



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση, χαρακτηρισμός και βιολογική δραστικότητα συμπλόκων του Cu(II) με
Ph₂P(O)NHP(O)Ph₂ και διιμίνες**

ΜΑΡΙΑ ΤΣΟΥΚΑΛΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2016

**Σύνθεση, χαρακτηρισμός και βιολογική δραστικότητα συμπλόκων του Cu(II) με
Ph₂P(O)NHP(O)Ph₂ και διιμίνες
ΜΑΡΙΑ ΤΣΟΥΚΑΛΑ**

A.M.: 81404

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Παναγιώτης Κυρίτσης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Χ.-Α. Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Κων/νος Μεθενίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Παναγιώτης Κυρίτσης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 14/10/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία, το αντικείμενο μελέτης είναι η σύνθεση και ο δομικός χαρακτηρισμός των παρακάτω συμπλόκων του Cu(II) με τον ιμιδοδιφωσφινικό υποκαταστάτη (O,O) = $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2]^-$ και διάφορες διιμίνες: $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\}(2,2'\text{-bipy})]\text{NO}_3$ (**1**), $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\}(1,10\text{-phen})]\text{NO}_3$ (**2**), $[\text{Cu}_2\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(1,10\text{-phen})_2(\text{OH})_2]$ (**3**), $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}(\text{neocuproine})]\text{NO}_3$ (**4**) και $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\}(\text{curcuAX133})]\text{NO}_3$, (curcuAX133 = παράγωγο κουρκουμίνης) (**5**).

Όπως αποδεικνύεται από μελέτες κρυστάλλων των συμπλόκων **1**, **2** και **4** οι οποίοι προέκυψαν σε σύστημα διαλυτών $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:3, με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, η πρώτη σφαίρα συντάξεως CuO_3N_2 φέρει γεωμετρία τριγωνικής διπυραμίδας. Η δομή σταθεροποιείται με ενδομοριακές π-π αλληλεπιδράσεις, όπως επίσης και με δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα σε ένα συμπλεγμένο, στο μεταλλικό κέντρο, μόριο νερού και τα δύο άτομα οξυγόνου στα άκρα των δύο υποκαταστατών $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2]^-$, τα οποία, απρόσμενα, συμπλέκονται μονοσχιδώς. Το σύμπλοκο **3** είναι διπυρηνικό, με δύο γεφυρωτικά OH^- μεταξύ δύο κέντρων Cu(II)

Περαιτέρω μελέτες με τις τεχνικές φασματοσκοπίας UV-vis και cw-EPR και φασματομετρίας μάζας αποδεικνύουν ότι εν διαλύσει τα σύμπλοκα **1**, **2**, **4** και **5** εμφανίζουν τετραγωνική δομή. Οι αλληλεπιδράσεις υπερ-υπέρλεπτης υφής του ασύζευκτου ηλεκτρονίου στα σύμπλοκα **1** και **5** διερευνήθηκαν με φασματοσκοπίες ENDOR and HYSCORE.

Τα πειράματα μελέτης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου **1** με DNA δείχνουν ότι το σύμπλοκο προκαλεί δομικές ανακατατάξεις στο μόριο του ct-DNA. Όπως προκύπτει από βιολογικά πειράματα, το εν λόγω σύμπλοκο είναι τοξικό στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7, παρεμποδίζοντας τη μετάβαση των κυτάρων από τη G_2 στη M φάση του κυτταρικού κύκλου.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοανόργανη Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: χαλκός, ιμιδοδιφωσφινικός υποκαταστάτης, διιμίνη, DNA, αντικαρκινική δράση

Abstract

In this work, the synthesis and characterization of the following Cu(II) complexes, bearing the imidodiphosphinato ligand $(O,O) = [Ph_2P(O)NP(O)Ph_2]^-$ and various diimines, is presented: $[Cu\{Ph_2P(O)NP(O)Ph_2\}(2,2'\text{-bipy})]NO_3$ (**1**), $[Cu\{Ph_2P(O)NP(O)Ph_2\}(1,10\text{-phen})]NO_3$ (**2**), $[Cu_2\{Ph_2P(O)NP(O)Ph_2-O\}_2(1,10\text{-phen})_2(OH)_2]$ (**3**), $[Cu\{Ph_2P(O)NP(O)Ph_2\}(\text{neocuproine})]NO_3$ (**4**) and $[Cu\{Ph_2P(O)NP(O)Ph_2\}(\text{curcuAX133})]NO_3$, (curcuAX133 = curcumin derivative) (**5**).

X-ray crystallographic studies on crystals of **1**, **2** and **4** obtained by the layering method (CH_3OH/H_2O 1:3) revealed a trigonal bipyramidal CuO_3N_2 first coordination sphere. The structure is stabilized by intramolecular pi-pi stacking, as well as by hydrogen bonds involving the coordinated H_2O and O atoms of the two $[Ph_2P(O)NP(O)Ph_2]^-$ ligands, which, unexpectedly, are coordinated in a monodentate fashion. Complex **3** is dinuclear, bearing two bridging OH^- between two Cu(II) centers.

UV-vis and cw EPR spectroscopy studies provided evidence that in solution complexes **1**, **2**, **4** and **5** exhibit a tetragonal structure. Ligand super-hyperfine interactions of the unpaired electron of **1** were investigated by pulsed ENDOR and HYSCORE spectroscopies.

DNA-binding experiments showed that complex **1** induces conformational changes to DNA. Moreover, this complex was shown to be cytotoxic towards the breast cancer cell line MCF-7 and to inhibit the G_2/M cycle transition.

SUBJECT AREA: Bioinorganic Chemistry

KEYWORDS: Copper, imidodiphosphinato ligand, diimine, DNA, anticancer activity

Στην Οικογένειά μου...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	14
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	16
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	18
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
1.1 Ο καρκίνος.....	19
1.2 Ογκογονικός σχηματισμός ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό.....	19
1.3 Αντικαρκινικά φάρμακα	20
1.4 Αλληλεπίδραση χημικών ενώσεων με το DNA.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	30
ΠΕΡΙ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ CU(II)	30
2.1 Η χημεία του Χαλκού.....	30
2.2 Ιδιότητες των συμπλόκων του χαλκού (Cu).....	31
2.3 Τα σύμπλοκα του Cu(II) ως αντικαρκινικά φάρμακα	32
2.4 Η περίπτωση των Κασσιοπινών	32
2.5 Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων του Χαλκού	34
2.5.1 ROS: παραγωγή και αδρανοποίηση	35
2.5.2 Ενίσχυση οξειδωτικού περιβάλλοντος (αντίδραση Fenton).....	36
2.6 Τρόπος αλληλεπίδρασης των συμπλόκων του Cu(II) με το DNA.....	37
2.7 Σύμπλοκα του Cu(II) με χηλικούς ιμιδοδιφωσφινικούς υποκαταστάτες.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	44
ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΩΝ	44
3.1 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Δομής	44
3.1.1 Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ	44
3.1.2 Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR)	45
3.1.3 Φασματοσκοπία Ορατού Υπεριώδους.....	49
3.1.4 Φασματοσκοπία υπερύθρου	50
3.1.5 Φασματομετρία μάζας (MS)	51
3.2 Μέθοδοι μελέτης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με CT-DNA.....	51
3.2.1 Τιτλοδότηση μέσω της φασματοσκοπίας UV-vis	52
3.2.2 Προσδιορισμός Σημείων Τήξεως (Tm)	53
3.2.3 Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού (CD)	54
3.2.3 Ιξωδομετρία (Viscosimetry)	56
3.3 Μέθοδοι μελέτης της κυτταροτοξικότητας του συμπλόκου	57
3.3.1 Δοκιμασία MTT	57
3.3.2 Ανάλυση FACS.....	58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	59
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	59
4.1 Σύνθεση και ο χαρακτηρισμός υποκαταστατών και συμπλόκων	59
4.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου 1 με το CT-DNA	60
4.3 Βιολογικά πειράματα	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	63
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ CU(II)	63
5.1 Σύνθεση υποκαταστατών	63
5.2 Σύνθεση συμπλόκων του Cu(II)	64
5.2.1 Σύνθεση και δομικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου [Cu{Ph ₂ P(O)NP(O)Ph ₂ }(2,2'-bipy)] (1)	65
5.2.2 Σύνθεση και δομικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου [Cu{Ph ₂ P(O)NP(O)Ph ₂ }(1,10-phen)]NO ₃ (2)	74
5.2.3 Σύνθεση και δομικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου [Cu ₂ {Ph ₂ P(O)NP(O)Ph ₂ -O} ₂ (1,10-phen) ₂ (OH) ₂] (3)	79
5.2.4 Σύνθεση και δομικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου [Cu{Ph ₂ P(O)NP(O)Ph ₂ }(neocuproine)]NO ₃ (4)	82
5.2.5 Σύνθεση και δομικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου [Cu({Ph ₂ P(O)NP(O)Ph ₂ })(curcuAX133)]NO ₃ (5), όπου curcuAX133: 2-(3,5-bis(3,4-dimethoxystyryl)-1H-pyrazol-1-yl)pyridine	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	95
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ 1 ΜΕ ΤΟ CT-DNA	95
6.1 Παρασκευή διαλυμάτων	95
6.1.1 Διαλύματα ct-DNA	95
6.1.2 Διαλύματα για φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους	96
6.1.3 Διαλύματα για φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των Σημείων Τήξεως (T _m)	96
6.1.4 Διαλύματα για φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	97
6.1.5 Διαλύματα για Ιξωδομετρία	97
6.2 Ανάλυση με φασματοσκοπία UV-Vis	97
6.2.1 Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση του συμπλόκου C1	97
6.2.2 Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης (T _m)	100
6.3 Ανάλυση με Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού (Circular Dichroism, CD)	101
6.4 Ιξωδομετρία (viscosity)	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	103
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ 1 ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ MCF-7	103
7.1 Κυτταρικές καλλιέργειες	103
7.2 Μεθοδολογία δοκιμασίας MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium)	105
7.3 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής (FACS)	108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	116
ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΩΝ ΔΟΜΩΝ.....	116
8.1 Η κρυσταλλική δομή [Cu(N,N)(O)(O)(H₂O)] ή «τρεις παραλλαγές σε ένα θέμα»	116
8.1.1 Σύγκριση της δομής [Cu(N,N)(O)(O)(H₂O)] με ανάλογο βιολογικό σύστημα	118
8.1.2 Σύγκριση της δομής [Cu(N,N)(O)(O)(H₂O)] με ανάλογες δομές από τη βιβλιογραφία .	121
8.2 Εκτίμηση της βιολογικής δραστηριότητας του συμπλόκου 1	126
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	127
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΣ ΟΡΟΣ	127
ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΟΡΟΣ	127
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	128
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	129
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	130

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Παρουσίαση της διάσχισης Zeeman για ένα σύστημα με $S = \frac{1}{2}$ σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0	48
Σχήμα 2: Παρουσίαση της επίδρασης του οκταεδρικού CF στα ενεργειακά επίπεδα ενός $3d^9$ ιόντος μετάλλου μετάπτωσης (με την ενεργειακή διάσχιση να είναι Δ)	49
Σχήμα 3: Τυπική πορεία τήξης του DNA.....	54
Σχήμα 4: Φάσματα CD για τις πιθανές διαμορφώσεις του DNA	55
Σχήμα 5: Αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη μέσω ενζύμων αναγωγής.....	57
Σχήμα 6: Το φάσμα UV-vis του συμπλόκου 1 σε διαλύτη CH_3OH	67
Σχήμα 7: Σειρά φασμάτων UV-vis του συμπλόκου 1 σε διαλύτη CH_3OH	67
Σχήμα 8: Φάσματα IR για το 1 ως κρυσταλλικό και άμορφο σύστημα.....	68
Σχήμα 9: Το φάσμα cw-EPR του συμπλόκου 1 σε διάλυμα μεθανόλης/τολουολίου, σε αναλογία 1:1, στους 70 K (μπλέ χρώμα) και η προσομοίωσή του (κόκκινο χρώμα).....	69
Σχήμα 10: Το φάσμα Davies ENDOR του συμπλόκου 1 (με μπλε γραμμή) και η προσομοίωσή του (κόκκινη γραμμή).	70
Σχήμα 11: Το φάσμα HYSCORE του συμπλόκου 1.....	71
Σχήμα 12: Τα φάσματα cw-EPR του συμπλόκου 1 σε χρονικό διάστημα τριών ημερών.....	72
Σχήμα 13: Φάσμα MS του συμπλόκου 1.....	73
Σχήμα 14: Ισοτοπική κατανομή του $[C_{38}H_{28}CuN_3O_2P_2]^+$	73
Σχήμα 15: Το φάσμα UV-vis του συμπλόκου 2 σε CH_3OH	76
Σχήμα 16: Φάσμα IR του συμπλόκου 2 σε CH_3OH	77
Σχήμα 17: Το φάσμα cw-EPR του συμπλόκου 2 (πράσινη γραμμή), σε σύγκριση με αυτά του 1 (κόκκινη και μπλε γραμμή).	78
Σχήμα 18: Φάσμα UV-vis του συμπλόκου 3 σε διαλύτη CH_3OH	81
Σχήμα 19: Το φάσμα cw-EPR του συμπλόκου 3.....	81
Σχήμα 20: Φάσμα IR του συμπλόκου 4	84
Σχήμα 21: Φάσμα UV-vis του συμπλόκου 4 σε CH_3OH	85
Σχήμα 22: Τα φάσματα cw-EPR για το σύμπλοκο 4 σε σχέση με αυτά των 1 και 2. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
Σχήμα 23: Ο συντακτικός τύπος του υποκαταστάτη curcuAX133, ενός νέου παραγώγου της φυσικής κουρκουμίνης με τη χημική ονομασία 2-(3,5-bis(3,4-dimethoxystyryl)-1H-pyrazol-1-yl)pyridine.	87
Σχήμα 24: Φάσμα MS για το σύμπλοκο $[Cu(\{Ph_2P(O)NP(O)Ph_2\})(curcuAX133)]NO_3$	88
Σχήμα 25: Ισοτοπική κατανομή του $[C_{52}H_{47}O_6N_4CuP_2]^+$, επάνω η πειραματική, κάτω η θεωρητική).....	89
Σχήμα 26: Φάσμα IR του συμπλόκου 5.....	89
Σχήμα 27: Φάσμα UV-vis του συμπλόκου 5.....	91

Σχήμα 28: Το φάσμα cw-EPR του συμπλόκου 5 (μπλε γραμμή).....	92
Σχήμα 29: Τα φάσματα ENDOR του συμπλόκου 5 (με μπλε γραμμή) και η προσομοίωσή τους (κόκκινη και πράσινη γραμμή) για δύο μη ισοδύναμα άτομα αζώτου.	92
Σχήμα 30: Τα φάσματα HYSCORE του συμπλόκου 5.	93
Σχήμα 31: Προτεινόμενος τρόπος σύμπλεξης στο κέντρο Cu(II) του παραγώγου curcuAX133.	94
Σχήμα 32: Φάσματα UV-vis συμπλόκου 1-DNA.....	98
Σχήμα 33: Διάγραμμα μεταβολής του λόγου [DNA]/($\epsilon_A - \epsilon_F$) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση [DNA] στο σύστημα 1-DNA.	99
Σχήμα 34: Φάσμα CD για το σύστημα 1-DNA.	101
Σχήμα 35: Διάγραμμα ιξωδομετρίας για τη σειρά: DNA-Σύμπλοκο 1.	102
Σχήμα 36: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας (α) του δι-οξυγονωμένου υποκαταστάτη (OPPh ₂ NH), (β) της 2,2'-διπυριδίνης, (γ) του συμπλόκου 1 και (δ) του μείγματος (OPPh ₂ NH) / 2,2'-διπυριδίνης (σε αναλογία 1:1), μετά την επίδρασή τους στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7	107
Σχήμα 37: Control στις 24 h.	110
Σχήμα 38: Σύμπλοκο 1 στις 24 h.	110
Σχήμα 39: Υποκαταστάτης 2,2'-διπυριδίνη στις 24 h.....	110
Σχήμα 40: Διάγραμμα του % ποσοστού των φάσεων G1, G2 και S του κυτταρικού κύκλου μετά από 24 ώρες επώασης με τα παράγωγα [complex: 1, ligand: 2,2'-bipyridine].....	111
Σχήμα 41: Control στις 48 h.	112
Σχήμα 42: Σύμπλοκο 1 στις 48 h.	112
Σχήμα 43: Υποκαταστάτης 2,2'-διπυριδίνη στις 48 h.....	112
Σχήμα 44: Διάγραμμα του % ποσοστού των φάσεων G1, G2 και S του κυτταρικού κύκλου μετά από 48 h επώασης με τα παράγωγα [complex: 1, ligand: 2,2'-bipyridine]	113
Σχήμα 45: Control στις 72 h.	114
Σχήμα 46: Σύμπλοκο 1 στις 72 h.	114
Σχήμα 47: Υποκαταστάτης 2,2'-διπυριδίνη στις 48 h.....	114
Σχήμα 48: Διάγραμμα του % ποσοστού των φάσεων G1, G2 και S του κυτταρικού κύκλου μετά από 72 ώρες επώασης με τα παράγωγα [complex: 1, ligand: 2,2'-bipyridine].....	115

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Το p53 οδηγεί τα κύτταρα με βλάβη στο DNA σε απόπτωση	20
Εικόνα 2: Τα ζεύγη των συμπληρωματικών βάσεων στο DNA	22
Εικόνα 3: Η μεγάλη και η μικρή αύλακα του DNA	22
Εικόνα 4: Συνοπτική αναπαράσταση των μηχανισμών δράσης των αντικαρκινικών φαρμάκων στη μεταγραφική πορεία	23
Εικόνα 5: (Α) Παρεμβολή του επίπεδου δακτυλίου του υποκαταστάτη ενός συμπλόκου στο DNA. (Β) Παρεμβολή του $[Ru(L)_2(L')^{2+}]$ ($L=bipyridine$, $1,10\text{-phenanthroline (phen)}$, $L'= dppz$) σε τμήμα DNA (CG-GC). (Γ) Παρεμβολή συμπλόκου $Ru(XXX)$ σε B-DNA.	26
Εικόνα 6: “Threading” & “Non-threading” παρεμβολή από τις ισομερείς 1,5 και 1,8 ανθρακινόνες (τριπλοί παρεμβολείς)	27
Εικόνα 7: Δομή ακτίνων Χ που παριστάνει την παρεμβολή της 9-αμινο-6-βρωμο-DACA (χωροπληρωτικό μοντέλο) στη διπλή έλικα του DNA 5'-d(C/G(5-BrU)AC/G)2-3'(τρισδιάστατη απεικόνιση) (η κόκκινη / δηλώνει παρεμβολή).	28
Εικόνα 8: (Α) DNA με νετροψίνη στη μικρή αύλακα. (Β) Μοντέλο πρόσδεσης της acridine bis-imidazolidinones ($R=ethyl$) σε γειτονικά ζεύγη βάσεων G-C στη μικρή αύλακα του DNA	29
Εικόνα 9: Εξωτερική σύνδεση συμπλόκου του $Ru(II)$, παρουσία ιόντων, σε πολυηλεκτρολύτη DNA	29
Εικόνα 10: Ο αστερισμός της Κασσιόπης	33
Εικόνα 11: Γενικοί χημικοί τύποι Κασσιοπινών $[Cu(N-N)(O-O)]^+$, όπου $(O-O)=acac$ & $(N-N)=bipy$ (αριστερά) και $phen$ (δεξιά)	33
Εικόνα 12: Συντακτικός τύπος και διάγραμμα ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $\nabla^2\rho(r)$, της κασσιοπίνης $Cu[(2,2'\text{-bipyridine})(acetylacetonate)]^+$, όπου παρατηρούνται δύο «δεσμικά μονοπάτια» (bond paths) ανάμεσα στο Cu^{+2} και τα δύο άτομα αζώτου των αρωματικών δακτυλίων και δύο ανάμεσα στο Cu^{+2} και τα άτομα οξυγόνου του $acac$	34
Εικόνα 13: Ανηγγμένη Γλουταθειόνη, GSH	35
Εικόνα 14: Οξειδωμένη Γλουταθειόνη, GSSG.....	35
Εικόνα 15: Αντιδράσεις κατά την παραγωγή ROS μέσω μηχανισμού Fenton.	36
Εικόνα 16: Μοριακό μοντέλο απεικόνισης της δομής «δεοξυριβόζη-φωσφορική ομάδα-κασσιοπίνη».	37
Εικόνα 17: Μοντέλο προσομοίωσης της “Casiopaina III-Da”	38
Εικόνα 18: «Μοριακή αναγνώριση» μεταξύ DNA κι ενός συμπλόκου του $Cu(II)$	39
Εικόνα 19: Συνθετική μέθοδος και κρυσταλλική δομή συμπλόκου του $Cu(II)$	40
Εικόνα 20: (α) Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[chromone\text{-appended-Cu(II)}]$ συνδεδεμένου στην περιοχή G-C της μικρής αύλακας DNA, δωδεκαμερούς $d(CGCGAATTCGCG)_2$	41
Εικόνα 21: Δομή του συμπλόκου $[Cu\{Ph_2P(O)NP(O)Ph_2-O\}_2(2,2'\text{-bipy})(H_2O)]$	66

Εικόνα 23: Δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(1,10\text{-phen})(\text{H}_2\text{O})]$	75
Εικόνα 24: Δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}_2\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(1,10\text{-phen})_2(\text{OH})_2]$	79
Εικόνα 25: Δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(\text{neocuproine})(\text{H}_2\text{O})]$	83
Εικόνα 26: Αιματοκυττόμετρο. Δεξιά, σε μεγέθυνση, φαίνεται η περιοχή μέτρησης των κυττάρων.	105
Εικόνα 27: Δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(2,2'\text{-bipy})(\text{H}_2\text{O})]$	117
Εικόνα 28: Δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(1,10\text{-phen})(\text{H}_2\text{O})]$.	117
Εικόνα 29: Δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(\text{neocuproine})(\text{H}_2\text{O})]$ (4)	117
Εικόνα 30: Η τρισδιάστατη δομή της καρβονικής ανυδράσης και το ενεργό κέντρο $\text{Zn}(\text{II})$ του ενζύμου.....	118
Εικόνα 31: Απόδοση του ενεργού κέντρου της ανθρώπινης καρβονικής ανυδράσης II, όπου φαίνονται τρία κατάλοιπα ιστιδίνης (His) και OH^- συμπλεγμένα (διακεκομμένες γραμμές) με $\text{Zn}(\text{II})$	119
Εικόνα 32: Ο «Μηχανισμός Zn -υδροξειδίου» της καρβονικής ανυδράσης.....	120
Εικόνα 33: Η δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}(\text{dtbp})_2(1,10\text{-phen})(\text{OH}_2)]$	121
Εικόνα 34: Μοντέλο ενεργοποίησης του συμπλεγμένου μορίου H_2O προς OH^-	122

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Παραδείγματα αλληλεπίδρασης φαρμάκου-DNA.....	25
Πίνακας 2: Ομάδες υποκαταστατών στις Κασσιοπίνες $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]^+$	33
Πίνακας 3: Τα μήκη κύματος των εμφανιζόμενων ταινιών στα φάσματα CD	55
Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(2,2'\text{-bipy})(\text{H}_2\text{O})]$	66
Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(1,10\text{-phen})(\text{H}_2\text{O})]$	75
Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου $[\text{Cu}_2\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(1,10\text{-phen})_2(\text{OH})_2]$	80
Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(\text{neocuproine})(\text{H}_2\text{O})]$	83
Πίνακας 8: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR στο φάσμα του συμπλόκου 5	90
Πίνακας 9: Τα Σημεία Τήξεως (T_m), τα ΔT_m και η % hr στα 258 nm σε διάφορους λόγους R για το σύμπλοκο 1.....	100
Πίνακας 10: Τιμές IC_{50} (μM).....	107
Πίνακας 11: Μήκη δεσμών υδρογόνου μεταξύ του συμπλεγμένου H_2O και του ελεύθερου ατόμου O του υποκαταστάτη $\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}$	116
Πίνακας 12: Παράθεση συμπλόκων ενώσεων των μετάλλων Sb, Sn, Co, Pt, Pd και Au με τα παράγωγα του σκελετού $\text{Ph}_2\text{PNHPPH}_2$ που συμπλέκονται μονοσχιδώς.....	125

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, Ανόργανη Χημεία και Τεχνολογία, κατ' εξοχήν στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, του Τμήματος Χημείας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του ΕΚΠΑ, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή, κ. Παναγιώτη Κυρίτση. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για τη συνεχή καθοδήγησή του, την εμπιστοσύνη του και την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής, την Καθηγήτρια και Δ/ντρια του Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας, κ. Χριστιάννα Μητσοπούλου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή, κ. Κων/νο Μεθενίτη, για τη βοήθεια και την καθοδήγησή του στα πειράματα μελέτης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Παραβατού, Ερευνήτρια Β' στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Ερευνών, Ενέργειας και Ασφάλειας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, για τη συνεχή βοήθειά της προς την επιτυχή ολοκλήρωση των βιολογικών πειραμάτων.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω από το Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, τον κ. Γ. Μήτρικα, Ερευνητή Β' για την απόδοση των φασμάτων EPR και τον κ. Β. Ψυχάρη και την κ. Κ. Ραπτοπούλου για την επίλυση της κρυσταλλικής δομής των συμπλόκων ενώσεων.

Από το Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. κ. Μαρία Πελεκάνου, Ερευνήτρια Α', στο εργαστήριο της οποίας έγινε η σύνθεση του παραγώγου της κουρκουμίνης από την Δρ. Σαγνού Μαρίνα και την Δρ. Αλεξίου Πολυξένη, καθώς και τον Ερευνητή κ. Χάρη Πρατσίνη, στο Εργαστήριο του οποίου ολοκληρώθηκαν τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής.

Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Τμήμα Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας) του ΕΙΕ.

Επί πλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα, κ. Πολύδωρο Ιωάννου για την πολύτιμη βοήθειά του στη σύνθεση των ενώσεων, αλλά και όλους τους συναδέλφους στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας για το φιλικό και ευχάριστο κλίμα όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Οικογένειά μου και να τους αφιερώσω την παρούσα εργασία, ως ελάχιστη ένδειξη ευγνωμοσύνης προς την αέναη αγάπη τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα σύμπλοκα των μετάλλων έχουν γίνει αντικείμενο πολλών ερευνών, λόγω της εν δυνάμει χρήσης τους στη διάγνωση και τη χημειοθεραπεία του καρκίνου. Στην πορεία αυτή, ένα από τα πιο σημαντικά ζητήματα είναι η σύνθεση ενώσεων με λιγότερη τοξικότητα και περισσότερη δραστικότητα από τα ήδη γνωστά αντικαρκινικά φάρμακα, όπως το cisplatin.

Ο Χαλκός είναι ένα από τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία για τον ανθρώπινο οργανισμό, σημαντικό για τη λειτουργία πολλών ενζύμων που έχουν σχέση με το μεταβολισμό, την αναπνοή και τη σύνθεση του DNA στα κύτταρα. Οι σημαντικότερες λειτουργίες των βιολογικά ενεργών ενώσεων του χαλκού περιλαμβάνουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, στις οποίες ο χαλκός αντιδρά απευθείας με το μοριακό οξυγόνο ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου προς σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Η τοξικότητα του χαλκού προέρχεται από την ικανότητα παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species). Επομένως, λόγω του ότι ο χαλκός υπάρχει στον οργανισμό ως ιχνοστοιχείο, οι σύμπλοκες ενώσεις του μπορούν να είναι λιγότερο τοξικές από μέταλλα, όπως π.χ. ο λευκόχρυσος στο cisplatin.

Τα τελευταία χρόνια, πολλά σύμπλοκα του χαλκού μελετώνται ως προς την αντικαρκινική τους δραστικότητα.

Απαραίτητες τεχνικές, τόσο για τον χαρακτηρισμό των εν λόγω συμπλόκων, όσο και για τη μελέτη του τρόπου αλληλεπίδρασής τους με το DNA, είναι μεταξύ άλλων η φασματοσκοπία UV-vis, η φθορισμομετρία, η μέθοδος ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) και η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Από τη συνδυαστική παρατήρηση των πειραματικών αποτελεσμάτων μπορούν να εξαχθούν πολύτιμα συμπεράσματα τόσο για τη δομή του φαρμάκου, όσο και για τον τρόπο αλληλεπίδρασής του με το DNA. Η διερεύνηση του τρόπου αλληλεπίδρασης συμπλόκου-DNA είναι σημαντική για την κατανόηση του τρόπου δράσης ενός φαρμάκου, καθώς και για το σχεδιασμό άλλων πιο αποτελεσματικών, με παραπλήσιες θεραπευτικές ιδιότητες και λιγότερες παρενέργειες για τον άνθρωπο.

1.1 Ο καρκίνος

Ο καρκίνος αποτελεί μία ομάδα περισσότερων από εκατό διαφορετικών νόσων που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό μη φυσιολογικών κυττάρων, τα οποία μπορούν να εξαπλωθούν σε άλλα σημεία του σώματος μέσω του αίματος και του λεμφικού συστήματος.

Όλοι οι καρκίνοι ξεκινούν στα κύτταρα. Το σώμα αποτελείται από πολλούς τύπους κυττάρων, τα οποία αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με έναν ελεγχόμενο τρόπο για να παράγουν περισσότερα κύτταρα αφού είναι αναγκαία για να διατηρηθεί το σώμα υγιές. Όταν τα κύτταρα γεράσουν ή καταστραφούν, πεθαίνουν και αντικαθίστανται από νέα. Στους φυσιολογικούς ιστούς, ο ρυθμός ανάπτυξης των νέων κυττάρων και θανάτου των γερασμένων βρίσκεται σε ισορροπία. Στον καρκίνο, αυτή η ισορροπία διακόπτεται και μπορεί να προκληθεί από την ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη ή από την απώλεια της ικανότητας των κυττάρων να υποβληθούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται **«απόπτωση»**. Απόπτωση ή «προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος», είναι ο μηχανισμός μέσω του οποίου γερασμένα ή κατεστραμμένα κύτταρα αυτοκαταστρέφονται. Η βαθμιαία αύξηση του αριθμού των διαιρούμενων κυττάρων δημιουργεί μια αναπτυσσόμενη μάζα ιστού που ονομάζεται **«όγκος»** ή **«νεόπλασμα»**. Ανεξάρτητα από τον ρυθμό ανάπτυξης, οι όγκοι τελικά θα αυξηθούν σε μέγεθος διότι παράγονται νέα κύτταρα σε ποσότητες μεγαλύτερες από όσο χρειάζονται. Όσο αυτά συσσωρεύονται, η κανονική οργάνωση του ιστού βαθμιαία διακόπτεται.

Οι καρκίνοι είναι ικανοί να εξαπλώνονται σε όλο το σώμα μέσω δύο μηχανισμών, της διήθησης (invasion) και της μετάστασης. Η διήθηση αναφέρεται στην άμεση εισβολή και διείσδυση των καρκινικών κυττάρων στους γειτονικούς ιστούς, ενώ η μετάσταση αναφέρεται στην ικανότητά τους να διηθούν στα λεμφικά αγγεία και στα αγγεία αίματος.

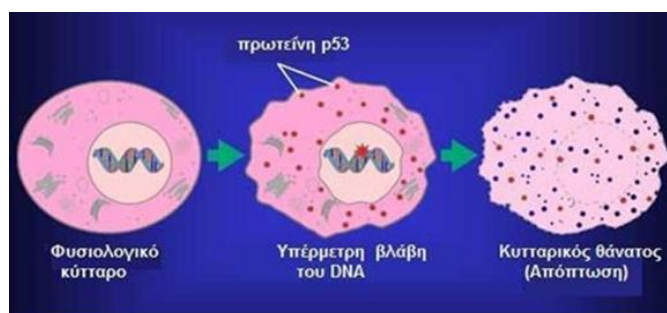
Οι όγκοι κατηγοριοποιούνται σε *καλοήθεις* και *κακοήθεις*, ανάλογα με το αν μπορούν να εξαπλωθούν μέσω της διήθησης και της μετάστασης ή όχι. Οι πρώτοι δεν μπορούν να εξαπλωθούν και αναπτύσσονται μόνο τοπικά, ενώ οι δεύτεροι έχουν την ικανότητα της μετάστασης γι' αυτό και ο όρος **«καρκίνος»** αναφέρεται μόνο στους κακοήθεις όγκους.

1.2 Ογκογονικός σχηματισμός ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό

Με την παθογένεια του καρκίνου έχουν συσχετισθεί τρεις κατηγορίες γονιδίων: τα ογκοκατασταλτικά, τα ογκογονίδια και, μία τρίτη κατηγορία, τα τροποποιητικά γονίδια, στα οποία ανήκουν γονίδια ενός ευρέος λειτουργικού φάσματος που μπορούν να

τροποποιήσουν την προδιάθεση για καρκινογένεση. Δυσλειτουργία των πρωτεϊνικών προϊόντων αυτών των γονιδίων οδηγεί σε ανώμαλη ρύθμιση των λειτουργιών που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, τη γενετική σταθερότητα και τη διαφοροποίηση του κυττάρου.

Τα *ογκοκατασταλτικά* γονίδια (tumor suppressor genes) είναι μία οικογένεια φυσιολογικών γονιδίων που δίνουν οδηγίες στα κύτταρα για την παραγωγή πρωτεϊνών που αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Παραδείγματος χάριν, η πρωτεΐνη που παράγεται από το ανοσοκατασταλτικό γονίδιο P53 ονομάζεται πρωτεΐνη p53 και στα κύτταρα αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο αν δεν γίνει σωστά η αντιγραφή του DNA ή προκαλεί απόπτωση [1]. Αν η βλάβη δεν μπορεί να διορθωθεί, η p53 πρωτεΐνη τελικά προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο, αποτρέποντας έτσι το γενετικά κατεστραμμένο κύτταρο από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη.



Εικόνα 1: Το p53 οδηγεί τα κύτταρα με βλάβη στο DNA σε απόπτωση [2].

Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb) στο ανθρώπινο ρετινοβλάστωμα, η πρώτη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε.

Ένα *ογκογονίδιο* (oncogene) είναι ένα γονίδιο το οποίο, όταν μεταλλάσσεται ή εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, βοηθά τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Τα ογκογονίδια μπορούν να προκαλέσουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων τα οποία κάτω από φυσιολογικές συνθήκες υποβάλλονται σε ένα προγραμματισμένο σχήμα θανάτου (απόπτωση) [2].

1.3 Αντικαρκινικά φάρμακα

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Δυστυχώς, τα αντικαρκινικά φάρμακα που διαθέτουμε μέχρι σήμερα δεν εμφανίζουν εκλεκτική τοξικότητα, δεδομένου ότι δρουν τόσο στα καρκινικά «κύτταρα-στόχους» όσο και στα φυσιολογικά. Επομένως, τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα έχουν στενό θεραπευτικό εύρος και εμφανίζουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Προσπάθεια

αντιμετώπισης αυτού του προβλήματος γίνεται με χορήγηση συνδυασμού χημειοθεραπευτικών.

Στο πλαίσιο του σχεδιασμού και της ανάπτυξης νέων χημειοθεραπευτικών μέσων, γίνονται προσπάθειες βελτίωσης της εκλεκτικότητάς τους, και ως εκ τούτου μείωσης των ανεπιθύμητων ενεργειών τους. Μια από τις σημαντικότερες προσπάθειες, αφορά στην *εκλεκτική* μεταφορά των κυτταροτοξικών παραγόντων στα καρκινικά κύτταρα, η οποία επιτυγχάνεται μέσω ποικίλων στρατηγικών: α) με προφάρμακα που ενεργοποιούνται από ενδογενή ένζυμα τα οποία εντοπίζονται κυρίως στα καρκινικά κύτταρα, β) με εξειδικευμένα εξωγενή ένζυμα τα οποία εισάγονται εντός των κυτταρικών ιστών μέσω γενετικής τεχνολογίας και γ) με σύζευξη διαφόρων αντινεοπλασματικών παραγόντων με χημικές δομικές ομάδες που δύνανται να αναγνωρίζουν τα καρκινικά κύτταρα, όπως μονοκλωνικά αντισώματα, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, φυλλικό οξύ, υαλουρονικό οξύ και πεπτίδια. Επίσης, με την ανάπτυξη της Μοριακής Βιολογίας, Βιοχημείας, Γενετικής, Γονιδιωματικής και Βιοτεχνολογίας εντοπίζονται νέοι μοριακοί στόχοι σχετιζόμενοι με τον καρκίνο και ακολουθεί ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων εκλεκτικών αντινεοπλασματικών παραγόντων (π.χ. αναστολείς της τυροσίνης των κινασών).

Τα αντικαρκινικά φάρμακα διαχωρίζονται ανάλογα με τον *τρόπο δράσης* τους σε: **(α)** φάρμακα που συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA, **(β)** αντιμεταβολίτες, **(γ)** φάρμακα που συνδέονται μη ομοιοπολικά με το DNA, **(δ)** αναστολείς των μικροσωληνίσκων, **(ε)** αναστολείς της DNA τοποϊσομεράσης I και II, **(στ)** φάρμακα που επιδρούν στη λειτουργία του ενδοκρινούς συστήματος και **(ζ)** στους παράγοντες διαφοροποίησης [3].

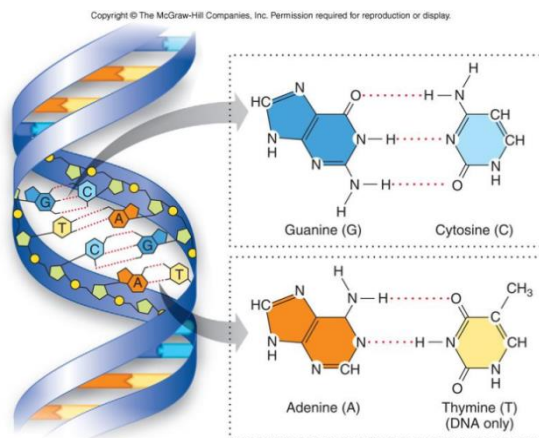
1.4 Αλληλεπίδραση χημικών ενώσεων με το DNA

Για την καλύτερη κατανόηση των διαφόρων τύπων πρόσδεσης χημικών ενώσεων στο δίκλωνο DNA, θα ήταν απαραίτητο να γίνει μία σύντομη περιγραφή της βασικής δομής του DNA.

1.4.1 Η δομή του DNA

Ένα μόριο DNA συνίσταται από δύο μακριές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, οι οποίες αποτελούνται από τέσσερα είδη νουκλεοτιδίων. Καθεμία από αυτές τις αλυσίδες αναφέρεται ως *αλυσίδα DNA* ή *κλώνος DNA*. Οι δύο αλυσίδες συγκρατούνται εσωτερικά με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των νουκλεοτιδίων: η Αδενίνη (A) πάντα αλληλεπιδρά με τη Θυμίνη (T) και η Γουανίνη (G) με την Κυτοσίνη (C). Τα νουκλεοτίδια συνδέονται ομοιοπολικά μεταξύ τους σε μια αλυσίδα μέσω των σακχάρων και των

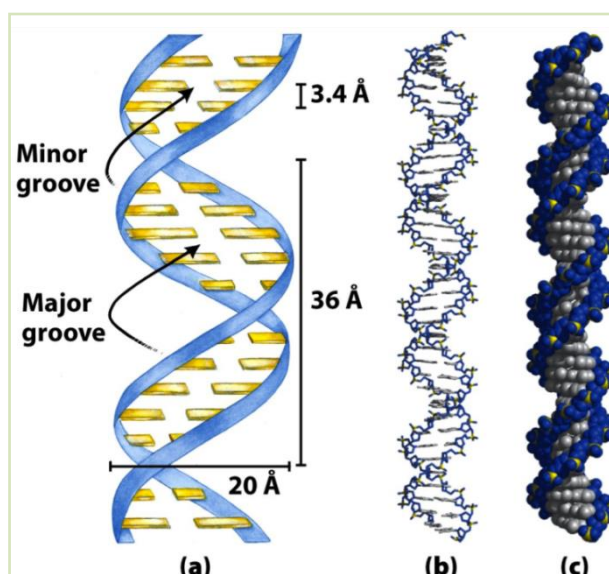
φωσφορικών ομάδων τους, σχηματίζοντας στο εξωτερικό της έλικας ένα «σκελετό» εναλλασσόμενων μονάδων σακχάρου-φωσφορικής ομάδας-σακχάρου-φωσφορικής ομάδας (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Τα ζεύγη των συμπληρωματικών βάσεων στο DNA [4].

Τα μέλη κάθε ζεύγους βάσεων προσαρμόζονται μέσα στη διπλή έλικα, μόνο όταν οι δύο κλώνοι της είναι αντιπαράλληλοι, δηλαδή μόνο όταν η πολικότητα του ενός κλώνου έχει αντίθετο προσανατολισμό από την πολικότητα του άλλου. Για το λόγο αυτό, ο κάθε κλώνος ενός μορίου DNA περιέχει μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων η οποία είναι ακριβώς συμπληρωματική προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του άλλου κλώνου.

Λόγω της περιστροφής του ενός κλώνου γύρω από τον άλλο, δημιουργούνται δύο αύλακες, η κύρια και η δευτερεύουσα. Η *μεγάλη ή κύρια* αύλακα (major groove) είναι ευρεία, ρηχή και το πλάτος της ανέρχεται σε 12 Å, ενώ η *μικρή ή δευτερεύουσα* αύλακα (minor groove) είναι μικρότερη και το πλάτος της ανέρχεται σε 6 Å (Εικόνα 3).



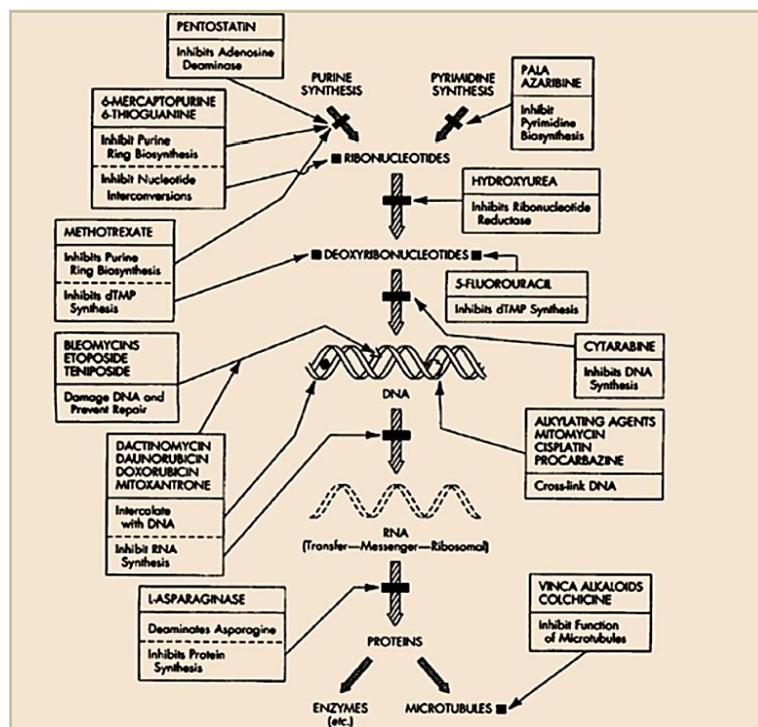
Εικόνα 3: Η μεγάλη και η μικρή αύλακα του DNA [5].

1.4.2 Τύποι αλληλεπίδρασης φαρμάκου-DNA

Το DNA αποτελεί στόχο για πολλά φάρμακα που ήδη χρησιμοποιούνται κλινικώς ή σχεδιάζονται με σκοπό να δοκιμαστούν στο μέλλον. Με την αλληλεπίδραση του φαρμάκου με το DNA τροποποιούνται ή παρεμποδίζονται σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μεταγραφή του DNA (γονιδιακή έκφραση και πρωτεϊνοσύνθεση) ή η αντιγραφή του (σημαντικό στάδιο κατά την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση). Επομένως για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης των φαρμάκων, είναι σημαντική η γνώση των τρόπων αυτής της αλληλεπίδρασης.

Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να αλληλεπιδράσει ένα αντικαρκινικό φάρμακο με το DNA (Εικόνα 4):

- Μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-DNA, όπως είναι οι πολυμεράσες και ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες.
- Μέσω της πρόσδεσης RNA στη διπλή έλικα του DNA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δομών «τριπλής νουκλεοτιδικής έλικας» ή τον RNA υβριδισμό σε μία έλικα του DNA και το σχηματισμό DNA-RNA υβριδίων, τα οποία μπορούν να παρεμβαίνουν στη μεταγραφική λειτουργία.
- Μέσω της πρόσδεσης μικρών, συνήθως αρωματικών, μορίων στη διπλή έλικα του DNA. είτε με ομοιοπολικούς δεσμούς είτε με αλληλεπιδράσεις άλλου τύπου.



Εικόνα 4: Συνοπτική αναπαράσταση των μηχανισμών δράσης των αντικαρκινικών φαρμάκων στη μεταγραφική πορεία [6].

1.4.3 Τρόποι πρόσδεσης του φαρμάκου στο DNA

Μία χημική ένωση μπορεί να προσδεθεί στο DNA με δύο βασικούς τρόπους· είτε με ομοιοπολικό δεσμό, είτε με μη-ομοιοπολικό τρόπο (Πίνακας 1).

(α) Ομοιοπολικός τρόπος

Έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένα φάρμακα αλληλεπιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς, είτε μέσω αλκυλίωσης, είτε μέσω δια- και ενδο-κλωνικών σταυροσυνδέσεων (inter- and intrastrand crosslinking). Ο εν λόγω τύπος πρόσδεσης είναι μη αντιστρεπτός και επάγει ποικιλοτρόπως την πλήρη αναστολή των λειτουργιών του DNA, με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Μείζον πλεονέκτημα των ενώσεων που συνδέονται με το DNA μέσω ομοιοπολικού δεσμού είναι η ισχυρή τους πρόσδεση.

Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ομοιοπολικής σύνδεσης με το DNA αποτελεί το **cisplatin** [διχλωροδιαμινολευκόχρυσος(II)]. Στο εσωτερικό του κυττάρου, το σύμπλοκο υδρολύεται προς $[Pt(NH_3)_2(H_2O)(OH)]^+$ δεδομένου ότι το μεταλλικό κέντρο Pt(II) είναι αρκετά ισχυρό οξύ κατά Lewis, μορφή η οποία πιστεύεται ότι είναι η ενεργός μορφή του φαρμάκου. Η τετραγωνική δομή του συμπλόκου είναι ιδανική για την πρόσδεσή του στις αλυσίδες του DNA, κατά την οποία οι αζωτούχες βάσεις του DNA αντικαθιστούν το H_2O και το OH^- . Η παρουσία του συμπλόκου παρεμποδίζει την αντιγραφή του DNA, με αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου [7].

(β) Μη ομοιοπολικός τρόπος

Οι ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA με μη ομοιοπολικό τρόπο είναι γενικότερα λιγότερο τοξικοί για το κύτταρο σε σύγκριση με παράγοντες που ενώνονται με το DNA μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Παρότι τα μηχανιστικά μονοπάτια των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων δεν έχουν εξιχνιαστεί επακριβώς, ως σημαντικότερες επιπτώσεις τους αναφέρονται οι διαταράξεις στη δομή του DNA, αλλαγές της στροφικής του ικανότητας, αλληλεπιδράσεις του DNA με πρωτεΐνες όπως οι τοπο-ισομεράσες, καθώς και επιπτώσεις στη δομή και λειτουργία του μιτοχονδριακού DNA. Ο μη ομοιοπολικός τρόπος σύνδεσης φαρμάκου-DNA μπορεί να ταξινομηθεί περαιτέρω σε τρεις ειδικότερους τύπους αλληλεπίδρασης: (i) η παρεμβολή (intercalation), (ii) η πρόσδεση στη μικρή ή τη μεγάλη αύλακα του DNA (groove binding) και (iii) η εξωτερική σύνδεση (external binding).

Πίνακας 1: Παραδείγματα αλληλεπίδρασης φαρμάκου-DNA.

