligand: synthesis, characterization, thermodynamic stabilities and DNA cleavage activity of homodinuclear copper and nickel complexes, *Inorg. Chim. Acta*, 342, 2003, pp. 158-170.

145. I. Kiseleva, D. Pyreu, T. Krivonogikh, M. Bazanova, T. Hochenkova, E. Kozlovskii, Thermodynamic study of mixed-ligand complex formation of copper(II) and nickel(II) nitrilotriacetates with amino acids in solution, *Polyhedron*, 51, 2013, pp. 10–17.

146. J. J.N. Segoviano-Garfias, G. Mendoza-Díaz, R. Moreno-Esparza, A comparative study of the speciation in methanol solution and activity in the oxidative coupling of 2,6-di-tert-butylphenol presented by the complexes: Copper(II)-N,N'-di-tert-butylethylenediamine-halogen and some copper(II)-diamine-halogen complexes, *Inorg. Chim. Acta*, 411, 2014, pp. 148–157.

147. J.J.N. Segoviano-Garfias, R. Moreno-Esparza, G. Mendoza-Díaz, Spectrophotometric determination of formation constants for the Cu–ethylenediamine–halogen (chloride and bromide) system and their catalytic effect on the oxidative coupling of 2,6-di-tert-butyl-phenol, *Inorg. Chim. Acta*, 363, 2010, pp. 3461–3468.

148. J.J.N. Segoviano-Garfias, G. Mendoza-Díaz, R. Moreno-Esparza, Spectrophotometric determination of the formation constants of the cupric halogen complexes with 1,3-propanediamine and 1,4-butanediamine in methanol solution and their activity on the oxidative coupling of the 2,6-di- tert-butylphenol, *Inorg. Chim. Acta*, 400, 2013, pp. 184–190.

149. I. Kiseleva, D. Pyreu, T. Krivonogikh, M. Bazanova, T. Hochenkova, E. Kozlovskii, Thermodynamic study of mixed-ligand complex formation of copper(II) and nickel(II) nitrilotriacetates with amino acids in solution. I, *Polyhedron*, 51, 2013, pp. 10–17.

150. B. G.Evale, S.M.Hanagodimath, Static and dynamic quenching of biologically active coumarin derivative by aniline in benzene–acetonitrile mixtures, *J. of Luminescence*, 130, 2010, pp. 1330–1337.

151. S. Pushpam, M. Kottaisamy, V. Ramakrishnan, Dynamic quenching study of 2-amino-3-bromo-1,4-naphthoquinone by titanium dioxide nano particles in solution (methanol), *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 114, 2013, pp. 272–276.

- 152.** H.M. Suresh Kumar, R.S. Kunabenchi, J.S. Biradar, N.N. Math, J.S. Kadadevarmath, S.R. Inamdar, Analysis of fluorescence quenching of new indole derivative by aniline using Stern–Volmer plots, *J. of Luminesc.*, 116, 2006, pp. 35–42.
- 153.** R.M. Melavanki, R.A.Kusanur, J.S.Kadadevaramath, M.V.Kulakarni, Quenching mechanisms of 5BAMC by aniline in different solvents using Stern–Volmer plots, *J. of Luminesc.*, 129, 2009, pp. 1298–1303.
- 154.** B. Pan, B. Xing, W. Liu, .G. Xing, S. Tao, Investigating interactions of phenanthrene with dissolved organic matter: Limitations of Stern–Volmer plot, *Chemosph.*, 69, 2007, pp. 1555–1562.
- 155.** D. Forcha, K. J. Brown, Z. Assefa, Luminescence, absorption, and Stern–Volmer studies of cerium chloride and nitrate compounds in acidic and neutral aqueous, and non-aqueous solutions, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 103, 2013, pp. 90-95.
- 156.** K. Zamojć, W. Wicz, B. Zaborowski, D. Jacewicz, L. Chmurzyński, Fluorescence quenching of 7-amino-4-methylcoumarin by different TEMPO derivatives, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 136, 2015, pp. 1875–1880.
- 157.** N.R. Patil, R.M. Melavanki, D. Nagaraja, H.D. Patil, F.M. Sanningannavar, S.B. Kapatakar, Quenching of the fluorescence of ENCDTTC by aniline and carbon tetrachloride in different organic solvents, *J. of Molec. Liquids*, 180, 2013, pp. 112–120.
- 158.** J.S. Kadadevarmath, G.H. Malimath, R.M. Melavanki, N.R. Patil, Static and dynamic model fluorescence quenching of laser dye by carbon tetrachloride in binary mixtures, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 117, 2014, pp. 630–634.
- 159.** B. Naik, L.R. Naik, J.S. Kadadevarmath, H. Pal, V. Jayathirtha Rao, Fluorescence quenching of anthrylvinyl acetate by carbon tetrachloride, *J. of Photochem. and Photobiol. A: Chem.*, 214, 2010, pp. 145–151
- 160.** H.A. Benesi, J.H. Hildebrand, A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons, *J.Am Chem Soc*, 71, 1949, pp. 2703–2707.
- 161.** R.B. Singh, S. Mahanta, N. Guchhait, , Spectral modulation of charge transfer fluorescence probe encapsulated inside aqueous and non-aqueous β -cyclodextrin nanocavities. *J Mol Struc* 963, 2010, pp. 92–97.

- 162.** S.-P. Wu & Z.-M. Huang & S.-R. Liu, P. Kun Chung, A Pyrene-based Highly Selective Turn-on Fluorescent Sensor for Copper(II) Ion and its Application in Live Cell Imaging, *J. Fluoresc.*, 22, 2012, pp. 253–259.
- 163.** K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Drug–DNA Interactions Structures And Spectra*, A John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- 164.** N. Hadjiliadis, E. Sletten, *Metal Complex–DNA Interactions*, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 2009.
- 165.** L.Z. Zhang, G.Q. Tang, Silicon Microchannel Heat Sinks Microtechnology and MEMS, *J. Photochem. Photobiol. B*, 74, 2004, pp. 119–125.
- 166.** H. Sun, J. Xiang, Y. Liu, L. Li, Q. Li, G. Xu, Y. Tang, A stabilizing and denaturing dual-effect for natural polyamines interacting with G-quadruplexes depending on concentration, *Biochimie*, 93, 2011, pp. 1351–1356.
- 167.** J. Jaumot, R. Gargallo, Experimental Methods for Studying the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands, *Curr. Pharm. Des.*, 18, 2012, pp. 1900–1916.
- 168.** A.M. Pyle, J.P. Rehmann, R. Meshoyrer, C.V. Kumar, N.J. Turro, J.K. Barton, Mixed-ligand complexes of ruthenium(II): factors governing binding to DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 1989, pp. 3051–3058.
- 169.** F. Cui, R. Huo, G. Hui, X. Lv, J. Jin, G. Zhang, W. Xing, Study on the interaction between aglycon of daunorubicin and calf thymus DNA by spectroscopy, *J. Mol. Struct.*, 1001, 2011, pp. 104–110.
- 170.** C.V. Kumar, R.S. Turner, E.H. Asuncion, Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effect, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 74, 1993, pp.231-238.
- 171.** D. A. Marvin, M. Spencer, M. H. F. Wilkins, L. D. Hamilton, The Molecular Configuration of Deoxyribonucleic Acid III. X-ray Diffraction Study of the C form of the Lithium Salt, *J. Mol. Biol.*, 3, 1961, pp. 547-565.
- 172.** W. A. Baase, W. C. Johnson Jr, Circular dichroism and DNA secondary structure, *Nucleic Acids Res.*, 6, 1979, pp. 797-814.
- 173.** A.Bonincontro, M. Falivene, C.L.Mesa, G.Risuleo, M.R. Peña, Dynamics of DNA Adsorption on and Release from SDS-DDAB Cat–Anionic Vesicles: a Multitechnique Study, *Langmuir*, 24, 2008, pp. 1973–1978.