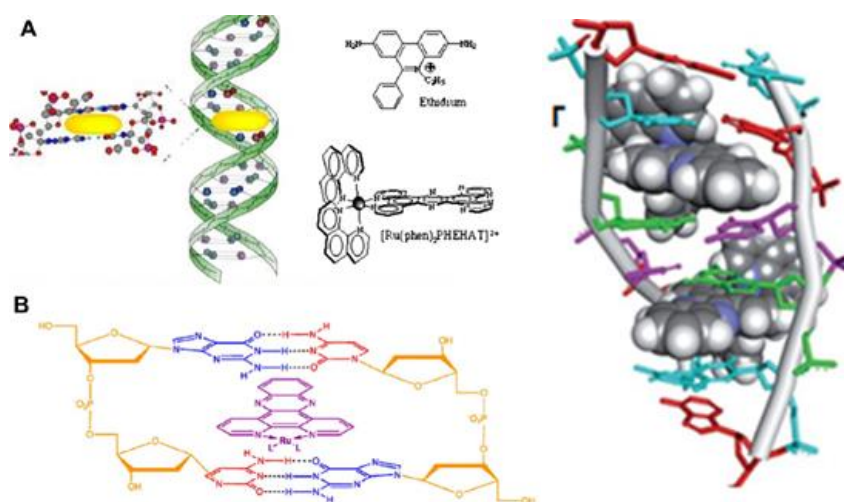
Φάρμακα μη ομοιοπολικής σύνδεσης με το DNA		Φάρμακα ομοιοπολικής σύνδεσης με το DNA
(Α) Μέσω πρόσδεσης στην αύλακα του DNA	(Β) Μέσω παρεμβολής στο DNA	
berenil	Αμινοακριδίνες	busulfan
διβενζιμαδόλες	αρυλαμινοαλκοόλες	καμπποθεσίνη
μπλεομυκίνη	Κουμαρίνες	chlorambucil
chloroquine	κυστοδυτίνη J	cis-platin
χρωμομυκίνη A3	Διπλαμίνη	clomesone
διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη	ΥΟ-1 και ΥΟΥΟ-1	cyclodisone
δισταμυκίνη Α	Δαυνομυκίνη	μουστάρδες αζώτου
γουανυλική διφουραμιδίνη	κινολίνες και κινοξαλίνες	nitrosoureas
μιθραμυκίνη	αιθίδιο βρωμίδιο	
νεταμυκίνη	Προφλαβίνη	
νετροψίνη	εχινομυκίνη	

(i) Σύνδεση φαρμάκου-DNA μέσω παρεμβολής

Η παρεμβολή (*intercalation*) επίπεδων οργανικών ενώσεων στο μόριο του DNA προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Lerman, προκειμένου να ερμηνεύσει την ισχυρή συγγένεια συγκεκριμένων ετεροκυκλικών αρωματικών χρωστικών, όπως οι ακριδίνες, για το DNA [8]. Επίπεδες ετεροκυκλικές ενώσεις δρουν ως παρεμβολείς που στοιβάζονται ανάμεσα σε γειτονικά ζεύγη βάσεων του DNA, αναπτύσσοντας ισχυρές πηλεκτρονιακές επικαλύψεις. Οι παρεμβολείς είναι μόρια που στοιβάζονται κάθετα στο σκελετό του DNA δίχως το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών και τη διάσπαση των

δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA. Οι μόνοι γνωστοί δεσμοί που εξασφαλίζουν τη σταθερότητα στο σύμπλοκο παρεμβολέας-DNA, ακόμα περισσότερο και από ό,τι το DNA μόνο του, είναι οι van der Waals, οι δεσμοί υδρογόνου, οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και/ή ιόντος-ιόντος. Για να εφαρμόσει ένας παρεμβολέας ανάμεσα στις βάσεις, η διπλή έλικα χαλαρώνει κι επιμηκύνεται σε βαθμό που εξαρτάται από τον παρεμβολέα, π.χ τα κατιόντα αιθιδίου (Εικόνα 5Α) χαλαρώνουν το DNA κατά 26° ενώ η προφλαβίνη κατά 17°. Αυτές οι δομικές αλλαγές μπορούν να οδηγήσουν σε τροποποιήσεις λειτουργιών, όπως η μεταγραφή, ο αναδιπλασιασμός του DNA, καθώς και αλλαγές σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, καθιστώντας έτσι τους παρεμβολείς ισχυρά μεταλλαξιγόνα. Τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία με στόχο την παρεμπόδιση της αντιγραφής του DNA σε καρκινικά κύτταρα που διαιρούνται με ταχύ ρυθμό.

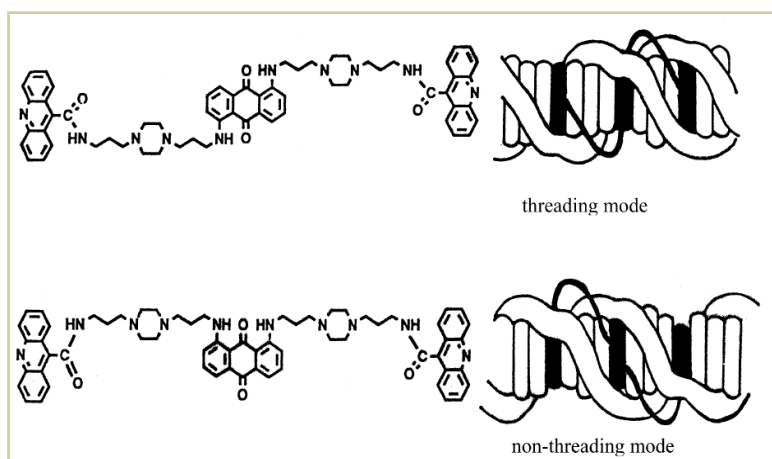
Η παρεμβολή είναι συνήθως ανεξάρτητη της αλληλουχίας βάσεων στο DNA (έχει παρατηρηθεί μια μικρή εξειδίκευση στα ζεύγη GC). Αυτός ο τρόπος πρόσδεσης ευνοείται από την παρουσία υποκαταστατών με εκτεταμένο αρωματικό δακτύλιο, όπως το PHEHAT [1,10-phenanthroline(5,6-b)1,4,5,8,9,12-hexaazatriphenylene] ή η DPPZ [dipyrido(3,2-a, 2,3-c)phenazine] (Εικόνα 5B,Γ).



Εικόνα 5: (Α) Παρεμβολή του επίπεδου δακτυλίου του υποκαταστάτη ενός συμπλόκου στο DNA. (Β) Παρεμβολή του $[Ru(L)_2(L')]^{2+}$ (L =bipyridine, 1,10-phenanthroline (phen), L' = dppz) σε τμήμα DNA (CG-GC). (Γ) Παρεμβολή συμπλόκου $Ru(XXX)$ σε B-DNA [9].

Με λιγότερο εκτεταμένους αρωματικούς δακτυλίους, αντί της παρεμβολής, συνήθως προτιμάται η αλληλεπίδραση των βοηθητικών υποκαταστατών με το φωσφοδιεστερικό σκελετό, όπως στην περίπτωση του $[Ru(phen)_3]^{2+}$ [10],[11].

Εκτός από την κλασική, υπάρχει κι ένας άλλος τύπος παρεμβολής του φαρμάκου στο DNA, ενισχυμένης όμως και από άλλες αλληλεπιδράσεις. Οι παρεμβολείς αυτού του είδους φέρουν συνήθως εκατέρωθεν του αρωματικού συστήματος ογκώδεις και συνήθως φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες, όπως σάκχαρα, μία εκ των οποίων μπορεί να διεισδύει στην κοιλότητα της παρεμβολής. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός ενός ιδιαίτερου σταθερού συμπλέγματος φαρμάκου-DNA, γεγονός που φαίνεται να ευνοείται από τις αλληλεπιδράσεις των πλευρικών αλυσίδων με τη μικρή και τη μεγάλη αύλακα του DNA. Συνολικά, η σύνδεση του παρεμβολέα εσωτερικά και εξωτερικά του δίκλωνου DNA μοιάζει με το πέρασμα της κλωστής από τη βελόνα, εξ' ου και ο όρος *threading intercalation* (thread = νήμα), που χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία. Φαίνεται μάλιστα ότι ακόμα και οι διαφορές στην τοπολογία δύο ισομερών ενώσεων παίζουν καθοριστικό ρόλο για το είδος της παρεμβολής τους στο DNA (Εικόνα 6).

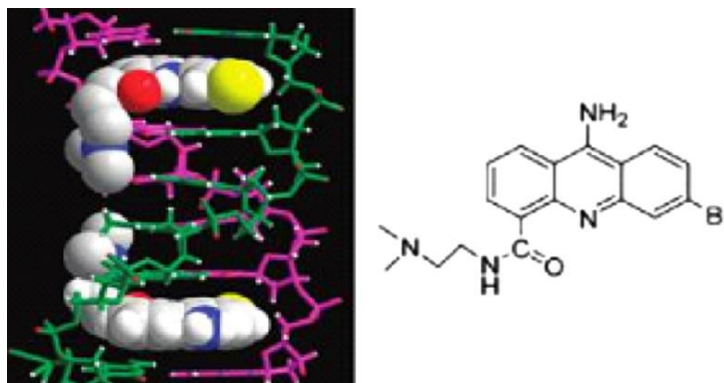


Εικόνα 6: “Threading” & “Non-threading” παρεμβολή από τις ισομερείς 1,5 και 1,8 ανθρακινόνες (τριπλοί παρεμβολείς) [13].

Η περίπτωση της *acridine-4-carboxamides* είναι ένα παράδειγμα τέτοιου είδους παρεμβολής στο DNA. Ορισμένες ενώσεις ακριδίνης μπορούν να εμποδίσουν τις τοποϊσομεράσες I και II (Εικόνα 7).

Οι DNA τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα που διαμορφώνουν την τοπολογία του DNA, και είναι υπεύθυνα για το γενετικό υλικό κατά τη διάρκεια της μεταγραφής της αναδίπλωσής του. Η δραστηριότητα των τοποϊσομερασών συνίσταται στο σπάσιμο της έλικας του DNA (μονό ή διπλό σπάσιμο που προκαλεί η τοποϊσομεράση I ή II, αντίστοιχα). Οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης σταθεροποιούν το σύμπλεγμα τοποϊσομεράση-DNA. Το σύμπλεγμα φάρμακο {(αναστολέας τοποϊσομεράσης) & DNA & τοποϊσομεράση}

προκαλεί μη αναστρέψιμο σπάσιμο της διπλής έλικας του DNA, το οποίο οδηγεί στην απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) μέσω βιοχημικών ή γονιδιακών αλλαγών.

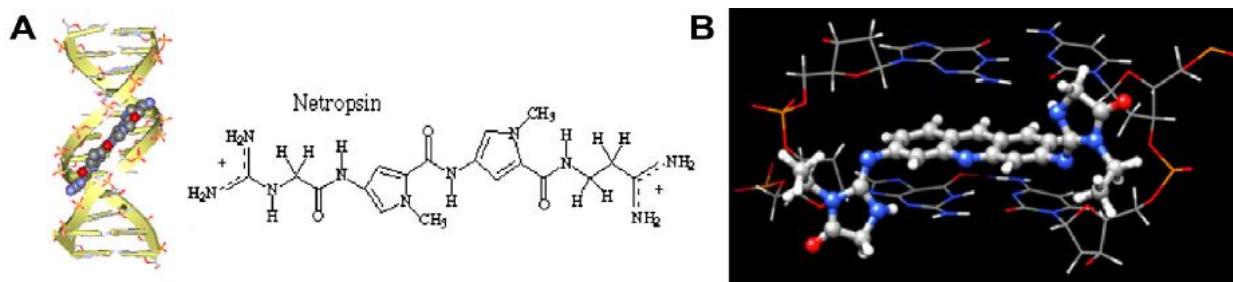


Εικόνα 7: Δομή ακτίνων Χ που παριστάνει την παρεμβολή της 9-αμινο-6-βρωμο-DACA (χωροπληρωτικό μοντέλο) στη διπλή έλικα του DNA 5'-d(C/G(5-BrU)AC/G)2-3' (τρισδιάστατη απεικόνιση) (η κόκκινη / δηλώνει παρεμβολή).

(ii) Πρόσδεση φαρμάκου στη μεγάλη ή τη μικρή αύλακα του DNA

Γενικά ισχύει ότι ενώσεις μικρού μεγέθους, κυρίως επίπεδες και κατιοντικές, προσδένονται στο DNA μέσω της μικρής αύλακας (*minor groove binding*), ενώ ενώσεις μεγαλύτερου μεγέθους, όπως στερεοχημικώς παρεμποδισμένα μεταλλικά σύμπλοκα, πρωτεΐνες ή ολιγονουκλεοτίδια, αλληλεπιδρούν κυρίως με τη μεγάλη αύλακα του DNA (*major groove binding*). Η πρόσδεση μικρών ενώσεων με αρωματικούς δακτυλίους, όπως πυρρολίου, φουρανίου ή βενζολίου, στη μικρή αύλακα του DNA γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals και δεσμών υδρογόνου. Τα μόρια αυτά έχουν στενό σχήμα και καμπυλότητα τέτοια ώστε να μπορεί το φάρμακο να προσαρμοστεί απόλυτα στη μικρή αύλακα του DNA. Εμφανίζονται -συνήθως- σε αλληλουχίες πλούσιες σε αδερίνη και θυμίνη (AT), ίσως επειδή οι περιοχές αυτές είναι πιο στενές και ευνοούνται περισσότερο οι αλληλεπιδράσεις τύπου van der Waals από ό,τι στις G-C περιοχές της αύλακας. Για να αλληλεπιδράσει η ένωση με το DNA είναι επίσης απαραίτητη η παρουσία Mg^{2+} .

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αντιβιοτικό *νετροψίνη* (Εικόνα 8A). Ωστόσο έχουν σχεδιαστεί ορισμένα συνθετικά πολυαμίδια (π.χ. *lexitropsins*) και πολυαμίδια με ιμιδαζολικούς-πυρρολικούς δακτυλίους που έχουν εξειδίκευση στις GC περιοχές της μικρής αύλακας (Εικόνα 8B).

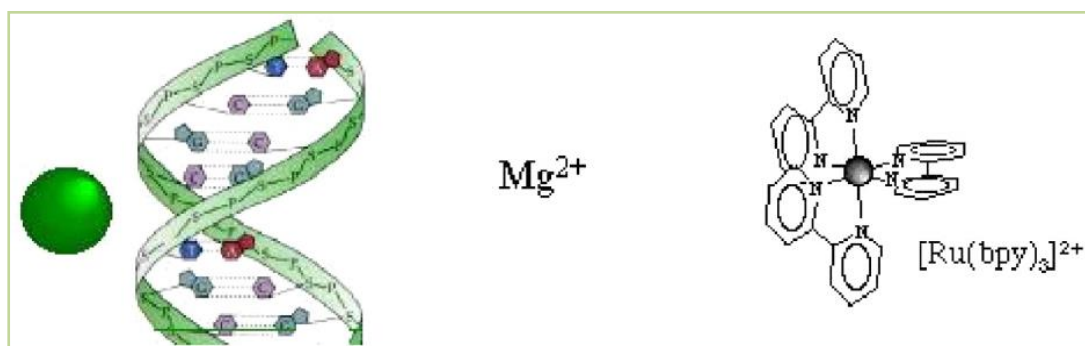


Εικόνα 8: (Α) DNA με νετροψίνη στη μικρή αύλακα. (Β) Μοντέλο πρόσδεσης της acridine bis-imidazolidinones (R=ethyl) σε γειτονικά ζεύγη βάσεων G-C στη μικρή αύλακα του DNA [13].

(iii) Εξωτερική σύνδεση φαρμάκου στο DNA

Ο τύπος αυτός πρόσδεσης εμφανίζεται με την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων ή ιόντων και της φωσφορικής ομάδας του «σκελετού» του DNA στην εξωτερική του επιφάνεια. Η σύνδεση εξαρτάται από το φορτίο του ιόντος ή του μορίου, την υδροφοβικότητα του υποκαταστάτη και το μέγεθος των ιόντων. Τέτοιου είδους συνδέσεις εμφανίζουν συχνά τα ιόντα μετάλλων που ανήκουν στην ομάδα των Αλκαλίων και των Αλκαλικών Γαιών, όπως π.χ. τα Mg^{2+} στα αντιβιοτικά της ομάδας *μιθραμυκίνης*.

Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση συμπλόκου του $Ru(II)$, το οποίο λόγω του θετικού φορτίου $2+$ του μετάλλου, αλληλεπιδρά με τον αρνητικά φορτισμένο φωσφοροσακχαρικό σκελετό εξωτερικά της διπλής έλικας του DNA. Αυτός ο τρόπος σύνδεσης επροτάθη για το $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, όταν παρατηρήθηκε ενίσχυση της φωταύγειας του συμπλόκου κατά την πρόσδεσή του στο DNA, γεγονός που είναι άμεσα συνυφασμένο με την ιοντική ισχύ. Κατιόντα επίσης όπως το Mg^{2+} αλληλεπιδρούν συνήθως με αυτόν τον τρόπο (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Εξωτερική σύνδεση συμπλόκου του $Ru(II)$, παρουσία ιόντων, σε πολυηλεκτρολύτη DNA [14].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΡΙ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ Cu(II)

2.1 Η χημεία του Χαλκού

Η πρώτη χρήση του χαλκού από τον άνθρωπο χρονολογείται περί τα 10000 χρόνια πριν. Στο Β. Ιράκ βρέθηκε γυναικείο κόσμημα που χρονολογείται στα 8700 π.Χ. , ενώ για περίπου 5000 χρόνια ο χαλκός ήταν το μόνο γνωστό μέταλλο για τον άνθρωπο («η εποχή του χαλκού»). Κατά την αρχαιότητα, η Κύπρος ήταν γνωστή για τα πλούσια κοιτάσματα χαλκού. Μάλιστα η λατινική ονομασία του χαλκού (*cuprium*) προέρχεται από την έκφραση “*Cuprium aes*”, που σημαίνει «μέταλλο της Κύπρου», εξ’ ου και ο χημικός συμβολισμός του χαλκού ως Cu [15].

Ο χαλκός είναι το 29^ο χημικό στοιχείο του Περιοδικού Πίνακα και ανήκει στην πρώτη σειρά της Ομάδας 11 των μετάλλων, έχοντας ηλεκτρονιακή απεικόνιση $3d^{10}4s^1$. Έτσι, το ιόν Cu(I) έχει μια πλήρως συμπληρωμένη στιβάδα $3d^{10}$, ενώ το ιόν Cu(II) έχει μερικώς συμπληρωμένη $3d^9$ στιβάδα και συμπεριφέρεται ως ένα κοινό στοιχείο μεταπτώσεως.

Ο χαλκός είναι ένα από τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία για όλα τα υψηλά φυτά και τα ζώα. Στα θηλαστικά, απαντά πρωτίστως στην κυκλοφορία του αίματος, ως συμπαράγοντας σε διάφορα ένζυμα, καθώς και σε χρωστικές ουσίες. Από τα 80-120 mg σε έναν υγιή άνθρωπο των 70 kg, 8 mg χαλκού βρίσκονται στο ήπαρ, ενώ 15 mg μοιράζονται στην καρδιά, τη σπλήνα, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο και το αίμα. Εντούτοις, σε υψηλές συγκεντρώσεις, ο χαλκός μπορεί να αποβεί τοξικός έως και θανατηφόρος για τον οργανισμό. Στη μορφή του Cu(II), ο χαλκός είναι πολύ τοξικός για τους κατώτερους οργανισμούς. Π.χ., παρουσία χαλκού, τα βακτήρια και άλλοι μικροοργανισμοί δεν επιβιώνουν στο νερό, ενώ φαίνεται ότι τα φύκη δεν έχουν ομαλή ανάπτυξη [16]. Ομοίως, στον άνθρωπο, βρέθηκε ότι ο χαλκός συνδέεται με το DNA με τόσο υψηλή συγγένεια όσο κανένα άλλο δισθενές κατιόν και έχει ως αποτέλεσμα την οξειδωτική διάσπαση του DNA. Η πρόσδεση ενώσεων του χαλκού σε συγκεκριμένες θέσεις μπορεί να επιφέρει τροποποιήσεις στις δομικές διαμορφώσεις των πρωτεϊνών, των πολυνουκλεοτιδίων ή του DNA και των μεμβρανών [17]. Ο τρόπος πρόσδεσης εξαρτάται από το φορτίο του ιόντος χαλκού και τη γεωμετρία της χημικής ένωσης του χαλκού. Είναι γνωστό ότι στα ιόντα χαλκού Cu^+/Cu^{2+} των «μπλε χαλκοπρωτεϊνών» το δυναμικό αναγωγής ρυθμίζεται επιθυμητά ώστε οι εν λόγω πρωτεΐνες να δρουν ως

μεταφορείς ηλεκτρονίων. Ένας υψηλός βαθμός εκλεκτικότητας επιτυγχάνεται κατά τη μοριακή αναγνώριση μέσω των ιόντων των μετάλλων μεταπτώσεως, γεγονός που μπορεί να ρυθμίζεται μέσω κατάλληλων οξειδοαναγωγικών μετατροπών [18].

2.2 Ιδιότητες των συμπλόκων του χαλκού (Cu)

Οι ιδιότητες των ενώσεων του χαλκού, είτε ανόργανων κλασικών ή οργανομεταλλικών είτε βιοανόργανων, εξαρτώνται κατά πολύ από τη φύση των υποκαταστατών και των ατόμων δοτών στο μεταλλικό ιόν. Τέσσερις είναι οι οξειδωτικές καταστάσεις στις οποίες το μέταλλο μπορεί να σταθεροποιηθεί: Cu(IV), Cu(III), Cu(II) και Cu(I), όμως υπάρχουν πολύ λίγα παραδείγματα ενώσεων του Cu(III) και του Cu(IV). Η συμπλεκτική χημεία του χαλκού κυριαρχείται από σύμπλοκα του Cu(II), ενώ λίγα, αλλά σημαντικά, είναι του Cu(I). Λόγω της d^{10} ηλεκτρονιακής απεικόνισης, τα σύμπλοκα του **Cu(I)** είναι συνήθως άχρωμα στερεά, τετραϋποκατεστημένα, με τετραεδρική γεωμετρία και με υποκαταστάτες που φέρουν «μαλακά» άτομα δότες, όπως P, καθώς και αρωματικές αμίνες.

Αντίθετα, η d^9 ηλεκτρονιακή απεικόνιση του **Cu(II)** ευνοεί τις $d-d$ μεταπτώσεις και τα έντονα χρώματα στα σύμπλόκά του. Σε αυτές τις ενώσεις, ο αριθμός συναρμογής ποικίλλει από 4-6 και η γεωμετρία του συμπλόκου μπορεί να είναι επίπεδη τετραγωνική (τετραϋποκατεστημένα), τριγωνικής διπυραμίδας (πενταϋποκατεστημένα) ή οκταεδρική (εξαϋποκατεστημένα). Η μεγάλη ποικιλία των δυνατών διαμορφώσεων επιτρέπει την επιλογή των υποκαταστατών (από μονο- έως εξασχιδή χηλικό), και των ατόμων-δοτών (N, O, S και αλογονίδια).

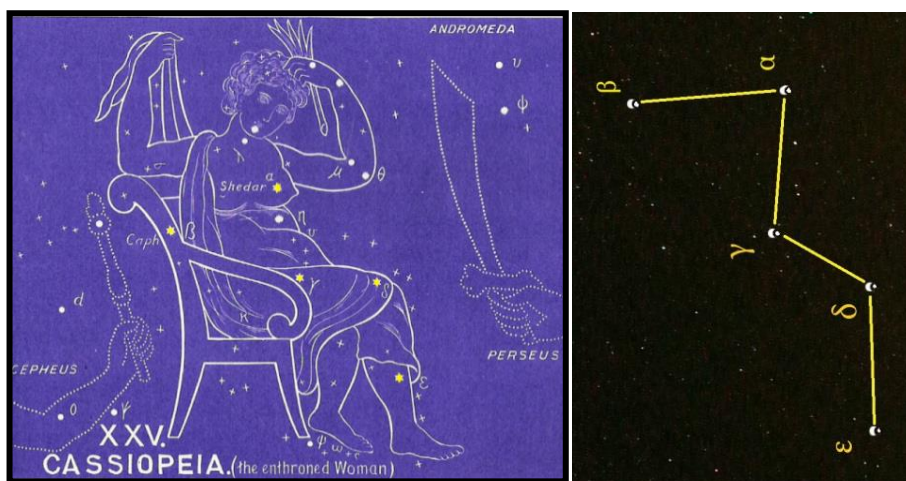
Το δυναμικό αναγωγής του ζεύγους Cu(I)/Cu(II) ποικίλλει και εξαρτάται από το περιβάλλον των υποκαταστατών όπως διαμορφώνεται από τα άτομα δότες, τη γεωμετρία των μορίων, τις ηλεκτρονιακές και στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις και τα φαινόμενα χηλιώσεως. Π.χ. κατά την οξειδωση του Cu(I) από O_2 , εμφανίζεται μια ευρεία σειρά δυναμικών αναγωγής, από -1.5 ως +1.3 V σε σχέση με το NHE. Επιπλέον, αυτή η μεταφορά ηλεκτρονίου περιλαμβάνει πάντα σημαντικές τροποποιήσεις της στερεοχημείας των σχετικών ανηγμένων/οξειδωμένων συμπλόκων. Οι ιδιότητες αυτές, σε συνδυασμό με την ενδεχόμενη απελευθέρωση ομάδων, π.χ μετατροπή από Cu(II) οκταεδρικά σε Cu(I) τετραεδρικά σύμπλοκα, είναι σημαντικές και συνεισφέρουν αρκετά στη μεγάλη πολυπλοκότητα των συστημάτων Cu(I)/Cu(II), που εμφανίζονται σε βιολογικούς οργανισμούς [22].

2.3 Τα σύμπλοκα του Cu(II) ως αντικαρκινικά φάρμακα

Η πρώτη ένδειξη ότι τα σύμπλοκα του χαλκού εμφανίζουν αντικαρκινική δράση πρέπει να εντοπίζεται στις αρχές της δεκαετίας του 1960. Έκτοτε, πολλά είναι τα σύμπλοκα του χαλκού που έχουν μελετηθεί ως προς την αντικαρκινική τους δράση και φαίνεται ότι διασπούν το DNA είτε μέσω νουκλεοβασικής οξειδωσης και/ή απόσπασης ατόμων υδρογόνου από ένα σάκχαρο ριβόζης, είτε μέσω υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών. Ορισμένα από αυτά είναι φωτοενεργά και κατάλληλα για χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου, άλλα φθορίζουν και άλλα όχι. Οι ιδιότητες των συμπλόκων του Cu(I) ή του Cu(II) έχουν άμεση σχέση με τη φύση των υποκαταστατών και των ατόμων-δοτών που συνδέονται με το μέταλλο. Ο Sigman και οι συνεργάτες του συνέθεσαν πρώτοι ένα σύμπλοκο του Cu(I), το δι-1,10-φαινανθρολινοΧαλκός(I), $[Cu(phen)_2]^+$, ως την πρώτη «χημική νουκλεάση» [19]. Πολύ λίγα σύμπλοκα του Cu(I), τα οποία δεν εμφανίζουν d-d ταινίες (σύστημα $3d^{10}$), έχουν μελετηθεί για φωτοεπαγόμενη διάσπαση του DNA. Ο Zaleski και οι συνεργάτες του αναφέρουν την αναερόβια φωτο-διάσπαση του DNA από ένα σύμπλοκο του Cu(I) $[Cu(brod)_2](PF_6)$, όπου brod=cis-1,8-bis(pyridine-3-oxy)oct-4-ene-2,6-diyne, κατά τη φωτόλυση, στην MLCT ταινία ($\lambda \geq 395\text{nm}$). Παλαιότερες μελέτες αναφέρονται σε πορφυρίνες του χαλκού, όμως, τελικά, αποδείχτηκε ότι είναι λιγότερο αποτελεσματικές από τις «ελεύθερες» πορφυρίνες στη φωτο-διάσπαση του DNA. Τα παραμαγνητικά $3d^9$ σύμπλοκα του Cu(II), λόγω της χημείας των υποκαταστατών, της δομικής τους ευελιξίας και της οξειδοαναγωγικής τους ικανότητας είναι εν δυνάμει κατάλληλα για θεραπευτικές εφαρμογές.

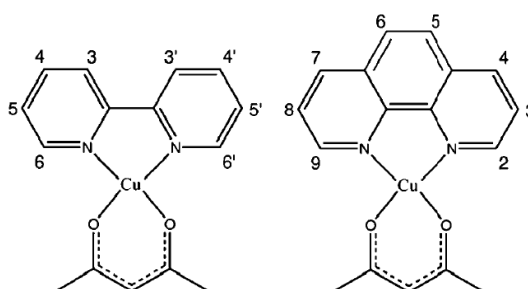
2.4 Η περίπτωση των Κασσιοπινών

Οι «Κασσιοπίνες» είναι μια ειδική οικογένεια αντικαρκινικών συμπλόκων του Cu(II), που άρχισαν να μελετώνται από μια ομάδα του Μεξικού από τη δεκαετία του 1980. Οι γενικοί τους τύποι είναι: $[Cu(NN)(NO)]^+$ και $[Cu(NN)(OO)]^+$. Η ονομασία τους προέρχεται από το όνομα της βασίλισσας «Κασσιόπης», που, σύμφωνα με την αρχαία ελληνική μυθολογία, έγινε αστερισμός, αιφανής στον ελληνικό ουρανό, και αναγνωρίζεται από το χαρακτηριστικό «ζιγκ-ζαγκ» - μοιάζει με ανοικτό M ή W σχήμα- που σχηματίζουν τα 5 φωτεινότερα άστρα της (τα β,α,γ,δ, και ε κατά σειρά) (Εικόνα 10). Ο συσχετισμός είναι προφανής: τα πέντε «βασικά» άτομα των «Κασσιοπινών», δηλαδή Cu-(N,N)-(O,O) συνδέονται στο σύμπλοκο, με σχήμα όπως τα πέντε άστρα στον αστερισμό της Κασσιόπης.



Εικόνα 10: Ο αστερισμός της Κασσιόπης [20].

Στην παρούσα εργασία, εξετάζονται οι «Κασσιοπίνες» με χημικό τύπο $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]^+$, όπου $\{(\text{N-N})=\text{ένα υποκατεστημένο μόριο διπυριδίνης (dipyridine) ή φαινανθρολίνης (phenanthroline)}\}$ και $\{(\text{O-O})=\text{μια ομάδα acac (acetylacetonate) ή σαλικυλικής αλδεϋδης}\}$ (Εικόνα 11). Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι ομάδες υποκαταστατών με όλους τους δυνατούς τρόπους υποκατάστασης.



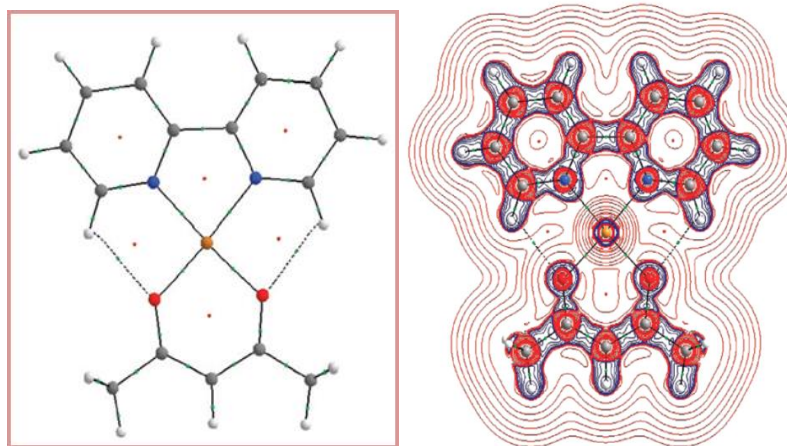
Εικόνα 11: Γενικοί χημικοί τύποι Κασσιοπινών $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]^+$, όπου $(\text{O-O})=\text{acac}$ & $(\text{N-N})=\text{bip}$ (αριστερά) και phen (δεξιά) [21].

Πίνακας 2: Ομάδες υποκαταστατών στις Κασσιοπίνες $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]^+$

Family	Number	Ligands ^{a,b,c}	Substituents
1	01	acac/bip	H
	02	acac/bip	4,4'-diMe
2	03	acac/phen	H
	04	acac/phen	4-Me
	05	acac/phen	5-Me
	06	acac/phen	4,7-diMe
	07	acac/phen	5,6-diMe
	08	acac/phen	3,4,7,8-tetraMe
	09	acac/phen	5-phenyl
	10	acac/phen	4,7-diphenyl
	11	acac/phen	5-Cl
	12	acac/phen	5-NO ₂

^abip=bipyridine, ^bacac= acetylacetonate, ^cphen= phenanthroline.

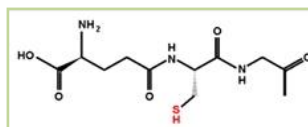
Οι Κασσιοπίνες είναι επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα, όπου η μέση απόσταση του κατιόντος Cu(II) από τους υποκαταστάτες είναι περίπου 2 Å. Η μικρότερη απόσταση Cu–O (1.908 Å) και η μεγαλύτερη Cu–N (1.998 Å) εμφανίζεται στο σύμπλοκο **(1)** (Εικόνα 12).



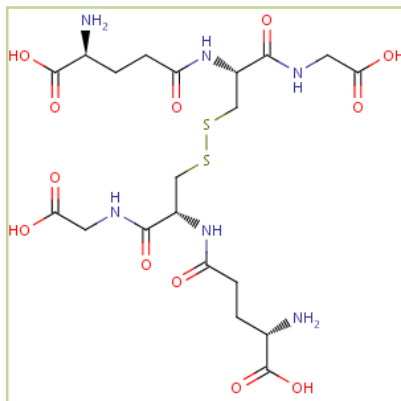
Εικόνα 12: Συντακτικός τύπος και διάγραμμα ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $\nabla^2 p(r)$, της κασσιοπίνης $\text{Cu}[(2,2'\text{-bipyridine})(\text{acetylacetonate})]^+$, όπου παρατηρούνται δύο «δεσμικά μονοπάτια» (bond paths) ανάμεσα στο Cu^{+2} και τα δύο άτομα αζώτου των αρωματικών δακτυλίων και δύο ανάμεσα στο Cu^{+2} και τα άτομα οξυγόνου του acac [21].

2.5 Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων του Χαλκού

Τα περισσότερα από τα αντικαρκινικά σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως, και κυρίως του χαλκού, δρουν λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν δραστικές ελεύθερες ενώσεις οξυγόνου (*ROS*, **Reactive Oxygen Species**), $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 και $\cdot\text{OH}$. Τα ιόντα του Cu(I) μπορούν να ανάγουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε ρίζα υδροξυλίου, ενώ τα ιόντα Cu(II) μπορούν να αναχθούν σε Cu(I) μέσω ανιόντος σουπεροξειδίου ή γλουταθειόνης (GSH) (Εικόνα 14). Επομένως η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου έχει άμεση σχέση με την παρουσία χαλκού, άσχετα με τη μορφή- Cu(I) ή Cu(II)- με την οποία εισέρχεται στο σώμα. Η έντονη παρουσία ROS εντός του κυττάρου μπορεί να προκαλέσει καταστροφή του DNA εντός του κυττάρου, λόγω οξειδωτικού στρες, ενεργοποίησης του γονιδίου p53 στα μιτοχόνδρια, αταξίας-τηλεαγγειεκτασίας (ATM) μεταλλαγμένης / Rad3 πρωτεΐνης (ATR) και ενεργοποίησης της MAPK (Mitogen-activated protein kinase) [22].



Εικόνα 13: Ανηγμένη Γλουταθειόνη, GSH.



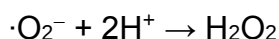
Εικόνα 14: Οξειδωμένη Γλουταθειόνη, GSSG.

2.5.1 ROS: παραγωγή και αδρανοποίηση

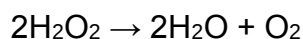
Η κυριότερη πηγή ROS στον άνθρωπο είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια, το οποίο φυσιολογικά εμφανίζεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η τελική του τύχη είναι ο σχηματισμός μορίων νερού. Επιπρόσθετα, οι αντιδράσεις ουβικινόνης της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν και αυτές μια ατυχή τάση να προκαλούν διαρροή ηλεκτρονίων απευθείας στο οξυγόνο. Συνολικά, μέχρι και 2% του οξυγόνου που εισέρχεται στην αναπνευστική αλυσίδα σχηματίζει ανιόντα σουπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$). Υποστηρίζεται ότι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν φλαβινοπρωτεΐνες επίσης συνεισφέρουν ένα ποσοστό των συνολικών ROS. Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) μπορούν να παράγουν ποικίλα ένζυμα, μεταξύ των οποίων αρκετές οξειδάσες. Τα κυριότερα από αυτά είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P_{450} [23].

Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι αναγκαίο να εγκατασταθεί μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ROS. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά όπλα που διαθέτει το κύτταρο είναι:

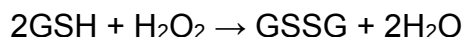
- Η **δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD)**, που καταλύει την αντίδραση:



- Η **καταλάση**, που καταλύει την αντίδραση:

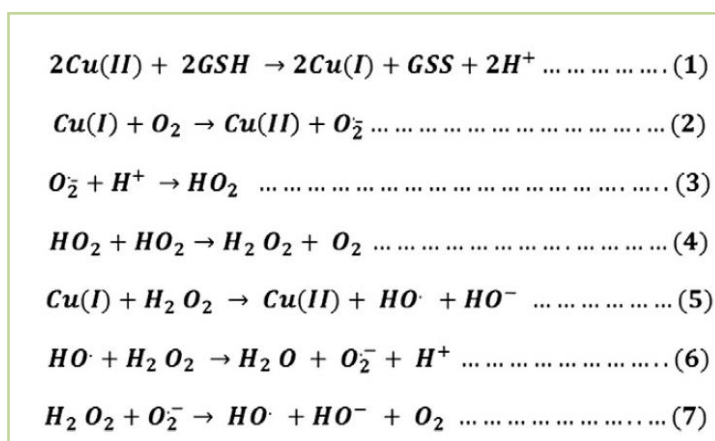


- Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταλύει την αντίδραση:



2.5.2 Ενίσχυση οξειδωτικού περιβάλλοντος (αντίδραση Fenton)

Σε πειράματα με «κασσιοπίνες» σε κύτταρα νευροβλαστώματος διαπιστώθηκε αύξηση ROS σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, γεγονός που αποδίδεται στην υπόθεση ότι τα σύμπλοκα του Cu(II) συμμετέχουν σε έναν καταλυτικό κύκλο (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Αντιδράσεις κατά την παραγωγή ROS μέσω μηχανισμού Fenton [24].

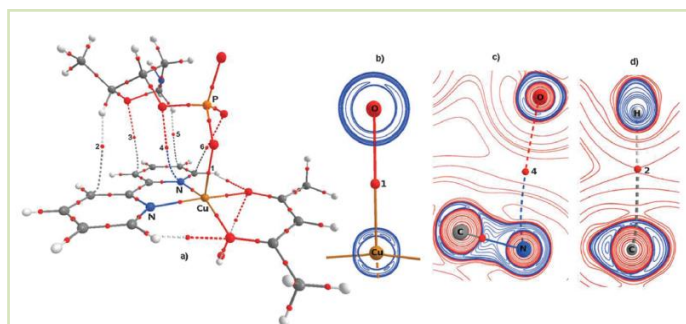
Οι αντιδράσεις (1), (2) και (5) εξηγούν την, κατά 30-40% περίπου, παρατηρούμενη αύξηση της συγκέντρωσης του ανιόντος σουπεροξειδίου O_2^- , που σε υδατικό διάλυμα είναι σε ισορροπία με το συζυγές του οξύ, την περοξυλική ρίζα $\text{HO}_2^\cdot$, που είτε μπορεί να αποπρωτονιωθεί, είτε να οδηγήσει στην παραγωγή H_2O_2 , ως τελικό προϊόν. Πράγματι, τα επίπεδα, που μετρήθηκαν στα πειράματα αυτά, βρέθηκαν αρκετά χαμηλά, λόγω των αντιδράσεων (5)-(7). Το H_2O_2 είναι ένα από τα αντιδραστήριο παραγωγής ριζών υδροξειδίου $\text{OH}^\cdot$, των πιο επιθετικών ROS, που προκαλούν καταστροφές και οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση [24].

Εκτός από την αυξημένη παραγωγή ROS, χημικά, το οξειδωτικό στρες σχετίζεται και με τη μείωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών του οργανισμού, όπως του μηχανισμού ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG). Σε κύτταρα μυϊκού μελανώματος και καρκίνου του πνεύμονα, υπό την επίδραση της κασσιοπίνης Cas IIgly, παρατηρήθηκε μείωση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH, που σημαίνει ότι η GSH μπορεί να αποτελεί το υπόστρωμα για τις προ-οξειδωτικές αντιδράσεις στο κύτταρο [25].

2.6 Τρόπος αλληλεπίδρασης των συμπλόκων του Cu(II) με το DNA

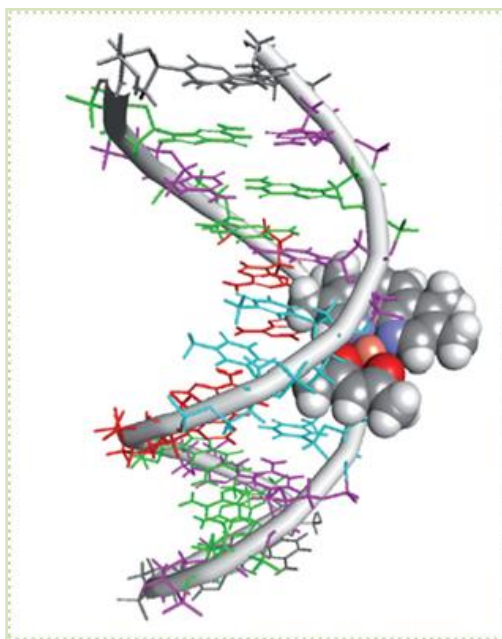
Σύμφωνα με την Τράπεζα Πληροφοριών Πρωτεϊνών (PDB: Protein Data Bank), στις δομές «φαρμάκου-DNA», υπάρχουν σύμπλοκα όπου τα ιόντα του χαλκού αλληλεπιδρούν με τις νουκλεοτιδικές βάσεις του Z-DNA [26]. Ο Schultz και οι συνεργάτες του αναφέρουν μια τροποποιημένη αλυσίδα B-DNA με τροποποιημένα κατάλοιπα που συμπλέκονται με ιόντα χαλκού [27]. Ο Neidle και η ομάδα του αναφέρουν ένα πολύ ενδιαφέρον σύμπλοκο Cu(II)-salphen που στοιβάζεται ανάμεσα στις δυο αντιπαράλληλες αλυσίδες G-τετραμερούς [28]. Περαιτέρω υπολογιστικές προσπάθειες μοντελοποίησης των αλληλεπιδράσεων «φαρμάκου-DNA» προτείνουν μηχανισμούς όπου τα σύμπλοκα του Cu(II) αλληλεπιδρούν είτε με τις αύλακες του DNA, είτε μέσω παρεμβολής στα ζεύγη των βάσεων, ανάλογα με τη δομή τους.

Ο ακριβής τρόπος «αναγνώρισης» και αλληλεπίδρασης των κασσιοπινών με το DNA δεν είναι ακόμα γνωστός. Μετά από προσπάθειες, όμως, προσομοίωσης της κρυσταλλικής δομής «DNA-συμπλόκου» φαίνεται ότι τα σύμπλοκα συνδέονται αρχικά μεν με τη μικρή αύλακα του DNA, με ενέργεια πρόσδεσης που εξαρτάται από το είδος της υποκατάστασης, ορισμένα δε από αυτά παρεμβάλλονται στο DNA με αλληλεπιδράσεις τύπου «π-stacking» στα ζεύγη βάσεων, σχηματίζοντας δομές πολύ σταθερές σε σχέση με τις υπόλοιπες [29]. Η διαμόρφωση της δομής «δεοξυριβόζη-φωσφορική ομάδα-κασσιοπίνη» στη μικρή αύλακα φαίνεται ότι είναι το πρώτο βήμα στην πορεία διάσπασης των αλυσίδων του DNA. Το άτομο χαλκού μιας κασσιοπίνης ενώνεται με το άτομο οξυγόνου μιας φωσφορικής ομάδας, ενώ ο αρωματικός υποκαταστάτης αλληλεπιδρά με τη δεοξυριβόζη μέσω επαφών C-H...π, O...π(C) και O...π(N) [30] (Εικόνα 16).



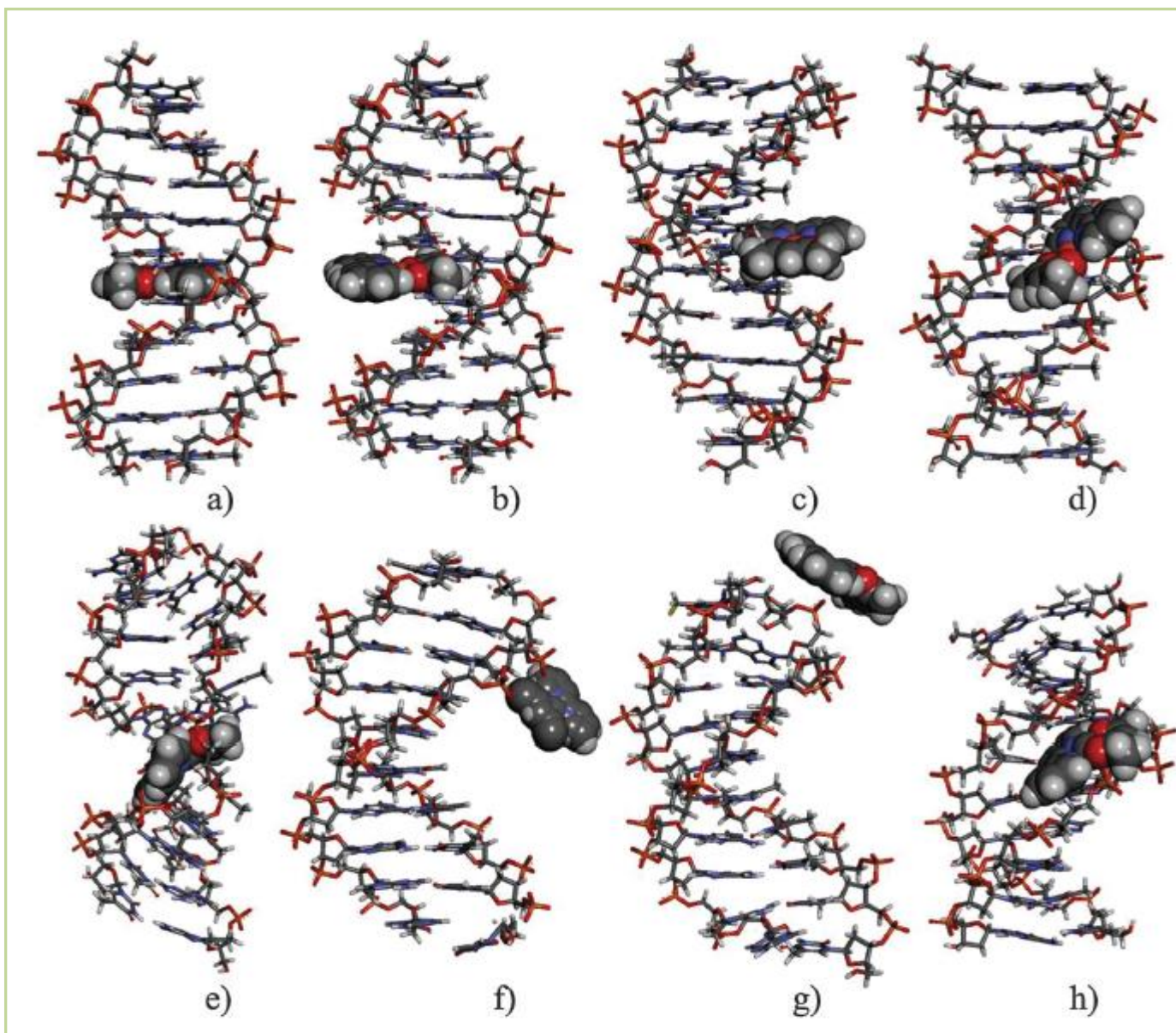
Εικόνα 16: (a) Μοριακό μοντέλο απεικόνισης της δομής «δεοξυριβόζη-φωσφορική ομάδα-κασσιοπίνη». Διαγράμματα ηλεκτρονιακής απεικόνισης των (b) O₃PO-Cu, (c) O...π(N) και (d) C-H...π αλληλεπιδράσεων «δότη-δέκτη e⁻». Χρωματική αντιστοίχιση: γκρι σφαίρες-άτομα άνθρακα, κόκκινες μεγάλες-οξυγόνου, άσπρες-υδρογόνου, μπλε-αζώτου, κόκκινες μικρές- κρίσιμα σημεία δεσμών, μικρές κίτρινες- κρίσιμα σημεία δακτυλίου, διακεκομμένες γραμμές- «δεσμικά μονοπάτια» ασθενών αλληλεπιδράσεων [29].

Το μοντέλο προσομοίωσης της δομής της “Casiopείna III-Da” $[Cu(2,2'$ -dipyridine)(acetylacetonato) (H_2O)] NO_3 με B-DNA φαίνεται στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17: Μοντέλο προσομοίωσης της “Casiopείna III-Da”, $[Cu(2,2'$ -dipyridine)(acetylacetonato)(H_2O)] NO_3 , συνδεδεμένης με B-DNA (Προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής (MD Simulation)) [31].

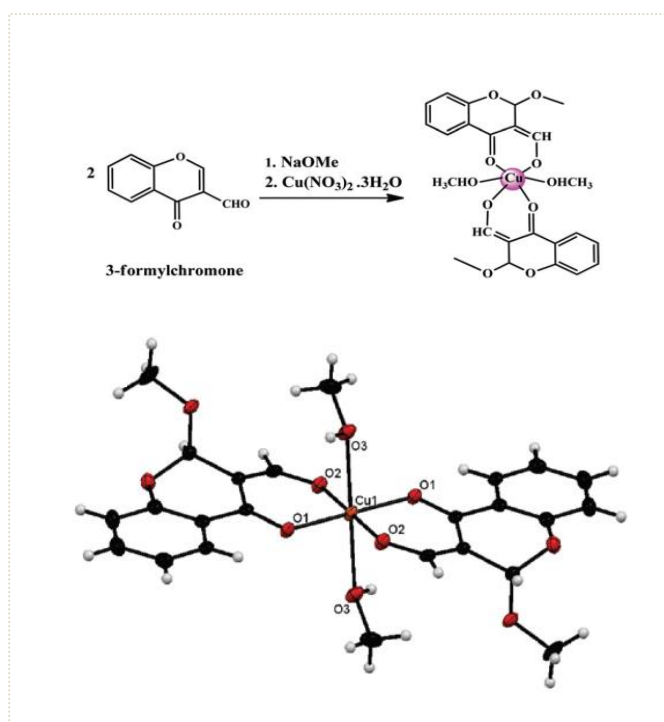
Παρακάτω φαίνονται οι μοριακές δυναμικές προσομοιώσεις (σε δυναμικά πεδία τύπου Cornell, AMBER 11¹⁶ σειρά λογισμικού, έκδοση CUDA, pmemd). Τέσσερις αλυσίδες B-DNA κατασκευάστηκαν: poly-d(AAAAAAAAAA)₂, poly-d(ATATATATAT)₂, poly-d(GGGGGGGGGG)₂ και poly-d(GCGCGCGCGC)₂ με πρόγραμμα *nucgen* και η κασσιοπίνη $[Cu(2,2'$ -dipyridine) (acetylacetonato)(H_2O)]⁺ (Cas) εισήλθε σε κάθε αλυσίδα DNA με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους (Accelrys DS Visualizer software).



Εικόνα 18: «Μοριακή αναγνώριση» μεταξύ DNA κι ενός συμπλόκου του Cu(II).

Στην πάνω σειρά, οι αρχικές θέσεις της Cas στις αλυσίδες του DNA: (a) παρεμβολή του αρωματικού υποκαταστάτη (POS1), (b) παρεμβολή του μη αρωματικού υποκαταστάτη (POS2), (c) η Cas στη μεγάλη αύλακα του DNA (MAG), (d) η Cas στη μικρή αύλακα του DNA (MIG). Στη δεύτερη σειρά, οι μέσες δομές μετά από 10 ns: (e) η POS1 οδήγησε σε παραμόρφωση του DNA, (f)&(g) οι POS2 και MAG κατέληξαν σε διάλυση της Cas και απομάκρυνση του μορίου κατά ~10 Å, (h) η Cas παρέμεινε στη μικρή αύλακα [29].

Ένα ακόμα φάρμακο του Cu(II), που φέρει δυο ομάδες χρωμονίου [*chromone-appended Cu(II)*], έχει μελετηθεί ως προς την δραστικότητά του και φαίνεται ότι έχει σχέση με την παραγωγή ROS (Εικόνα 19).

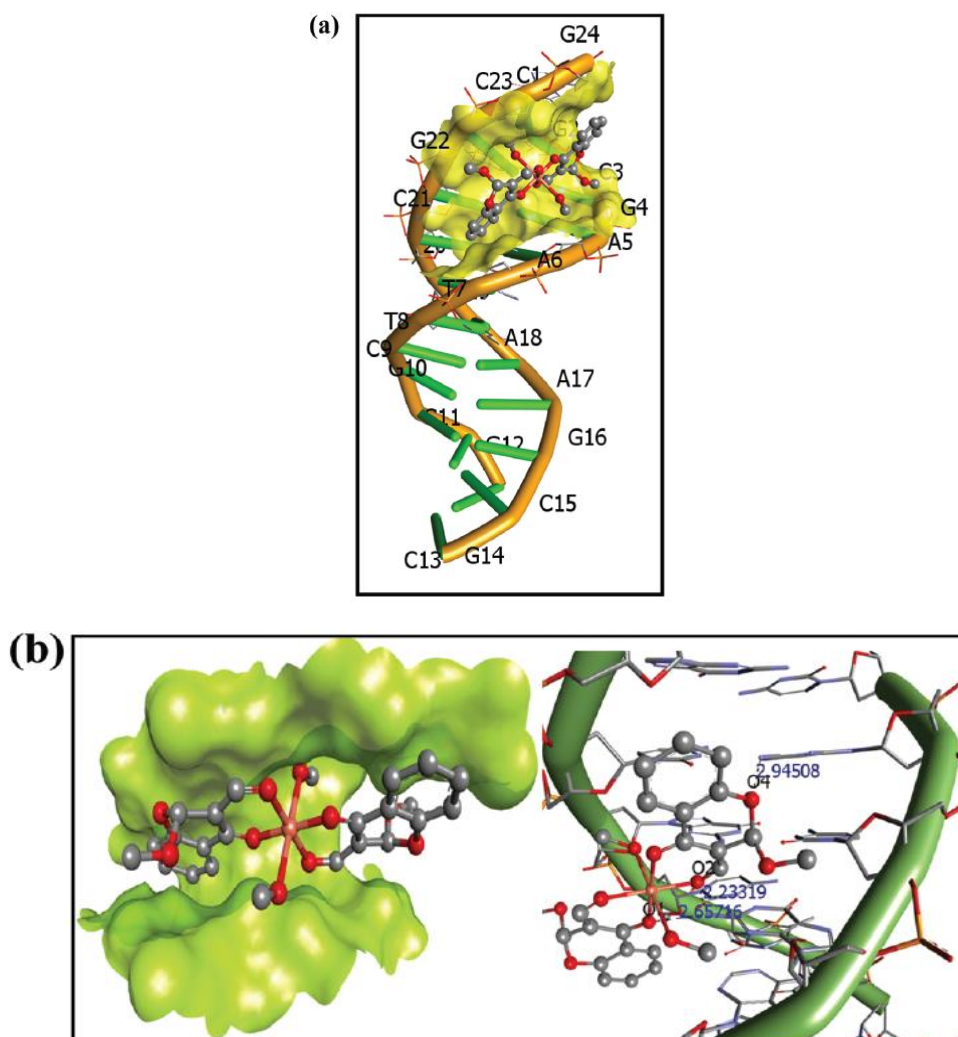


Εικόνα 19: Συνθετική μέθοδος και κρυσταλλική δομή συμπλόκου του Cu(II) [30].

Σε κρυσταλλογραφικές μελέτες της μοριακής σύνδεσης του παραπάνω συμπλόκου σε δωδεκαμερή νουκλεοτιδική αλυσίδα, φάνηκε πως η πιο ευνοϊκή, ενεργειακά, διαμόρφωση ήταν αυτή με το σύμπλοκο απόλυτα προσαρμοσμένο στο καμπύλο περίγραμμα του DNA-στόχου στη στενή, και ελαφρώς βαθύτερη, G-C περιοχή της μικρής αύλακας (Εικόνα 18a). Η μικρή αύλακα του DNA είναι ένας στόχος που έλκει τα μικρά μόρια, καθώς η εγγύτητα των κλώνων επιτρέπει την πιο στενή επαφή και την καλύτερη προσαρμογή της ένωσης στο DNA. Τα δομικά χαρακτηριστικά του εν λόγω συμπλόκου διευκολύνουν επίσης το σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, λαμβάνοντας υπόψη την απόσταση των 3 Å περίπου, μεταξύ ατόμου οξυγόνου του συμπλόκου και ατόμου υδρογόνου του N2 της G2 και της G4. Στη σταθερότητα της σύνδεσης συμπλόκου-DNA φαίνεται να συνεισφέρουν ακόμη υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις των δακτυλίων χρωμονίου με τις ομάδες της αύλακας του DNA (Εικόνα 18b).

Κατά την εφαρμογή του συμπλόκου σε HepG2 και MCF-7 κυτταρικές σειρές, τα επίπεδα ROS ανήλθαν σημαντικά, ενώ παράλληλα μειώθηκαν τα επίπεδα GSH. Έτσι, τα

αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων μελέτης της κυτταροτοξικότητας πιστοποίησαν ότι το σύμπλοκο [chromone-appended-Cu(II)] είναι ένας πιθανός χημειοθεραπευτικός παράγοντας για τις καρκινικές σειρές HepG2 και MCF-7, οπότε χρειάζεται και η περαιτέρω μελέτη του *in vivo*.



Εικόνα 20: (α) Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου [chromone-appended-Cu(II)] συνδεδεμένου στην περιοχή G-C της μικρής αλυσίδας DNA, δωδεκαμερούς d(CGCGAATTCGCG)₂ (PDB ID:1BNA).

(b) Το σύμπλοκο εντός του υδροφοβικού περιβάλλοντος της G-C περιοχής στη μικρή αλυσίδα, που πιθανώς αλληλεπιδρά με τα ζεύγη βάσεων μέσω δεσμών υδρογόνου.

2.7 Σύμπλοκα του Cu(II) με χηλικούς ιμιδοδιφωσφινικούς υποκαταστάτες

Τα τελευταία χρόνια οι ιμιδοδιφωσφινικοί υποκαταστάτες της μορφής $(\text{XPR}_2)(\text{YPR}'_2)\text{NH}$ ($\text{R}, \text{R}' = \text{Me}, \text{Ph}, \text{iPr}, \text{OPh}$ και $\text{X}, \text{Y} = \text{O}, \text{S}, \text{Se}, \text{Te}$) προκάλεσαν το αυξημένο συνθετικό ενδιαφέρον της συμπλεκτικής χημείας μετάλλων τόσο των κυρίων ομάδων όσο και μετάλλων μετάπτωσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η ανιοντική μορφή των υποκαταστατών L^- , $[\text{R}_2\text{P}(\text{E})\text{NP}(\text{E}')\text{R}_2]^-$. Στην παρούσα εργασία, το ενδιαφέρον εστιάζεται σε παράγωγα με διαφορετικά άτομα χαλκογόνων, του τύπου $(\text{OPPh}_2)(\text{EPPh}_2)\text{NH}$ ($\text{E} = \text{S}, \text{Se}$) όπως επίσης και στο διοξυγονωμένο ανάλογο $(\text{OPPh}_2)_2\text{NH}$ και στα σύμπλοκα τα οποία σχηματίζουν με $\text{Cu}(\text{II})$.

Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μεταλλικά ιόντα της πρώτης ομάδας των στοιχείων μεταπτώσεως $\text{M}(\text{II})$, $\text{M} = \text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Zn}$, μόνο ένας μικρός αριθμός συμπλόκων του $\text{Cu}(\text{II})$ έχει συντεθεί και χαρακτηριστεί. Μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων X έδειξαν ότι τα δις-χηλιωμένα $[\text{Cu}\{(\text{OPR}_2)(\text{OPR}_2)\text{N}\}_2]$ σύμπλοκα, $\text{R} = \text{OPh}$ [33], Ph [34] διαθέτουν μια επίπεδη τετραγωνική $\text{Cu}(\text{II})\text{O}_4$ σφαίρα συντάξεως. Θα πρέπει να τονιστεί ότι, ήδη από το 1967, η φασματοσκοπία EPR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του $\text{S} = 1/2$ $[\text{Cu}\{(\text{OPPh}_2)(\text{OPPh}_2)\text{N}\}_2]$ συμπλόκου, πολύ πριν το δομικό του χαρακτηρισμό [35]. Επιπλέον, το διπυρηνικό σύμπλοκο $[\text{Cu}_2\{(\text{OPPh}_2)_2\text{N}\}_2(\mu\text{-O}_2\text{PPh}_2)_2]$, που περιλαμβάνει τη σύμπλεξη του $\text{Cu}(\text{II})$ στο $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NHP}(\text{O})\text{Ph}_2]^-$, έχει επίσης χαρακτηριστεί δομικά [36]. Από την άλλη πλευρά, το σύμπλοκο $[\text{Cu}\{(\text{OPPh}_2)(\text{SPPH}_2)\text{N}\}_2]$, με δύο διαφορετικά άτομα δότες, έδειξε να παρουσιάζει CuO_2S_2 σφαίρα συντάξεως σε επίπεδη τετραγωνική και D_{2d} γεωμετρία στον ίδιο κρύσταλλο.

Το σύμπλοκο $[\text{Cu}\{(\text{SPPH}_2)(\text{SPPH}_2)\text{N}\}_2]$, τύπου “ $\text{Cu}(\text{II})\text{S}_4$ ”, έχει μελετηθεί με φασματοσκοπία EPR [37] και IR, [38], [39], αλλά δεν έχει χαρακτηριστεί δομικά λόγω της τάσης των δισουλφιδοιμιδοδιφωσφινικο- υποκαταστατών να ανάγουν τα σύμπλοκα του $\text{Cu}(\text{II})$ προς $\text{Cu}(\text{I})$. [40]-[42]. Επίσης, σύμπλοκα τύπου “ $\text{Cu}(\text{II})\text{S}_4$ ”, όμως με διαφορετικές ομάδες R and R' , έχουν συντεθεί, αλλά δεν έχουν δομικά χαρακτηριστεί [43], [44]. Ο υποκαταστάτης $\text{iPr}_2\text{P}(\text{O})\text{NHP}(\text{O})\text{iPr}_2$ συντέθηκε και χαρακτηρίστηκε από την ομάδα του Woollins [45]. Κατά τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{iPr}_2\text{P}(\text{O})\text{NHP}(\text{O})\text{iPr}_2\text{-O,O'}\}\text{Cl}_2]$ διαπιστώθηκε η ύπαρξη παραμορφωμένων D_{2d} και, δομικά, ευέλικτων $\text{Cu}(\text{II})\text{OOCl}_2$ σφαιρών συντάξεως. Η δομική ευελιξία του τελευταίου εξετάστηκε σε στερεό δείγμα με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και σε διάλυμα με φασματοσκοπία EPR, ενώ ως $3d^9$ σύμπλοκο του $\text{Cu}(\text{II})$ εξετάστηκε και ως προς τις αναμενόμενες παραμορφώσεις Jahn-Teller.

Στην παρούσα εργασία, το ενδιαφέρον εστιάζεται στη σύμπλεξη του υποκαταστάτη $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NHP}(\text{O})\text{Ph}_2$, τύπου (O,O), και υποκαταστατών τύπου (N,N) στη σφαίρα συντάξεως του $\text{Cu}(\text{II})$. Ως (N,N) υποκαταστάτες επιλέγονται οι bipy (2, 2'-bipyridine), phen (1,10-phenanthroline), neocuproine (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline), καθώς και η (N,N) κουρκουμίνη. Στόχος είναι η σύνθεση συμπλόκων με γενικό τύπο $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]^+$, όπως οι κασσιοπίνες, ο δομικός τους χαρακτηρισμός και η μελέτη της συμπεριφοράς τους σε βιολογικά συστήματα και συγκεκριμένα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΩΝ

3.1 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Δομής

Μετά τη σύνθεση, απαραίτητος είναι ο προσδιορισμός της δομής του συμπλόκου, τόσο σε στερεά ή/και κρυσταλλική, όσο κι εν διαλύσει, μορφή. Για το σκοπό αυτό, στην παρούσα εργασία, εφαρμόστηκαν οι τεχνικές μέθοδοι φασματοσκοπίας EPR, UV-vis, IR, φασματομετρίας μάζας και κρυσταλλογραφίας ακτίνων χ.

3.1.1 Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

Το αντικείμενο της *κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ* είναι η μελέτη του *κρυσταλλικού πλέγματος*, δηλαδή της γεωμετρικής δόμησης των κρυστάλλων, μέσω της χρήσης ακτίνων Χ. Με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας και των μεθόδων της, αποκαλύπτεται η ακριβής γεωμετρική διάταξη (κρυσταλλικό σύστημα) των ατόμων που συγκροτούν τους κρυστάλλους. Η εφαρμογή της κρυσταλλογραφίας απαιτεί τη δημιουργία κρυστάλλου υψηλής ποιότητας του μοριακού συστήματος του οποίου η δομή μελετάται. Ένας υψηλής ποιότητας κρύσταλλος περιέχει μόρια διατεταγμένα κανονικά, στη βάση ενός πλέγματος. Η πορεία προς την αποκάλυψη της κρυσταλλικής δομής μιας ένωσης είναι δύσκολη και περιλαμβάνει συνοπτικά τα εξής στάδια:

(α) Η κρυσταλλογραφική μελέτη ξεκινά με την διαδικασία της *κρυστάλλωσης*. Η κρυστάλλωση απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες, καθώς είναι εξαιρετικά ευαίσθητη τόσο στο pH (για υδατικά διαλύματα), τη θερμοκρασία, τους διαλύτες και τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας. Η κρυστάλλωση είναι μια σχετικά αργή διαδικασία, που συνήθως απαιτεί αρκετές μέρες και στηρίζεται στην αρχή της βαθμιαίας αύξησης της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας σε κατάλληλο διαλύτη μέχρι ένα σημείο πέραν του κορεσμού. Η συγκέντρωση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους, όπως της βραδείας εξάτμισης, της βραδείας ψύξης ή διάχυσης. Οι πυρήνες κρυστάλλωσης που θα προκύψουν, ανάλογα με τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία του διαλύματος, θα πρέπει να έχουν ορισμένο μέγεθος για να προχωρήσει η διαδικασία της κρυστάλλωσης.

(β) Η κρυσταλλογραφική μελέτη συνεχίζεται με τη διαδικασία της *περίθλασης των ακτίνων Χ* από τον κρύσταλλο. Ο κρύσταλλος τοποθετείται σε έναν τριχοειδή σωλήνα και παίρνει έναν συγκεκριμένο προσανατολισμό σε σχέση με τις ακτίνες Χ και το φιλμ [46]. Η δέσμη ακτίνων Χ, παράγεται από ηλεκτρόνια που επιταχύνονται προς ένα

στόχο χαλκού. Οι ακτίνες X είναι οι καταλληλότερες ακτίνες, καθώς το μήκος κύματος τους βρίσκεται στην περιοχή των Angstrom ($0,1 \text{ nm}$) και προσεγγίζει το μήκος των ενδομοριακών δεσμών [45]. Όταν λεπτή δέσμη ακτίνων X προσπίπτει στον κρύσταλλο, ένα μέρος της τον διαπερνά, ενώ, υπό συνθήκες, η υπόλοιπη σκεδάζεται ή περιθλάται σε διάφορες κατευθύνσεις. Η δέσμη που σκεδάζεται ή περιθλάται μπορεί να ανιχνευτεί σε φιλμ ακτίνων X ή από έναν ηλεκτρονικό ανιχνευτή στερεάς κατάστασης, όπου η ένταση των κηλίδων είναι ανάλογη προς την ένταση των ακτίνων [47].

(γ) Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής, εξαρτάται από την εύρεση των φάσεων των περιθλώμενων ακτίνων X από τον μονοκρύσταλλο. Η επεξεργασία των δεδομένων, αρχικά απαιτεί τη δεικτοδότηση των ανακλάσεων που καταγράφηκαν στις πολλαπλές καταγεγραμμένες εικόνες περίθλασης. Αυτό σημαίνει αρχικά αναγνώριση των διαστάσεων της μοναδιαίας κυψελίδας και αντιστοίχιση των κηλίδων των εικόνων περίθλασης με θέσεις του αντιστρόφου χώρου. Ένα προϊόν της δεικτοδότησης είναι ο προσδιορισμός της συμμετρίας του κρυστάλλου, δηλαδή της ομάδας χώρου αυτού, μέσω των δεδομένων που συνενώνονται σε ενιαίο σύνολο. Κηλίδες που εμφανίζονται σε δύο ή 24 περισσότερες εικόνες πρέπει να συγχωνευτούν και τελικά να αναχθούν σε κοινή κλίμακα, έτσι ώστε να έχουν μια συνεχή κλίμακα έντασης. Η βελτιστοποίηση της κλίμακας εντάσεων είναι κρίσιμη, γιατί η σχετική ένταση των κηλίδων είναι η πληροφορία κλειδί από την οποία προσδιορίζεται η δομή.

3.1.2 Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR)

Η φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR, Electron Paramagnetic Resonance) μελετά ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια, όπως είναι τα παραμαγνητικά σύμπλοκα του Cu(II) . Για τις ενώσεις των στοιχείων μεταπτώσεως έχουμε να παρατηρήσουμε ότι πολλές φορές περιέχουν ασύζευκτα d ηλεκτρόνια και είναι παραμαγνητικές. Η ύπαρξη όμως ασύζευκτων ηλεκτρονίων αποτελεί αναγκαία συνθήκη για να παρατηρηθεί φάσμα EPR, δεν είναι όμως και ικανή συνθήκη. Σε πολλές περιπτώσεις υπάρχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια αλλά δεν παρατηρείται φάσμα EPR. Ειδικά για τις ενώσεις των στοιχείων μεταπτώσεως, συχνά για να παρατηρηθεί τέτοιο φάσμα πρέπει να ενσωματωθούν σε ένα κρύσταλλο διαμαγνητικού υλικού της ίδιας δομής σε μικρή συγκέντρωση. Έτσι ελαττώνεται η αλληλεπίδραση ανάμεσα στα spin της παραμαγνητικής ενώσεως και επιτυγχάνεται η παρατήρηση του φάσματος EPR. Επιπλέον είναι συχνά απαραίτητο, η παρατήρηση να γίνει σε χαμηλές θερμοκρασίες, π.χ. σε θερμοκρασία υγρού αζώτου (77 K) ή και πολύ χαμηλότερα (υγρού ηλίου). Η

παρουσίαση των φασμάτων EPR γίνεται με καταγραφή της εντάσεως απορρόφησης ως συνάρτηση του μαγνητικού πεδίου, αλλά πολλές φορές και με την πρώτη παράγωγο της καμπύλης αυτής. Το μέγιστο στην καμπύλη αντιστοιχεί στο σημείο τομής της καμπύλης της παραγώγου με τον άξονα των x .

Στη φασματοσκοπία μετρούνται ενεργειακές διαφορές με σκοπό την εξακρίβωση της ταυτότητας, της δομής και της δράσης του υπό μελέτη δείγματος. 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. (Tesla: μονάδα πεδίου στη σύγχρονη βιβλιογραφία, Gauss: «παλαιότερη» μονάδα, $1T = 10^4$ G). Αυτό είναι το λεγόμενο *φαινόμενο Zeeman* (Zeeman effect). Επειδή το ηλεκτρόνιο έχει μια μαγνητική ροπή μ , συμπεριφέρεται ως πυξίδα όταν «τοποθετείται» σε ένα μαγνητικό πεδίο. Αυτή η μαγνητική ροπή κβαντίζεται και μπορεί να πάρει μόνο διακριτές τιμές. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των καταστάσεων είναι ανάλογη του B_0 . Το ελεύθερο ηλεκτρόνιο και ένας σημαντικός αριθμός δειγμάτων που μελετούνται με το EPR έχουν spin $S=1/2$ που σημαίνει ότι μπορούν να προκύψουν δύο διαφορετικές καταστάσεις. Η ενέργεια μεταξύ αυτών των καταστάσεων δίνεται για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο από τη σχέση

$$\Delta E = h\nu = g_e \beta_e B_0 \quad (3.1)$$

όπου $\beta_e = 9,27402 \text{ e}^{-24} \text{ JT}^{-1}$ η μαγνητόνη του Bohr και $g_e = 2,00232$ (παράγοντας δίχως διαστάσεις για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο). Ο g είναι ένας αναλογικός παράγοντας – συχνά εξαρτώμενος από το προσανατολισμό του μορίου – που σχετίζεται με την ηλεκτρονιακή 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, παρέχοντας ένα μέτρο της συσσώρευσης της *ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο μεταλλικό κέντρο*, τον αριθμό των ισοδυνάμων πυρήνων που συζεύγνυνται με το ηλεκτρόνιο και την υπέρ- υπέρλεπτη υφή (αλληλεπίδραση spin του παραμαγνητικού κέντρου με το πυρηνικό spin των γειτονικών πυρήνων, π.χ. των υποκαταστατών).

Πιο αναλυτικά, η απλούστερη περίπτωση που μπορεί να παρουσιαστεί είναι αυτή ενός παραμαγνητικού κέντρου με ηλεκτρονικό spin $S = 1/2$. Υπό την απουσία μαγνητικού πεδίου, η μαγνητική ροπή που σχετίζεται με το ηλεκτρονικό spin προσανατολίζεται

τυχαία και οι δύο ενεργειακές καταστάσεις είναι εκφυλισμένες. Η εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 οδηγεί στο διαχωρισμό των δύο ενεργειακών καταστάσεων καθώς το ηλεκτρονικό spin μπορεί να προσανατολιστεί είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα με το άνυσμα του μαγνητικού πεδίου. Η κβάντωση των ενεργειακών καταστάσεων προκύπτει από την κβαντομηχανική φύση του ηλεκτρονικού spin. Η δυναμική ενέργεια του συστήματος αυτού προέρχεται από την κλασσική έκφραση για την ενέργεια ενός μαγνητικού διπόλου σε ένα μαγνητικό πεδίο και περιγράφεται από τον Χαμιλτωνιακό τελεστή του spin, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\mathbf{H} = g_e \frac{\beta_e}{h} \mathbf{S} \cdot \mathbf{B}_0 \quad (3.2)$$

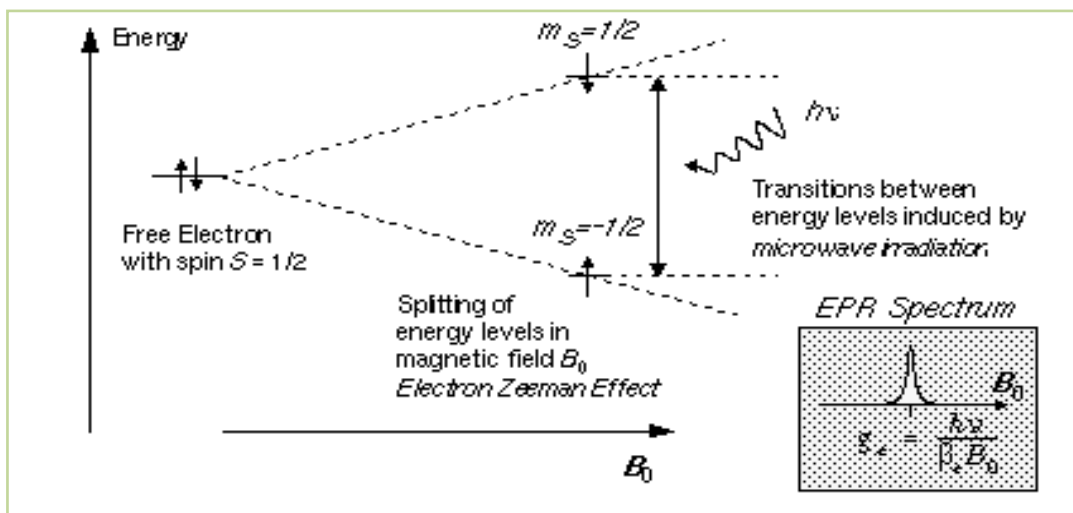
Οι ενέργειες των δύο καταστάσεων του spin χαρακτηρίζονται από τους κβαντικούς αριθμούς του spin $m_s = \pm 1/2$,

$$E(m_s) = g_e \frac{\beta_e}{h} B_0 m_s \quad (3.3)$$

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 1). 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). Το πιο απλό πείραμα EPR που μπορεί κανείς να φανταστεί περιλαμβάνει την εφαρμογή ενός ηλεκτρομαγνητικού πεδίου ποικίλων συχνοτήτων ν στο σύστημα αυτό. Αν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αντιστοιχεί στην ενεργειακή διαφορά ΔE , μπορεί να προκληθούν μεταπτώσεις μεταξύ των δύο καταστάσεων spin, δηλαδή το spin μεταπίπτει από τον ένα προσανατολισμό στον άλλο, και η συνθήκη απορρόφησης (συντονισμού) έχει εκπληρωθεί:

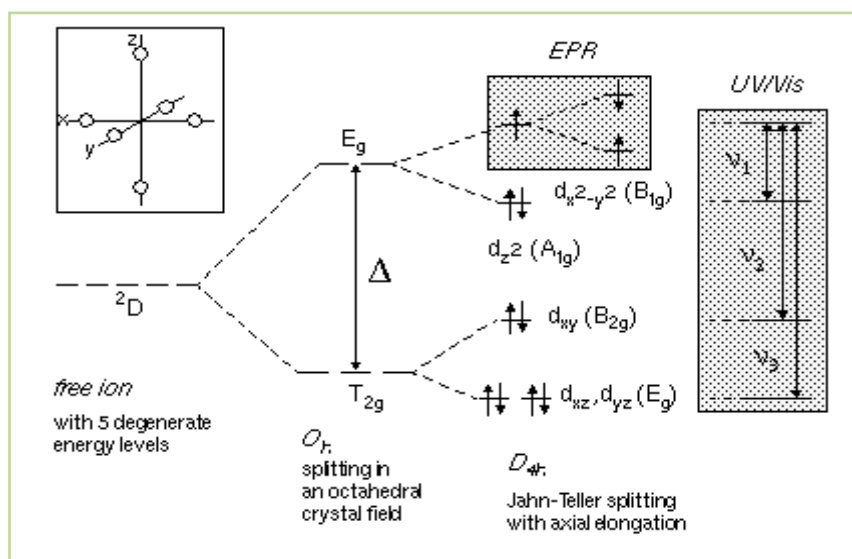
$$\Delta E = h\nu = g_e \frac{\beta_e}{h} B_0 \quad (3.4)$$

Για τα μέταλλα των στοιχείων μετάπτωσης, οι αλληλεπιδράσεις που είναι υπεύθυνες για τους μεγάλους ενεργειακούς διαχωρισμούς είναι η *διάσχιση κρυσταλλικού πεδίου* (crystal-field (CF) splitting) και η *spin-orbit σύζευξη* (spin-orbit coupling, SOC). Η συνδυασμένη επίδραση των δύο αυτών αλληλεπιδράσεων αίρει τον τροχιακό εκφυλισμό των ενεργειακών καταστάσεων των περισσοτέρων ιόντων των μετάλλων μετάπτωσης, αφήνοντας μια μη εκφυλισμένη θεμελιώδη κατάσταση, συχνά με μηδενική τροχιακή στροφορμή.



Σχήμα 1: Παρουσίαση της διάσχισης Zeeman για ένα σύστημα με $S = 1/2$ σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 .

Η επίδραση του οκταεδρικού CF σε ένα ιόν μετάλλου μετάπτωσης δίνεται στο πρώτο μέρος του Σχήματος 2. Η ενεργειακή διάσχιση στην περίπτωση της οκταεδρικής συμμετρίας δίνεται με το Δ . Στην περίπτωση ενός $3d^9$ ιόντος με O_h συμμετρία ο εκφυλισμός του όρου E_g δεν επηρεάζεται από την SOC, και εφαρμόζεται το *θεώρημα Jahn-Teller*. Μια αξονική επιμήκυνση στην οκταεδρική σύμπλεξη οδηγεί στο διάγραμμα των ενεργειακών καταστάσεων του σχήματος με το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο τροχιακό $d_{x^2-y^2}$. Η μέτρηση του φάσματος EPR περιορίζεται στη διάσχιση Zeeman που προέρχεται από ένα εξωτερικό πεδίο πάνω στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο του μη εκφυλισμένου τροχιακού $d_{x^2-y^2}$ και κάποιος μπορεί να πιστεύει ότι το σύστημα περιγράφεται από τη χαμιλτωνιανή του spin της εξίσωσης (3.2) με $S = 1/2$. Όμως, εξαιτίας της SOC υφίσταται αλληλεπίδραση μεταξύ της θεμελιώδους και διεγερμένων καταστάσεων και «ανάμειξη» μικρών ποσών τροχιακής στροφορμής με τη θεμελιώδη κατάσταση που συζεύγνυνται με το ηλεκτρονικό spin και το καθιστούν ευαίσθητο στο κρυσταλλικό του περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο παράγοντας g να μην είναι πλέον ισότροπος – η διάσχιση των επιπέδων Zeeman εξαρτώνται από τη συμμετρία του πεδίου των υποκαταστατών και τον προσανατολισμό του συστήματος στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο



Σχήμα 2: Παρουσίαση της επίδρασης του οκταεδρικού CF στα ενεργειακά επίπεδα ενός $3d^9$ ιόντος μετάλλου μετάπτωσης (με την ενεργειακή διάσχιση να είναι Δ). Ο εκφυλισμός των τροχιακών επηρεάζεται εκ νέου από το θεώρημα Jahn-Teller οδηγώντας στις οπτικές μεταπτώσεις ν_1 , ν_2 και ν_3 . Η διάσχιση Zeeman του θεμελιώδους επιπέδου (B_{1g}) δίνεται στο μικρό γραμμοσκιασμένο πλαίσιο.

Συνεπώς ένα πείραμα EPR παρέχει πληροφορίες για τη συμμετρία του παραμαγνητικού μεταλλικού κέντρου και συνεπώς επηρεάζεται από την επίδραση του πεδίου των υποκαταστατών. Η φασματοσκοπία EPR κατέχει ιστορική θέση στη χημεία των συμπλόκων, καθώς παρέχει αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με την ομοιοπολικότητα των δεσμών μετάλλου-υποκαταστάτη, μέσω της σύζευξης του ηλεκτρονικού με το πυρηνικό spin (I) του μετάλλου (υπέρλεπτη αλληλεπίδραση) [48-50].

3.1.3 Φασματοσκοπία Ορατού Υπεριώδους

Η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης UV-vis ασχολείται με την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της απορρόφησης, που προκύπτει από διάφορες ενώσεις που απορροφούν φως στην περιοχή υπεριώδους (UV, 200-400 nm) και στην περιοχή του ορατού (Visible, 400-800 nm). Η απορρόφηση ορατού ή υπεριώδους φωτός προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων. Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας καλείται *χρωμοφόρο* και μπορεί να είναι μία χαρακτηριστική ομάδα, ένας απομονωμένος πολλαπλός δεσμός ή ένα σύστημα πολλαπλών δεσμών. Το *φάσμα απορρόφησης* που λαμβάνεται είναι η καταγραφή της απορρόφησης, της διαπερατότητας ή της έντασης της ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος. Ένα μεγάλο μέρος αυτής της φωτομετρικής μεθόδου στηρίζεται στους νόμους των *Lambert-Beer*. Σύμφωνα με το νόμο του Lambert, «το

ποσοστό του προσπίπτοντος φωτός που απορροφάται από ένα μέσο, είναι ανεξάρτητο της έντασης και κάθε διαδοχική μονάδα στοιβάδας του μέσου απορροφά ίσο κλάσμα του φωτός που την διαπερνά». Ο Beer απέδειξε ότι «η απορρόφηση του φωτός είναι ανάλογη του αριθμού των μορίων της ουσίας που απορροφά το φως. Έτσι, αν η ουσία που απορροφά το φως διαλύεται σε διαλύτη που είναι διαφανής στο φως, η απορρόφηση του διαλύματος είναι ανάλογη της μοριακής του συγκέντρωσης». Οι δύο νόμοι περιγράφονται από την παρακάτω σχέση (σχ.3.5):

$$A = \log(P_0 / P) = -\log T = \epsilon b c_{\text{mol/L}} = \alpha b c_{\text{g/L}} \quad (3.5),$$

όπου

A= Απορρόφηση (Absorbance), καθαρός αριθμός

P₀= Ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

P= Ισχύς της εξερχόμενης από το διάλυμα ακτινοβολίας

T= Διαπερατότητα (Transmittance) = P/P₀ που εκφράζεται συνήθως επί τοις %T.

c= η συγκέντρωση του διαλύματος σε mol/L ή g/L.

b= το μήκος της διαδρομής που διάνυσε η δέσμη μέσα στο διάλυμα σε cm.

ε= σταθερά αναλογίας που ονομάζεται μοριακή απορροφητικότητα (molar absorptivity) όταν η c εκφράζεται σε mol/L.

α= σταθερά αναλογίας που ονομάζεται απορροφητικότητα (absorptivity) όταν η c εκφράζεται σε g/L.

3.1.4 Φασματοσκοπία υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Infrared Spectroscopy) παρέχει 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 ηλεκτρικότητας μεταξύ των ατόμων που συμμετέχουν στο δεσμό. Οι περισσότερες πληροφορίες μπορούν να διεξαχθούν από την περιοχή 1.400-4.000 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.

3.1.5 Φασματομετρία μάζας (MS)

Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) ονομάζεται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κυρίως κατιόντων) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης (μαγνητική, τετραπόλου, χρόνου πτήσης) και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Στον ειδικό θάλαμο ιοντισμού παράγονται ηλεκτρόνια από θερμαινόμενο μεταλλικό νήμα κι έχουν δυναμικό της τάξεως των 70 eV. Το δυναμικό αυτό είναι αρκετό για να αποσπάσει ένα ηλεκτρόνιο από το υπό μελέτη μόριο και να το μετατρέψει σε θετικά φορτισμένο ιόν: $[M] - e^- \rightarrow [M]^+$. Το μοριακό ιόν $[M]^+$ εκφράζει τη σχετική μοριακή μάζα της ένωσης.

Για την ίδια ένωση, το λαμβανόμενο φάσμα μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικό με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιονισμού. Ένας διαχωρισμός των τεχνικών ιονισμού μπορεί να γίνει σε "μαλακές" και "σκληρές" τεχνικές. Στις σκληρές τεχνικές ιονισμού χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια που προκαλεί διάσπασή της σε θυγατρικά ιόντα (θραύση) [51].

Το φάσμα μαζών είναι το γράφημα της (σχετικής) έντασης ως προς το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Η κορυφή του φάσματος που έχει τη μεγαλύτερη ένταση καλείται κύρια κορυφή (base peak). Συνήθως, τα φάσματα εστιάζονται και ρυθμίζονται με βάση την κύρια κορυφή, οπότε το γράφημα προσαρμόζεται ως προς το ύψος της κύριας κορυφής και οι εντάσεις και τα ύψη των υπόλοιπων κορυφών προβάλλονται σε σχέση με την κύρια κορυφή. Η μοριακή κορυφή (molecular peak) είναι η κορυφή που αντιστοιχεί στη σχετική μοριακή μάζα της αναλυόμενης ένωσης.

3.2 Μέθοδοι μελέτης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με CT-DNA

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης χημικών ενώσεων με το DNA αποτελεί σημαντικό τομέα στη Φαρμακολογία και γίνεται συνδυαστικά με πολλές τεχνικές μεθόδους, προκειμένου να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για το είδος και την ισχύ της αλληλεπίδρασης αυτής.

Στη συνέχεια, περιγράφονται εν συντομεία οι αρχές ορισμένων από αυτών των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

3.2.1 Τιτλοδότηση μέσω της φασματοσκοπίας UV-vis

Με τη φασματοσκοπία UV-vis αντλούνται πληροφορίες για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA, για το πόσο ισχυρός είναι ο δεσμός της ένωσης με αυτό και υπολογίζεται η σταθερά σύνδεσης με το DNA (K_b). Η μελέτη της αλληλεπίδρασης μιας ένωσης με το DNA μέσω της φασματοσκοπίας UV περιλαμβάνει δύο στάδια.

Αρχικά τιτλοδοτείται διάλυμα DNA, το ποίο είναι CT-DNA (Calf Thymus) B-μορφής. Η τιτλοδότηση λαμβάνει χώρα στην περιοχή του υπεριώδους (UV) για $\lambda=200-600$ nm και πραγματοποιείται με την προσθήκη σε αυξανόμενες ποσότητες της ένωσης που μελετάται κάθε φορά. Ουσιαστικά εξετάζεται αν και με ποιο τρόπο η ένωση μπορεί να αλληλεπιδράσει με το CT-DNA, μελετώντας τις μεταβολές που εμφανίζονται στα φάσματα UV του CT-DNA κατά την προσθήκη της ένωσης σε διάφορες αναλογίες [ένωσης]/[DNA] (R). Πιο συγκεκριμένα, εξετάζεται η μεταβολή της απορρόφησης της ταινίας με $\lambda_{max}=260$ nm, καθώς και πιθανές μεταβολές στο λ_{max} της παραπάνω ταινίας.

Η εμφάνιση οποιασδήποτε μεταβολής της απορρόφησης στο λ_{max} υποδηλώνει ένδειξη αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα, παρεμβολή της ένωσης στο CT-DNA παρατηρείται όταν εμφανίζεται μετατόπιση της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος με ταυτόχρονη μείωση της απορρόφησης (υποχρωμισμός). Σε περίπτωση εμφάνισης υπερχρωμίας, η συναρμογή της ένωσης με το DNA γίνεται κατά πάσα πιθανότητα στην εξωτερική επιφάνειά του [52]. Η μετατόπιση της θέσης του λ_{max} δείχνει σταθεροποίηση ή μη της έλικας του CT-DNA μετά την αλληλεπίδραση με την ένωση, η βαθυχρωμία δείχνει σταθεροποίηση ελικοειδούς δομής DNA λόγω αλληλεπίδρασης με την ένωση [53]. Η ένταση της απορρόφησης του μεγίστου της ταινίας του CT-DNA μπορεί να αυξάνεται λόγω έκθεσης των πουρινών (αδενίνη, γουανίνη) και πυριμιδινών (θυμίνη, κυτοσίνη) του CT-DNA [54], εξαιτίας της δράσης των ενώσεων στο DNA. Η υπερχρωμία σε αυτήν την περίπτωση αποτελεί ένδειξη καταστροφής δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων, άρα και της δευτεροταγούς δομής του DNA.

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται τιτλοδότηση με φασματοσκοπία UV-vis διαλύματος της ένωσης σε διάλυμα με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων του CT-DNA. Σε αρχικό διάλυμα της ένωσης γίνεται προσθήκη του DNA σε διάφορες αναλογίες [ένωσης]/[DNA](=R) και καταγράφονται τα φάσματα, καθώς και οι μεταβολές της

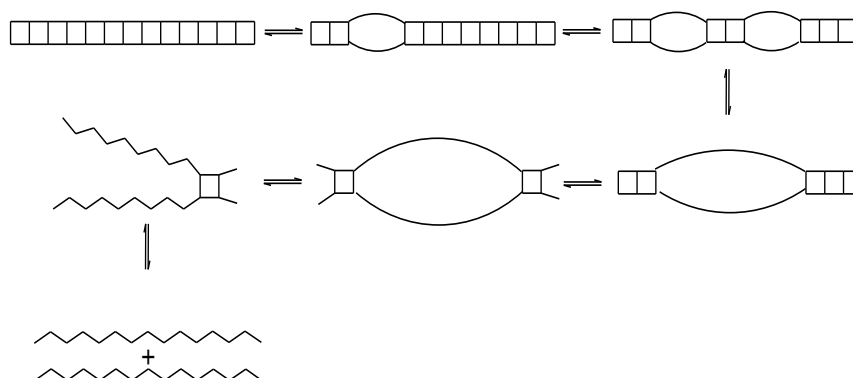
απορρόφησης και της τιμής του $\lambda_{\max}$. Οι παρατηρούμενες μεταβολές μπορούν να οδηγήσουν σε αξιόπιστα συμπεράσματα σχετικά με το είδος της αλληλεπίδρασης. Η σταθερά σύνδεσης K_b της ένωσης με το CT-DNA προσδιορίζεται από το λόγο της τεταγμένης επί την αρχή προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων που προσδιορίζεται σε διαγράμματα του λόγου $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$, σε συνάρτηση με τη $[DNA]$ με βάση την εξίσωση (3.6):

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_A - \epsilon_F)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_B - \epsilon_F)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_B - \epsilon_F)} \quad (3.6)$$

όπου $[DNA]$ είναι η συγκέντρωση του DNA, ϵ_A ο λόγος της απορρόφησης προς τη συγκέντρωση της ένωσης σε κάθε μέτρηση, ϵ_F ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της ελεύθερης ένωσης, ϵ_B ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της πλήρως δεσμευμένης ένωσης στο DNA και K_b είναι η σταθερά σύνδεσης της ένωσης με το DNA.

3.2.2 Προσδιορισμός Σημείων Τήξεως (T_m)

Ο προσδιορισμός σημείου τήξεως είναι μια επιπλέον βοηθητική μέθοδος για τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης του DNA με μικρά μόρια. 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 [55,56]. 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 [57]. Σχηματικά, μια τυπική πορεία τήξης του DNA παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: 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:

$$\%h_r = 100 \frac{A_\tau - A_\alpha}{A_\tau} \quad (3.7)$$

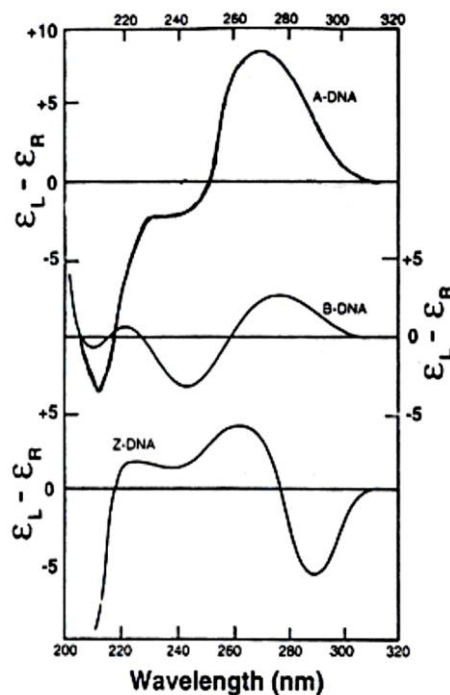
όπου: A_α είναι η αρχική απορρόφηση του διαλύματος (της διπλής έλικας δηλαδή) και A_τ είναι η απορρόφηση του διαλύματος για κάθε θερμοκρασία.

Όπως αναφέρθηκε, 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 .

3.2.3 Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού (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 (CD= Circular Dichroism) [58]. 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 [59]. 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 (χρωμοφόρων) 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 4.



Σχήμα 4: Φάσματα CD για τις πιθανές διαμορφώσεις του DNA

Στον Πίνακα 3 φαίνονται τα μήκη κύματος που σχετίζονται με τις εμφανιζόμενες ταινίες.

Πίνακας 3: Τα μήκη κύματος των εμφανιζόμενων ταινιών στα φάσματα CD

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

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 [60, 61].

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) [62]. Σε αυτό το φαινόμενο στηριχθήκαμε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου (μη χειρόμορφο μόριο) με το DNA (χειρόμορφο μόριο).

3.2.3 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 μεγάλη μήκους δομή και διαμόρφωσή τους καθώς και στην ακαμψία τους [95-103]. 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:

$$\eta = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (3.8)$$

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:

$$\left(\frac{L}{L_0} \right) = \left(\frac{\eta}{\eta_0} \right)^{1/3} = \frac{(t - t_0)^{1/3}}{(t_{DNA} - t_0)^{1/3}} \quad (3.9)$$

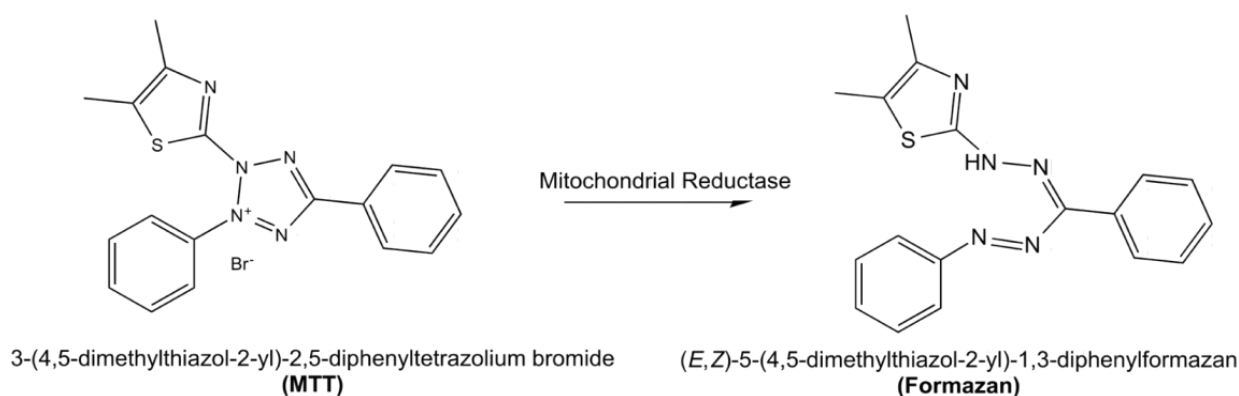
όπου L , L_0 το περιμετρικό μήκος του ραβδόμορφου DNA, παρουσία και απουσία του φαρμάκου αντίστοιχα, η , η_0 τα εσωτερικά ιξώδη (για τις πολύ αραιές συγκεντρώσεις του πειράματος κατά προσέγγιση ίσα με τα ανηγμένα ιξώδη) παρουσία και απουσία του φαρμάκου αντίστοιχα, t , t_{DNA} και t_0 είναι οι χρόνοι 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.

3.3 Μέθοδοι μελέτης της κυτταροτοξικότητας του συμπλόκου

3.3.1 Δοκιμασία MTT

Η δοκιμασία MTT (=methyl-thiazolyl-tetrazolium) 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 5) [63, 64].

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).



Σχήμα 5: Αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη μέσω ενζύμων αναγωγάσης

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

ενζυμική 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 [65-69].

3.3.2 Ανάλυση FACS

Η **Κυτταρομετρία ροής** (flow cytometry) είναι μία τεχνική για τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε ρέον υγρό. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονικής ανίχνευσης [70]. Ο όρος FACS (=Fluorescence-Activated Cell Sorting) αφορά στην απομόνωση κυττάρων, η οποία βασίζεται σε κυτταρομετρίας ροής ενεργοποιούμενης από φθορισμό, όπου τα κύτταρα διαχωρίζονται από ετερογενή μείγματα χωρίς σχετική απώλεια του μεγέθους και της δομής τους. Τα χαρακτηριστικά και οι παράμετροι που συλλέγονται από κάθε γεγονός βασίζονται αποκλειστικά στον σκεδασμό του φωτός και στα φθορίζοντα σωματίδια. Τα δεδομένα συγκεντρώνονται και αποθηκεύονται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου εμφανίζονται με τη μορφή ιστογραμμάτων (histograms) ή διαγραμμάτων σημείου (dot plots) και μπορούν να αναλυθούν και να παρέχουν συγκεκριμένες πληροφορίες για κυτταρικούς υποπληθυσμούς.