- 174.** M.P. Uma, M.J. Palaniandavar, DNA binding and cleavage properties of certain tetrammine ruthenium(II) complexes of modified 1,10-phenanthrolines – effect of hydrogen-bonding on DNA-binding affinity, *J. of Inorg. Biochem.*, 98, 2004, pp. 219–230.
- 175.** J.L. Mergny, G. Duval-Valentin, C.H. Nguyen, L. Perrouault, B. Faucon, M. Rougee, T. Montenay-Garestier, E. Bisagni, C. Helene, Triple helix-specific ligands, *Science*, 256, 1992, pp. 1681–1684.
- 176.** Y.M. Song, J.W. Kang, J. Zhou, Z.H. Wang, X.Q. Lu, L.F. Wang, J.Z. Gao, Study on the fluorescence spectra and electrochemical behavior of ZnL2 and Morin with DNA, *Spectrochim. Acta A*, 56, 2000, pp. 2491–2497.
- 177.** J. Olmsted, D.R. Kearns, Study on the fluorescence spectra and electrochemical behavior of ZnL2 and Morin with DNA, *Biochem.*, 16, 1977, pp. 3647–3654.
- 178.** H.K. Liu, P.J. Sadler, Metal Complexes as DNA Intercalators, *Acc. Chem. Res.*, 44, 2011, pp. 349–359.
- 179.** M.B. Lyles, I.L. Cameron, Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA, *Biophys. Chem.*, 96, 2002, pp. 53–76.
- 180.** J. Zhu, L. Chen, Y. Dong, J. Li, X. Liu, Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-Hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 124, 2014, pp. 78–83.
- 181.** G. Zhang, X. Hu, P. Fu, Spectroscopic studies on the interaction between carbaryl and calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a fluorescence probe, *J. of Photochem. and Photobiol. B: Biology*, 108, 2012, pp. 53–61.
- 182.** S. Nafisi, A. Akbar Saboury, N. Keramat, J.-F. Neault, H.-A. Tajmir-Riahi, Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue, *J. of Molec. Struct.* 827, 2007, pp. 35–43.
- 183.** C. Qiao, S. Bi, Y. Sun, D. Song, H. Zhang, W. Zhou, Study of interactions of anthraquinones with DNA using ethidium bromide as a fluorescence probe, *Spectrochim. Acta Part A*, 70, 2008, pp. 136–143.
- 184.** S. Bi, H. Zhang, C. Qiao, Y. Sun, C. Liu, Studies of interaction of emodin and DNA in the presence of ethidium bromide by spectroscopic method, *Spectrochim. Acta Part A*, 69, 2008, pp. 123–129.
- 185.** I.Ch. Gherghi, S.T. Girousi, A.N. Voulgaropoulos, R. Tzimou-Tsitouridou, Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in

solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE), *Talanta*, 61, 2003, pp. 103-112.

186. Y. Nia, Y. Wangb, S. Kokot, Study of the interaction between 10-hydroxycamptothecine and DNA with the use of ethidium bromide dye as a fluorescence probe, *Sens. and Actuat. B*, 156, 2011, pp. 290–297.

187. C.S. Liu, H. Zhang, R. Chen, X.S. Shi, X.H. Bu, M. Yang, Two New Co(II) and Ni(II) Complexes with 3-(2-Pyridyl)pyrazole-Based Ligand: Synthesis, Crystal Structures, and Bioactivities, *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 2007, pp. 996–1001.

188. M.A. Husain, Z. Yaseen, S.U. Rehman, T. Sarwar, M. Tabish, Naproxen intercalates with DNA and causes photocleavage through ROS generation, *FEBS J.*, 280, 2013, pp. 6569–6580.

189. S.U. Rehman, Z. Yaseen, M.A. Husain, T. Sarwar, H.M. Ishqi, M. Tabish, Interaction of 6 Mercaptopurine with Calf Thymus DNA – Deciphering the Binding Mode and Photoinduced DNA Damage, *PLoS ONE*, 9(4), 2014, e93913.

190. R. Bera, B.K. Sahoo, K.S. Ghosh, S. Dasgupta, Studies on the interaction of isoxazolcurcumin with calf thymus DNA, *Int. J. Biol. Macromol.*, 42, 2008, pp. 14–21.

191. X.-Z. Zhao, T. Jiang, L. Wang, H. Yang, S. Zhang, P. Zhou, Interaction of curcumin with Zn(II) and Cu(II) ions based on experiment and theoretical calculation, *J. of Molec. Struct.* 984, 2010, pp. 316–325.