Στην παρούσα εργασία, τα καρκινικά κύτταρα της σειράς MCF-7 μελετήθηκαν με κυτταρομετρία ροής, προκειμένου να διερευνηθεί η δράση -ή μη- του υπό εξέταση συμπλόκου στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Μετά τη μονιμοποίηση με αιθανόλη, τα κύτταρα δέχονται χρώση με Propidium Iodide (PI). Η χρωστική PI φθορίζει όταν προσδεθεί στο DNA και η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA κάθε κυττάρου. Η ποσότητα του DNA (2N, 4N ή ενδιάμεση) είναι χαρακτηριστική της φάσης του κυτταρικού κύκλου (G1, G2 ή S). Η ανάλυση του φθορισμού των κυττάρων με FACS μας δείχνει το ποσοστό αυτών στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

4.1 Σύνθεση και ο χαρακτηρισμός υποκαταστατών και συμπλόκων

Για τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό υποκαταστατών και συμπλόκων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αρχικά αντιδραστήρια. Ήταν τουλάχιστον αναλυτικού βαθμού καθαρότητας p.a (>95%), ενώ οι διαλύτες παραλήφθηκαν από τις εταιρείες Sigma Aldrich, Fluka και Merck, αποστάχθηκαν σε συσκευή απόσταξης και αποξυγονώθηκαν σε γραμμή κενού.

- **o-phenanthroline**
- **2,2'-dipyridine**
- **Neocuproine**
- **Παράγωγο κουρκουμίνης AX133: 2-(3,5-bis(3,4-dimethoxystyryl)-1H-pyrazol-1-yl)pyridine**
- **CH₃OH**
- **C₂H₅OH**
- **Διάλυμα THF**
- **CH₂Cl₂**
- **KBr**
- **Διάλυμα αμινοτριμεθυλοσιλανίου HN[Si(CH₃)₃]₂**
- **Toluene**
- **Διάλυμα χλωρο- διφαινυλοφωσφίνης ClP(C₆H₅)₂**
- **H₂O₂ (30% w/w)**
- **C₄H₉OK**
- **Cu(NO)₃·3H₂O**
- **H₂O** απιονισμένο

Τα ηλεκτρονικά φάσματα απορρόφησης ορατού υπερύθρου UV/vis ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο τύπου Cary 300 της Varian, χρησιμοποιώντας κυψελίδες από χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Τα φάσματα υπερύθρου IR ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο τύπου 833 της Perkin με χρήση δισκίων KBr. Οι κρυσταλλογραφικές αναλύσεις είχαν ως πηγή ακτινοβολίας Cu ή Mo και διεξήχθησαν στο ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος. Για την κατασκευή των Πινάκων οι οποίοι περιλαμβάνουν τα μήκη δεσμών και τα μεγέθη των γωνιών των κρυσταλλογραφικά αναλυμένων δομών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Mercury. Η διεξαγωγή πειραμάτων φασματοσκοπίας

EPR έγινε στο «Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών» του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και φασματομετρίας μάζας στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας στο «Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών».

4.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου 1 με το CT-DNA. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου 1 με το DNA πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες μεθόδους: φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis) (Scatchard, καμπύλες θερμικής μετουσίωσης), κυκλικό διχρωϊσμό (CD) και ιξωδομετρία, στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή κ. Κων/νου Μεθενίτη. Τα αντιδραστήρια και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- **Na₂HPO₄·7H₂O:** Merck
- **KH₂PO₄:** Merck
- **NaCl:** PENTA
- **KBr:** Merck
- **Calf Thymus DNA:** ίνες φυσικού DNA από θύμο αδένος βοοειδούς type II, μετά νατρίου άλας, 42%
- **H₂O:** από τη συσκευή απιονισμένου ύδατος Milli-Q plus της Millipore
- **Ψηφιακός Αναλυτικός Ζυγός ADAM:** ± 0.1 mg
- **pH-μετρο Xenon:** ηλεκτρόδιο λευκοχρύσου RUSSEL CMAWL/3.7/180
- **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
- **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
- **Ιξωδόμετρο:** SI Analytics CK 300

4.3 Βιολογικά πειράματα

Μετά τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό, και τη μελέτη της αλληλεπίδρασής του με το CT-DNA, το σύμπλοκο 1, διερευνήθηκε και ως προς την κυτταροτοξικότητά του και την επίδρασή του στον κυτταρικό κύκλο, ακολουθώντας τη δοκιμασία MTT και την ανάλυση FACS, αντιστοίχως. Συγκεκριμένα, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 (καρκίνος του μαστού) από την κυτταρική τράπεζα του ερευνητικού κέντρου Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και

Ραδιολογικών Ερευνών, Ενέργειας και Ασφάλειας, υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Β', κ. Μαρίας Παραβατού.

Τα αντιδραστήρια, υλικά και όργανα που χρειάστηκαν παρατίθενται στη συνέχεια:

- **Κυτταρική σειρά MCF-7** (καρκινικά κύτταρα του μαστού ανθρώπου)
- **Θρεπτικό υλικό (medium) D-MEM HIGH GLUCOSE**, Biochem AG
- **Εμβρυϊκός ορός μόσχου (FBS)**, PAA Laboratories
- **Διάλυμα L-γλουταμίνης 200 Mm**, PAA Laboratories
- **Διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης 100 Units/Μl και 10mg/Μl**, Biochem AG
- **Διάλυμα θρυψίνης/ EDTA (0,05%/0,02% σε PBS χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+})**, Biochem AG
- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+})**
- **Εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό D-MEM HIGH GLUCOSE:** (10% FBS, 1% L-Glutamine, 1% Penicilin/Streptomycin)
- **MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)**, Applichem
- **Διάλυμα χρώσης : Propidium Iodide (4 mg / mL σε DMSO), Tris.HCl (pH 7.5, 1M), MgCl_2 (1M), RNase A (10 mg / mL)**
- **Διάλυμα μεθανόλης**
- **Διάλυμα παγωμένης αιθανόλης**
- **Απεσταγμένο νερό**
- **Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης**, Axiovert 25 Zeiss
- **Επωαστικός κλίβανος με παροχή CO_2** , Format Scientific
- **Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow)**, ELMED
- **Δοχείο υγρού αζώτου**, Forma
- **Αιματοκυττόμετρο**, Neubauer
- **Φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών**, Orange Scientific
- **Σιφώνια ακριβείας**, Orange Scientific
- **Ειδικά κρυάντοχα σωληνάρια ψύξης κυττάρων των 2 Μl**, Orange Scientific
- **Μικροπιπέτες:** 'Precision Variable-Volume Pipettes' i) 100-1000 μL High Tech. Lab., ISO 9001 και ii) 10-100 μL , Hamilton, ISO 9001

- **Πιπέτες**, Gilson
- **Φυγόκεντρος**, Heraeus Christ
- **Φασματοφωτόμετρο ELISA**: Sirio S Seac RADIM-Group Diachel ELISA plate reader
- **FACSCalibur**, Becton Dickinson

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

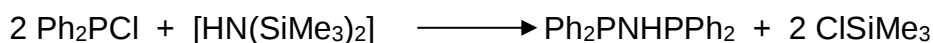
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ Cu(II)

5.1 Σύνθεση υποκαταστατών

(α) Σύνθεση και χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη Ph₂PNHPPh₂ (διφαινυλοφωσφινόϊμίνης, DPPA)

Εντός τρίλαιμης σφαιρικής φιάλης των 250 mL εισάγεται διάλυμα αμινο-τριμεθυλοσιλανίου HN[Si(CH₃)₃]₂ (11 mL, 0,052 mol) σε 50 mL ζεστού τολουολίου (80-90°C), ενώ προσαρμόζεται εσφυρισμένο θερμόμετρο και κάθετος ψυκτήρας. Κατόπιν προετοιμάζεται σταγονομετρικό χωνί με εσμύρισμα, εντός του οποίου έχει εισαχθεί διάλυμα χλωρο- διφαινυλοφωσφίνης ClP(C₆H₅)₂ (19,9 mL, 0,104 mol) σε τολουόλιο (25 mL). Το σταγονομετρικό χωνί με το περιεχόμενό του τοποθετείται στον «τρίτο λαιμό» της σφαιρικής και σκεπάζεται μερικώς με λίγο parafilm. Ενεργοποιούμε το μανδύα και όταν η θερμοκρασία φθάσει στους 80-90 °C, προσθέτουμε στάγδην το περιεχόμενο με τη φωσφίνη σε χρονικό διάστημα 30 min. Το σύστημα θερμαίνεται κατ' αναρροή (με τον κάθετο ψυκτήρα) για μία ώρα, ενώ η θερμοκρασία ελέγχεται και ρυθμίζεται περίπου στους 90 °C. Η θέρμανση συνεχίζεται για άλλες 2 h με πλάγιο ψυκτήρα, ενώ καθ' όλη τη διάρκεια του βρασμού το λευκό στερεό που παρατηρείται στα στόμια της σφαιρικής φιάλης αλλά και στον ψυκτήρα αποδίδεται στο χλωρο-τριμεθυλοσιλάνιο (παραπροϊόν της αντίδρασης) που απομακρύνεται. Μετά το πέρας των 3 h, η θερμοκρασία αυξάνεται πάνω από τους 100 °C, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το παραπροϊόν που συναποσπάσει πλέον μαζί με το τολουόλιο (αποσπάζονται περίπου 10-15 mL τολουολίου). Μετά την πάροδο δύο με τριών ημερών, με ψύξη στους 0 °C, προκύπτει λευκή πούδρα, η οποία συλλέγεται με διήθηση σε ηθμό Buchner κι εκπλύνεται με τολουόλιο και πετρελαϊκό αιθέρα σε αναλογία 1:1 (20 και 20 mL, αντιστοίχως).

Αντίδραση:



Απόδοση: Παρασκευάστηκαν 13,67 g προϊόντος (% απόδοση α = 68,2)

Στο φάσμα IR του υποκαταστάτη, Ph₂PNHPPh₂ διακρίνονται οι χαρακτηριστικές δονήσεις στα 3219 cm⁻¹ : ν (NH) και στα 895 cm⁻¹ : ν (PNHP). Το φάσμα ³¹P NMR του υποκαταστάτη χαρακτηρίζεται από μια απλή κορυφή στα 44,1 ppm, λόγω της χημικής ισοδυναμίας των δύο ατόμων φωσφόρου [71].

(β) Σύνθεση και χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη Ph₂P(O)NHP(O)Ph₂

Σε 20 mL απαερωμένου και σε 0 °C THF, προστίθενται 0,57 g (= 1,48 mmol) Ph₂PNHPPh₂ και στη συνέχεια διαβιβάζονται στάγδην 0,70 mL H₂O₂ (30% w/w) με έντονη ανάδευση. Η ανάδευση συνεχίζεται για 1 h περίπου και το προκύπτον μείγμα διηθείται υπό κενό. Το λευκό στερεό αφήνεται να ξηρανθεί καλά και συλλέγεται.

Απόδοση: Παρασκευάστηκαν 0,4 g Ph₂P(O)NHP(O)Ph₂ (α = 65, %).

Στο φάσμα IR του υποκαταστάτη Ph₂P(O)NHP(O)Ph₂, διακρίνονται οι χαρακτηριστικές δονήσεις στα 1121, 1106 cm⁻¹ : ν (PO) και στα 921 cm⁻¹ : ν (PNHP). Στο φάσμα ³¹P NMR, παρατηρείται μία μόνο κορυφή στα 21,5 ppm λόγω της ισοδυναμίας των ατόμου φωσφόρου [72, 73].

5.2 Σύνθεση συμπλόκων του Cu(II)

Με τον παραπάνω δισχιδή ιμιδοδιφωσφινικό υποκαταστάτη (OPPh₂)₂NH και διάφορες διιμίνες συντέθηκαν σύμπλοκες ενώσεις του Cu(II). Κοιτώντας ενδελεχώς τις βιβλιογραφικές αναφορές για ανάλογα σύμπλοκα παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν δομικά για πρώτη φορά τα ακόλουθα:

- [Cu{Ph₂P(O)NP(O)Ph₂}(2,2'-bipy)]NO₃ (**1**)
- [Cu{Ph₂P(O)NP(O)Ph₂}(1,10-phen)]NO₃ (**2**)
- [Cu₂{Ph₂P(O)NP(O)Ph₂-O}(1,10-phen)₂(OH)₂] (**3**)
- [Cu{Ph₂P(O)NP(O)Ph₂}(neocuproine)]NO₃ (**4**)

Μετά τη σύνθεσή τους, τα εν λόγω σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία UV-vis, IR, κρυσταλλογραφία με περίθλαση ακτίνων Χ και, με φασματοσκοπία EPR (**1 – 4**) και φασματομετρία μάζας MS (**1**).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του συμπλόκου του χαλκού Cu(II) [Cu{Ph₂P(O)NP(O)Ph₂}(curcuAX133)]NO₃ (**5**), όπου curcu AX133= 2-(3,5-bis(3,4-dimethoxystyryl)-1H-pyrazol-1-yl)pyridine, παράγωγο κουρκουμίνης. Η σύνθεση του εν λόγω παραγώγου πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο της Δρ. Μ. Πελεκάνου στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» από τη Δρ. Μ. Σαγνού και την Δρ. Π. Αλεξίου.

5.2.1 Σύνθεση και δομικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\}(2,2'\text{-bipy})]\text{NO}_3$ (1)

Σύνθεση: $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\}(2,2'\text{-bipy})]$ (1). Σε κωνική φιάλη τίθεται ποσότητα 10 mL απεσταγμένης αιθανόλης και απεαerώνεται. Στη συνέχεια προστίθενται 0,07 g (= 0,17 mmol) δι-οξυγονωμένου υποκαταστάτη $(\text{OPPh}_2)_2\text{NH}$ με 0,019 g (= 0,17 mmol) βουτοξειδίου του καλίου ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OK}$) και αφήνονται υπό ανάδευση για 20 min. Ακολουθεί προσθήκη 0,041 g (= 0,17 mmol) του άλατος $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (= 0,17 mmol) και 0,030 g 2,2'-διπυριδίνης (= 0,17 mmol), οπότε σχηματίζεται ένα μείγμα γαλανού χρώματος, το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση για 20 h περίπου κι επιπλέον ψύχεται στους -40°C για μία ημέρα. Στη συνέχεια απομακρύνεται ο διαλύτης (συμπύκνωση μέχρι ξηρού), οπότε στα τοιχώματα της κωνικής φιάλης απομένουν κρύσταλλοι γαλάζιου χρώματος, που διαλυτοποιούνται σε 3 mL MeOH . Έπειτα προστίθενται 10 mL περίπου απεσταγμένου νερού και το μείγμα αποκτά «όψη γαλακτώματος». Το γαλάζιο στερεό παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό και αφήνεται να ξηρανθεί.

Αντιδράσεις: $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})]_2\text{NH} + \text{C}_4\text{H}_9\text{OK} \rightarrow [\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})]\text{NK} + \text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$

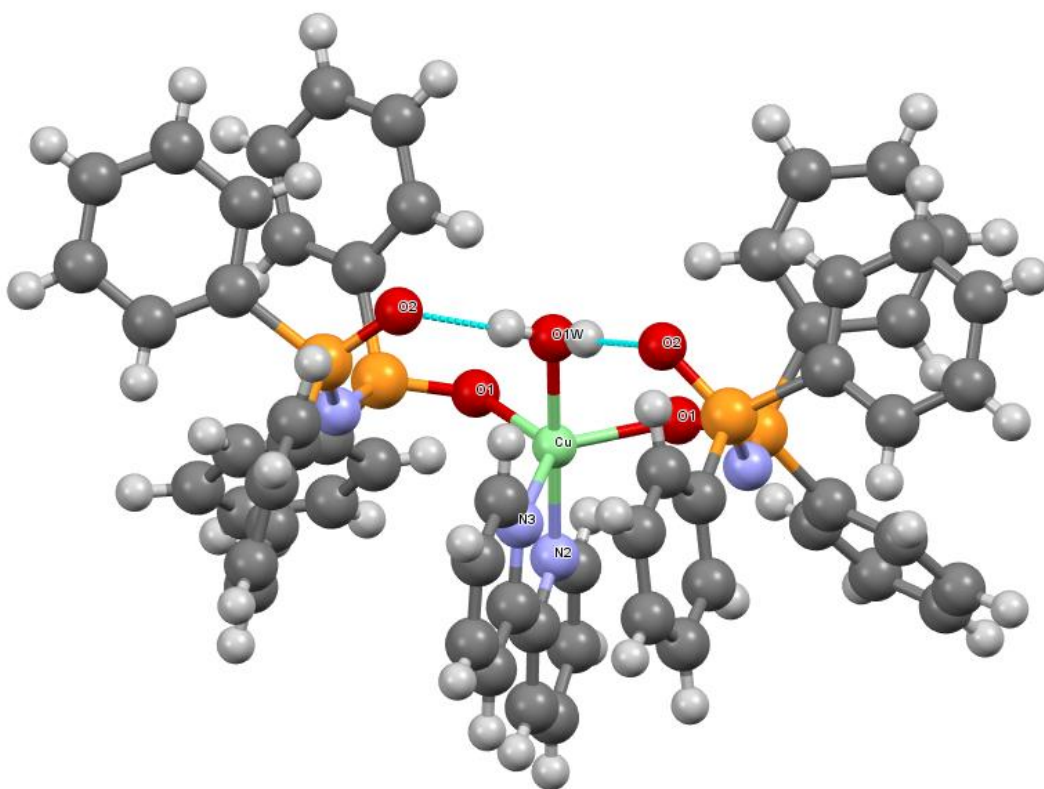
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + [\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})]\text{NK} + 2,2'\text{-bipyridine} \rightarrow [\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\}(2,2'\text{-bipy})]\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$

Παρασκευάστηκαν 0,10 g συμπλόκου 1.

(Απόδοση $\alpha = 53\%$)

Χαρακτηρισμός δομής:

(α) *Κρυσταλλογραφία:* Η παραγόμενη σκόνη δεν διαλύεται σε νερό, αλλά διαλύεται σε μεθανόλη. Από το διάλυμα που προκύπτει λαμβάνεται ποσότητα 2 mL, προστίθεται στάγδην, με μεγάλη προσοχή, σε 6 mL H_2O εντός σωλήνα κρυσταλλώσεως και το σύστημα των δύο -καλώς διαχωρισμένων- φάσεων αφήνεται προς διάχυση στιβάδων. Μετά την πάροδο μίας εβδομάδας περίπου, στα τοιχώματα του σωλήνα προέκυψαν κρύσταλλοι, των οποίων η ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ έδωσε τη δομή που παρουσιάζεται στην Εικόνα 21. Στον Πίνακα 4 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών του συμπλόκου. Τα άτομα CuO_3N_2 στην πρώτη σφαίρα συντάξεως του συμπλόκου σχηματίζουν γεωμετρική δομή παραμορφωμένης τριγωνικής διπυραμίδας. Η δομή στον κρύσταλλο σταθεροποιείται με ενδομοριακές π-π αλληλεπιδράσεις, όπως επίσης και με δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στο, συμπλεγμένο στο μεταλλικό κέντρο, μόριο H_2O και τα ελεύθερα άτομα O των δύο υποκαταστατών $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2]^-$, οι οποίοι, απρόσμενα, συμπλέκονται μονοσχιδώς.



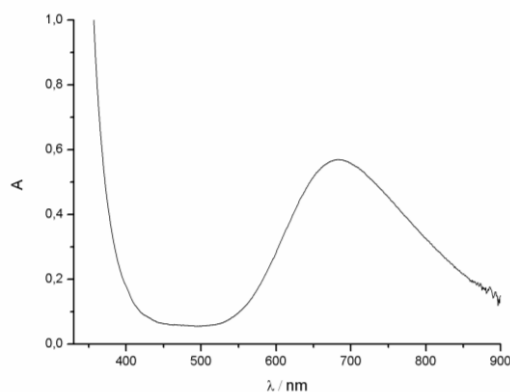
Εικόνα 21: Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(2,2'\text{-bipy})(\text{H}_2\text{O})]$.

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(2,2'\text{-bipy})(\text{H}_2\text{O})]$.

Γωνίες (°)		Μήκη δεσμών (Å)	
O(1)-Cu-N(2)	91,03	Cu-N(2)	1,973
O(1)-Cu-N(3)	127,30	Cu-N(3)	2,055
O(1)-Cu-O(1w)	90,32	Cu-O(1w)	1,959
O(1)-Cu-O(1)	104,68	Cu-O(1)	2,078
N(2)-Cu-N(3)	80,93	Δεσμοί Υδρογόνου	
N(2)-Cu-O(1)	91,03	O(1w)-H(1w)...O(2)	1,804
N(3)-Cu-O(1w)	96,86	O(1w)-H(2w)...O(2)	1,804

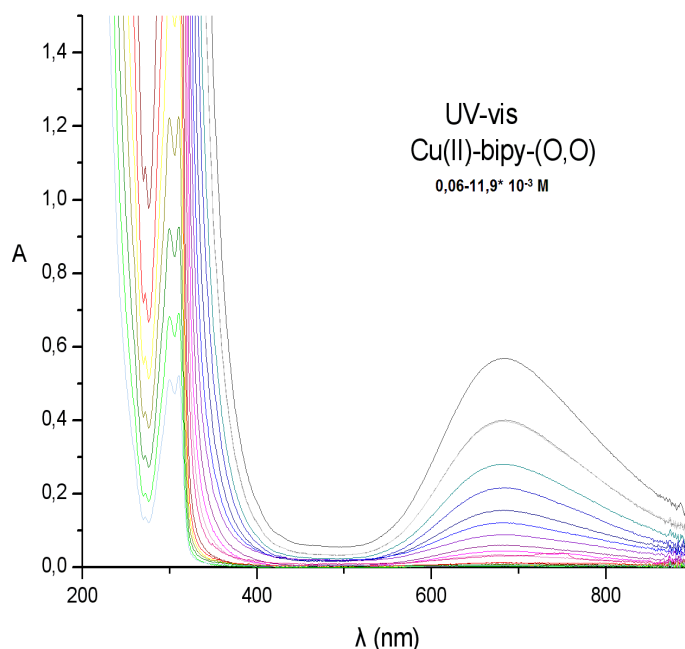
(β) Φασματοσκοπία IR και UV-vis

Από τη μελέτη των φασμάτων IR και UV-vis προκύπτουν ισχυρές ενδείξεις ότι η δομή του εν λόγω συμπλόκου σε διάλυμα αποκτά τετραγωνική δομή. Η d-d μετάπτωση στα 681 nm [$\epsilon(681 \text{ nm}) = 50 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$] είναι χαρακτηριστική τετραγωνικής γεωμετρίας (Σχήματα 6, 7).



Σχήμα 6: Το φάσμα UV-vis του συμπλόκου 1 σε διαλύτη CH₃OH.

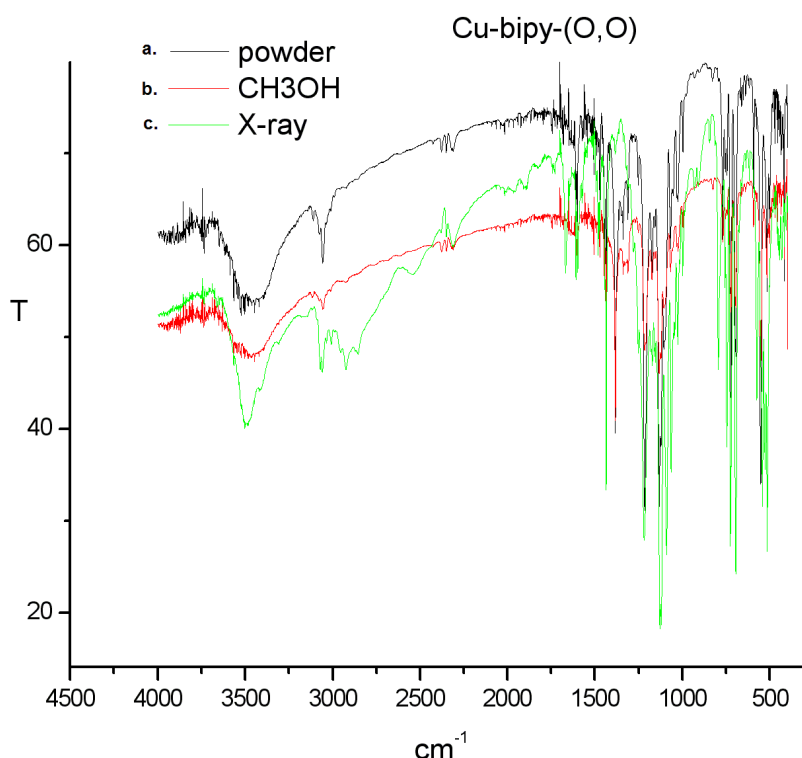
Οι μεταπτώσεις σε υψηλότερες ενέργειες στα 300 και 310 nm [και με μεγαλύτερες τιμές $\epsilon(300) = 8590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ & $\epsilon(310) = 8640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ αντιστοίχως] πιθανότατα αντιστοιχούν είτε σε μεταπτώσεις μεταφοράς φορτίου LMCT (Ligand to Metal Charge Transfer), είτε σε μεταπτώσεις μεταξύ τροχιακών του υποκαταστάτη (intra-ligand transitions) [82].



Σχήμα 7: Σειρά φασμάτων UV-vis του συμπλόκου 1 σε διαλύτη CH₃OH.

Σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε CH₃OH, είναι εμφανής η ταινία στα 681 nm, ενώ σε μικρότερες είναι ορατές οι ταινίες στα 300 και 310 nm.

Η διαφοροποίηση της δομής του εν λόγω συστήματος από τη στερεά κατάσταση σε διάλυμα φαίνεται και από τα παρακάτω φάσματα IR.



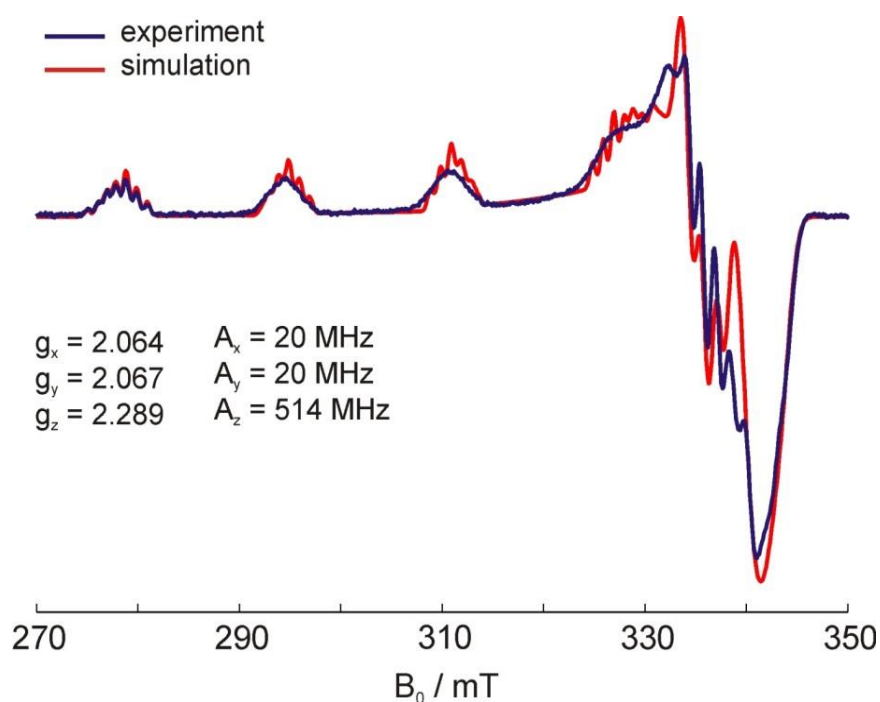
Σχήμα 8: Τα φάσματα IR για το σύμπλοκο **1** ως κρυσταλλικό και άμορφο σύστημα.

Στο Σχήμα 8, η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στο φάσμα IR του συμπλόκου **1** σε στερεά μορφή, η κόκκινη στο φάσμα IR των κρυστάλλων που λαμβάνονται μετά την εξάτμιση διαλύματός του σε CH₃OH, ενώ η πράσινη γραμμή στο φάσμα IR των κρυστάλλων που σχηματίστηκαν κατά την κρυστάλλωσή του στο σύστημα CH₃OH/H₂O. Και στα τρία φάσματα επιβεβαιώνεται η *σύμπλεξη του διοξυγονωμένου υποκαταστάτη* από τις χαρακτηριστικές συχνότητες δονήσεως ν(P–N–P): 1216 και ν(P–O): 1133 cm⁻¹ (οι αντίστοιχες κορυφές στον ελεύθερο υποκαταστάτη βρίσκονται στα 921 και 1121 cm⁻¹, αντιστοίχως). Η *σύμπλεξη της 2,2'-διπυριδίνης* επιβεβαιώνεται από τις χαρακτηριστικές δονήσεις των δεσμών C–H εκτός του αρωματικού δακτυλίου ν(C–H): 770(a) / 722(b) / 760(c) cm⁻¹ και δονήσεις τάσεως αρωματικού δακτυλίου πυριδίνης 1384 (a) / 1383(b) / 1436 (c) cm⁻¹ (οι αντίστοιχες κορυφές σε ένα ελεύθερο μόριο 2,2'-διπυριδίνης είναι 760 και 1450 cm⁻¹) [80]. Αξίζει να παρατηρήσει κανείς ότι στο φάσμα IR των κρυστάλλων (c), η κορυφή στα 3484 cm⁻¹ είναι πιο έντονη, γεγονός που πιθανότατα αποδίδεται στην ύπαρξη του συμπλεγμένου νερού στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου. Επί πλέον, η κορυφή στα 1384 / 1383 cm⁻¹ στην σκόνη και το στερεό μετά την εξάτμιση διαλύματος

CH₃OH (μαύρη και κόκκινη γραμμή, Σχήμα 8), η οποία αποδίδεται στα NO₃⁻ και απουσιάζει από τους κρυστάλλους σε σύστημα CH₃OH/H₂O, πιστοποιεί ότι οι τελευταίοι δεν περιέχουν NO₃⁻ σε αντίθεση με τη σκόνη του συμπλόκου.

(γ) Φασματοσκοπία EPR

Στα ακόλουθα σχήματα (Σχήματα 9-11) παρουσιάζονται τα φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (cw-EPR) για το $S = \frac{1}{2}$ σύμπλοκο **1** του Cu (II) (σύστημα 3d⁹ με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο) σε θερμοκρασία $T = 70$ K. Στο Σχήμα 9 φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις υπέρλεπτης υφής μεταξύ του spin του ηλεκτρονίου και του πυρήνα του μεταλλικού κέντρου. Οι τιμές του παράγοντα g διαφοροποιούνται στις τρεις διευθύνσεις του χώρου με τέτοιο τρόπο, ώστε ένας μοναδικός άξονας να διαφέρει από τους άλλους δύο, $g_x = g_y \neq g_z$, οπότε το σύστημα χαρακτηρίζεται ως *αξονικό*, με $g_{||} > g_{\perp}$ και $A_{||} > A_{\perp}$.

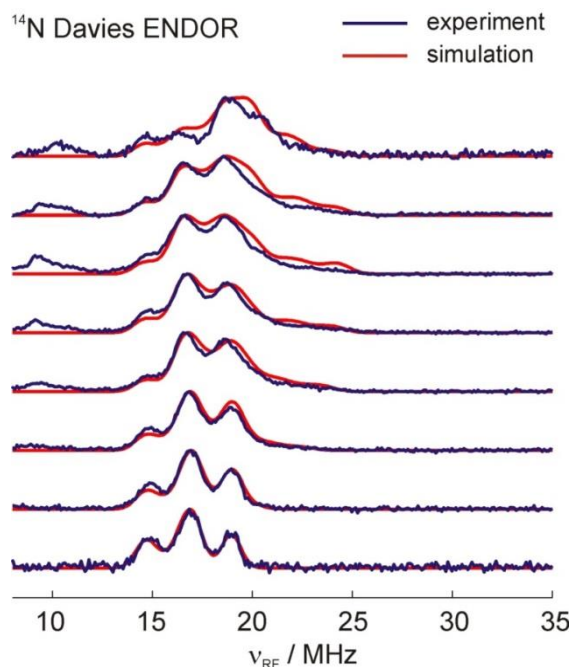


Σχήμα 9: Το φάσμα cw-EPR του συμπλόκου **1** σε διάλυμα μεθανόλης/τολουολίου, σε αναλογία 1:1, στους 70 K (μπλε χρώμα) και η προσομοίωσή του (κόκκινο χρώμα).

Η παρατηρούμενη τετραπλέτα εξηγείται με τη βοήθεια του διαγράμματος ενεργειακών καταστάσεων για σύστημα με $S = 1/2$ και $I(^{63}\text{Cu}, ^{65}\text{Cu}) = 3/2$ (Σχήμα 2).

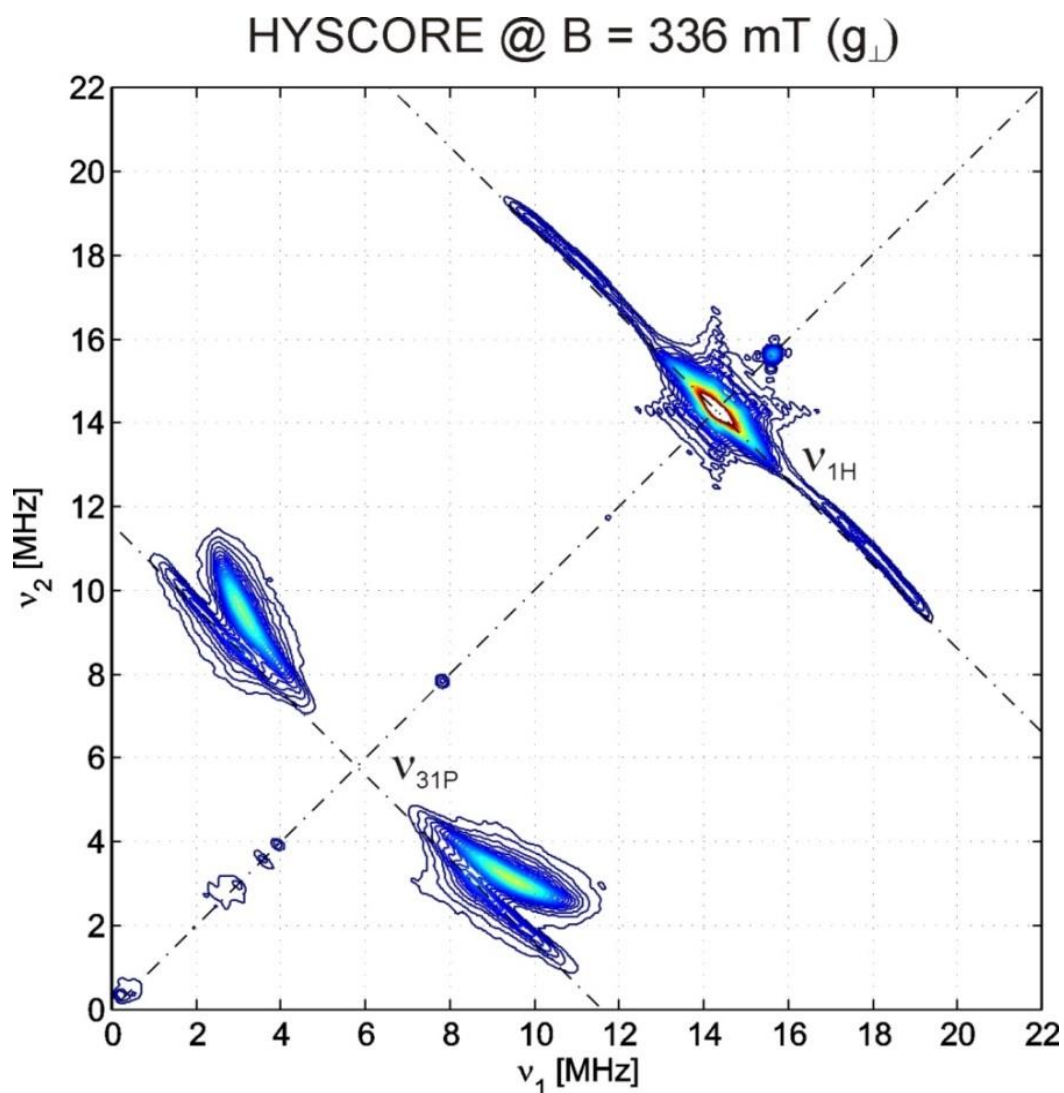
Στο Σχήμα 10, παρουσιάζεται το φάσμα ENDOR (20 K) για το σύμπλοκο **1**, όπου αποτυπώνονται οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις υπερ-υπέρλεπτης υφής του spin του

ηλεκτρονίου με τους δύο γειτονικούς (ισοδύναμους) πυρήνες αζώτου, $I(^{14}\text{N}) = 1$, που ανήκουν στη συμπλεγμένη με το μεταλλικό κέντρο 2,2'-διπυριδίνη. Από την προσομοίωση των φασμάτων προέκυψαν οι ακόλουθες τιμές για τις συνιστώσες του τανυστή της υπερ-υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης: $A_1 = 32.4$; $A_2 = 33.4$; $A_3 = 43$ MHz.



Σχήμα 10: Το φάσμα Davies ENDOR του συμπλόκου **1** (με μπλε γραμμή) και η προσομοίωσή του (κόκκινη γραμμή). Από κάτω προς τα πάνω, αυξάνεται η ένταση του μαγνητικού πεδίου στο οποίο ελήφθη το φάσμα.

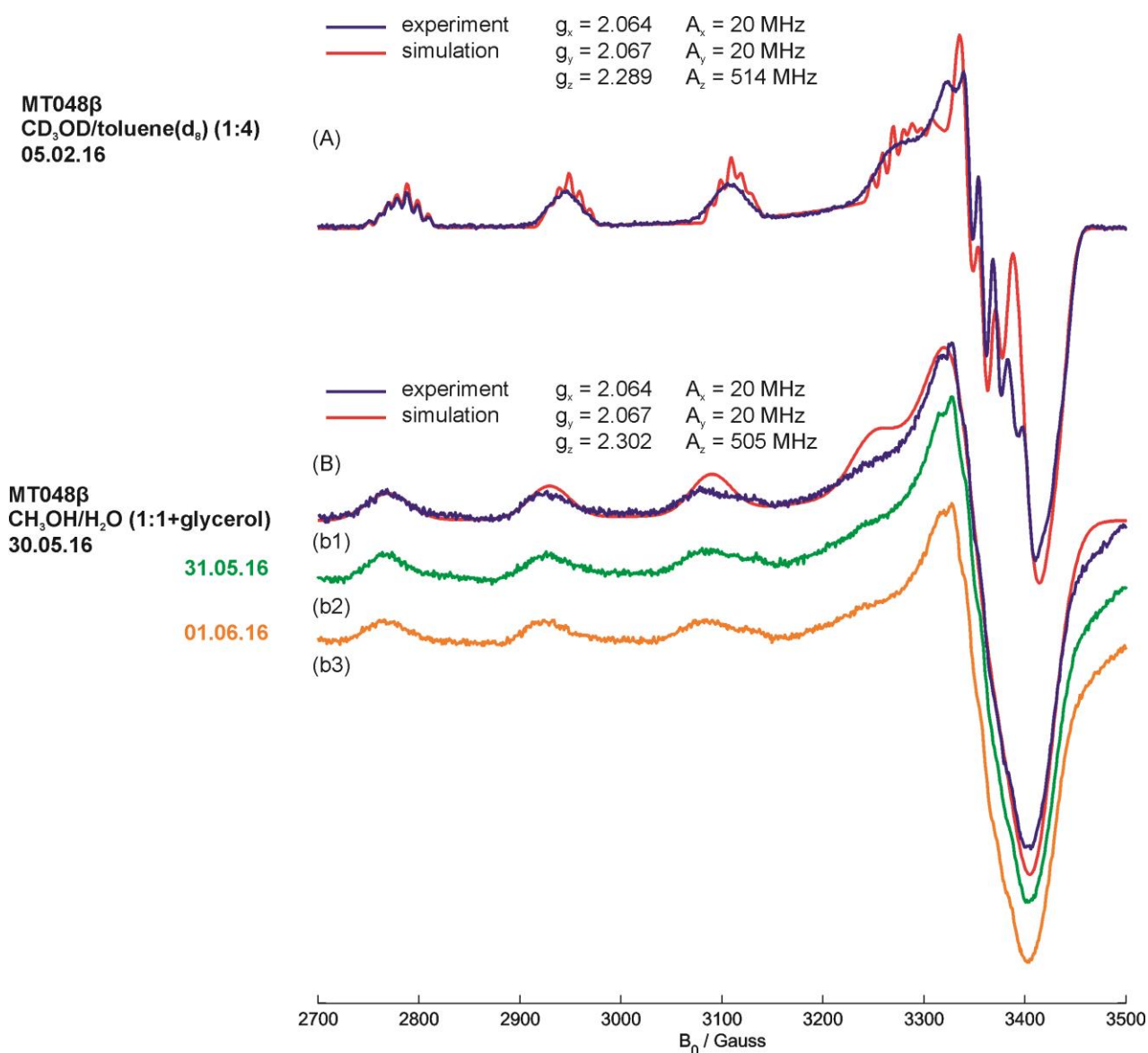
Από την άλλη πλευρά, στα φάσματα HYSCORE (2d) (20 K) (Σχήμα 11) αποτυπώνονται ασθενέστερες υπερ-υπέρλεπτες αλληλεπιδράσεις, επομένως, όπως ανεμένετο, εμφανίζονται σήματα τα οποία οφείλονται στην αλληλεπίδραση του ασύζευκτου ηλεκτρονίου με τους πυρήνες των πλησιέστερων στο μεταλλικό κέντρο ατόμων ^1H ($I = 1/2$) της 2,2'-διπυριδίνης, καθώς και των ατόμων ^{31}P ($I = 1/2$) του διοξυγονωμένου υποκαταστάτη. Αντιθέτως, δεν εμφανίζονται σήματα ^{14}N λόγω της ισχυρής τους αλληλεπίδρασης με το κέντρο Cu(II) , δεδομένου του δεσμού μεταξύ τους. Τα σήματα ^{31}P HYSCORE είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα σήματα για το δις-χηλικό σύμπλοκο $[\text{Cu}(\text{O},\text{O})_2]$ το οποίο έχει μελετηθεί παλαιότερα (ΜΔΕ Άγγελος-Νικόλαος Στάμος, 2015), γεγονός το οποίο παρέχει ενδείξεις ότι στο εν διάλυση σύμπλοκο **1** (σε CH_3OH), ο υποκαταστάτης (O,O) συμπλέκεται επίσης χηλικά.



Σχήμα 11: Το φάσμα HYSCORE του συμπλόκου 1.

Σε όλα τα παραπάνω φάσματα, δεν φαίνεται πουθενά η παρουσία του H_2O ως συμπλεγμένου υποκαταστάτη. Κατά συνέπεια, ενισχύεται η άποψη ότι εν διαλύσει, το σύμπλοκο **1** δεν έχει δομή με γεωμετρία τριγωνικής διπυραμίδας, αλλά αποκτά τετραγωνική δομή, όπου οι υποκαταστάτες 2,2'-bipyridine και (O,O) συμπλέκονται δισχιδώς σε αναλογία 1:1 με το κέντρο Cu(II) .

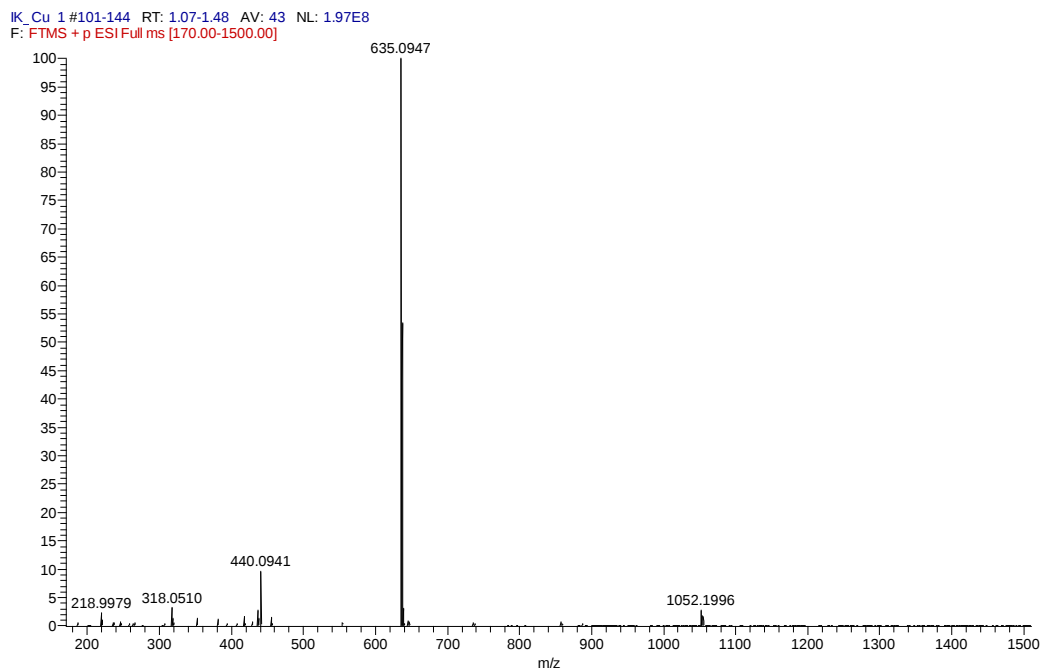
Η δράση του εν λόγω συμπλόκου σε βιολογικά συστήματα μελετήθηκε περαιτέρω, όπως περιγράφεται αναλυτικά στα Κεφάλαια 6 και 7. Προκειμένου να διαπιστωθεί η σταθερότητα στο χρόνο του συμπλόκου **1** σε μείγμα CH₃OH/H₂O, ελήφθησαν φάσματα cw-EPR επί τρεις συνεχόμενες ημέρες. Τα αποτελέσματα των εν λόγω μετρήσεων (Σχήμα 12) επιβεβαιώνουν τη σταθερότητά του.



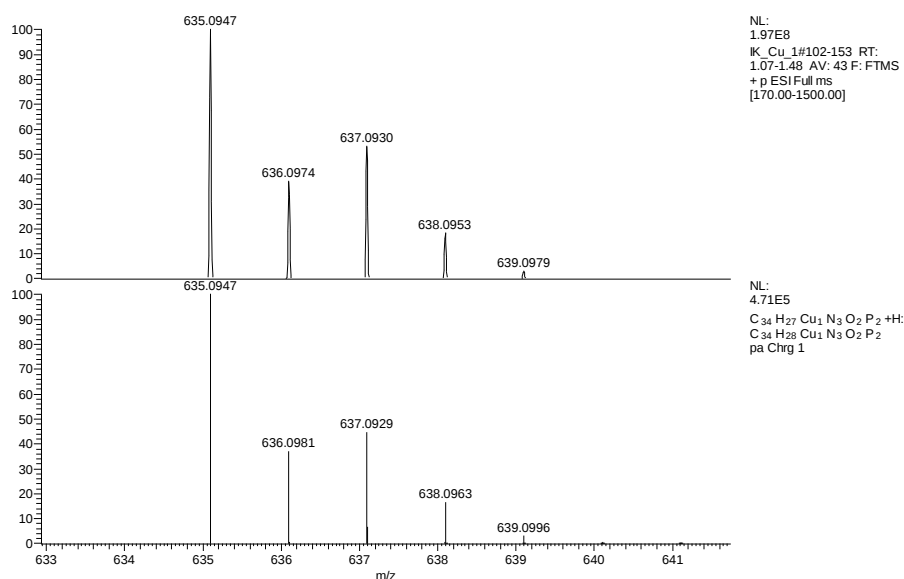
Σχήμα 12: Τα φάσματα cw-EPR του συμπλόκου **1** σε χρονικό διάστημα τριών ημερών.

(δ) Φασματομετρία MS

Η διαφοροποίηση της δομής του συμπλόκου **1** από τον κρύσταλλο στο διάλυμα επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα φασματοφωτομετρίας μάζας. Από το φάσμα ESI-MS (m/z) με θετικό ιονισμό, προκύπτει ότι το κύριο θραύσμα είναι το $[C_{38}H_{28}CuN_3O_2P_2]^+$, με m/z ίσο με 635,0947 (Σχήμα 13). Τα βασικότερα θραύσματα, σε διαλύτη μεθανόλη, φαίνονται στο Σχήμα 14. Το κύριο θραύσμα αντιστοιχεί σε σύστημα με στοιχειομετρική αναλογία Cu / (O,O) / 2,2'-bipy 1:1:1.



Σχήμα 13: Το φάσμα MS του συμπλόκου **1**.



Σχήμα 14: Ισοτοπική κατανομή του $[C_{38}H_{28}CuN_3O_2P_2]^+$
(επάνω η πειραματική, κάτω η θεωρητική).

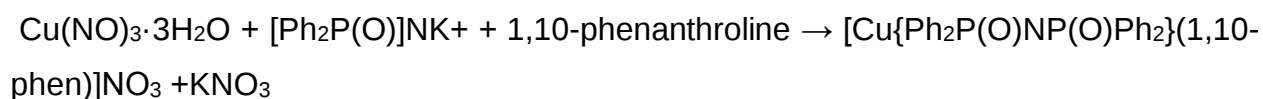
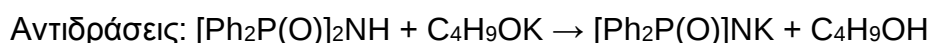
5.2.2 Σύνθεση και δομικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[Cu\{Ph_2P(O)NP(O)Ph_2\}(1,10\text{-phen})]NO_3$ (2)

Σύνθεση: $[Cu\{Ph_2P(O)NP(O)Ph_2\}(1,10\text{-phen})]NO_3$ (2). Σε κωνική φιάλη τίθεται ποσότητα 8 mL απεσταγμένης αιθανόλης και απασερώνεται. Στη συνέχεια προστίθενται 0,06 g (= 0,14 mmol) δι-οξυγονωμένου υποκαταστάτη $(OPPh_2)_2NH$ με 0,016 g (= 0,14 mmol) βουτοξειδίου του καλίου (C_4H_9OK) και αφήνονται υπό ανάδευση για 10 min. Ακολουθεί προσθήκη 0,035 g (= 0,15 mmol) του άλατος $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ και 0,029 g (= 0,14 mmol) 1,10-φαινανθρολίνης, οπότε σχηματίζεται ένα μείγμα γλαυκού χρώματος, το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση για 24 h. Την επόμενη ημέρα παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του μείγματος και η φιάλη τοποθετείται στους $-40^\circ C$ για 2 h. Μετά την ψύξη, το ίζημα που καταβυθίζεται διαχωρίζεται από το υπερκείμενο υγρό μέσω διήθησης υπό κενό (Εικόνα 22) και αφήνεται να ξηρανθεί. Το γαλάζιο στερεό συλλέγεται και το υποκίτρινου χρώματος διήθημα μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και αφήνεται να εξατμιστεί σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 22: Συσκευή διήθησης υπό κενό.

Στον υάλινο ηθμό (χωνευτήριο με πυθμένα από πορώδη ύαλο) συγκρατείται το γαλάζιο στερεό, ενώ στην κωνική φιάλη συλλέγεται το διήθημα υποκίτρινου χρώματος.

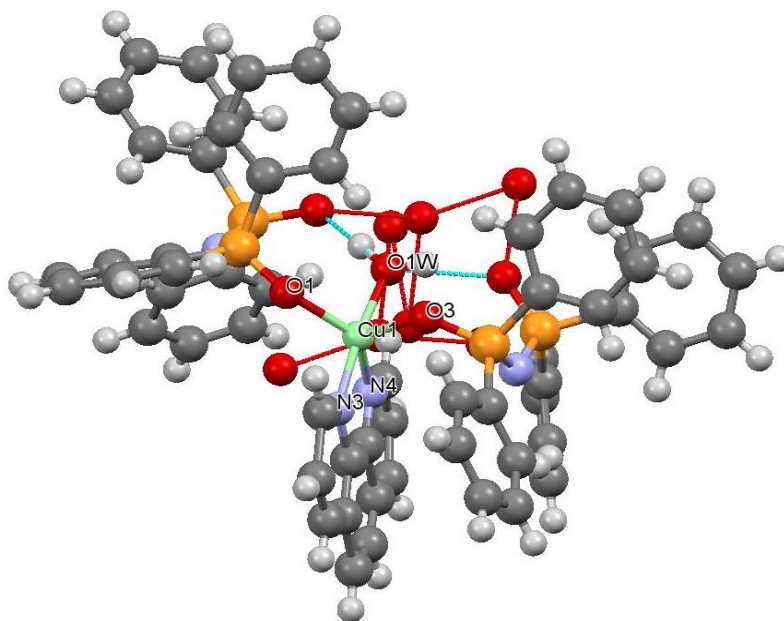


Παρασκευάστηκαν 0,22 g συμπλόκου 2.

(Απόδοση $\alpha = 70\%$)

Χαρακτηρισμός δομής:

(α) *Κρυσταλλογραφία*: Το παραπάνω στερεό είναι μη διαλυτό σε νερό, αλλά διαλύεται σε CH₃OH. Κατά την κρυστάλλωση με τη μέθοδο της ανάμιξης στιβάδων και χρησιμοποιώντας το κλασικό σύστημα CH₃OH/H₂O προέκυψαν κρύσταλλοι γαλάζιου χρώματος. Από την κρυσταλλογραφική ανάλυση ακτίνων Χ προέκυψε η δομή που φαίνεται στην Εικόνα 23, ενώ στον Πίνακα 5 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών του συμπλόκου.



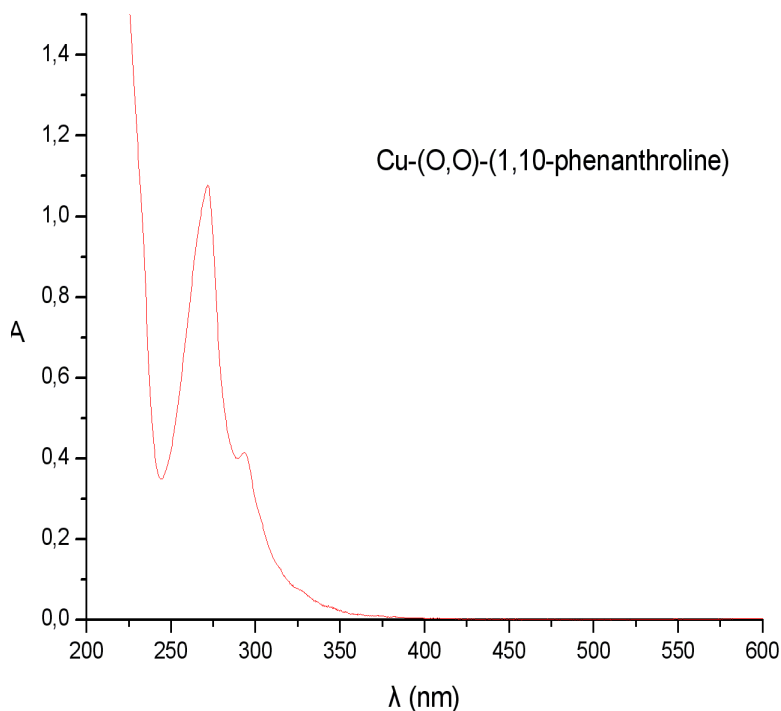
Εικόνα 22: Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου [Cu{Ph₂P(O)NP(O)Ph₂-O}₂(1,10-phen)(H₂O)].

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου [Cu{Ph₂P(O)NP(O)Ph₂-O}₂(1,10-phen)(H₂O)].

Γωνίες (°)		Μήκη δεσμών (Å)	
O(1)-Cu-N(4)	134,30	Cu-N(3)	1,973
O(1)-Cu-N(3)	92,90	Cu-N(4)	2,015
O(1)-Cu-O(1w)	93,50	Cu-O(1w)	1,945
O(1)-Cu-O(3)	102,10	Cu-O(1)	1,987
N(4)-Cu-N(3)	83,70	Cu-O(3)	2,051
N(3)-Cu-O(1w)	173,50	Δεσμοί Υδρογόνου	
O(1w)-Cu-O(3)	87,40	O(1w)-H(1w)...O(4)	1,794
O(1w)-Cu-N(4)	92,50	O(1w)-H(2w)...O(2)	1,539

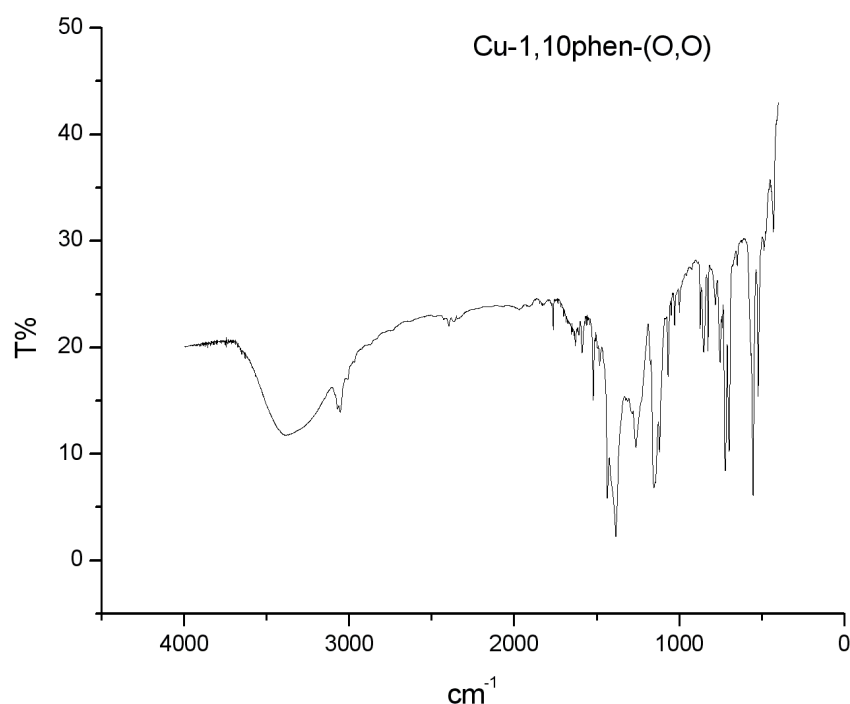
(β) Φασματοσκοπία UV-vis και IR

Στο Σχήμα 15 παρουσιάζεται το φάσμα UV-vis του συμπλόκου **2**, σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε CH₃OH. Παρατηρείται κορυφή στο μήκος κύματος 272 nm με τιμή μοριακής απορροφητικότητας $\epsilon(272) = 19950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και ένας «ώμος» στα 294 nm, με $\epsilon(294) = 7670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Οι εν λόγω ταινίες πιθανότατα αντιστοιχούν είτε σε μεταπτώσεις LMCT, είτε σε μεταπτώσεις μεταξύ τροχιακών του υποκαταστάτη [82].



Σχήμα 15: Το φάσμα UV-vis του συμπλόκου **2** σε CH₃OH.

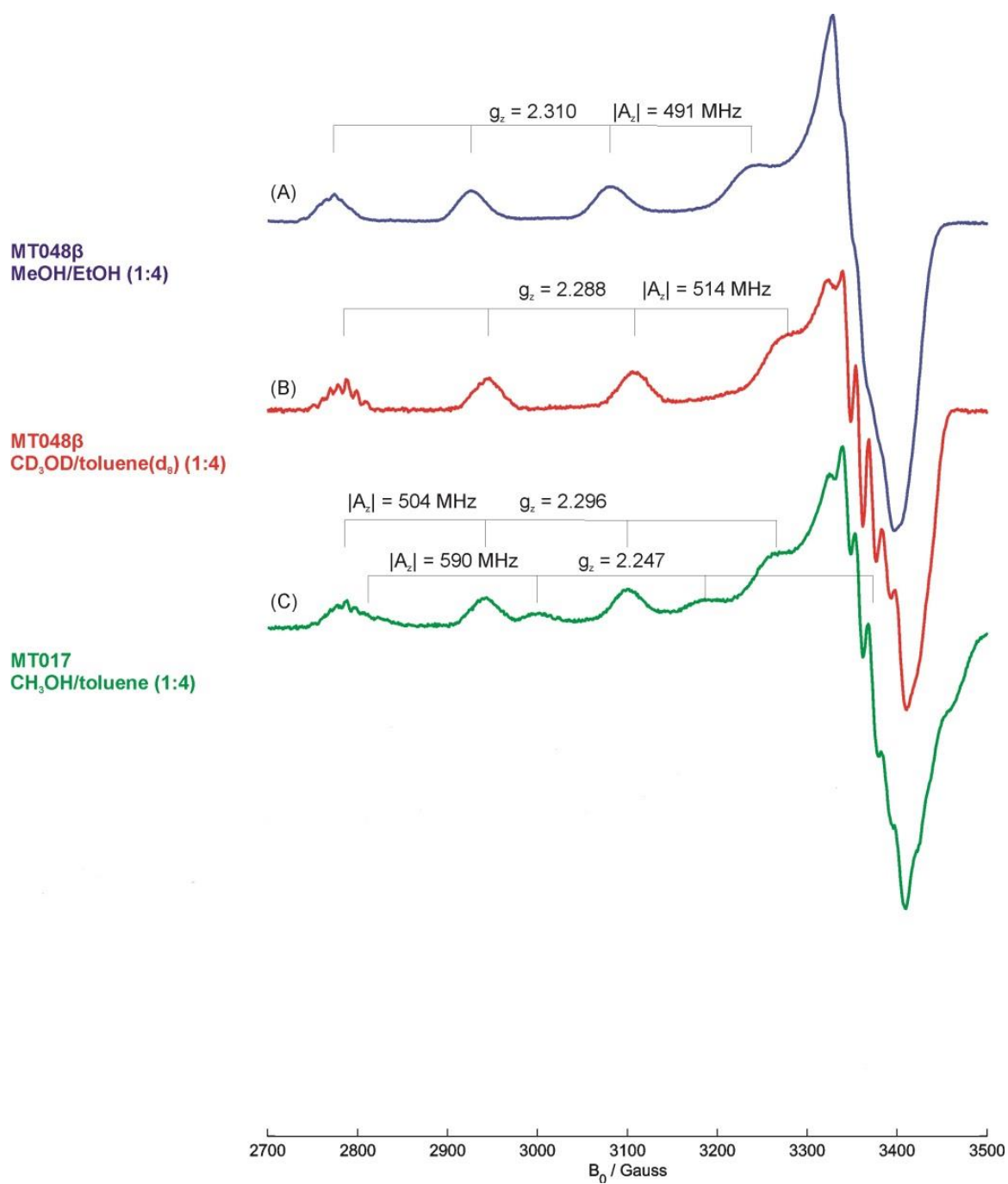
Ακολουθεί το φάσμα υπερύθρου (Σχήμα 16) για το σύμπλοκο **2**. Η σύμπλεξη του διοξυγονωμένου υποκαταστάτη υποδηλώνεται από τις χαρακτηριστικές συχνότητες δονήσεως $\nu(\text{P}-\text{N}-\text{P})$: 1263 και $\nu(\text{P}-\text{O})$: 1154 cm^{-1} (οι αντίστοιχες κορυφές στον ελεύθερο υποκαταστάτη βρίσκονται στα 921 και 1121 cm^{-1} , αντιστοίχως). Η σύμπλεξη της 1,10-φαινανθρολίνης επιβεβαιώνεται από τις χαρακτηριστικές δονήσεις των δεσμών C–H εκτός του αρωματικού δακτυλίου $\nu(\text{C}-\text{H})$: 721 cm^{-1} και δονήσεις τάσεως του αρωματικού δακτυλίου της πυριδίνης 1436 cm^{-1} (οι αντίστοιχες κορυφές σε ένα ελεύθερο μόριο 1,10-φαινανθρολίνης είναι 736-711 και 1430-1421 cm^{-1}) [81]. Επί πλέον, και εδώ παρατηρείται η κορυφή στα 1383 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στα NO_3^- .



Σχήμα 16: Το φάσμα IR του συμπλόκου 2 σε CH₃OH.

γ) Φασματοσκοπία EPR

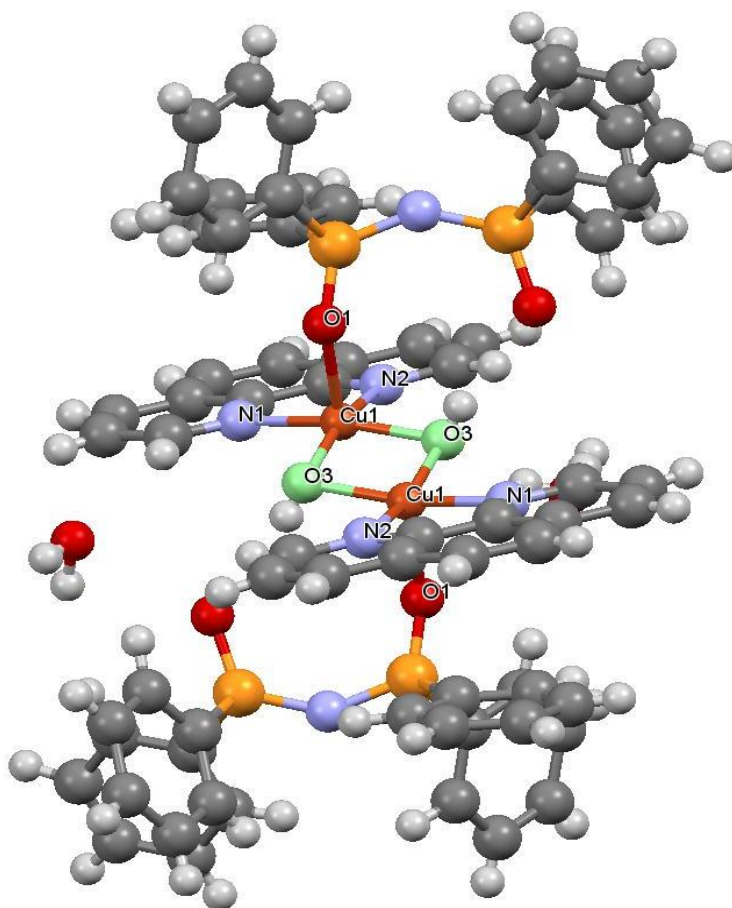
Στο Σχήμα 17 φαίνεται το φάσμα cw-EPR του συμπλόκου **2** (70 K) σε μείγμα διαλυτών CH₃OH/τολουόλιο (1:1), σε σχέση με τα αντίστοιχα φάσματα που ελήφθησαν για το σύμπλοκο **1**. Παρατηρούμε ότι ανάμεσα στις κορυφές της τετραπλέτας παρεμβάλλονται και άλλες κορυφές, γεγονός που υποδηλώνει τη συνύπαρξη διαφορετικών συστημάτων Cu(II). Η κύρια τετραπλέτα έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με την αντίστοιχη του συμπλόκου **1**, παρέχοντας ενδείξεις για παρόμοια σφαίρα συντάξεως Cu(II).



Σχήμα 17: Το φάσμα cw-EPR του συμπλόκου 2 (πράσινη γραμμή), σε σύγκριση με αυτά του 1 (κόκκινη και μπλε γραμμή).

5.2.3 Σύνθεση και δομικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Cu}_2\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(1,10\text{-phen})_2(\text{OH})_2]$ (3)

Όπως προαναφέρθηκε, κατά τη σύνθεση του παραπάνω συμπλόκου (Εικόνα 23), συλλέγεται το διήθημα και αφήνεται να εξατμιστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Από τη μελέτη δείγματος των κρυστάλλων που σχηματίστηκαν στα τοιχώματα του σωλήνα προέκυψε η δομή $\text{Cu}_2(\text{OH})_2(\text{O})_2(\text{phen})_2$ (3), όπου (O) = μονοσχιδώς συμπλεγμένος υποκαταστάτης (O,O) (Εικόνα 24). Για το διπυρηνικό σύμπλοκο, όπως φαίνεται από τα χαρακτηριστικά μεγέθη γωνιών και μήκη γωνιών, το κάθε κέντρο Cu(II) αποκτά δομή η οποία έχει χαρακτηριστικά τετραγωνικής πυραμίδας.



Εικόνα 23: Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}_2\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(1,10\text{-phen})_2(\text{OH})_2]$.

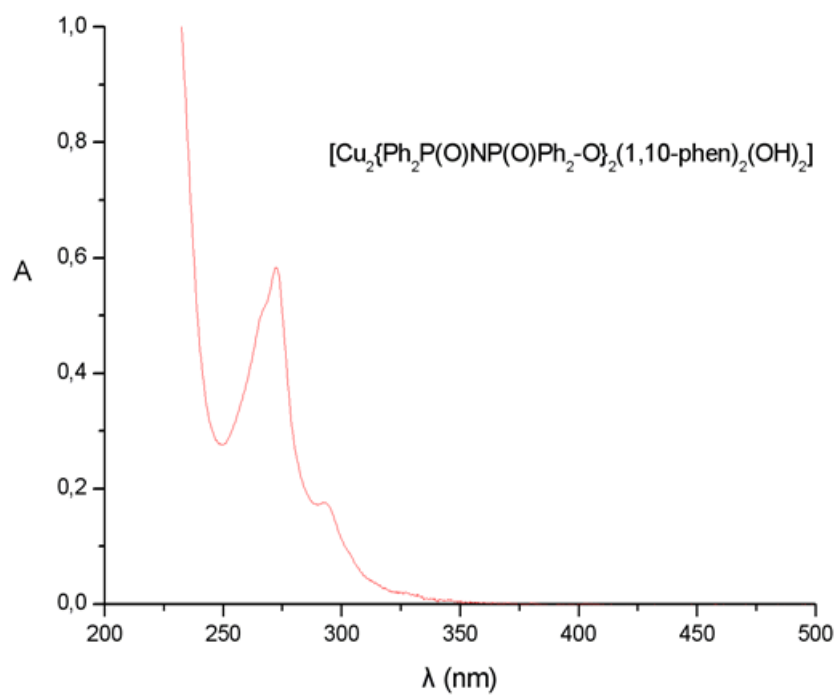
Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου $[\text{Cu}_2\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(1,10\text{-phen})_2(\text{OH})_2]$.

Γωνίες (°)		Μήκη δεσμών (Å)	
Cu-O(3)-Cu	95,89	Cu-Cu	2,907
O(3)-Cu-N(1)	164,12	Cu-N(2)	2,036
O(1)-Cu-N(2)	103,78	Cu-N(1)	2,040
O(3)-Cu-O(3)	84,11	Cu-O(3)	1,962
N(1)-Cu-N(2)	80,70	Cu-O(3)	1,954
N(1)-Cu-O(1)	99,88	Δεσμοί Υδρογόνου	
N(1)-Cu-O(3)	97,23	O(3)-H(H3O)...O(2)	2,243
O(3)-Cu-N(2)	94,57	O(3)-H(H3O)...O(2)	2,243
O(3)-Cu-N(2)	164,12		
O(1)-Cu-O(3)	92,09		
O(1)-Cu-O(3)	92,58		

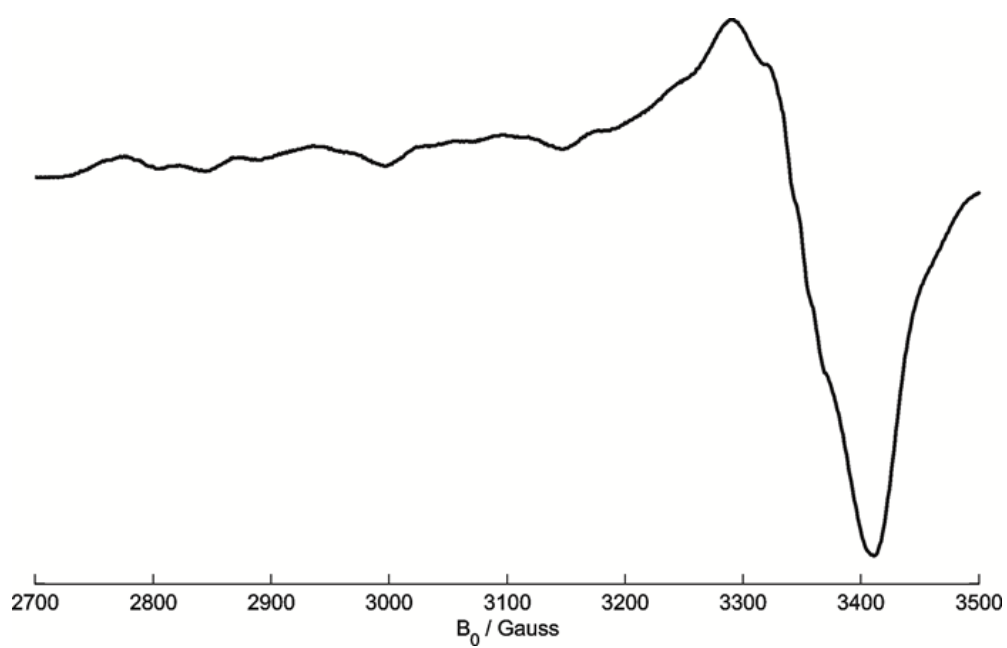
Φασματοσκοπία UV-vis και EPR

Στο Σχήμα 18 παρουσιάζεται το φάσμα UV-vis του συμπλόκου **3**, σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε CH_3OH , το οποίο παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με αυτό του συμπλόκου **2**. Παρατηρείται κορυφή στο μήκος κύματος 273 nm με τιμή μοριακής απορροφητικότητας $\epsilon(273) = 2540 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και ένας «ώμος» στα 294 nm, με $\epsilon(294) = 760 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Στο Σχήμα 19 φαίνεται το φάσμα cw-EPR του συμπλόκου **3**. Η τετραπλέτα που αναμένεται λόγω του Cu(II) επηρεάζεται είτε από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις Cu(II) ... Cu(II), είτε από τη συνύπαρξη διαφορετικών κέντρων Cu(II).



Σχήμα 18: Το φάσμα UV-vis του συμπλόκου 3 σε διαλύτη CH_3OH .

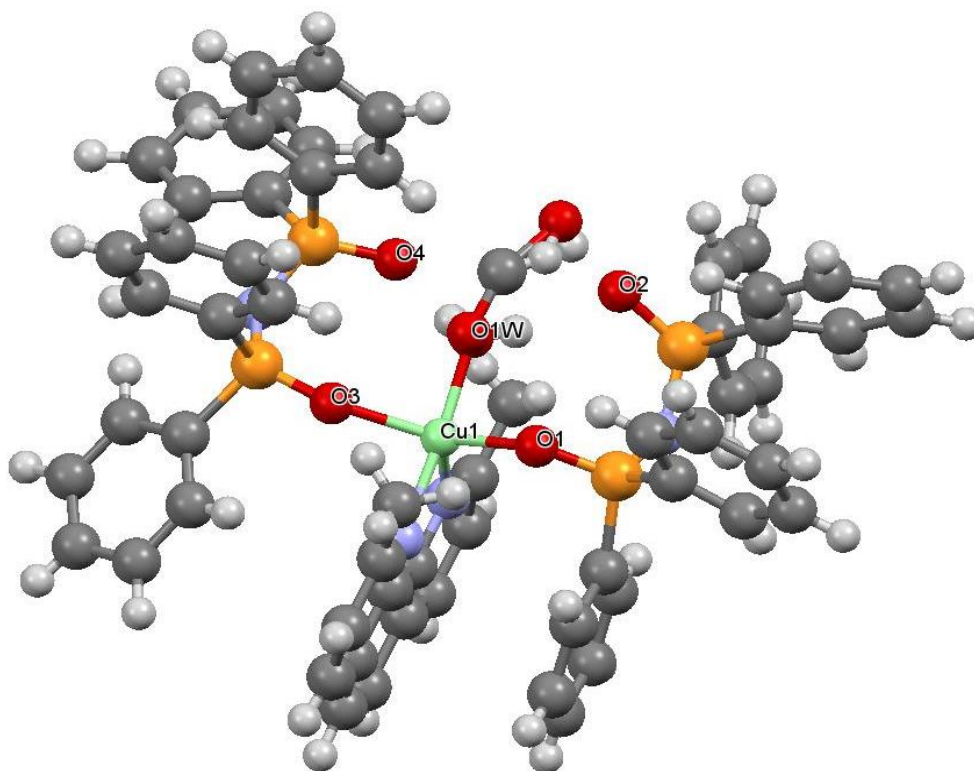


Σχήμα 19: Το φάσμα cw-EPR του συμπλόκου 3.

5.2.4 Σύνθεση και δομικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\}(\text{neocuproine})]\text{NO}_3$ (4)

Σύνθεση: $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\}(\text{neocuproine})]\text{NO}_3$ (Complex 4). Σε κωνική φιάλη τίθεται ποσότητα 10 mL μείγματος $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ σε αναλογία 1:1. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα 0,04 g (= 0,20 mmol) του άλατος $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και το μείγμα θερμαίνεται σε αμμόλουτρο ($\theta = 35\text{--}40^\circ\text{C}$) για 30 min. Σε άλλη κωνική φιάλη τίθεται ποσότητα 5 mL μεθανόλης, 0,07 g (0,17 mmol) δι-οξυγονωμένου υποκαταστάτη $(\text{OPPh}_2)_2\text{NH}$ με 0,02 g (= 0,17 mmol) βουτοξειδίου του καλίου ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OK}$) και αφήνονται υπό ανάδευση για 30 min. Ακολουθεί ανάμειξη των δύο μειγμάτων και ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 2 h προστίθεται στο μείγμα 0,04 g (= 0,19 mmol) νεοκουπροΐνης (ή 2,9-διμεθυλο-1,10-φαινανθρολίνης), που εν τω μεταξύ έχουν διαλυθεί σε 10 mL H_2O , και το τελικό μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Την επόμενη ημέρα παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του μείγματος (κιτρινωπό) και καταβύθιση ιζήματος για 2 h. Το στερεό (ανοιχτού γαλαζοπράσινου χρώματος) συλλέγεται με διήθηση υπό κενό και αφήνεται να ξηρανθεί. Το κοκκινωπού χρώματος διήθημα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού προς απομάκρυνση του διαλύτη. Τα στερεά υπολείμματα που απομένουν στα τοιχώματα της φιάλης διαλυτοποιούνται σε CH_3OH και το διάλυμα που προκύπτει αποκτά κόκκινο χρώμα.

α) *Κρυσταλλογραφία:* Ομοίως με τις περιπτώσεις των δύο προηγούμενων συμπλόκων, κατά την κρυστάλλωση με το σύστημα $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ προέκυψαν λαμπεροί κρύσταλλοι (πολύ ανοιχτού πράσινου χρώματος), των οποίων η κρυσταλλογραφική ανάλυση απέδωσε τη δομή που φαίνεται στην Εικόνα 25, ενώ στον Πίνακα 7 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών του συμπλόκου.



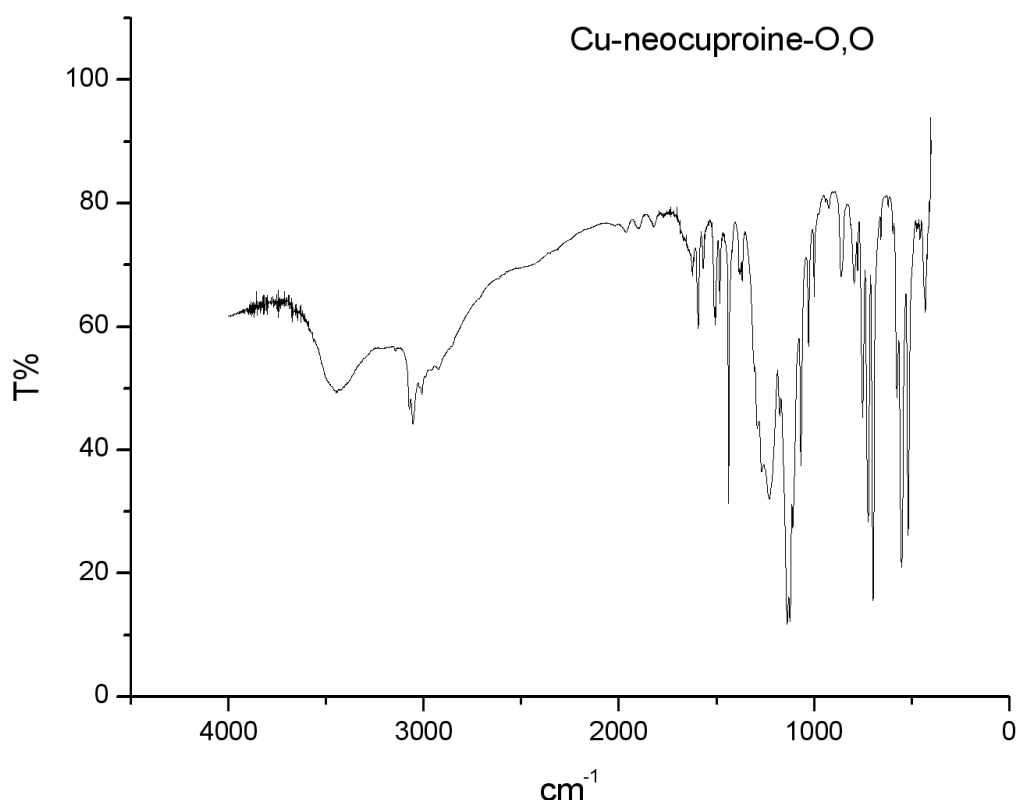
Εικόνα 24: Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(\text{neocuproine})(\text{H}_2\text{O})]$.

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά μήκη δεσμών και μεγέθη γωνιών της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(\text{neocuproine})(\text{H}_2\text{O})]$.

Γωνίες (°)		Μήκη δεσμών (Å)	
O(1)-Cu-N(4)	114,00	Cu-N(3)	2,003
O(1)-Cu-N(3)	93,70	Cu-N(4)	2,228
O(1)-Cu-O(1w)	87,60	Cu-O(1w)	1,988
O(1)-Cu-O(3)	139,40	Cu-O(1)	1,928
N(4)-Cu-N(3)	79,60	Cu-O(3)	1,984
N(3)-Cu-O(1w)	175,50	Δεσμοί Υδρογόνου	
O(1w)-Cu-O(3)	89,90	O(1w)-H(1w)...O(4)	2,603
O(1w)-Cu-N(4)	103,80	O(1w)-H(2w)...O(2)	2,676

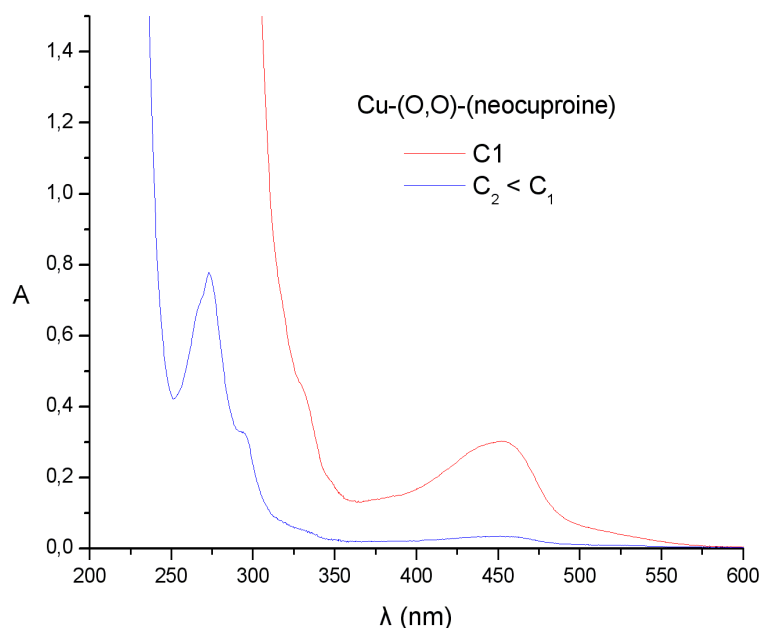
β) Φασματοσκοπία IR και UV-vis

Στο φάσμα υπερύθρου (Σχήμα 20) για το σύμπλοκο **4**, η σύμπλεξη του διοξυγονωμένου υποκαταστάτη υποδηλώνεται από τις χαρακτηριστικές συχνότητες δονήσεως ν(P–N–P): 1227 και ν(P–O): 1138 cm^{-1} (οι αντίστοιχες κορυφές στον ελεύθερο υποκαταστάτη βρίσκονται στα 921 και 1121 cm^{-1} , αντιστοίχως). Η σύμπλεξη της 1,10-νεοκουπροΐνης επιβεβαιώνεται από τις χαρακτηριστικές δονήσεις της από τις χαρακτηριστικές δονήσεις των δεσμών C–H εκτός του αρωματικού δακτυλίου ν(C–H): 721 cm^{-1} και δονήσεις τάσεως του αρωματικού δακτυλίου της πυριδίνης 1437 cm^{-1} .



Σχήμα 20: Το φάσμα IR του συμπλόκου 4.

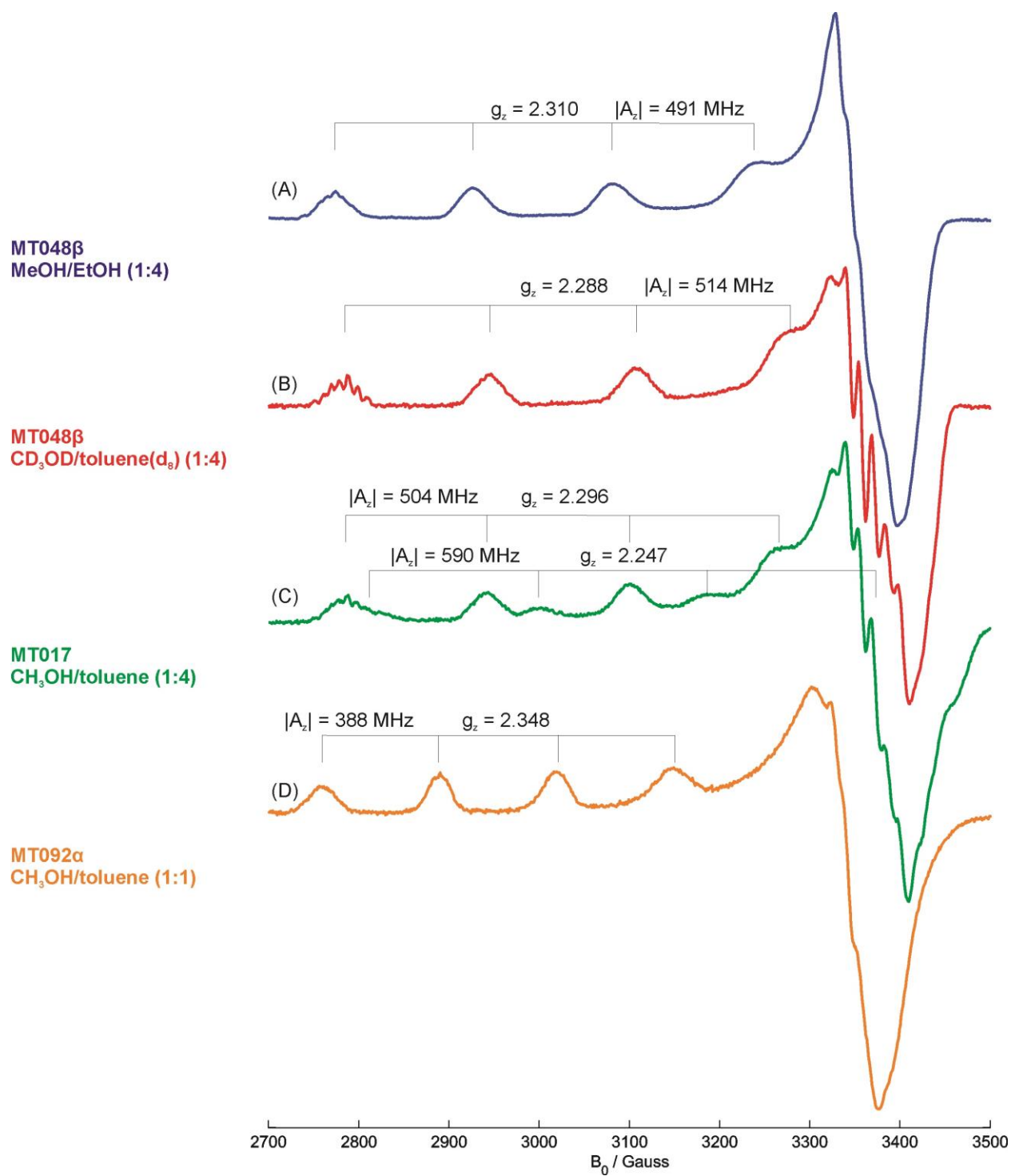
Στο Σχήμα 21 παρουσιάζεται το φάσμα UV-vis του συμπλόκου **4**. Σε υψηλές συγκεντρώσεις του συμπλόκου σε CH_3OH παρατηρείται χαρακτηριστική d-d μετάπτωση στα 452 nm, με τιμή μοριακής απορροφητικότητας $\epsilon(452) = 190 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρατηρείται κορυφή στο μήκος κύματος 272 nm με τιμή μοριακής απορροφητικότητας $\epsilon(273) = 3690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και ένας «ώμος» στα 294 nm, με $\epsilon(294) = 4100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



Σχήμα 21: Το φάσμα UV-vis του συμπλόκου 4 σε CH₃OH.

γ) Φασματοσκοπία EPR

Στο Σχήμα 22 παρουσιάζονται τα φάσματα cw-EPR για το σύμπλοκο **4** (70 K) σε σχέση με τα αντίστοιχα των συμπλόκων **1** και **2**. Όπως και στην περίπτωση του συμπλόκου **1**, φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις υπέρλεπτης υφής μεταξύ του spin του ηλεκτρονίου και του πυρήνα του μεταλλικού κέντρου, με τιμές $g_x = g_y \neq g_z$ και το σύστημα χαρακτηρίζεται ως *αξονικό*, με $g_{||} > g_{\perp}$ και $A_{||} > A_{\perp}$. Επομένως και εδώ καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η δομή του συμπλόκου **4** σε διάλυμα δεν έχει γεωμετρία τριγωνικής διπυραμίδας, όπως φαίνεται στην κρυσταλλική δομή, αλλά είναι τετραγωνική. Επί πλέον δεν εμφανίστηκε υπερ-υπέρλεπτη αλληλεπίδραση του spin του ηλεκτρονίου με γειτονικά άτομα αζώτου, άρα ίσως το σύμπλοκο **4** να μην περιέχει καθόλου τον (N,N) υποκαταστάτη (ενν. νεοκουπροΐνη). Εάν ισχύει κάτι τέτοιο, τότε παρά το γεγονός ότι από τη σύνθεση του συμπλόκου **4** προέκυψε η παραπάνω κρυσταλλική δομή (Εικόνα 25), δεν αποκλείεται η μεγαλύτερη ποσότητα του (N,N) υποκαταστάτη να συμπλέκεται με Cu(I) κι έτσι να προέκυψε το κοκκινωπού χρώματος διήθημα, που αναφέρθηκε στη συνθετική πορεία.

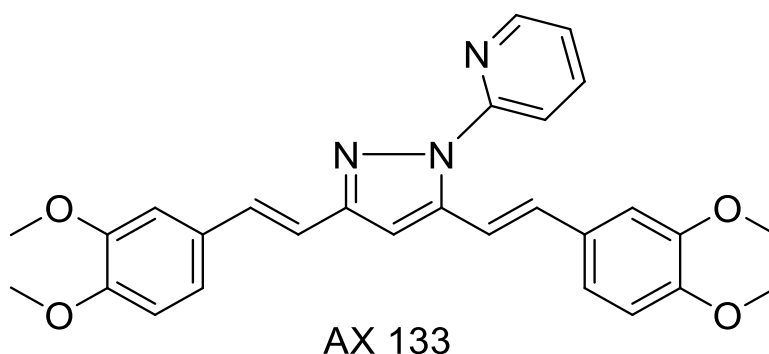


Σχήμα 22: Τα φάσματα cw-EPR για το σύμπλοκο 4 σε σχέση με αυτά των 1 και 2.

5.2.5 Σύνθεση και δομικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Cu}(\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\})](\text{curcuAX133})\text{NO}_3$ (5), όπου curcuAX133: 2-(3,5-bis(3,4-dimethoxystyryl)-1H-pyrazol-1-yl)pyridine.

Η κουρκουμίνη, όσο και τα κουρκουμινοειδή εμφανίζουν πολύ ενδιαφέρουσες αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες [107].

Η σύνθεση του συμπλόκου **5** πραγματοποιήθηκε με ένα νέο παράγωγο της φυσικής κουρκουμίνης, το 2-(3,5-bis(3,4-dimethoxystyryl)-1H-pyrazol-1-yl)pyridine, στο οποίο έχει αντικατασταθεί η δικετο-ομάδα της κουρκουμίνης με την ομάδα της «πυραζόλο-πυριδίνης» και μπορεί να δράσει ως δισχιδής διιμινικός υποκαταστάτης τύπου (N,N) (= δότης δύο ατόμων αζώτου). Ο συντακτικός τύπος του υποκαταστάτη φαίνεται στο Σχήμα 23.



Σχήμα 23: Ο συντακτικός τύπος του υποκαταστάτη curcuAX133, ενός νέου παραγώγου της φυσικής κουρκουμίνης με τη χημική ονομασία 2-(3,5-bis(3,4-dimethoxystyryl)-1H-pyrazol-1-yl)pyridine.

Σύνθεση: Σε κωνική φιάλη τίθεται ποσότητα 10 mL απεσταγμένης $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ και απεερώνεται. Στη συνέχεια προστίθενται 0,06 g (= 0,15 mmol) δι-οξυγονωμένου υποκαταστάτη $(\text{OPPh}_2)_2\text{NH}$ με 0,02 g (= 0,15 mmol) βουτοξειδίου του καλίου ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OK}$) και αφήνονται υπό ανάδευση για 10 min. Ακολουθεί προσθήκη 0,035 g (= 0,15 mmol) του άλατος $\text{Cu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και 0,07 g (= 0,15 mmol) curcuAX133, οπότε σχηματίζεται ένα μείγμα πράσινου χρώματος, το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση για 24 h. Την επόμενη ημέρα παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του μείγματος (πιο κιτρινωπό) και η φιάλη τοποθετείται στους $-40\text{ }^\circ\text{C}$ για 2 h. Μετά την ψύξη, το ίζημα που καταβυθίζεται διαχωρίζεται από το υπερκείμενο υγρό μέσω διήθησης υπό κενό και αφήνεται να ξηρανθεί.

Το κιτρινωπό στερεό συλλέγεται και ζυγίζεται: $m = 0,07\text{ g}$.

Αντιδράσεις: $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})]_2\text{NH} + \text{C}_4\text{H}_9\text{OK} \rightarrow [\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})]_2\text{NK} + \text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + \text{K}\{[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})]_2\text{N}\} + \text{curcuAX133} \rightarrow$
 $[\text{Cu}\{(\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2)\}(\text{curcuAX133})]\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$

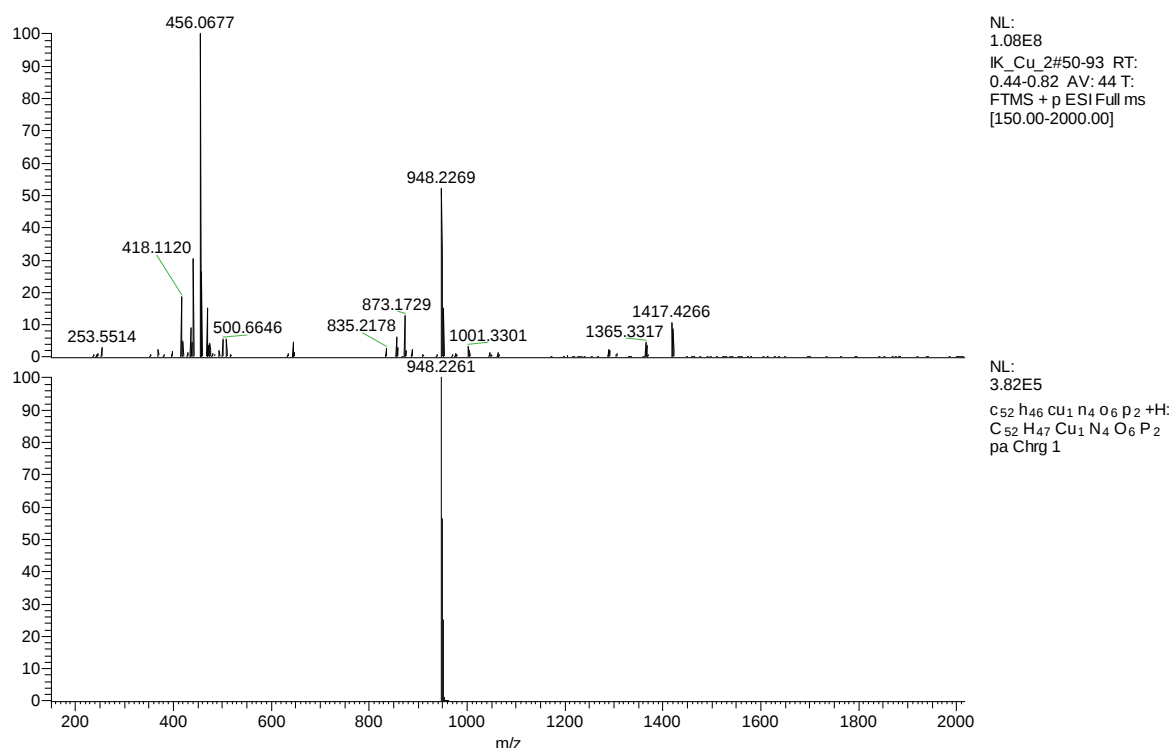
Παρασκευάστηκαν 0,07 g συμπλόκου **5**.

(Απόδοση $\alpha = 46\%$)

Το στερεό που παράγεται είναι ευδιάλυτο σε μεθανόλη και διχλωρομεθάνιο, λιγότερο σε αιθανόλη και καθόλου σε H_2O . Λαμβάνοντας υπόψη τη διαλυτότητά του, πραγματοποιήθηκαν πολλές προσπάθειες κρυστάλλωσης, σε διάφορα συστήματα διαλυτών, όπως «μεθανόλη/νερό», «διχλωρομεθάνιο/εξάνιο», κλπ., αλλά η απομόνωση κρυστάλλων προς ανάλυση, για το εν λόγω σύμπλοκο δεν κατέστη ακόμη δυνατή. Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος μελετήθηκε με τις παρακάτω τεχνικές.

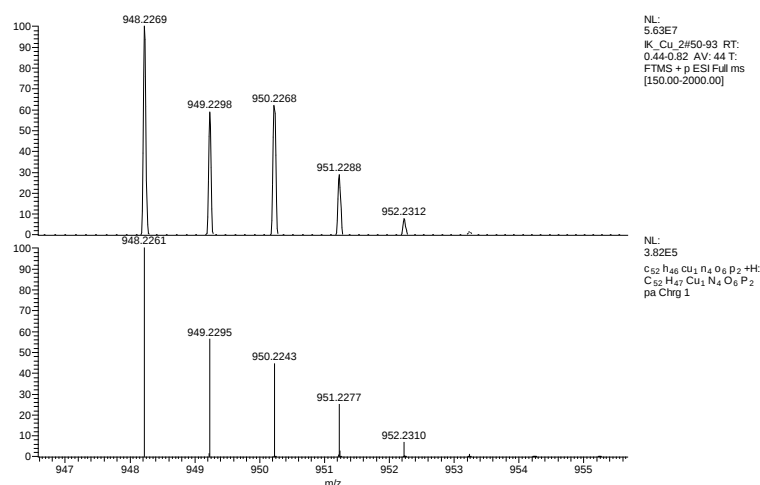
α) Φασματομετρία MS

Από το φάσμα ESI-MS(m/z) με θετικό ιονισμό, προκύπτει ότι το κύριο θραύσμα είναι το $[\text{C}_{52}\text{H}_{47}\text{O}_6\text{N}_4\text{CuP}_2]^+$ με $m/z = 948,2261$ (Σχήμα 24). Τα βασικότερα θραύσματα, σε διαλύτη μεθανόλη, φαίνονται στο Σχήμα 24.



Σχήμα 24: Το φάσμα MS για το σύμπλοκο $[\text{Cu}\{(\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2)\}(\text{curcuAX133})]\text{NO}_3$.

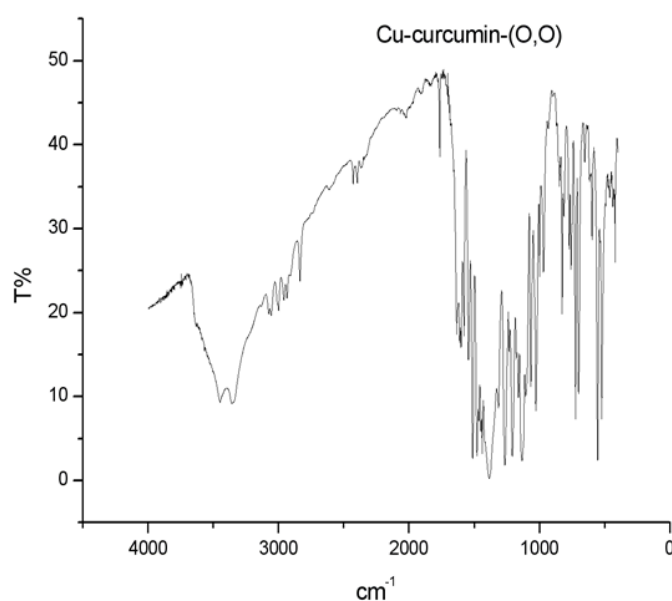
Ο Μοριακός Τύπος που αντιστοιχεί σε αυτή στη μάζα του κυρίου θραύσματος είναι $[\text{Cu}(\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\})(\text{curcuAX133})]^+$, ο οποίος περιέχει από ένα ισοδύναμο των υποκαταστατών (O,O) και curcuAX133.



Σχήμα 25: Ισοτοπική κατανομή του $[\text{C}_{52}\text{H}_{47}\text{O}_6\text{N}_4\text{CuP}_2]^+$, επάνω η πειραματική, κάτω η θεωρητική).

(β) Φασματοσκοπία IR

Στο Σχήμα 26 φαίνεται το φάσμα IR του συμπλόκου **5**. Η σύμπλεξη του διοξυγονωμένου υποκαταστάτη υποδηλώνεται από τις χαρακτηριστικές συχνότητες δόνησης $\nu(\text{P}-\text{O})$: 1132 και 1026 cm^{-1} (οι αντίστοιχες κορυφές στον ελεύθερο υποκαταστάτη βρίσκονται στα 1121 και 1106 cm^{-1}), ενώ η σύμπλεξη του curcuAX133 από τις χαρακτηριστικές συχνότητες που παρατίθενται στον Πίνακα 8 [107]. Επί πλέον, και εδώ παρατηρείται η κορυφή στα 1383 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στα NO_3^- .



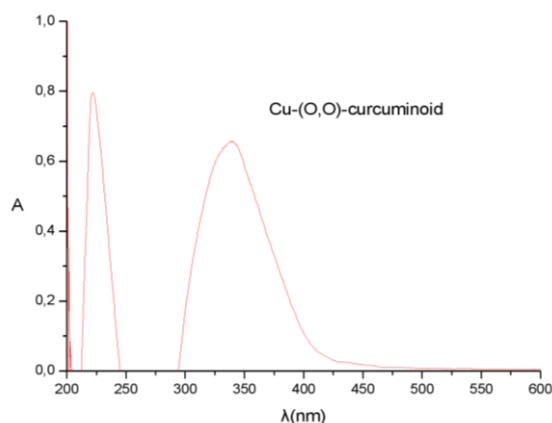
Σχήμα 26: Το φάσμα IR του συμπλόκου **5**.

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR στο φάσμα του συμπλόκου 5 σε σχέση με αυτές του υποκαταστάτη curcuAX133.

Χαρακτηριστικές συχνότητες (cm ⁻¹)		
Υποκ/της curcuAX133	Σύμπλοκο (5)	Απόδοση
1585	1600, 1577	δόνηση τάσης δεσμού C=N
1541, 1510, 1472, 1448, 1430, 959	1544, 1511, 1477	δονήσεις τάσεως C=C αρωματικού δακτυλίου 2- μονοϋποκατεστημένης πυριδίνης
1278	1264	δόνηση τάσης δεσμών φαινολικών C-O
1032	1026	δόνηση τάσης δεσμών μεθόξυ C-O
850, 878, 739	825, 723, 700	δόνηση τάσης δεσμών αρωματικών C-H, 1,2,4-τριϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου
-	418	Δόνηση τάσης δεσμού Cu-N

γ) Φασματοσκοπία UV-vis

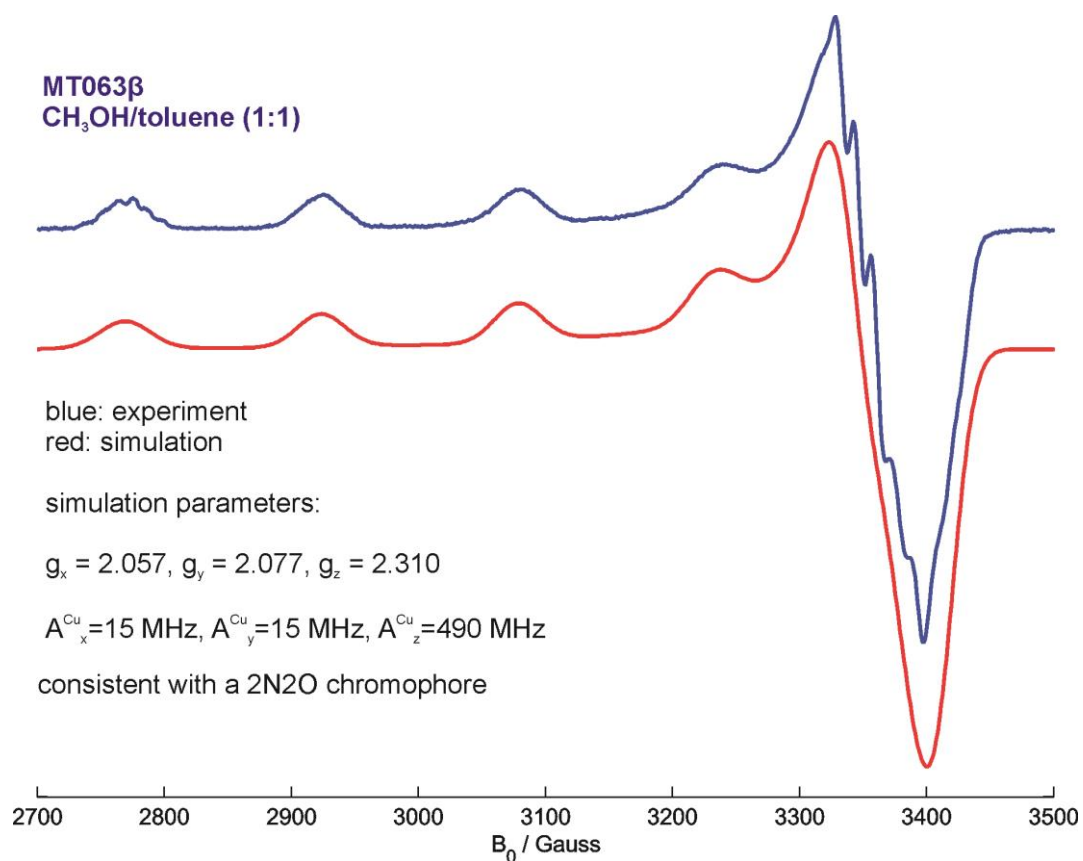
Στο Σχήμα 27 φαίνεται το φάσμα UV-vis του συμπλόκου **5** σε χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξεως του 10⁻⁵ M) σε διαλύτη CH₃OH. Παρατηρείται κορυφή στο μήκος κύματος 222 nm με τιμή μοριακής απορροφητικότητας ε(222) = 180 M⁻¹cm⁻¹ και μία κορυφή στα 339 nm, με ε (339) = 150 M⁻¹cm⁻¹.



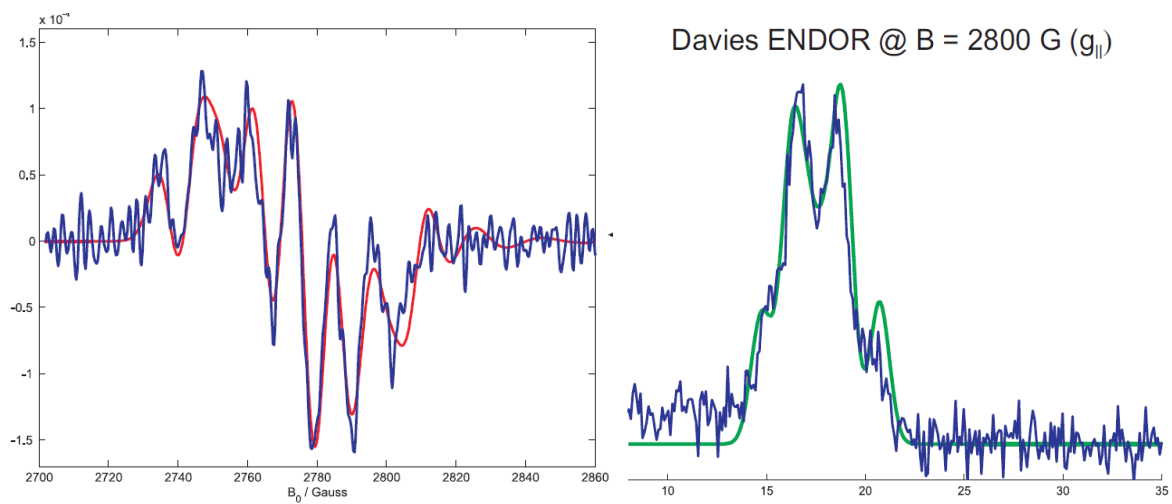
Σχήμα 27: Το φάσμα UV-vis του συμπλόκου 5 σε CH₃OH.

(γ) Φασματοσκοπία EPR

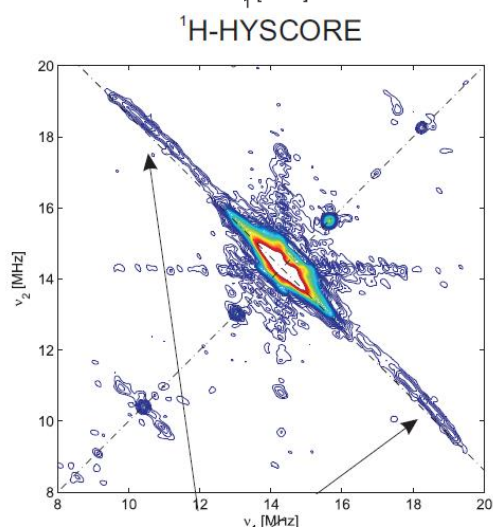
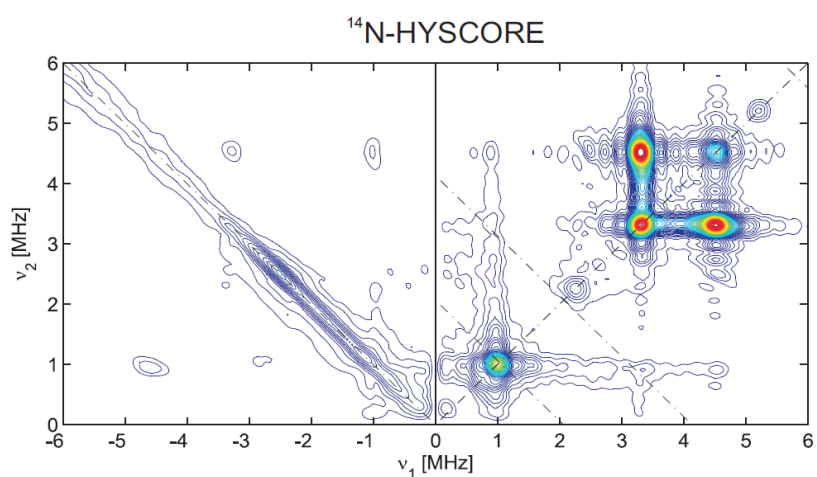
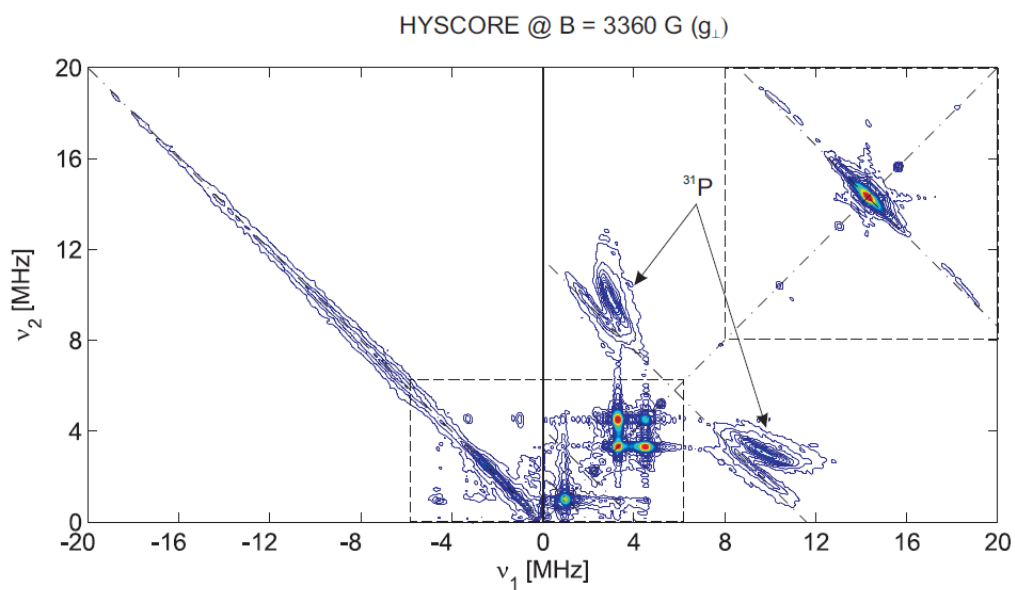
Στα Σχήματα (28-30) που ακολουθούν παρουσιάζονται τα φάσματα cw-EPR (70 K) για το σύμπλοκο **5**. Στο Σχήμα 28 φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις υπέρλεπτης υφής μεταξύ του spin του ηλεκτρονίου και του πυρήνα του Cu ($I = 3/2$). Οι τιμές του παράγοντα g διαφοροποιούνται στις τρεις διευθύνσεις του χώρου με τέτοιο τρόπο, ώστε ένας μοναδικός άξονας να διαφέρει από τους άλλους δύο, $g_x = g_y \neq g_z$, οπότε το σύστημα χαρακτηρίζεται ως *αξονικό*, με $g_{||} > g_{\perp}$ και $A_{||} > A_{\perp}$. Στα φάσματα ENDOR (Σχήμα 29) αποτυπώνονται οι αλληλεπιδράσεις υπερ-υπέρλεπτης υφής του spin του ηλεκτρονίου με γειτονικούς πυρήνες αζώτου ^{14}N , οι οποίοι, όπως προκύπτει από σχετική προσομοίωση, προέρχονται από μη ισοδύναμα άτομα αζώτου. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα ^{14}N -HYSCORE (Σχήμα 30) του εν λόγω συμπλόκου, όπου οι κορυφές αντιστοιχούν σε διπλά κβαντισμένες μεταπτώσεις του πυρήνα ^{14}N με συντελεστή υπέρλεπτης σύζευξης $a_{\text{iso}} = 1.4$ MHz. Η σύζευξη αυτή είναι χαρακτηριστική για άτομα αζώτου που βρίσκονται δύο ή τρεις δεσμούς μακριά από το κέντρο Cu(II), οπότε μπορεί να αποδοθεί στο ενδιάμεσο, μη συμπλεγμένο, άτομο N του κουρκουμινοειδούς υποκαταστάτη (Σχήμα 31, σεσημασμένο με κόκκινο χρώμα). Στο φάσμα ^1H -HYSCORE, οι παρατηρούμενες κορυφές οφείλονται σε υπερ-υπέρλεπτη αλληλεπίδραση του spin του ηλεκτρονίου με τα εγγύτερα άτομα H, εδώ πιθανότατα με το άτομο H του πυριδινικού δακτυλίου (Σχήμα 31, σεσημασμένο με μπλε χρώμα). Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο υποκαταστάτης curcuAX133 συνδέεται με το μεταλλικό κέντρο του Cu(II) δισχιδώς. Επί πλέον, το γεγονός ότι το φάσμα ^{31}P -HYSCORE του συμπλόκου **5** εμφανίζει παρόμοια χαρακτηριστικά με τα αντίστοιχα του συμπλόκου $[\text{Cu}(\text{O},\text{O})_2]$, (ΜΔΕ Άγγελος-Νικόλαος Στάμος, 2015) αποτελεί ένδειξη χηλικής σύμπλεξης του διοξυγονωμένου υποκαταστάτη στο σύμπλοκο **5**.



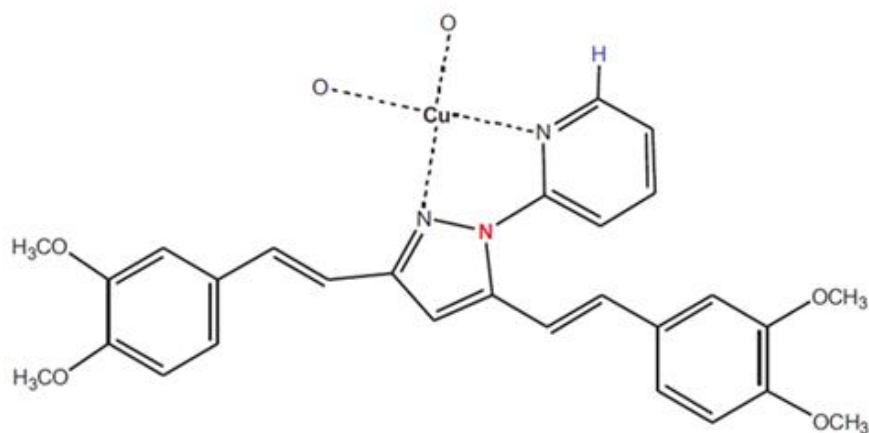
Σχήμα 28: Το φάσμα cw-EPR του συμπλόκου 5 (μπλε γραμμή) και η προσομοίωσή του (κόκκινη γραμμή).



Σχήμα 29: Τα φάσματα ENDOR του συμπλόκου 5 (με μπλε γραμμή) και η προσομοίωσή τους (κόκκινη και πράσινη γραμμή) για δύο μη ισοδύναμα άτομα αζώτου.



Σχήμα 30: Τα φάσματα HYSCORE του συμπλόκου 5.



Σχήμα 31: Προτεινόμενος τρόπος σύμπλεξης στο κέντρο Cu(II) του παραγώγου curcuAX133, όπως προκύπτει από τα φάσματα EPR.

Ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου **5** εξακολουθεί να βρίσκεται υπό διερεύνηση. Επίσης, συνεχίζονται οι προσπάθειες κρυσταλλώσεώς του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ 1 ΜΕ ΤΟ CT-DNA

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου **1** με το DNA πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες μεθόδους: φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis) (Scatchard, καμπύλες θερμικής μετουσίωσης) και κυκλικό διχρωϊσμό.

6.1 Παρασκευή διαλυμάτων

6.1.1 Διαλύματα ct-DNA

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

(i) Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων για το DNA

α) Παρασκευή αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$.

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 KH_2PO_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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, το οποίο έχει $\text{pH} \approx 7$ και μετράται κάθε φορά πριν τη χρήση του.

β) Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10.

Παρασκευάζεται με 1:10 αρραίωση του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$. Δηλαδή, μεταφέρονται 10 mL του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$ σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται με απιονισμένο νερό milli-Q.

γ) 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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$ και το υπόλοιπο συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό milli-Q.

(ii) Παρασκευή διαλύματος DNA και υπολογισμός της συγκέντρωσής του.

(α) 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, τυλίγεται σε αλουμινόχαρτο για την προστασία από το ηλιακό φως και αφήνεται στο σκοτάδι για μία νύκτα υπό ήπια ανάδευση.

(β) 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. Για τη γραμμή βάσης (baseline) 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 $\epsilon = 6,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και μετρώντας την απορρόφηση υπολογίζεται κάθε φορά η συγκέντρωση του διαλύματος DNA.

6.1.2 Διαλύματα για φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του **1** με το DNA παρασκευάζεται μία σειρά 12 μεθανολικών διαλυμάτων του **1**, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του **1** και ίση με 16,3 μM , και μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του DNA έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R = [\text{DNA}]/\text{σύμπλοκο } \mathbf{1}$, $R = 0\text{--}10,6$). Τα διαλύματα αυτά παραμένουν για επώαση επί 24 h. Στα διαλύματα αυτά, λαμβάνονται φάσματα UV-vis, από 600–200 nm, σε θερμοκρασία 25 °C.

6.1.3 Διαλύματα για φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των Σημείων Τήξεως (T_m)

Παρασκευάζεται μία σειρά διαλυμάτων **1**-DNA στην οποία η τελική συγκέντρωση του DNA παραμένει σταθερή και ίση με 100 μM σε τελικό όγκο 8 mL και μεταβάλλεται η συγκέντρωση του **1**, έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R = [\text{σύμπλοκο } \mathbf{1}]/[\text{DNA}]$, $R = 0\text{--}0,47$). Σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε τελικά η ποσότητα [μεθανολικό διάλυμα **1** + μεθανόλη] να παραμένει σταθερό και ίσο με 2% v/v. Τα διαλύματα αφήνονται για επώαση 24 h στους 25 °C. Οι μετρήσεις της απορρόφησης γίνονται σε μήκος κύματος 260 nm και σε εύρος θερμοκρασιών 25 έως 95 °C, όπου ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας είναι 0,5 °C/min.

6.1.4 Διαλύματα για φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

Για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής παρασκευάζεται μία σειρά διαλυμάτων (**1**-DNA) σταθερής συγκέντρωσης DNA και ίσης με 51,8 μM . Οι τελικές συγκεντρώσεις του **1** ποικίλλουν (1,63 μM – 24,5 μM) ανάλογα με τον επιθυμητό λόγο R ($R = [\text{σύμπλοκο } 1]/[\text{DNA}]$). Σε όλα τα διαλύματα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε τελικά η ποσότητα [μεθανολικό διάλυμα συμπλόκου **1** + μεθανόλη] να παραμένει σταθερό και ίσο με 2 % v/v. Τα διαλύματα αυτά αφήνονται για επώαση 24 h. Το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού λαμβάνεται σε περιοχή 600-200 nm, στους 25 °C.

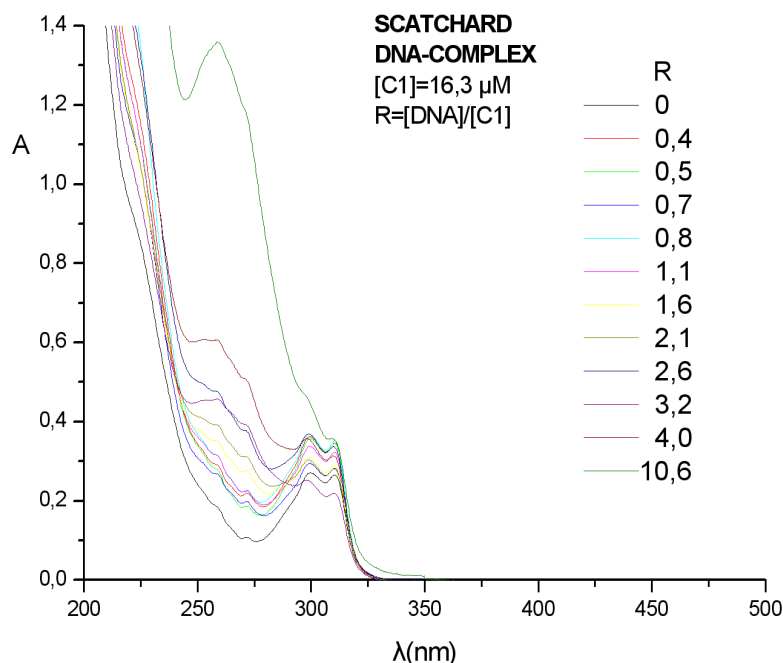
6.1.5 Διαλύματα για Ιξωδομετρία

Για να υπολογιστεί το ιξώδες του DNA παρουσία του συμπλόκου **1** παρασκευάστηκε μία σειρά διαλυμάτων (DNA- σύμπλοκο **1**) σταθερής τελικής συγκέντρωσης DNA ίσης με 10 μM , και μεταβαλλόμενης τελικής συγκέντρωσης του συμπλόκου **1** σε κάθε διάλυμα έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R = [\text{σύμπλοκο } 1]/[\text{DNA}]$, $R = 0-0,25$). Σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε τελικά η ποσότητα [μεθανολικό διάλυμα συμπλόκου **1** + μεθανόλη] να παραμένει σταθερή και ίση με 2% v/v. Τα διαλύματα αυτά παρέμειναν για επώαση 24 h και μετά πραγματοποιήθηκε το πείραμα ιξωδομετρίας.

6.2 Ανάλυση με φασματοσκοπία UV-Vis

6.2.1 Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση του συμπλόκου C1

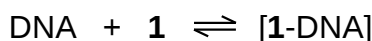
Μία από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μιας ένωσης με το DNA είναι η φασματοσκοπία UV-vis [74-79]. Συγκεκριμένα, εφαρμόζοντας τη μέθοδο Scatchard, εξετάζουμε αν υπάρχει οποιαδήποτε αλληλεπίδραση του συμπλόκου **1** με το DNA και υπολογίζοντας τη σταθερά σύνδεσης της ένωσης με το DNA (K_b) μέσω φασμάτων UV-vis, μπορούμε να καταλάβουμε πόσο ισχυρή είναι αυτή η αλληλεπίδραση (Σχήμα 32).



Σχήμα 32: Φάσματα UV-vis συμπλόκου 1-DNA.

Όπως γίνεται φανερό από το φάσμα UV-vis του συστήματος **1**-DNA (Σχήμα 28) η ένταση της ταινίας απορρόφησης στα ~310 nm παρουσιάζει μια συνεχή αύξηση όσο προστίθεται ποσότητα DNA για μικρούς λόγους R ($R=[\text{DNA}]/[\mathbf{1}]$), ενώ για μεγάλους λόγους παρατηρείται μείωση της έντασής της (υποχρωμισμός).

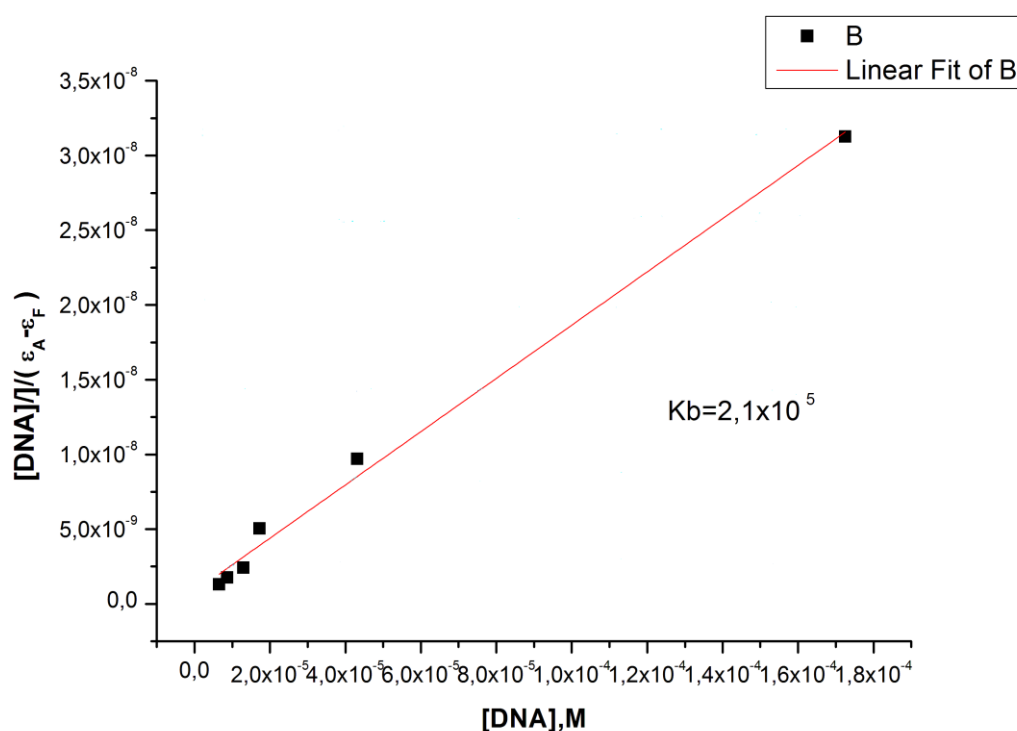
Από τα φάσματα του Σχήματος 28 μπορεί να υπολογισθεί η σταθερά σύνδεσης K_b του συμπλόκου **1** με το DNA, που αντιστοιχούν στις ισορροπίες:



Χρησιμοποιώντας τη σχέση:

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_A - \varepsilon_F)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_B - \varepsilon_F)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_B - \varepsilon_F)} \quad (6.1)$$

όπου ε_F , ε_B και ε_A είναι οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος του μη δεσμευμένου (ελεύθερου) συμπλόκου **1**, του δεσμευμένου με το DNA και του διαλύματος που περιέχει το μείγμα τους. Στο Σχήμα 33 παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου $[\text{DNA}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_F)$ σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του $[\text{DNA}]$ στα 310 nm για το **1**.



Σχήμα 33: Διάγραμμα μεταβολής του λόγου $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση $[DNA]$ στο σύστημα 1-DNA.

Από το διάγραμμα του Σχήματος 33 και με χρήση της Εξίσωσης (6.1) προκύπτει ότι για το σύστημα DNA- σύμπλοκο **1**, η K_b είναι ίση με $2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Η ισχυρή σταθερά σύνδεσης υποδηλώνει ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής (intercalation), καθώς όταν πρόκειται για αλληλεπίδραση ηλεκτροστατική ή μέσω της μικρής αύλακας του DNA η K_b είναι μικρότερη από 10^4 M^{-1} .

6.2.2 Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης (T_m)

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου **1** με το DNA πραγματοποιήθηκε και με τη βοήθεια των καμπυλών θερμικής μετουσίωσης [75]. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις καμπύλες θερμικής μετουσίωσης (Παράρτημα Ι) συνοψίζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Τα Σημεία Τήξεως (T_m), τα ΔT_m και η % h_r στα 258 nm σε διάφορους λόγους R για το σύμπλοκο **1**.

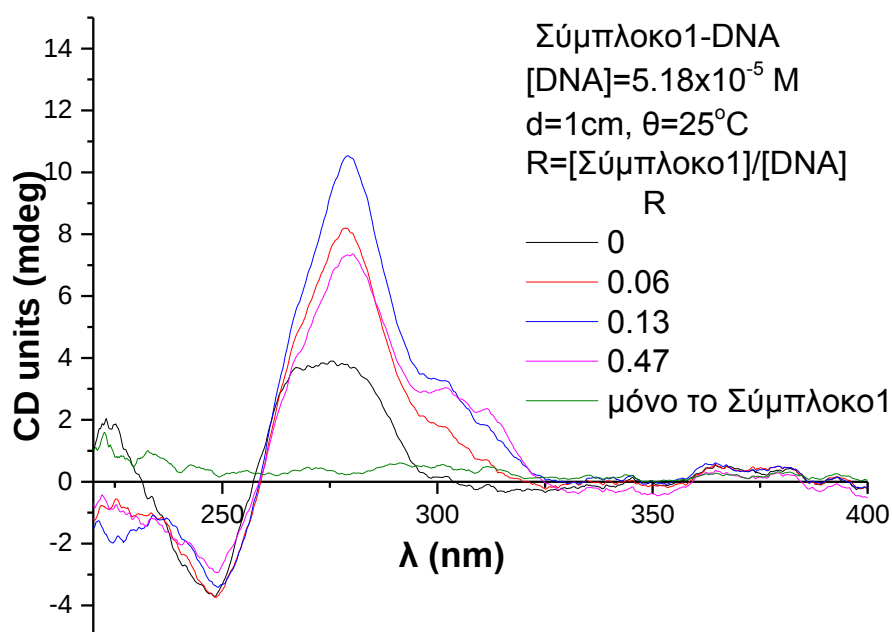
$R=[\text{Σύμπλοκο1}]/[\text{DNA}]$	T_m	ΔT_m	% h_r	Εύρος θερμοκρασιών Καμπυλών T_m , °C
0	67,01	0	29,00	22,61
0,10	69,09	2,08	26,60	32,21
0,47	74,00	6,9	17,60	20,00

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 9, το σημείο τήξης του DNA παρουσιάζει θεαματική αύξηση και το ΔT_m φτάνει τους 17,6 °C. Οι μεγάλες αυτές διαφορές οφείλονται στην ισχυρή σταθεροποίηση του DNA από το σύμπλοκο **1**, λόγω παρεμβολής ή αλληλεπίδρασής του με τη μικρή αύλακα του DNA, ενώ αποκλείεται η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή το εξωτερικό στοίβαγμα.

Επί πλέον παρατηρείται μείωση της υπερχρωμικότητας του DNA καθώς γίνεται προσθήκη διαλύματος του συμπλόκου **1**, ώστε 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). Στο δικό μας υπό μελέτη σύστημα, DNA-σύμπλοκο **1**, η αλληλεπίδραση μεταξύ των βάσεων εξασθενεί κατά την αλληλεπίδραση του DNA με το σύμπλοκο **1**, και αυτό γίνεται φανερό από τη μείωση της % υπερχρωμικότητας.

6.3 Ανάλυση με Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού (Circular Dichroism, CD)

Ο κυκλικός διχρωϊσμός αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές τεχνικές για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης χημικών ενώσεων με το DNA [78].



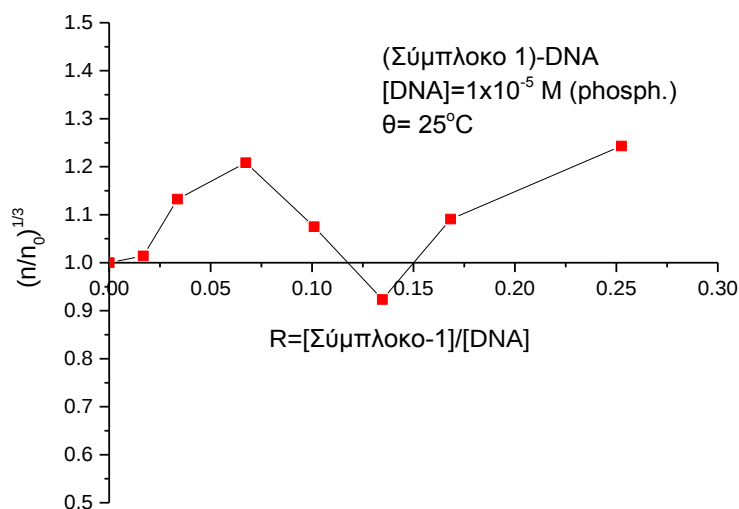
Σχήμα 34: Τα φάσματα CD για το σύστημα «σύμπλοκο 1-DNA».

Όπως παρατηρείται στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του διαλύματος που περιέχει μόνο το DNA, εμφανίζονται μόνο δύο κορυφές, μία θετική με μέγιστο στα 275 nm και μία αρνητική με ελάχιστο στα 245 nm. Το φάσμα λοιπόν αυτό είναι χαρακτηριστικό του DNA που υιοθετεί τη B-μορφή. Παρότι το σύμπλοκο **1** είναι οπτικώς ανενεργό (Σχήμα 34, πράσινη γραμμή), τελικά παρατηρείται διχρωϊκό σήμα, λόγω του φαινομένου εξ' επαγωγής κυκλικού διχρωϊσμού (Induced Circular Dichroism, ICD) και οφείλεται στο ότι το αρχικά μη χειρόμορφο σύμπλοκο **1** συνδέεται τελικά με το DNA. Παρουσία λοιπόν του συμπλόκου παρατηρούμε ότι η μορφή του φάσματος του DNA μεταβάλλεται. Η κορυφή στα 243 nm (αρνητικό Cotton), που σχετίζεται με την ελικότητα του DNA, παρουσιάζει μια μικρή μείωση στην έντασή της. Η κορυφή στα 280 nm (θετικό Cotton), η οποία σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζευγών βάσεων της διπλής έλικας του DNA, παρουσιάζει θεαματική αύξηση και ίσως οφείλεται στην αλληλεπίδραση των βάσεων του DNA με τα επίπεδα μέρη του υποκαταστάτη της 2,2'-διπυριδίνης. Επί πλέον εμφανίζονται οι κορυφές στα 300 και 310 nm, όπως συμβαίνει και στα φάσματα UV-vis του συμπλόκου **1**, οι οποίες πιθανότατα οφείλονται σε μεταπτώσεις μεταφοράς

φορτίου. Η εμφάνιση ICD αποτελεί μια σημαντική ένδειξη της εισαγωγής του μορίου στο DNA, αποκλείοντας έτσι ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή εξωτερικό στοίβαγμα.

6.4 Ιξωδομετρία (viscosity)

Άλλη μια τεχνική που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου **1** με το DNA είναι η ιξωδομετρία [104-106]. Το ιξώδες για το υπό μελέτη σύστημα (σύμπλοκο 1-DNA) παρουσιάζεται στο Σχήμα 35.



Σχήμα 35: Διάγραμμα ιξωδομετρίας για τη σειρά: DNA-Σύμπλοκο 1.

Στο Σχήμα 35 φαίνεται η σταδιακή αύξηση του ιξώδους του DNA κατά την προσθήκη διαλύματος του συμπλόκου **1**. Η αύξηση αυτή του ιξώδους υποδηλώνει την αύξηση του περιμετρικού μήκους του DNA κατά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου **1** με αυτό και πιθανότατα οφείλεται στην αλληλεπίδραση με το DNA μέσω παρεμβολής. Η παρατηρούμενη μείωση του ιξώδους πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το σύμπλοκο **1** προκαλεί κάμψη του DNA κατά την αλληλεπίδρασή του με αυτό. Αξιοσημείωτη είναι και η αύξηση του ιξώδους σε μεγάλους λόγους R, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι ίσως πρόκειται για παρεμβολή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ 1 ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ MCF-7

Μετά τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό, και τη μελέτη της αλληλεπίδρασής του με το CT-DNA, το σύμπλοκο **1**, διερευνήθηκε και ως προς την κυτταροτοξικότητά του στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 (καρκίνος του μαστού), ακολουθώντας τη δοκιμασία MTT και την ανάλυση FACS, αντιστοίχως.

7.1 Κυτταρικές καλλιέργειες

Σε μια κυτταρική καλλιέργεια, τα ευκαρυωτικά ή προκαρυωτικά κύτταρα αναπτύσσονται υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά MCF-7, που προέρχεται από καρκινικά κύτταρα του μαστού. Όλες οι εργασίες γίνονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με υπεριώδη (UV) λάμπα και φίλτρα αέρα, ώστε οι συνθήκες εργασίας να είναι άσηπτες. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C στον επωαστικό κλίβανο σε κορεσμένες συνθήκες εργασίας και παρουσία CO₂ 5%.

α) Απόψυξη κυτταρικής σειράς

Η κυτταρική σειρά MCF-7 παραλαμβάνεται υπό συνθήκες βαθιάς ψύξης (υγρό άζωτο - 196 °C, 10⁷ κύτταρα/mL διαλύματος ψύξης σε ειδικά κρυάντοχα σωληνάκια ψύξης κυττάρων των 2 mL). Τα σωληνάκια μεταφέρονται αμέσως από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Αμέσως μετά την απόψυξη, τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάκια φυγοκέντρωσης που έχουν εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό προθερμασμένο στους 37 °C. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 10 min στα 500g σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 10 mL εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού. Τέλος το επαναιώρημα μεταφέρεται σε φιάλες καλλιέργειας και τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο.

β) Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα της σειράς MCF-7 καλλιεργούνται με εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό D-MEM στον επωαστικό κλίβανο στους 37 °C παρουσία CO₂ 5 % και κορεσμένες συνθήκες υγρασίας. Κάθε δυο-τρεις ημέρες πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια.

γ) Ανακαλλιέργεια

Όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80-90 % της επιφάνειας της φιάλης στο οποίο καλλιεργούνται, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια. Ο προσδιορισμός του ποσοστού κάλυψης γίνεται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αφαιρείται το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα θρυψίνης/EDTA. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται τυχόν ίχνη ορού τα οποία περιέχουν αναστολείς της θρυψίνης. Προστίθενται 2 mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA ανά φιάλη και τα κύτταρα επωάζονται στον επωαστικό κλίβανο για περίπου 3-5 min. Η πορεία αποκόλλησης των κυττάρων παρακολουθείται στο μικροσκόπιο. Μετά την ολοκλήρωση της αποκόλλησης των κυττάρων παρακολουθείται το αιώρημα αυτών, χωρίζεται σε 3-4 φιάλες και προστίθενται 10 mL εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού.

δ) Ψύξη κυττάρων

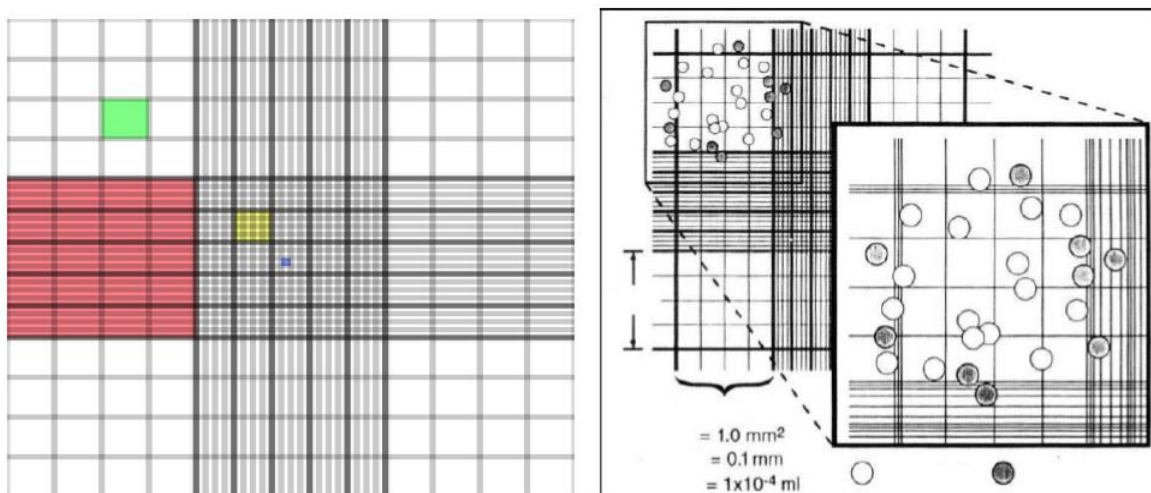
Η διατήρηση κάθε κυτταρικής σειράς για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι δυνατή με την αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο. Η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται βαθμιαία ως εξής: Κύτταρα που βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης αποκολλούνται από τη φιάλη, όπως περιγράφεται στην ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωλήνα φυγοκέντρωσης, όπου φυγοκεντρούνται για 10 min στα 500g. Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρωση, αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 1 mL διαλύματος ψύξης και μεταφορά σε ειδικά σωληνάρια ψύξης. Τα σωληνάρια τοποθετούνται διαδοχικά στους -4 °C για 1 h, στους -20 °C για 4 h, στους -70°C για 12 h και τέλος μεταφέρονται στο υγρό άζωτο.

ε) Μέτρηση κυττάρων σε εναιώρημα με αιματοκυττόμετρο

Είναι μια άμεση κι εύκολη μέθοδος προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων σε εναιώρημα γνωστού όγκου. Το αιματοκυττόμετρο (Εικόνα 27) είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δυο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες. Η κάθε επιφάνεια αποτελείται από εννέα μεγάλα τετράγωνα σε μορφή πλέγματος. Κάθε ένα από τα τέσσερα τετράγωνο στις γωνίες χωρίζεται σε 16 μικρότερα τετράγωνα. Το κάθε μεγάλο τετράγωνο έχει επιφάνεια 1 mm², έτσι ώστε όταν καλύπτεται με καλυπτρίδα ο όγκος του υγρού σε κάθε τετράγωνο να είναι 10⁻⁴ mL. Γνωρίζοντας τον όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος και μετρώντας τα κύτταρα σε ένα τετράγωνο, μπορεί να προσδιορισθεί ο αριθμός και η συγκέντρωσή τους. Τοποθετείται η καλυπτρίδα στο

αιματοκυττόμετρο και με πιπέτα Pasteur τοποθετούνται 10 μL από το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας, έτσι ώστε να καλυφθεί κατάλληλα επεξεργασμένη επιφάνεια λόγω του τριχοειδούς φαινομένου. Μετρώνται στο οπτικό μικροσκόπιο, τα κύτταρα στα τέσσερα ακριανά τετράγωνα. Ο αριθμός των κυττάρων ανά mL αρχικού εναιωρήματος δίνεται από τον τύπο:

Αριθμός κυττάρων / mL αρχικού εναιωρήματος = Μέσος όρος των τεσσάρων τετραγώνων $\times 10^4$ κύτταρα / mL αρχικού εναιωρήματος.



Εικόνα 25: Αιματοκυττόμετρο. Δεξιά, σε μεγέθυνση, φαίνεται η περιοχή μέτρησης των κυττάρων.

7.2 Μεθοδολογία δοκιμασίας MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium)

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας του συμπλόκου **1** και των υποκαταστατών, 2,2'-διπυριδίνης και δι-οξυγονωμένου υποκαταστάτη, $(\text{OPPh}_2)_2\text{NH}$ πραγματοποιούνται τρία ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα και το κάθε δείγμα τοποθετείται εις τετραπλούν. Σε κάθε ένα από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα ακολουθείται η εξής μεθοδολογία:

(α) 1^η ημέρα: Καλλιέργεια κυττάρων.

Την πρώτη ημέρα, σπέρνονται ~ 400000 κύτταρα/100 μL καλλιεργητικού υλικού σε κάθε φρεάτιο ενός πλακιδίου κυτταροκαλλιιεργειών 96 φρεατίων. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h στους 37 °C.

(β) 2^η ημέρα: Προσθήκη διαλυμάτων των ενώσεων.

Την δεύτερη ημέρα, αρχικά παρασκευάζονται τα διαλύματα του συμπλόκου **1**, των υποκαταστατών 2,2'-διπυριδίνης και δι-οξυγονωμένου υποκαταστάτη $(\text{OPPh}_2)_2\text{NH}$, καθώς και μείγματος των δύο τελευταίων σε αναλογία 1:1, ως εξής: όλες οι ενώσεις

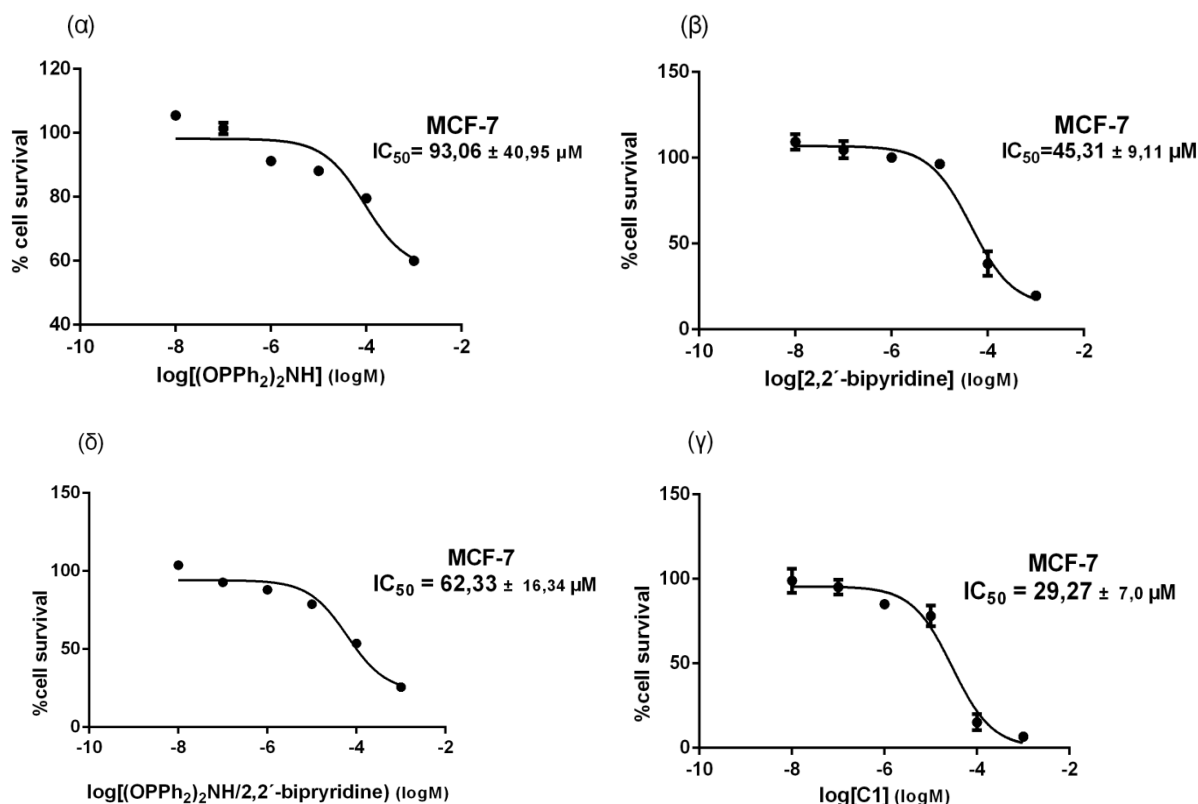
αρχικά διαλύονται σε μεθανόλη, οπότε προκύπτουν διαλύματα συγκέντρωσης 10 mM και στη συνέχεια σε απεσταγμένο νερό προς τελικό όγκο 1 mL και συγκέντρωση 1 mM. Με κατάλληλες αραιώσεις των τελευταίων διαλυμάτων στο θρεπτικό υλικό DMEM προκύπτουν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις διαλυμάτων με εύρος από 100 μ M - 10 nM. Στη συνέχεια, αφαιρείται η ποσότητα του παλιού θρεπτικού υλικού των κυττάρων από κάθε φρεάτιο και προστίθενται 100 μ L από κάθε ένα από τα 20 διαλύματα, που προηγουμένως έχουν παρασκευασθεί, και το κάθε διάλυμα εις τετραπλούν. Ως δείγμα αναφοράς (control), προστίθενται 100 μ L καθαρού θρεπτικού υλικού (1 mg / mL στο θρεπτικό υλικό DMEM). Τα πλακίδια τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο στους 37 $^{\circ}$ C.

(γ) 3^η ημέρα: Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων.

Μετά από 72 h επώασης, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται 100 μ L διαλύματος MTT (1 mg / mL στο θρεπτικό υλικό DMEM) σε κάθε φρεάτιο. Τα κύτταρα επωάζονται με το διάλυμα αυτό για 4 h, οπότε κατά τη διάρκεια της επώασης σχηματίζονται μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης. Μετά το πέρας των 4 h, αφαιρείται το διάλυμα MTT και προστίθενται 100 μ L ισοπροπανόλης σε κάθε φρεάτιο, προκειμένου να διαλυθούν οι σχηματιζόμενοι μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης. Έπειτα από καλή ανάδευση του πλακιδίου, αφού βεβαιωθούμε για τη διάλυση των κρυστάλλων, μετράται η απορρόφηση του διαλύματος σε κάθε φρεάτιο με φασματοφωτόμετρο ELISA READER σε μήκος κύματος 540 nm.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη βοήθεια του προγράμματος PRISM. Στο Σχήμα 35 παρουσιάζονται οι καμπύλες κυτταρικής επιβίωσης που προκύπτουν από την επίδραση των ενώσεων στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7. Στον άξονα των y αντιστοιχούν οι τιμές του ποσοστού κυτταρικής επιβίωσης, όπως υπολογίζονται με βάση τις τιμές απορρόφησης του προτύπου (control), ενώ στον άξονα των x αντιστοιχούν οι τιμές του λογαρίθμου της συγκέντρωσης (σε μ M) του κάθε δείγματος. Η τιμή IC₅₀ είναι η συγκέντρωση στην οποία μειώνεται κατά 50 % η τιμή της απορρόφησης.

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ για την κυτταρική σειρά MCF-7, έτσι όπως προκύπτουν από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Καθεμία από αυτές τις τιμές αντιστοιχεί στη μέση τιμή IC₅₀ (μ M) $\pm$ την τυπική απόκλιση.



Σχήμα 36: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας (α) του δι-οξυγονωμένου υποκαταστάτη ($OPPh_2NH$), (β) της 2,2'-διπυριδίνης, (γ) του συμπλόκου 1 και (δ) του μείγματος ($OPPh_2NH$) / 2,2'-διπυριδίνης (σε αναλογία 1:1), μετά την επίδρασή τους στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7.

Πίνακας 10: Τιμές IC_{50} (μM)

Παράγωγα	MCF-7
(Υποκαταστάτης 1) = $OPPh_2NH$	$93,06 \pm 40,95$
(Υποκαταστάτης 2) = 2,2'-διπυριδίνη	$45,31 \pm 9,11$
(Σύμπλοκο) 1	$29,27 \pm 7,00$
(Υπ/της 1) / (Υπ/της 2) (1:1)	$62,33 \pm 16,34$

Από τα στοιχεία του Πίνακα 10 φαίνεται ότι η τιμή του IC_{50} που αποδίδεται στο σύμπλοκο **1** είναι χαμηλότερη σε σχέση με των άλλων παραγώγων, επειδή η ένωση είναι πιο τοξική στα καρκινικά κύτταρα του μαστού της σειράς MCF-7. Επίσης τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε δείγμα 2,2'-διπυριδίνης εμφανίζουν αισθητή μείωση της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας, αντίθετα από ό,τι συμβαίνει στα κύτταρα με δι-οξυγονωμένο υποκαταστάτη και στα κύτταρα με μείγμα αυτού με διπυριδίνη. Στις δύο τελευταίες περιπτώσεις, οι τιμές των αποκλίσεων στις τιμές του IC_{50} είναι μεγάλες, γεγονός που οφείλεται στο ότι ο δι-οξυγονωμένος υποκαταστάτης δεν είναι καθόλου διαλυτός στο νερό, οπότε τα αντίστοιχα δείγματα που παρασκευάστηκαν δεν είχαν ομοιόμορφη σύσταση, εξού και η διαφορετική επίδραση στα κύτταρα. Από τα παραπάνω βιολογικά πειράματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η τοξική δράση του συμπλόκου ίσως να οφείλεται στο μόριο 2,2'-διπυριδίνης που συμπλέκεται στο κέντρο $Cu(II)$ στο σύμπλοκο **1**.

7.3 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής (FACS)

Η τοξικότητα του συμπλόκου **1** και της 2,2'-διπυριδίνης στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 διερευνάται περαιτέρω με ανάλυση FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter). Με τη μέθοδο αυτή αναλύεται ο πληθυσμός των κυττάρων, τα οποία διαχωρίζονται, λόγω του εκπεμπόμενου φθορισμού και της σκέδασης του φωτός, ανάλογα με το σχήμα και την ποσότητα DNA που φέρει το καθένα. Η ποσότητα του DNA (2N, 4N ή ενδιάμεση) είναι χαρακτηριστική της φάσης του κυτταρικού κύκλου (G1, G2 ή S), οπότε κατά την ανάλυση του φθορισμού των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής προκύπτει το ποσοστό αυτών στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Η μεθοδολογία που ακολουθείται είναι η εξής:

(α) Προετοιμασία των δειγμάτων & μονιμοποίηση κυττάρων

Την πρώτη ημέρα, καλλιεργούνται ~133000, ~88000 και ~44000 κύτταρα/φρεάτιο σε τρία πλακίδια των έξι φρεατίων, αντιστοίχως. Την δεύτερη ημέρα, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται τα διαλύματα του συμπλόκου **1** και της 2,2'-διπυριδίνης σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές των IC_{50} (45,31 μM και 29,27 μM , αντιστοίχως) εις διπλούν σε κάθε πλακίδιο, ενώ σε δύο φρεάτια προστίθεται καθαρό θρεπτικό υλικό (control). Τα κύτταρα επωάζονται για 24, 48 και 72 h στο κάθε πλακίδιο- γι' αυτό και διαφέρει ο αρχικός πληθυσμός των κυττάρων- κι ελέγχονται τακτικά. Μετά την πάροδο του κατάλληλου χρονικού διαστήματος, συλλέγεται το υπερκείμενο από κάθε φρεάτιο,

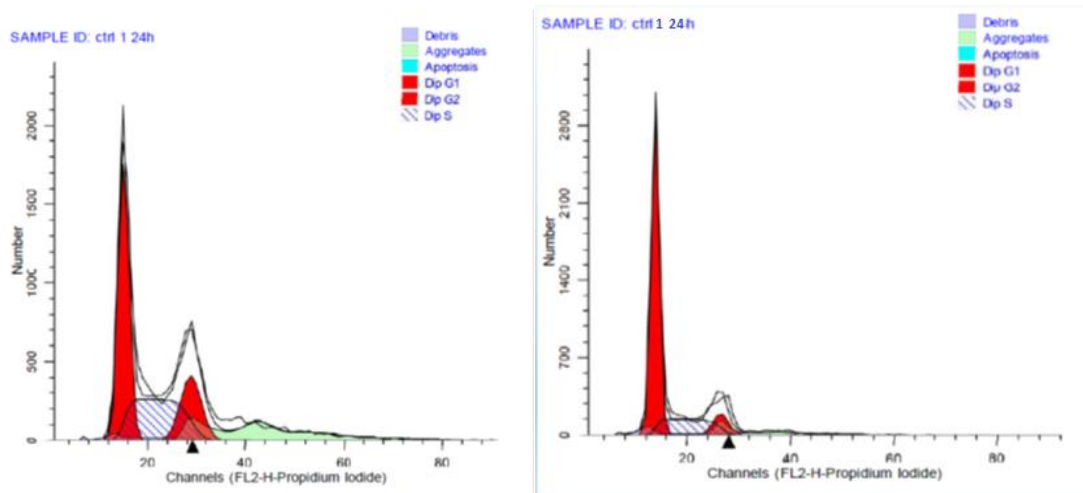
μεταφέρεται σε ειδικά σωληνάκια (falcon, 14 mL), τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS, προστίθεται σε αυτά διάλυμα θρυψίνης και το όλον μεταφέρεται στα σωληνάκια με το υπερκείμενο. Σε κάθε σωληνάκι, το μείγμα που προκύπτει φυγοκεντρείται στα 1100 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, τα κύτταρα ξεπλένονται εκ νέου με 5 mL PBS και το μείγμα φυγοκεντρείται ξανά στα 1100 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται με 1 mL PBS. Υπό έντονη ανάδευση, προστίθεται 1 mL κρύας αιθανόλης (absolute, 100%) για μονιμοποίηση της κατάστασης των κυττάρων και ανάλυσή τους σε μεταγενέστερο χρόνο. Τα δείγματα διατηρούνται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4 °C.

(β) Ανάλυση FACS

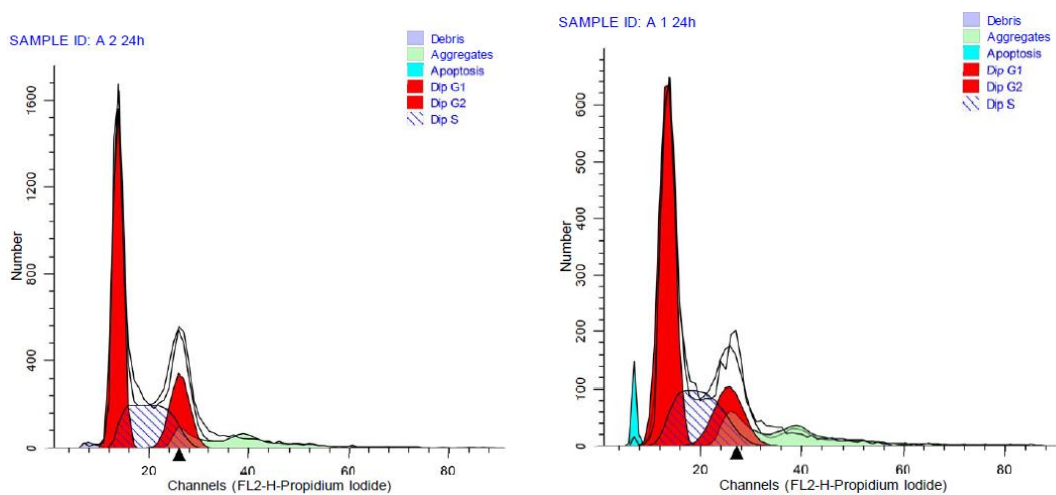
Μετά την πάροδο μίας εβδομάδας, τα δείγματα μεταφέρονται στο «Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης» του ερευνητικού κέντρου Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», όπου πραγματοποιούνται οι μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό των ποσοστών των φάσεων G1, G2/M και S, υπό την επίβλεψη του Ερευνητή κ. Χάρη Πρατσίνη. Για την ανίχνευση της ποσότητας του DNA, πραγματοποιείται προηγουμένως χρώση με Propidium Iodide (PI), σύμφωνα με το *πρωτόκολλο χρώσης κυττάρων*: (i) φυγοκέντρηση δειγμάτων στους 4 °C για 1 min, (ii) απόρριψη υπερκειμένου με πιπέτα Pasteur υπό κενό, (iii) προσθήκη 0,5 mL διαλύματος χρώσης PI [Propidium Iodide (4 mg / mL σε DMSO), Tris·HCl (pH 7.5, 1 M), MgCl₂ (1 M), RNase A (10 mg / mL)] και (iv) φύλαξη των δειγμάτων στο ψυγείο υπό έρεβος για 30 min.

Στη συνέχεια, τα δείγματα εισάγονται, το κάθε ένα ξεχωριστά, σε ειδικό υποδοχέα στη συσκευή FACS και πραγματοποιούνται οι μετρήσεις. Οι διαφορετικές κατανομές των κυττάρων της σειράς MCF-7 στις φάσεις G1, G2/M και S του κυτταρικού κύκλου φαίνονται στα ιστογράμματα που προκύπτουν (Σχήματα 36-38, 40-42, 44-46).

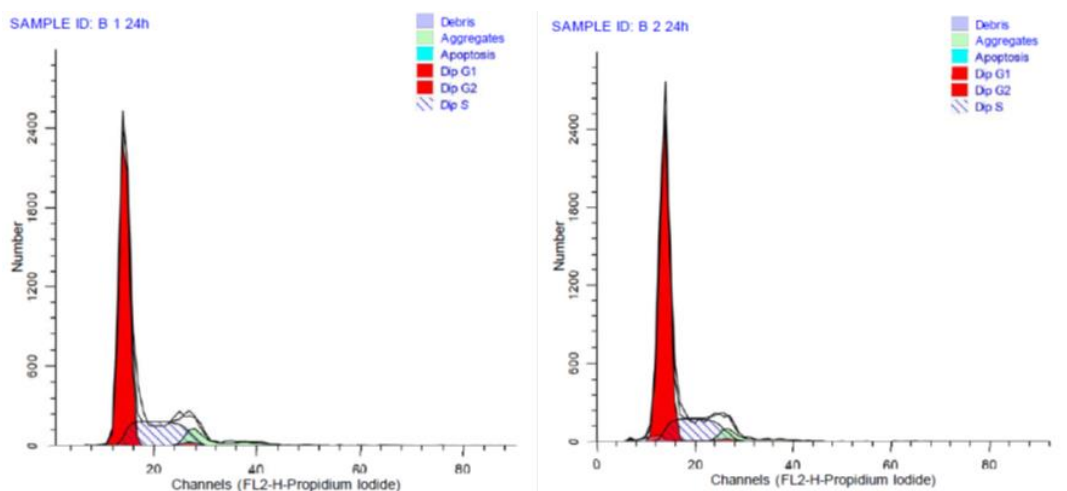
(A) Επώαση για 24 h



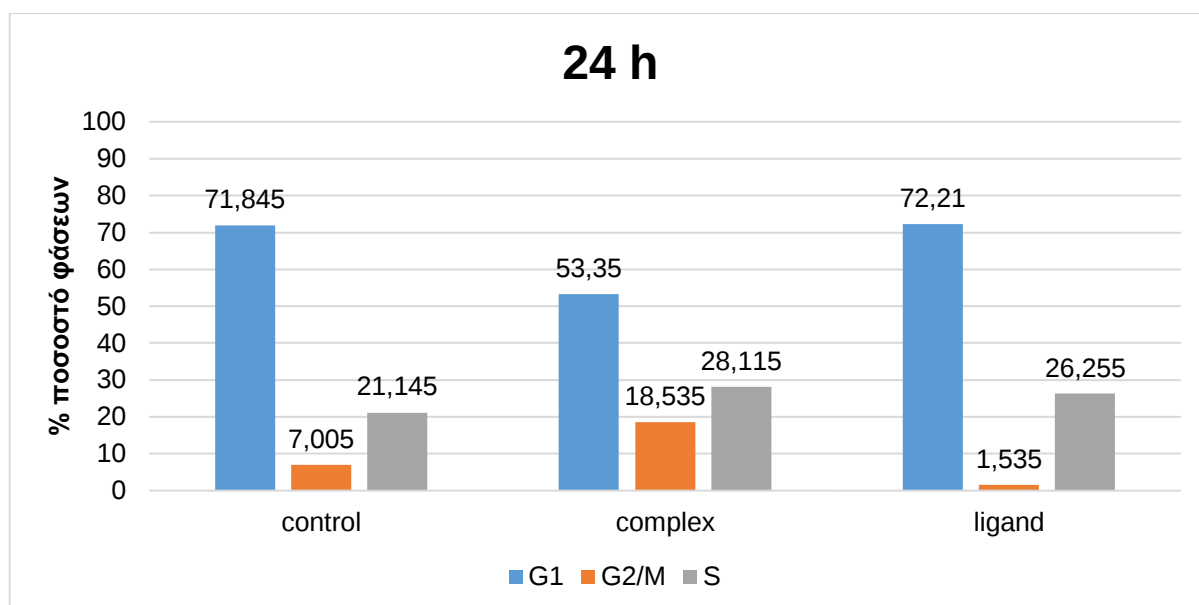
Σχήμα 37: Control στις 24 h.



Σχήμα 38: Σύμπλοκο 1 στις 24 h.



Σχήμα 39: Υποκαταστάτης 2,2'-διπυριδίνη στις 24 h.

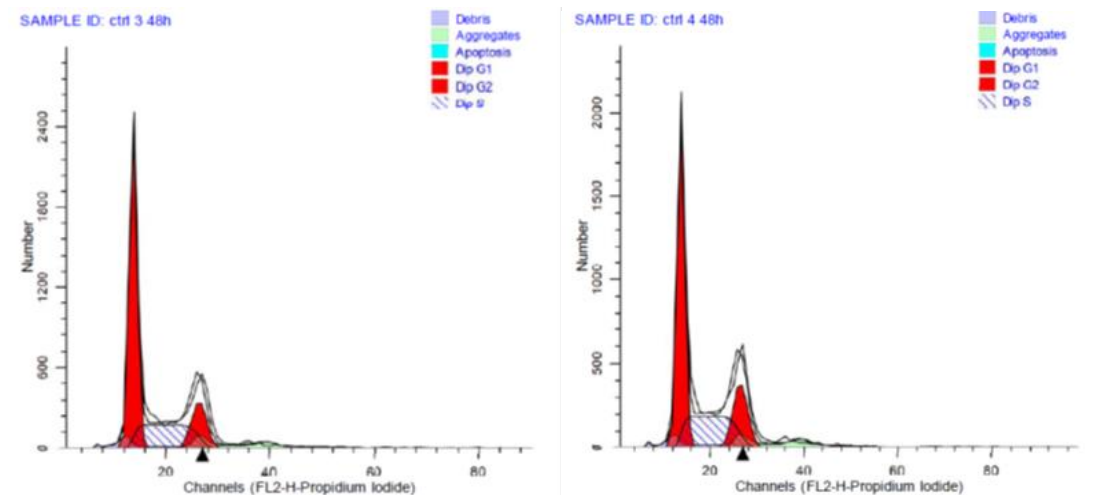


Σχήμα 40: Διάγραμμα του % ποσοστού των φάσεων G1, G2 και S του κυτταρικού κύκλου μετά από 24 ώρες επώασης με τα παράγωγα [complex: 1, ligand: 2,2'-bipyridine].

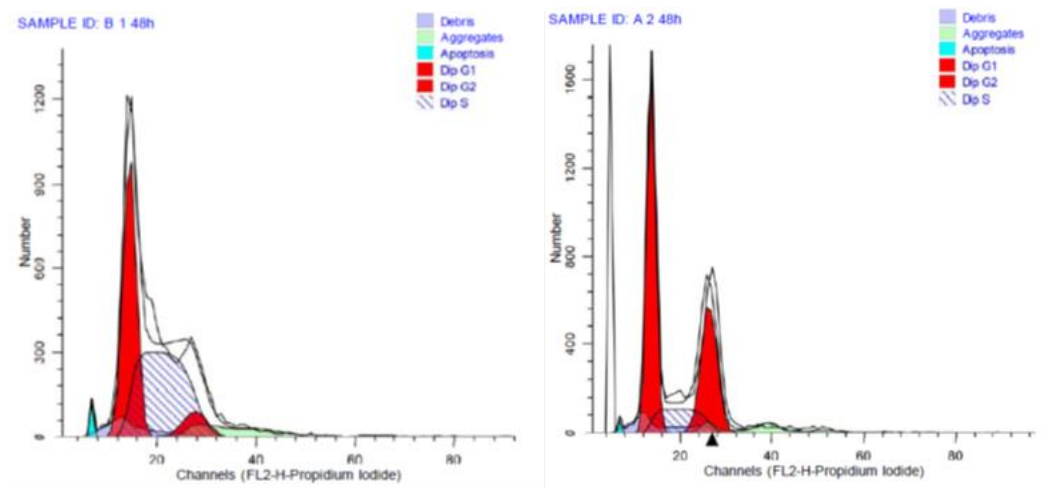
Σε σχέση με το πρότυπο, παρατηρείται:

- ✓ αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στο σημείο μετάβασης G2/M του κυτταρικού κύκλου, μετά από τη δράση του συμπλόκου για 24 h και
- ✓ αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, μετά από τη δράση του συμπλόκου και του υποκαταστάτη για 24 h.

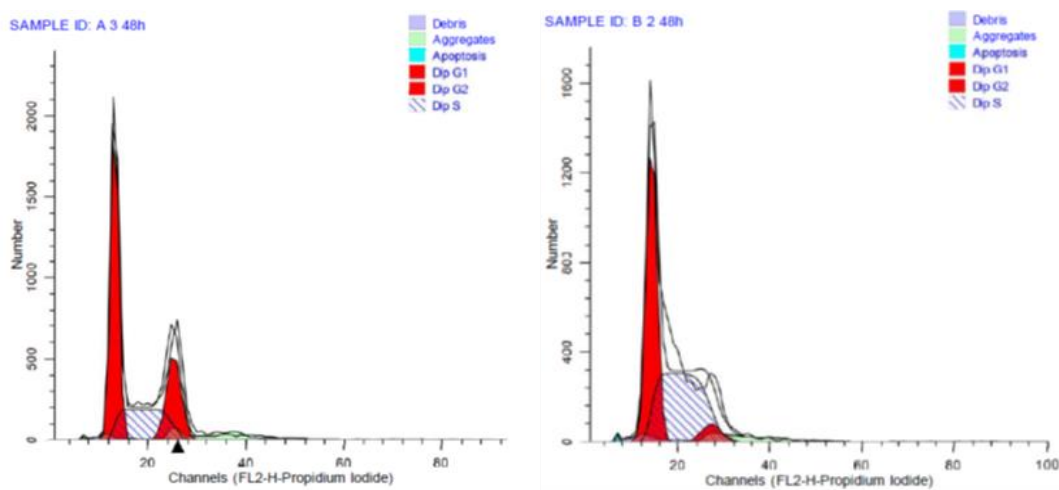
(B) Επώαση για 48 h.



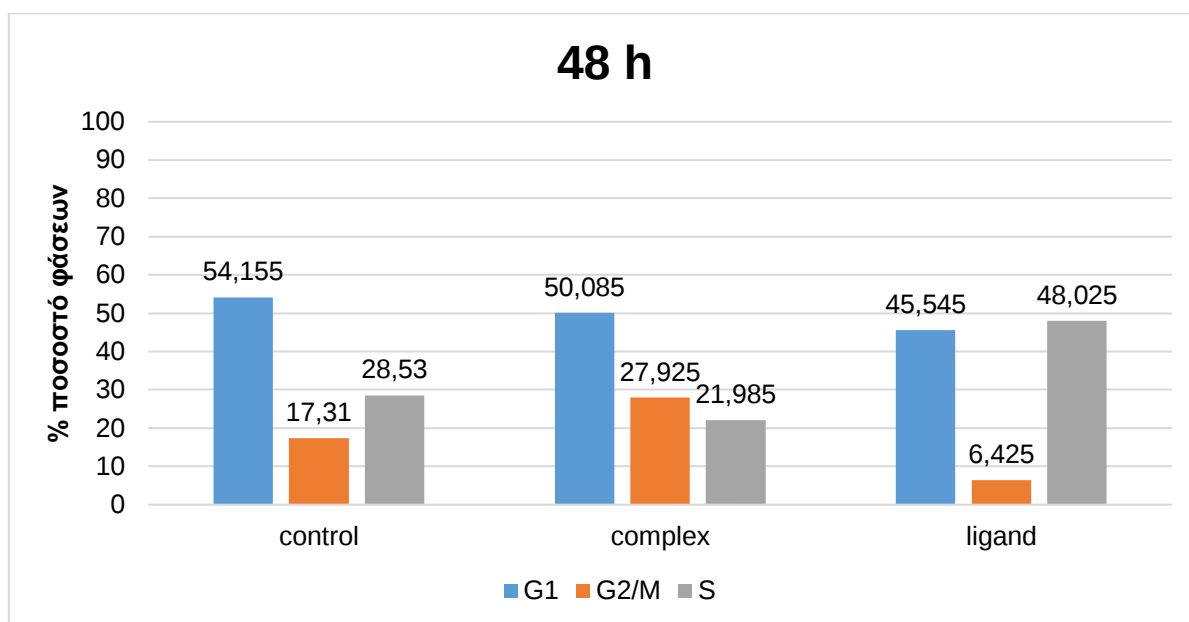
Σχήμα 41: Control στις 48 h.



Σχήμα 42: Σύμπλοκο 1 στις 48 h.



Σχήμα 43: Υποκαταστάτης 2,2'-διπυριδίνη στις 48 h.

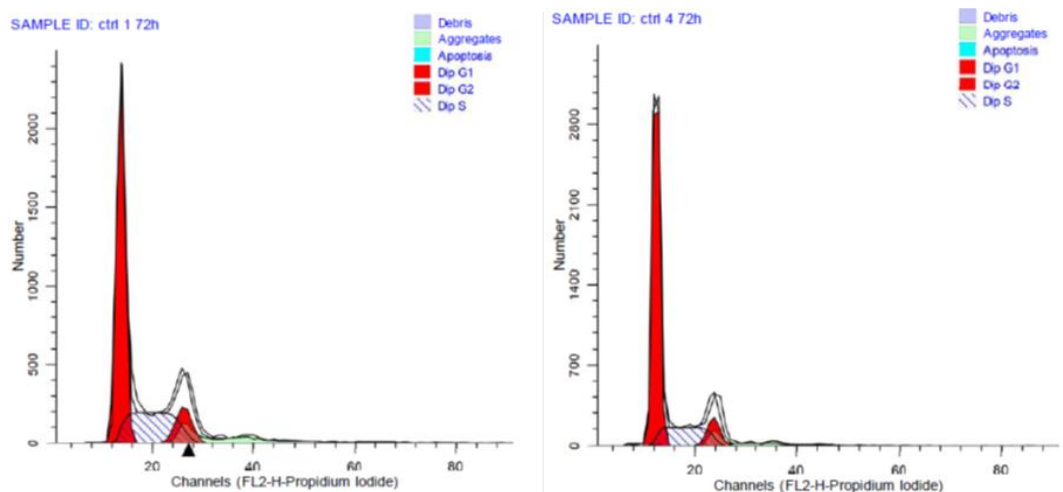


Σχήμα 44: Διάγραμμα του % ποσοστού των φάσεων G1, G2 και S του κυτταρικού κύκλου μετά από 48 h επώασης με τα παράγωγα [complex: 1, ligand: 2,2'-bipyridine].

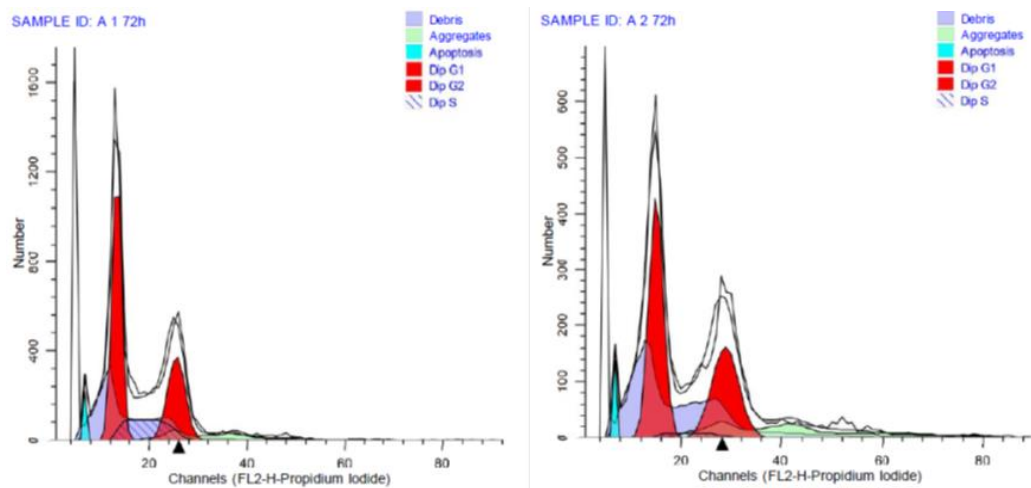
Σε σχέση με το πρότυπο, παρατηρείται:

- ✓ περαιτέρω αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στο σημείο μετάβασης G2/M του κυτταρικού κύκλου, μετά από τη δράση του συμπλόκου για 48 h και
- ✓ περαιτέρω αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, μετά από τη δράση του υποκαταστάτη για 48 h.

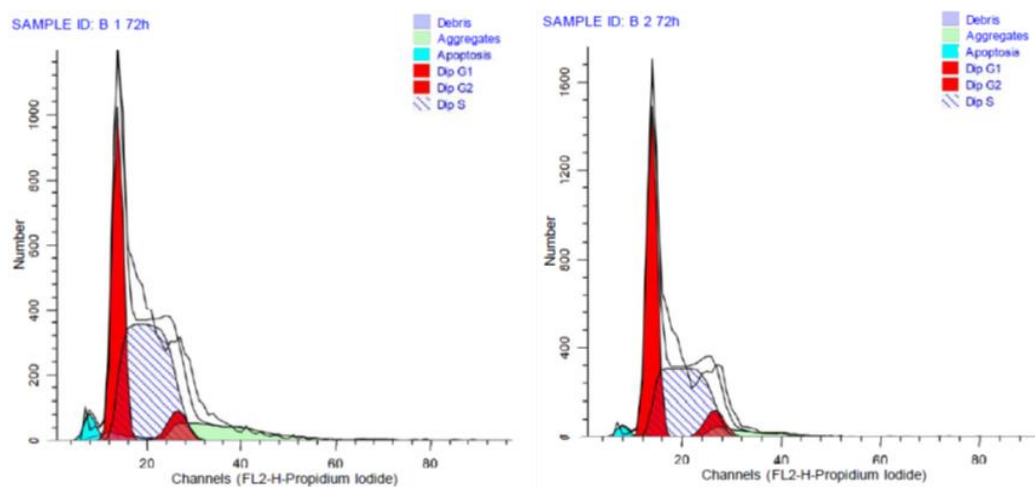
(Γ) Επώαση για 72 h



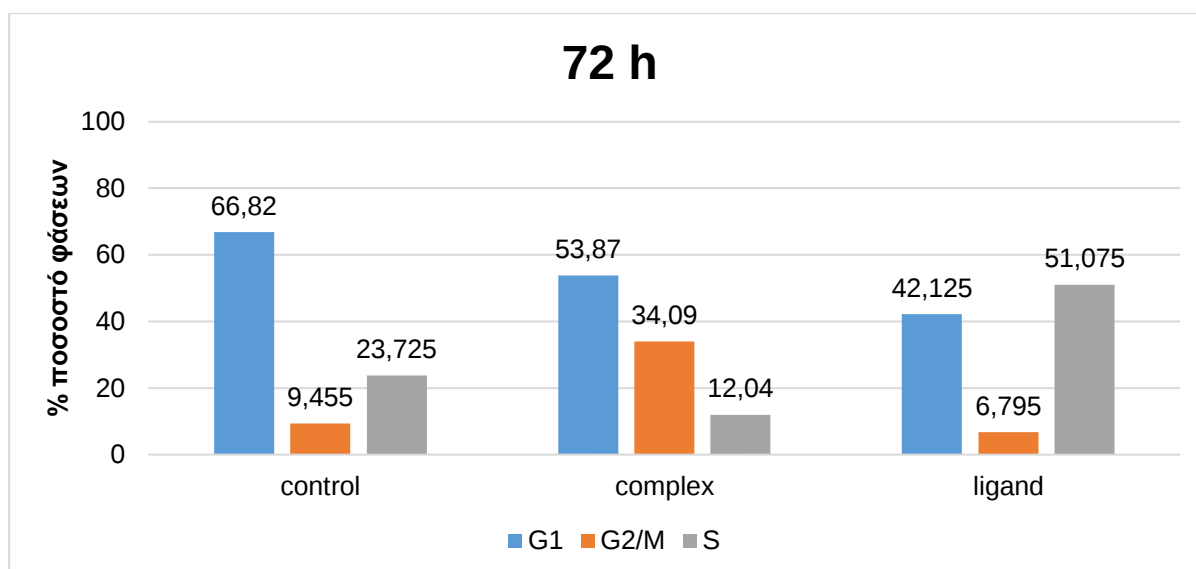
Σχήμα 45: Control στις 72 h.



Σχήμα 46: Σύμπλοκο 1 στις 72 h.



Σχήμα 47: Υποκαταστάτης 2,2'-διπυριδίνη στις 48 h.



Σχήμα 48: Διάγραμμα του % ποσοστού των φάσεων G1, G2 και S του κυτταρικού κύκλου μετά από 72 ώρες επώασης με τα παράγωγα [complex: **1**, ligand: 2,2'-bipyridine].

Σε σχέση με το πρότυπο, παρατηρείται:

- ✓ περαιτέρω αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στο σημείο μετάβασης G2/M του κυτταρικού κύκλου, μετά από τη δράση του συμπλόκου για 72 h και
- ✓ περαιτέρω αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, μετά από τη δράση του υποκαταστάτη για 72 h.

Μετά από τη συγκριτική μελέτη των παραπάνω αποτελεσμάτων, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο **1** αλληλεπιδρά με τα κύτταρα της καρκινικής σειράς MCF-7 με τέτοιον τρόπο που να εμποδίζει τη μετάβαση των κυττάρων από τη G2 στην M μιτωτική φάση του κυτταρικού κύκλου. Ενιαία συμπεριφορά φαίνεται να έχει και ο υποκαταστάτης 2,2'-διπυριδίνη, καθώς προκαλεί αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση που είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς αντανakλά την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα της νεοπλασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΩΝ ΔΟΜΩΝ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

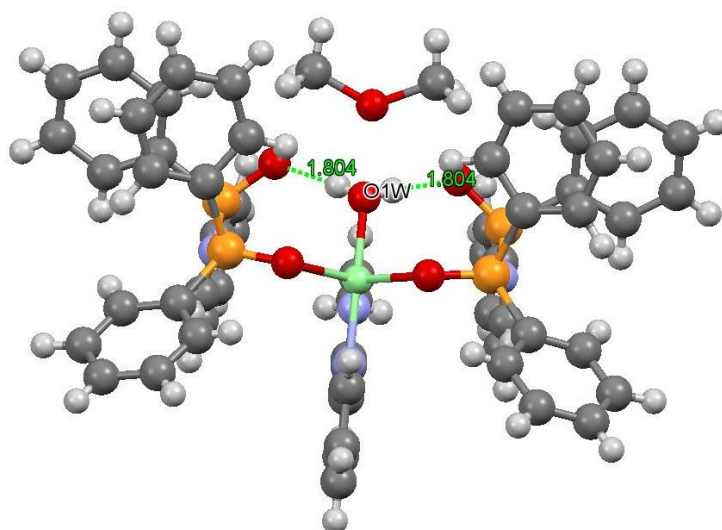
8.1 Η κρυσταλλική δομή $[\text{Cu}(\text{N,N})(\text{O})(\text{O})(\text{H}_2\text{O})]$ ή «τρεις παραλλαγές σε ένα θέμα»

Στο παρόν πόνημα πραγματοποιήθηκε η σύνθεση συμπλόκων ενώσεων του $\text{Cu}(\text{II})$ με τον ιμιδοδιφωσφινικό υποκαταστάτη $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NHP}(\text{O})\text{Ph}_2$ και διιμίνες (2,2'-διπυριδίνη, 1,10-φαινανθρολίνη, νεοκουπροΐνη και το παράγωγο φυσικής κουρκουμίνης 2-(3,5-bis(3,4-dimethoxystyryl)-1H-pyrazol-1-yl)pyridine)). Σε σύστημα κρυσταλλώσεως $\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ 1: 3, οι τρεις πρώτες διιμίνες παρέχουν σύμπλοκα που αποκτούν παρόμοια κρυσταλλική δομή με γεωμετρία παραμορφωμένης τριγωνικής διπυραμίδας και γενικό τύπο $[\text{Cu}(\text{N,N})(\text{O})(\text{O})(\text{H}_2\text{O})]$, αλλά με ενδιαφέρουσες διαφοροποιήσεις μεταξύ τους: (α) Η σύμπλεξη με 1,10-φαινανθρολίνη οδηγεί στον σχηματισμό και του διπυρηνικού συμπλόκου **3**, (β) η νεοκουπροΐνη πιθανότατα στο σύμπλοκο $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{N,N})_2](\text{NO}_3)$ και (γ) η 2,2'-διπυριδίνη σε τίποτα από τα παραπάνω. Το κοινό χαρακτηριστικό των τριών κρυσταλλικών δομών είναι η σύμπλεξη ενός μορίου H_2O στο μεταλλικό κέντρο $\text{Cu}(\text{II})$, το οποίο αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου με τα μη συμπλεγμένα άκρα του υποκαταστάτη $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2]^-$, σε διαφορετικό βαθμό ανά περίπτωση (Εικόνες 27-29). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 11, τα μήκη των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των δύο ατόμων H του H_2O [$\text{H}_1(\text{W})$ και $\text{H}_2(\text{W})$] και των δύο ατόμων O του υποκαταστάτη διαφέρουν.

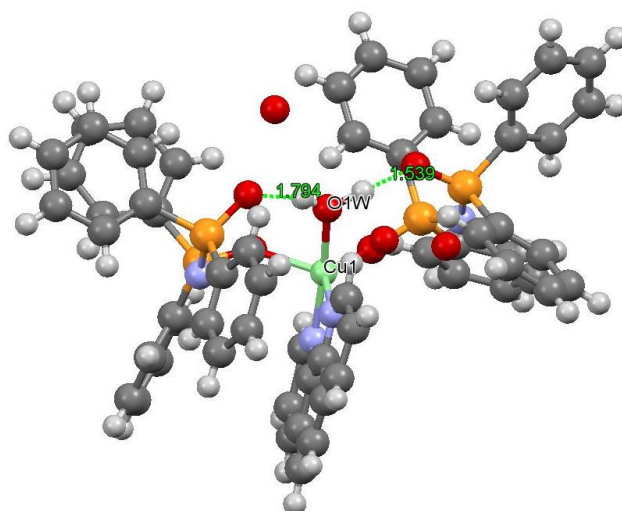
Πίνακας 11: Μήκη δεσμών υδρογόνου μεταξύ του συμπλεγμένου H_2O και του ελεύθερου ατόμου O του υποκαταστάτη $\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2-\text{O}\}$

Κρυσταλλική δομή συμπλόκου	Μήκος δεσμού* $\text{O}(\text{W})-\text{H}_1(\text{W})\cdots\text{O}$ (Å)	Μήκος δεσμού* $\text{O}(\text{W})-\text{H}_2(\text{W})\cdots\text{O}$ (Å)
$[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2-\text{O}\}_2(2,2'\text{-bipy})(\text{H}_2\text{O})]$	1,804	1,804
$[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2-\text{O}\}_2(1,10\text{-phen})(\text{H}_2\text{O})]$	1,794	1,539
$[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2-\text{O}\}_2(\text{neocup.})(\text{H}_2\text{O})]$	1,945	1,827

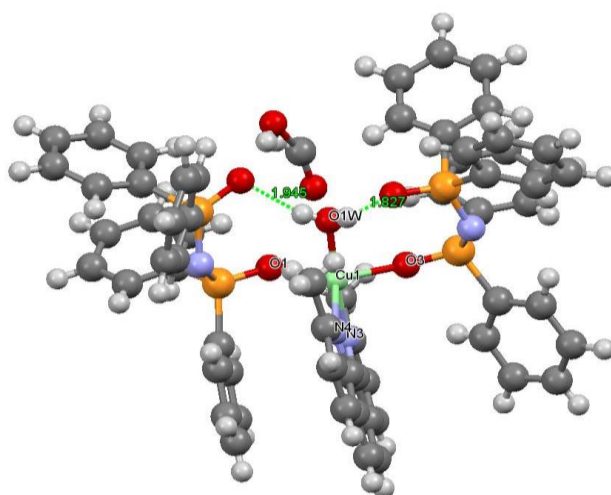
* $\text{O}(\text{W})$, $\text{H}_1(\text{W})$, $\text{H}_2(\text{W})$: άτομα H_2O , O: ελεύθερο άτομο του υποκαταστάτη $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2]^-$



Εικόνα 26: Δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(2,2'\text{-bipy})(\text{H}_2\text{O})]$ (1).



Εικόνα 27: Δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(1,10\text{-phen})(\text{H}_2\text{O})]$ (2).



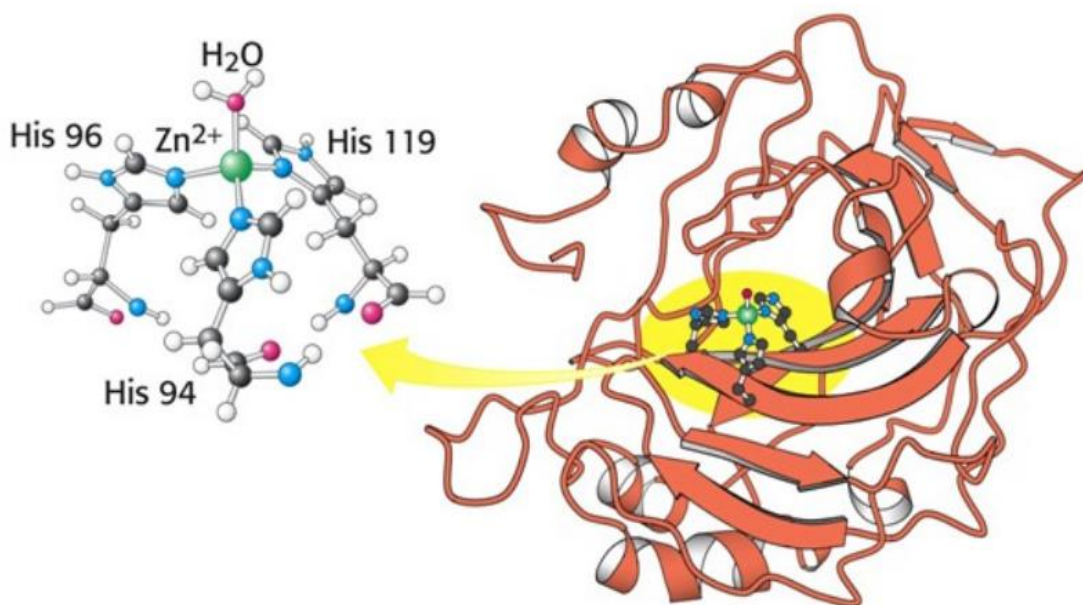
Εικόνα 28: Δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο $[\text{Cu}\{\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{O})\text{Ph}_2\text{-O}\}_2(\text{neocuproine})(\text{H}_2\text{O})]$ (4)

Στην περίπτωση του συμπλόκου **1** με την 2,2'-bipy, τα μήκη δεσμών H είναι ίδια (=1,804 Å) και η δομή παρουσιάζει κέντρο συμμετρίας, ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις οι αντίστοιχες τιμές διαφέρουν μεταξύ τους. Στο σύμπλοκο **2**, ο δεσμός O(W)-H₁(W)···O έχει μεγαλύτερη επιμήκυνση (1,794 Å) από τον O(W)-H₂(W)···O (1,539 Å), η οποία πιθανότατα οδηγεί στην αποπρωτονίωση του μορίου H₂O (προς OH⁻) και τον σχηματισμό του συμπλόκου **3**.

Φαίνεται λοιπόν ότι οι τρεις διαφορετικές «παραλλαγές» κρυσταλλικών δομών με γενικό τύπο [Cu(N,N)(O)(O)(H₂O)] προκύπτουν από τις διαφορετικές χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του διοξυγονωμένου υποκαταστάτη, των τριών διιμινών και των μορίων διαλυτών (CH₃OH και H₂O) τα οποία εγκλωβίζονται στο κρυσταλλικό πλέγμα. Το φαινόμενο αυτό απαντά σε ανάλογες δομές στη βιβλιογραφία, όπως επίσης και σε βιολογικά συστήματα, που αξίζει να αναφερθούν.

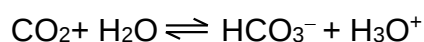
8.1.1 Σύγκριση της δομής [Cu(N,N)(O)(O)(H₂O)] με ανάλογο βιολογικό σύστημα

Η **καρβονική ανυδράση** είναι μια μονομερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 30 kDa, η τρισδιάστατη δομή της οποίας προσδιορίσθηκε με ακτίνες X (Εικόνα 30). Η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης είναι κυρίως η β-πτυχωτή επιφάνεια και το άτομο του Zn βρίσκεται σε μια κωνική κοιλότητα, περίπου 16 Å από την επιφάνεια της πρωτεΐνης, συμπλεγμένο με το N τριών ομάδων Ιστιδίνης και με ένα μόριο H₂O, σε μια παραμορφωμένη τετραεδρική γεωμετρία.

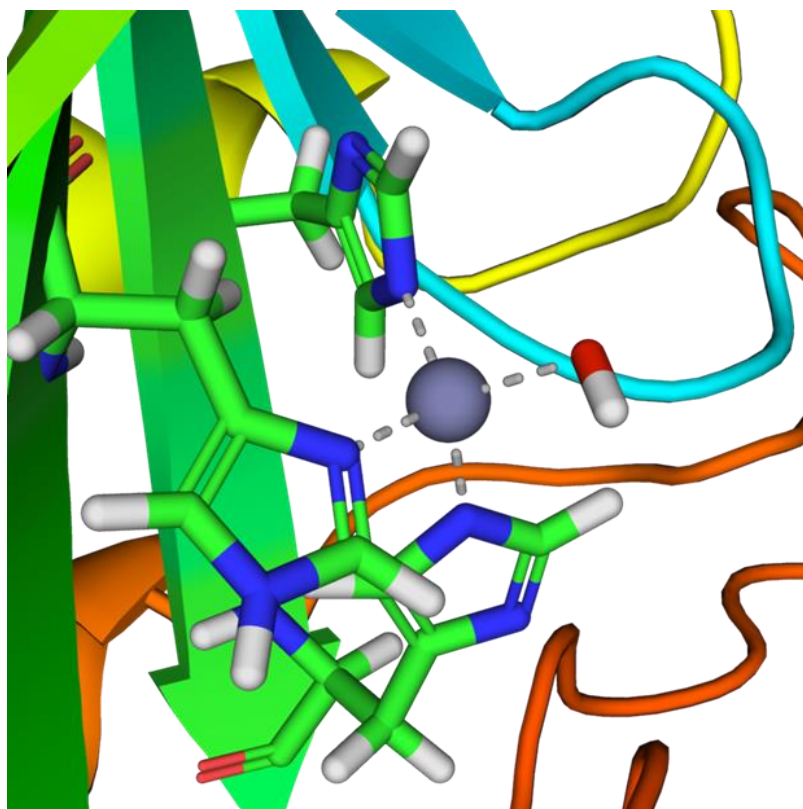


Εικόνα 29: Η τρισδιάστατη δομή της καρβονικής ανυδράσης και το ενεργό κέντρο Zn(II) του ενζύμου, το οποίο είναι συμπλεγμένο με το N τριών πλευρικών ομάδων Ιστιδίνης και με ένα μόριο H₂O, σε μια παραμορφωμένη τετραεδρική γεωμετρία.

Η καρβονική ανυδράση είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στο ανθρώπινο σώμα και καταλύει την ταχεία μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα και του ύδατος σε διττανθρακικά ιόντα ($k = 10^6 \text{ s}^{-1}$), σύμφωνα με την αντίδραση:



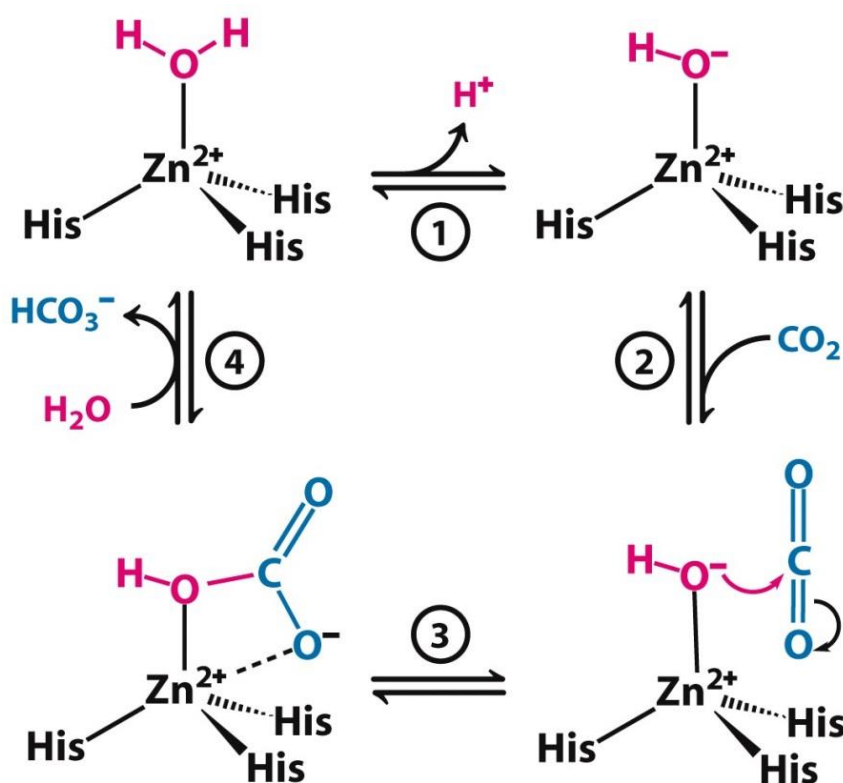
Με αυτόν τον τρόπο διατηρείται η οξεοβασική ισορροπία στο αίμα και άλλους ιστούς, ενώ ευνοείται η μεταφορά του CO_2 στον εξωκυττάριο χώρο. Ο προτεινόμενος μηχανισμός υδατώσεως του CO_2 με τη δράση του ενζύμου είναι ο «μηχανισμός Zn-υδροξειδίου». Η αποπρωτονίωση του H_2O αυξάνει σημαντικά τη βασικότητα του ατόμου οξυγόνου (Εικόνα 31) και διευκολύνει την πυρηνόφιλη προσβολή στο οξύ κατά Lewis CO_2 . Το προϊόν της αντιδράσεως απομακρύνεται από το μεταλλικό κέντρο, το οποίο συμπλέκει ένα καινούργιο μόριο H_2O και έτσι συμπληρώνεται ο καταλυτικός κύκλος (Εικόνα 32).



Εικόνα 30: Απόδοση του ενεργού κέντρου της ανθρώπινης καρβονικής ανυδράσης II, όπου φαίνονται τρία κατάλοιπα ιστιδίνης (His) και OH^- συμπλεγμένα (διακεκομμένες γραμμές) με Zn(II) [PDB: 1CA2].

Το κλειδί της καταλυτικής δραστηριότητας της καρβονικής ανυδράσης είναι η μειωμένη τιμή pK_a του συμπλεγμένου H_2O . Το ενεργό κέντρο του ενζύμου $[\text{Zn}(\text{His})_3(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ έχει υψηλό θετικό φορτίο αφού δεν εξουδετερώνεται από τις τρεις ουδέτερες, ηλεκτρικώς,

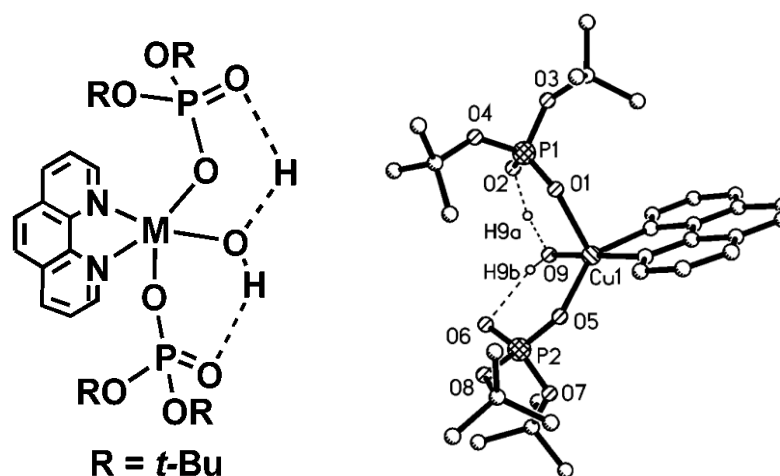
Ιστιδίνες, και το υδρόφοβο πρωτεϊνικό περιβάλλον του ενεργού κέντρου δεν ευνοεί την παρουσία του φορτίου αυτού. Έτσι ευνοείται ο ιοντισμός του συμπλεγμένου H_2O , αφού με αυτόν τον τρόπο το O —που παραμένει συμπλεγμένο εξουδετερώνει ένα θετικό φορτίο του κέντρου: $[\text{Zn}(\text{His})_3(\text{OH})]^+$. Ως αποτέλεσμα, η pK_a του συμπλεγμένου H_2O είναι περίπου 7, πολύ χαμηλότερη από αυτή του ελεύθερου H_2O ($\text{pK}_a = 14$) ή μορίων H_2O στο σύμπλοκο $[\text{Zn}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ ($\text{pK}_a = 10$). Γίνεται, λοιπόν, εμφανής ο σημαντικός ρόλος που παίζει το πρωτεϊνικό περιβάλλον στην καταλυτική δράση του ενζύμου [7].



Εικόνα 31: Ο «Μηχανισμός Zn-υδροξειδίου» της καρβονικής ανυδράσης, μέσω του ιοντισμού του συμπλεγμένου H_2O [83].

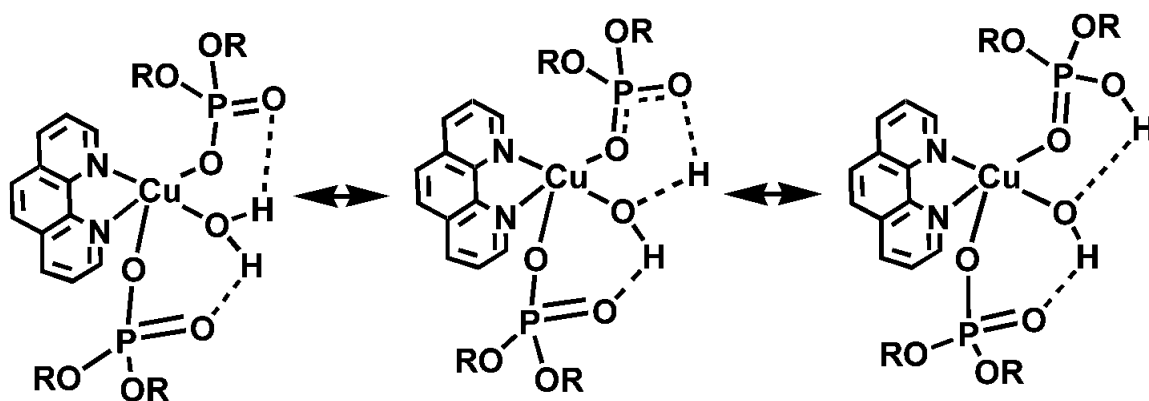
8.1.2 Σύγκριση της δομής $[\text{Cu}(\text{N,N})(\text{O})(\text{O})(\text{H}_2\text{O})]$ με ανάλογες δομές από τη βιβλιογραφία

Στη βιβλιογραφία έχουν παρασκευασθεί και χαρακτηριστεί ορισμένα σύμπλοκα που έχουν γενικό μοριακό τύπο $[\text{Cu}(\text{N,N})(\text{O})(\text{O})(\text{H}_2\text{O})]$, όπως το $[\text{Cu}(\text{dtbp})_2(1,10\text{-phen})(\text{H}_2\text{O})]$ (dtbp-H = δις-*tert*-βουτυλοφωσφοεστέρας), που φαίνεται στην Εικόνα 33 [84]. Η δομή του συμπλόκου, όπως προκύπτει από τα δεδομένα της κρυσταλλογραφικής ανάλυσης, έχει γεωμετρία παραμορφωμένης τριγωνικής διπυραμίδας: στο μεταλλικό κέντρο $\text{Cu}(\text{II})$ συμπλέκονται ο διοξυγονωμένος υποκαταστάτης dtbp μονοσχιδώς, ένα μόριο 1,10-phen δισχιδώς και ένα μόριο H_2O .



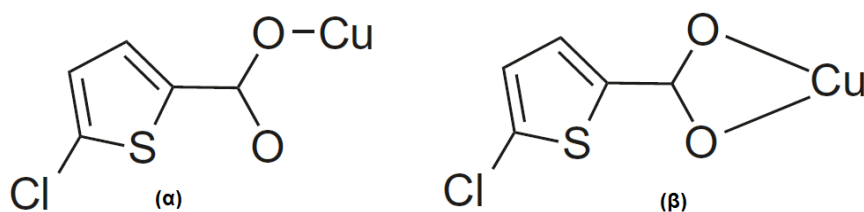
Εικόνα 32: Η δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}(\text{dtbp})_2(1,10\text{-phen})(\text{OH}_2)]$, όπου $\text{M} = \text{Cu}$, dtbp-H = δις-*tert*-βουτυλοφωσφοεστέρας [84].

Επί πλέον, η δομή αυτή φαίνεται να σταθεροποιείται από ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στο συμπλεγμένο μόριο H_2O και στα ελεύθερα άτομα O του φωσφορικού εστέρα. Από τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του εν λόγω συμπλόκου σε διάφορες τιμές θερμοκρασίας (293, 203 και 93 K), προκύπτουν χρήσιμα «στιγμιότυπα» της ενεργοποίησης του O-H δεσμού του συμπλεγμένου μορίου H_2O στο μεταλλικό κέντρο $\text{Cu}(\text{II})$. Συγκεκριμένα, στα 298 K, ο ένας από τους δύο δεσμούς O-H δέχεται μεγαλύτερη επιμήκυνση από τον άλλο [$\text{O}(9)\text{-H}(9a)$ 1,07 Å και $\text{O}(9)\text{-H}(9b)$ 0,69 Å] και $\text{H}(9a)\dots\text{O}(2)$ 1.53 Å]. Από τις μετρήσεις των τιμών στα αντίστοιχα μήκη δεσμών, προκύπτει το μοντέλο ενεργοποίησης του H_2O , που φαίνεται στην Εικόνα 34. Τα βασικά χαρακτηριστικά του είναι (α) η ισχυρή «αναγνώριση» των φωσφοεστερικών ομάδων από το μέταλλο, μέσω ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου και (β) ο σχηματισμός OH^- μέσω ενεργοποίησης του συμπλεγμένου μορίου H_2O .



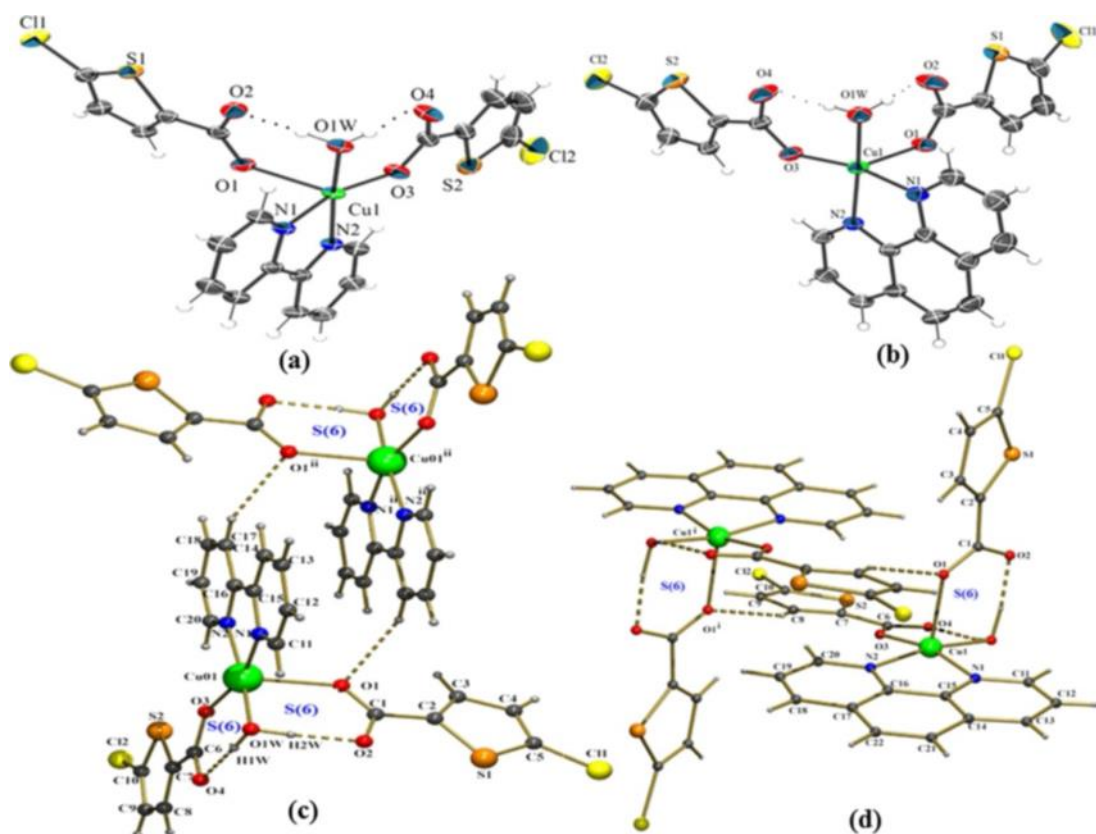
Εικόνα 33: Μοντέλο ενεργοποίησης του συμπλεγμένου μορίου H_2O προς OH^- [84].

Η παρουσία του H_2O ως συμπλεγμένου υποκαταστάτη στο μεταλλικό κέντρο Cu(II) φαίνεται και στα σύμπλοκα $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipy})(5\text{-TPC})_2(\text{H}_2\text{O})]$ και $[\text{Cu}(\text{phen})(5\text{-TPC})_2(\text{H}_2\text{O})]$, όπου *phen* = 1,10-phen ή 4,7-υδροξο-1,10-phen και 5-TPC = 5-χλωρο-2-θειοφαινοκαρβοξυλικό (Εικόνα 35) [85].



Εικόνα 35: Μονοσχιδής (α) και δισχιδής (β) σύμπλεξη σε κέντρο Cu(II) του υποκαταστάτη 5-TPC = 5-χλωρο-2-θειοφαινοκαρβοξυλικό [85].

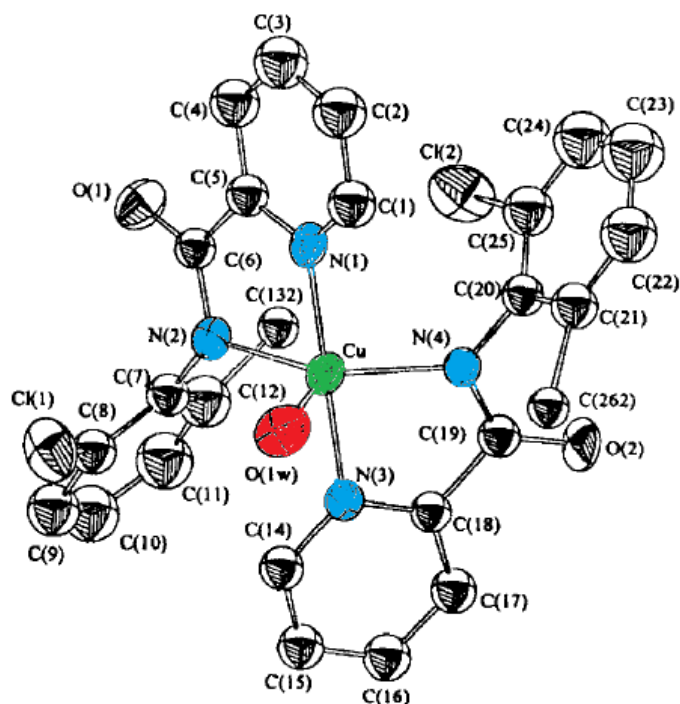
Εδώ, η δομή και των δύο συμπλόκων του Cu(II) αποκτά γεωμετρία *τετραγωνικής πυραμίδας*, όπου τα δύο άτομα N των δακτυλίων στις *bipy* και *phen* καταλαμβάνουν δύο ισημερινές θέσεις, οι άλλες δύο καταλαμβάνονται από δύο άτομα O, εκ των οποίων το ένα ανήκει στο μόριο H_2O και το άλλο στο ανιόν υποκαταστάτη 5-TPC, που συμπλέκεται στο Cu(II) μονοσχιδώς (Εικόνα 35α), ενώ η αξονική θέση καταλαμβάνεται από ένα δεύτερο ανιόν υποκαταστάτη 5-TPC. Το κοινό χαρακτηριστικό και στις δύο δομές είναι ότι σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ που σχηματίζονται ανάμεσα στα άτομα H του H_2O και τα άτομα O της καρβοξυλομάδας του υποκαταστάτη 5-TPC.



Εικόνα 36: Κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων (α) $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipy})(5\text{-TPC})_2(\text{H}_2\text{O})]$ και (β) $[\text{Cu}(\text{phen})(5\text{-TPC})_2(\text{H}_2\text{O})]$ και οι δεσμοί υδρογόνου $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ που σταθεροποιούν τις δομές [85].

Κατ' αναλογία με τα σύμπλοκα που συνετέθησαν στην παρούσα εργασία, είναι και η περίπτωση του συμπλόκου $[\text{Cu}(\text{L}_5)_2(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$, όπου HL^5 : N -(2-χλωρο-6-μεθυλφαινυλ)πυριδίνη-2-καρβοξαμίδιο, στην αποπρωτονιωμένη του μορφή, συμπλέκεται στο μεταλλικό κέντρο $\text{Cu}(\text{II})$, μέσω δύο ατόμων N , δισχιδώς.

Από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες και τα πειράματα φασματοσκοπίας στερεάς ανάκλασης φαίνεται ότι η δομή του κόρου CuN_4O έχει γεωμετρία τριγωνικής διπυραμίδας, με τα δύο αποπρωτονιωμένα άτομα N και το μόριο H_2O να βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο, ενώ τα δύο άτομα N των πυριδινών καταλαμβάνουν τις αξονικές θέσεις (Εικόνα 37).



Εικόνα 37: Η δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}(\text{L}_5)_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$, όπου $\text{HL}^5 = N$ -(2-χλωρο-6-μεθυλφαινυλ)πυριδίνη-2-καρβοξαμίδιο [86].

Εντούτοις, στο φάσμα UV-vis του συμπλόκου σε dmf, η d-d μετάπτωση που παρατηρείται στα 595 nm είναι χαρακτηριστική τετραγωνικής γεωμετρίας με κέντρο συμμετρίας, ενώ οι τιμές του παράγοντα g στα φάσματα cw-EPR του εν λόγω συμπλόκου σε διάλυμα dmf είναι $g_{\parallel} (= 2,24) > g_{\perp} (= 2,02)$ και αντιστοιχούν σε αξονικό σύστημα. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η δομή του συμπλόκου εν διαλύσει αλλάζει σε γεωμετρία τετραγωνικής πυραμίδας.

Από τα παραπάνω, λοιπόν, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το φαινόμενο της αλλαγής της κρυσταλλικής δομής των συμπλόκων **1**, **2** και **4** εμφανίζεται και σε άλλα παρόμοια συστήματα στη βιβλιογραφία και αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω.

Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι και στις τρεις κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων **1**, **2** και **4**, ο διοξυγονωμένος υποκαταστάτης συμπλέκεται μονοσχιδώς. Αντίστοιχες περιπτώσεις μονοσχιδούς σύμπλεξης ιμιδοδιφωσφινικών υποκαταστατών του τύπου $(\text{XPR}_2)(\text{YPR}'_2)\text{NH}$, όπου ($\text{R} = \text{Ph}$ και $\text{X}, \text{Y} = \text{O}, \text{S}, \text{Se}$) από τη βιβλιογραφία παρατίθενται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Παράθεση συμπλόκων ενώσεων των μετάλλων Sb, Sn, Co, Pt, Pd και Au με τα παράγωγα του σκελετού Ph₂PNHPPH₂ που συμπλέκονται μονοσχιδώς.

Μέταλλο	Υποκαταστάτης (XPR ₂)(YPR' ₂)NH (R=Ph και X, Y=O, S, Se)
Sb(V)	[Sb{Ph ₂ P(S)NP(O)Ph ₂ -S } ₂ (CH ₃) ₃] [87]
Sn(IV)	[Sn {(Ph ₂ P(S)NP(S)Ph ₂ -S)(CH ₃) ₃ }] [88]
Co(III)	[Co{(Ph ₂ PO) ₂ N} ₂ {Ph ₂ P(O)NP(O)Ph ₂ -O}] [89]
Co(II)	[Co{Ph ₂ P(O)NP(Se)Ph ₂ -O} ₂] [90]
Pt(II)	[Pt{(Ph ₂ PSe) ₂ N} ₂ {Ph ₂ PNP(O)Ph ₂ -O}] [91]
Pd (II)	[Pd(CH ₂ CH ₂ NH ₂) ₂ NH{Ph ₂ P(S)NP(O)Ph ₂ -S}] [92] [Pd(2-picolyamine){Ph ₂ P(S)NP(O)Ph ₂ -S} ₂] [92]
Au (I)	[Au(Ph ₂ PNH ₂){Ph ₂ P(S)NP(O)Ph ₂ -O}] [93]

8.2 Εκτίμηση της βιολογικής δραστηριότητας του συμπλόκου 1

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του συμπλόκου **1** με το CT-DNA. Από όλες τις τεχνικές που παρουσιάστηκαν εκτενώς παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο **1** σίγουρα εισάγεται στο μόριο του DNA και, το πιθανότερο, μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις του DNA.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* βιολογικές μελέτες της επίδρασης του συμπλόκου **1** και των υποκαταστατών, 2,2'-διπυριδίνης και δι-οξυγονωμένου υποκαταστάτη, (OPPh₂)₂N⁺ στην ανθρώπινη καρκινική σειρά MCF-7. Από τα πειράματα δοκιμασίας MTT διαπιστώνεται η τοξική δράση του συμπλόκου **1**, η οποία πιθανότατα οφείλεται στο μόριο 2,2'-διπυριδίνης που συμπλέκεται στο μεταλλικό κέντρο Cu(II). Τέλος, από την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής προκύπτει το συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο **1** αλληλεπιδρά με τα κύτταρα της καρκινικής σειράς MCF-7 με τέτοιο τρόπο που να εμποδίζει τη μετάβαση των κυττάρων από τη G2 στην M μιτωτική φάση του κυτταρικού κύκλου. Ο μηχανισμός της μετάβασης G2/M είναι πολύπλοκος, αξίζει όμως να διερευνηθεί ο τρόπος παρεμπόδισής του στο μέλλον [94].

Αυτά τα πρώτα βιολογικά πειράματα είναι ενθαρρυντικά και σε μια προοπτική βελτίωσης της κυτταροτοξικότητας του συμπλόκου **1**, αξίζει να μελετηθεί η βιολογική δραστηριότητα των συμπλόκων **2**, **3**, **4** και **5**.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
Electron Paramagnetic Resonance	Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός
continuous wave EPR	EPR συνεχούς κύματος
Electron Zeeman Interaction	Ηλεκτρονική αλληλεπίδραση Zeeman
Hyperfine Interaction	Υπέρλεπτη αλληλεπίδραση
Spin-orbit coupling	Spin-orbit σύζευξη
2,2'- bipyridine	2,2'-διπυριδίνη
1,10-phenanthroline	1,10-φαινανθρολίνη
neocuproine	νεοκουπροΐνη

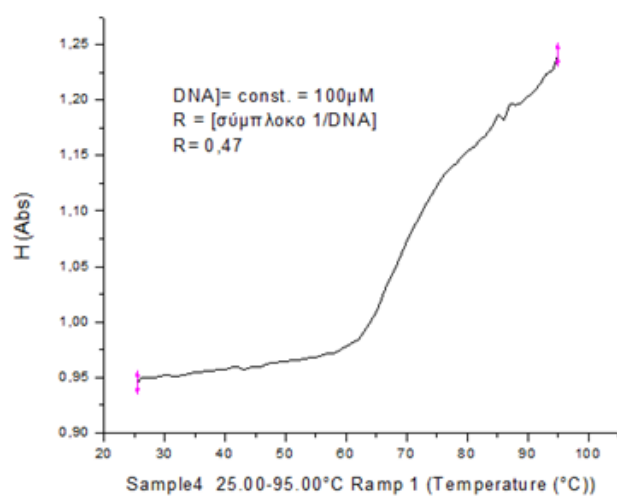
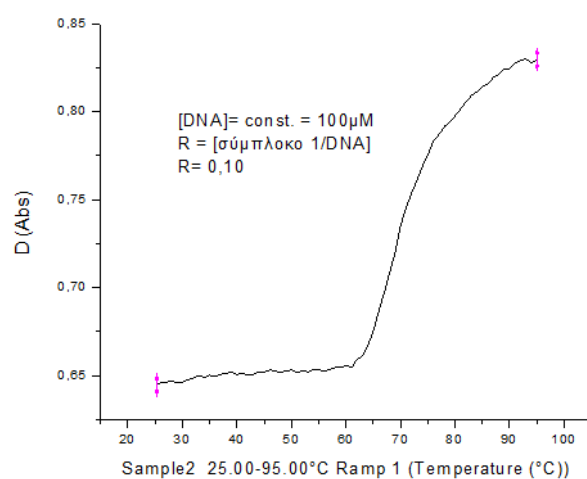
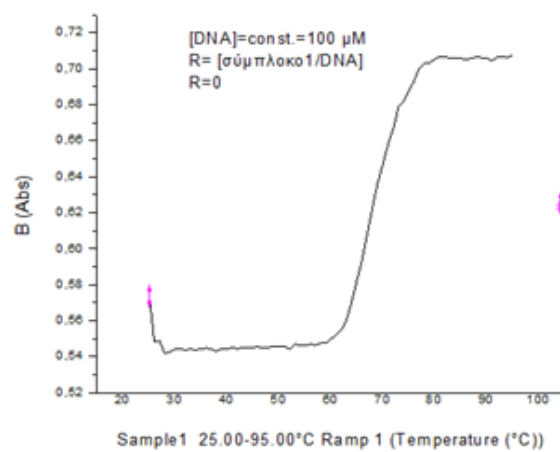
Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

DNA	DeoxyriboNucleic Acid
A-T	Adenine-Thymine
G-C	Guanine-Cytocine
P53	Protein 53
ICD	Induced Circular Dichroism
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
ENDOR	Electron- Nuclear Double Resonance
HYSCORE	HYperfine Sub-level CORrElation
UV-vis	UltraViolet-visible
MS	Mass Spectrometry
IR	Infrared
2,2'-bipy	2,2'-bipyridine
1,10-phen	1,10-phenanthroline
PI	Propidium Iodide
MTT	methyl-thiazolyl-tetrazolium
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
S (phase)	Synthesis
KBr	Sodium bromide
CT-DNA	Calf Thymous-DeoxyriboNucleicAcid
IC ₅₀	half maximal Inhibitory Concentration
EtBr	Ethidium Bromide
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
PBS	Phosphate Buffered Saline
FBS	Fetal Bovine Serum
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ROS	Reactive Oxygen Species
Cas	Casiopeina
GSH	Glutathione
THF	TetraHydroFuran

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης (T_m)



ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Ε. Παπαδημητρίου, Μοριακή Φαρμακολογία, Εκδ. Παρισιάνου, 2010.
2. K.W. Kinzler, B. Vogelstein. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. Vol. 386, 1997, pp. 761, 763.
3. Ι. Νικολάου, «Αντικαρκινικά φάρμακα», Τομέας Οργανικής Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ., 2010-11.
4. Κ. Καττή, *Μαθήματα Βιολογίας*, 9 Oct. 2016, <http://mathimatabiologias.weebly.com>
5. D.L. Nelson, M.M. Cox. Lehninger's "*Principles of Biochemistry*", Fifth Edition, W.H.Freeman & Company, 2008.
6. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. Vol. 124, 2013, pp.1-19.
7. Π. Κυρίτση, Σημειώσεις παραδόσεων, «ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ», Τομέας Ανόργανης Χημείας, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α., 2009.
8. L.S.Lerman, Structural considerations in the interaction of DNA and acridines, *J. Mol. Biol.*, Vol. 3, pp.18-30.
9. *Protein Data Bank*, 9 Oct. 2016, entry code 4E87.
10. C. Hiort, B. Norden, A. Rodger. Enantiopreferential DNA binding of [ruthenium(II)(1,10-phenanthroline)₃]²⁺ studied with linear and circular dichroism. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 112, pp. 1971-1982.
11. J. K. Barton, J. M. Goldberg, C.V. Kumar, N.J. Turro. Binding modes and base specificity of tris (phenanthroline)ruthenium(II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 108, pp. 2081-2088.
12. M.Takagi. Threading intercalation to double-stranded DNA and the application to DNA sensing. Electrochemical array technique. *Pure Appl. Chem.* Vol. 73, 2001, pp.1573-1577.
13. M.L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R.E. Dickerson., Binding of an antitumor drug to DNA, Netropsin and C-G-C-G-A-A-T-T-BrC-G-C-G, *J. Mol. Biol.* Vol. 183, 1985, pp. 553-63.

14. J. M. Kelly, A. B. Tossi, D.J. Mc Connell and C. OhUigin, A study of the interactions of some polypyridylruthenium (II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 13, 1985, pp. 6017–6034.
15. ΜΟΥΣΕΙΟ ΚΥΚΛΑΔΙΚΗΣ ΤΕΧΝΗΣ (Ίδρυμα Ν.&Ν. Γουλανδρή), Μόνιμη συλλογή, σειρά: «Κυπριακός Πολιτισμός».
16. I. Omae, Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied Organometallic Chemistry*. Vol.17, 2003, pp.81–105.
17. T. F. Kagawa, B. H. Geierstanger, A. H. Wang, P. S. Ho. Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA. The 1.2-Å Z-DNA structure of d(CGCGCG) in the presence of CuCl₂. *J. Biol. Chem.*, Vol. 266, 1991, pp. 20175-84.
18. J. J. R. Fraústo da Silva and R. J. P. Williams. “*The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life*” Second Edition. Oxford: Clarendon Press, 1994.
19. D. S. Sigman, A. Mazumder, D. M. Perrin. Chemical nucleases. *Chem. Rev.*, Vol.93, 1993, pp.2295–2316.
20. *Θερινό Τρίγωνο*, 9 Oct. 2016, <http://therino-trigono.webnode.gr/news>
21. Galindo-Murillo, J. Hernandez-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruíz-Azuara, R. Moreno-Esparza. π-Stacking between Casiopeinas and DNA. *Phys. Chem.*, Vol. 13, 2011, pp. 14510-14515.
22. C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini. Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, Vol. 9, 2009, pp. 185-211.
23. TPA Devasagayam, J. C. Tilac, K. K. Bloor, S. Sane Ketaki, S. Ghaskadbi Saroj, R.D. Lele. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of Association of Physicians of India*. Vol. 52, 2004, pp 794-804.
24. A. Grizett Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, J. Carlos García-Ramos, M. Flores-Alamo, E. Hernández-Lemus, L. Ruiz-Azuara, C. Mejía. Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Vol. 126, 2013, pp. 17–25.
25. E. Hernández-Lemus, A. Grizett Gutiérrez, Adriana Vázquez-Aguirre, M. Lourdes Palma-Tirado, L. Ruiz-Azuara and C. Mejía. “*Analysis of Apoptotic and*

Autophagic Pathways in Neuroblastoma by Treatment with Copper Compounds", Medicine/Infectious Diseases/ "Neuroblastoma", Hiroyuki Shimada, 2013.

26. B. H. Geierstanger, T. F. Kagawa, S. L. Hen, G. J. Quigley, P. S. Ho. Base-specific binding of copper (II) to Z-DNA. The 1.3-Å single crystal structure of d (m5CGUAm5CG) in the presence of CuCl₂. *J. Biol. Chem*, Vol. 266, no. 30, 1991, pp. 20185-91.
27. S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon and P. G. Schultz. Structure of a Copper-Mediated Base Pair in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 123, 2001, pp.12364–12367.
28. N. H. Campbell, N. H. Karim, G. N. Parkinson, M. Gunaratnam, V. Petrucci, A.K. Todd, R. Vilar, S. Neidle. Molecular basis of structure-activity relationships between salphen metal complexes and human telomeric DNA quadruplexes. *J. Med. Chem.*, Vol. 55, 2012, pp.209-22.
29. R. Galindo-Murillo, L. Ruíz-Azuara, R. Moreno-Esparz and F. Cortés-Guzmán. Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex. *Phys. Chem.*, Vol. 14, 2012, pp.15539-15546.
30. R. Galindo-Murillo, J. Carlos García -Ramos, L. Ruiz-Azuara, T.E. Cheatham and F. Cortés-Guzmán. Intercalation processes of copper complexes in DNA. *Nucl. Acids Res.*, Vol. 43, 2015, pp. 5364-5376.
31. J.C.García-Ramos, R.Galindo-Murillo, F.Cortés-Guzmán, and L.Ruiz-Azuara. Metal-Based Drug-DNA Interactions. *J. Mex. Chem. Soc.* Vol.57, 2013, pp. 245-259.
32. I. Yousuf, F. Arjmand, S. Tabassum, L. Toupet, R.A. Khan, M.A. Siddiqui. Mechanistic insights into a novel chromone-appended Cu(II) anticancer drug entity: in vitro binding profile with DNA/RNA substrates and cytotoxic activity against MCF-7 and HepG2 cancer cells. *Dalton Trans.*, Vol. 44, 2015, pp. 10330-42.
33. H. Richter, E. Fluck, H. Riffel, H. Hess. Tetraphenyl Imidodiphosphate, Salts, and Complexes. *Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie*, Vol. 496, 1983, pp.109-116.
34. A. Silvestru, A. Rotar, J. E. Drake, M. B. Hursthouse, M. E. Light, S.I. Farcas, R. Rosler, C. Silvestru. Synthesis, spectroscopic characterization, and structural studies of new Cu(I) and Cu(II) complexes containing organophosphorus ligands, and crystal structures of (Ph₃P)₂Cu[S₂PMe₂], (Ph₃P)₂Cu[(OPPh₂)₂N], Cu[(OPPh₂)₂N]₂ and

$\text{Cu}[(\text{OPPh}_2)(\text{SPPH}_2)\text{N}]_2$. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*. Vol. 79, 2001, pp. 983-991.

35. H. J. Keller, A. Schmidpeter. Spectroscopic investigation of complex compounds. IX. Electron paramagnetic resonance spectra of imidodiphosphinatocopper(II) chelates. *Anorg. Chem., Org. Chem., Biochem., Biophys., Biol.*, Vol. 22, 1967, pp.231-7.

36. X. Wang, S. C. Xiang, T. L. Sheng, R. B. Fu, Y.M. Li, X.T. Wu. Synthesis and crystal structure of a dinuclear compound $\text{Cu}_2[(\text{O}=\text{PPh}_2)_2\text{N}]_2(\mu\text{-O}_2\text{PPh}_2)_2$. *Chinese Journal of Structural Chemistry*. Vol. 25, 2006, pp.459-464.

37. R. D. Bereman, F. T. Wang, J. Najdzonek, D. M. Braitsch. Stereoelectronic Properties of Metalloenzymes Bis(Imidotetraphenyldithiodiphosphino-S,S')Copper(II) as a Tetrahedral Model for Type-1 Copper(II). *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 98, 1976, pp. 7266-7268.

38. G. P. McQuillan, I. A. Oxtan. Vibrational-spectrum, structure and complex-forming reactions of imidobis(diphenylphosphine sulfide), $(\text{PH}_2\text{PS})_2\text{NH}$. *Inorganica Chimica Acta*, Vol. 29, 1978, pp.69-75.

39. R. Czernuszewicz, E. Maslowsky, K. Nakamoto. Infrared and Raman spectra of bis(imidotetraphenyldithiodiphosphino-S,S') complexes with copper(II), cobalt(II) and iron(II). *Inorg. Chim. Acta*, Vol. 40, 1980, pp.199-202.

40. A. Davison, E. S. Switkes. Stereochemistry of four-coordinate bis(imidodiphosphinato)metal(II) chelate complexes. *Inorg. Chem.*, Vol. 10, 1971, pp. 837-842.

41. D. J. Birdsall, A. M. Z. Slawin, J. D. Woollins. Synthesis and X-ray crystal structure of $[\text{Cu(I)N(R}_2\text{PS)}_2]_3$. *Inorg. Chem.* Vol.38, 1999, pp. 4152-4155.

42. P. Moore, W. Errington, S. P. Sangha. Formation and Dissociation of Tetrahedral Nickel(II) and Cobalt(II) Complexes of 'Dithioimidodiphosphato' Ligands, Measurement of Kinetically Determined Stability Constants, and Kinetic Investigations of the Rapid Formation of Tetrahedral Bis(ligand)copper(II) Complexes and Their Rates of Reduction to Trinuclear Copper(I) Species. *Helvetica Chimica Acta*. Vol. 88, 2005, pp. 782-795.

43. A. Rotar, O. Moldovan, S. I. Farcas, R. A. Varga, C. Silvestru, A. Silvestru. New copper(I) and copper(II) tetraorganodichalcogenoimidodiphosphinates. Crystal and

molecular structure of the first monothioimidodiphosphinato copper(I) complex, $\text{Cu}_4[(\text{OPMe}_2)(\text{SPPH}_2)\text{N}]_4 \cdot 6\text{CH}_2\text{Cl}_2$. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemi.* Vol. 52, no. 1, 2007, pp. 81-89.

44. V. Kumar, T. Ahamad, N. Nishat. Some O,O',O'',O'''-di/tetra arylthioimidophonate transition metal complexes derived from catechol and bisphenol-A as antibacterial and antifungal agents. *Eur. J. Med. Chem.* Vol. 44, no. 2, 2009, pp. 785-793.

45. D. Cupertino, D.J. Birdsall, A.M.Z. Slawin, J.D. Woollins. The preparation and coordination chemistry of $\text{iPr}_2\text{P}(\text{E})\text{NHP}(\text{E}')\text{iPr}_2$ ($\text{E}, \text{E}' = \text{Se}; \text{E} = \text{Se}, \text{E}' = \text{S}; \text{E} = \text{S}, \text{E}' = \text{O}; \text{E}, \text{E}' = \text{O}$). *Inorg. Chim. Acta.* Vol. 290, Jun. 1999, pp.1-7.

46. K. Harata. Structural Aspects of Stereodifferentiation in the Solid State. *Chem. Rev.*, Vol. 98, 1998, pp.1803-1827.

47. L. Stryer. *Βιοχημεία Ι*. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 1997, 2η έκδοση.

48. Π. Κυρίτσης, *Σημειώσεις παραδόσεων μαθημάτων «EPR»*, 2015.

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

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

51. Γ. Θεοδωρίδης, *Φασματομετρία Μαζών σε Ειδικές και Διαχωριστικές Μέθοδοι Ανάλυσης*. Κεφ.12, εκδ. Ζήτη, Θεσσαλονίκη, 2004.

52. H. Chao, W .J. Mei, Q. W. Huang, L. N. Ji. DNA binding studies of ruthenium (II) complexes containing asymmetric tridentate ligands. *J. Biochem.* Vol. 92, 2002, pp.165-170.

53. E. C. Long, J. K. Barton. On demonstrating DNA intercalation. *Acc. Chem. Res.* Vol. 23, 1990, pp. 271-273.

54. V. J. DeRose, S. Burns, N. K. Kim, M. Vogt. RNA and DNA as ligands. *Comprehensive Coordination Chemistry II* , Elsevier Ltd., mpp.787-813, 2003.

55. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc. 2001.

56. A. Chouai, S. E. Wicke, C. Turro, J. Bacsá, K. R. Dunbar, D. Wang, R. P. Thummel. Ruthenium(II) Complexes of 1,12-Diazaperylene and Their Interactions with DNA. *Inorg. Chem.*, Vol.44, 2005, pp. 5996-6003.
57. L. Stryer, *Biochemistry*, 4th ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1995, ch.4 & 31.
58. 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.*, Vol. 63, 2013, pp.800-810. .
59. V. Bloomfield, D. Crothers, I. Jr. Tinoco, *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions*, University Science Books: California, USA, 2000.
60. K. Nakanishi, N. Berova and W. Woody, *CircularDichroism: Principles and Application*, VCH, New York, NY, 1994.
61. V. I. Ivanov, L. E.Minchencova, A.K. Schyolkina. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism, *Biopol.*, Vol.12, no. 1, 1973, pp.89-110.
62. C. A. Sprecher, W. A. Baase and W. C. Johnson, Conformation and circular dichroism of DNA, *Biopol.*, 18, 1979, pp.1009.
63. M. V. Berridge, P. M. Herst, and A. S. Tan. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, *Biotechnol. Annual Review*, Vol. 11, 2005, pp.127-152.
64. S. O'Hare, C. K Atterwill, *Methods in Molecular Biology, In Vitro toxicity testing protocols*, Vol. 43, Humana Press Inc., 1995.
65. 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.*, Vol. 114, 2012, pp.785– 796.
66. 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*, Vol. 92, 2013, pp.307–309.
67. 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*, Vol. 22, 2008, pp.232–239.

68. D. Gerlier, N. Thomasset, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *J. of Immunol. Methods*, Vol. 94, 1986, pp.57-63.
69. 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.*, Vol.113, 2003, pp.211–216.
70. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ, 9 Oct. 2016, www.kyttarometria.gr.
71. Ε. Φερεντίνος, «Δομικές, φασματοσκοπικές και μαγνητικές ιδιότητες συμπλόκων των ιόντων $Fe(III)$, $Co(II)$ και $Cu(II)$ με χηλικούς ιμιδοδιφωσφινικούς υποκαταστάτες (O,O), (O,S) και (O,Se)», Ερευνητική εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Ανόργανη Χημεία και Τεχνολογία, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2006.
72. Ε. Φερεντίνος «Δομικές, φασματοσκοπικές και μαγνητικές ιδιότητες συμπλόκων των στοιχείων Mn , Fe , Co , Ni , Cu , Zn με χηλικούς ιμιδοδιφωσφινικούς υποκαταστάτες», Διδακτορική διατριβή στην Ανόργανη Χημεία και Τεχνολογία, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2011.
73. G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts*, JOHN WILEY & SONS, LTD, Third Edition, 2001.
74. 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.*, Vol. 111, 1989, pp. 3051–3058.
75. 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.*, Vol. 1001, 2011, pp. 104–110.
76. 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.*, Vol. 74, 1993, pp.231-238.
77. 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.*, Vol. 3, 1961, pp. 547-565.
78. W. A. Baase, W. C. Johnson Jr, Circular dichroism and DNA secondary structure, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 6, 1979, pp. 797-814.

79. 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*, Vol. 24, 2008, pp. 1973–1978.
80. A. A. Schilt and R. C. Taylor, Infra-Red Spectra of 1, 10-phenanthroline metal complexes in the rock salt region below 2000 cm^{-1} , *J. Inorg. Nucl. Chem.*, Vol. 9, 1959, pp. 211–221.
81. J. E. Miranda-Calderon, L. Medina-Torres, M. Tinoco-Mendez, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramirez, J. Gracia-Mora, I. Gracia-Mora, M. J. Bernad-Bernad, Characterization of physical interaction between Casiopeina III-ia and chitosan. Toward a Cas III-ia drug delivery system, *Carbohydrate Research*, Vol. 346, 2011, pp. 121–126.
82. A. Tovar-Tovar, Lena Ruiz-Ramirez, A. Campero, A. Romerosa, R. Moreno-Esparza, M. J. Rosales-Hoz, Structural and reactivity studies on 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (CASIOPEINA III-ia) with methionine, by UV–visible and EPR techniques, *J. Inorg. Biochem.*, Vol. 98, 2004, pp. 1045–1053.
83. W.H. Freeman and Company, “*Biochemistry*”, Seventh Edition 2012, 9 Oct. 2016,
<http://oregonstate.edu/instruct/bb450/spring14/lecture/catalyticstrategiesoutline.html>.
84. R. Murugavel, M. Sathiyendiran, R. Pothiraja, R. J. Butcher, O–H Bond elongation in co-ordinated water through intramolecular $\text{P}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}$ bonding. ‘Snapshots’ in phosphate ester hydrolysis, *Chem. Commun.*, Vol. 9, 2003, pp. 2526–2527.
85. S. J. Jennifer, P. T. Muthiah, Synthesis, crystal structures and supramolecular architectures of square pyramidal Cu(II) complexes containing aromatic chelating N,N'-donor ligands, *Chem. Central Journal*, Vol. 8, 2014, pp. 2–29.
86. A. K. Patra, M. Ray, R. Mukherjee, Synthesis, crystal structure and properties of trigonal bipyramidal $[\text{M}(\text{L}^5)_2(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ complexes $[\text{M} = \text{cobalt(II)} (S = 3/2) \text{ or copper(II)} (S = 1/2); \text{HL}^5 = N-(2\text{-chloro-6-methylphenyl})\text{pyridine-2-carboxamide}]$, *J. Chem. Soc.*, Vol. 5, 1999, pp. 2461–2466.
87. I. Ghesner, A. Soran, C. Silvestru, J. E. Drake, Trimethylantimony(V) tetraphenyldichalcogenoimidodiphosphinates. Crystal structure of $\text{Me}_3\text{Sb}[\text{O}-\text{PPh}_2=\text{N}-\text{PPh}_2=\text{S}]_2$, a compound containing true O-monometallic monoconnective phosphorus ligands with XPNPY skeleton, *Polyhedron*, 2003, Vol. 22, 2003, pp. 3395–3401.

88. K. C. Molloy, M. F. Mahon, I. Haiduc, C. Silvestru, Solid state supramolecular structure of (tetraphenyldithioimidodiphosphinato)trimethyltin(IV).benzene, *Polyhedron*, Vol. 14, 1995, pp. 1169-1174.
89. J. Ellermann, W. Bauer, M. Dotzler, F.W. Heinemann, M. Moll, Synthese und Kristallstruktur paramagnetischen fünffach-koordinierten eines Cobalt (III)-Komplexes ausgehend von $\text{Co}_2(\text{CO})_8$, $\text{Ph}_2\text{P}-\text{N}^*\text{PPh}_2$ - $\text{PPh}_2^*\text{N}-\text{PPh}_2$ und Luft, *Monatsh.Chem.* (1999), **130**, 1419-1430.
90. M. C. Aragoni, M. Arca, M. B. Carrea, A. Garau, F. A. Devillanova, F. Isaia, V. Lippolis, G. L. Abbati, F. Demartin, C. Silvestru, S. Demeshko, F. Meyer, Tetrahedral Co(II) complexes with Co_2O and CoO_2S_2 cores. Crystal structures of $\text{Co}\{\text{HN}(\text{OPPh}_2)(\text{SPPH}_2)\text{-O}\}_2\text{I}_2$ and $[\text{Co}\{\text{N}(\text{OPPh}_2)(\text{SPPH}_2)\text{-O,S}\}_2]$, *Eur.J.Inorg.Chem.*, Vol. 29, 2007, pp. 4607-4614.
91. M. B. Smith, A. M. Z. Slawin, Synthesis and structure of platinum(II) complexes with mixed $\text{Ph}_2\text{PNHP}(\text{O})\text{Ph}_2/[\text{Ph}_2\text{PNP}(\text{O})\text{Ph}_2]^-$ or $\text{Ph}_2\text{PC}_6\text{H}_4\text{NH}_2/[\text{Ph}_2\text{PC}_6\text{H}_4\text{NH}]^-$ hybrid ligands: new M–P–N–H...N–P metallacycles, *New J.Chem.* , Vol. **24**, 2000, pp. 65-67.
92. M. B. Smith, A. M. Z. Slawin, New E-unidentate $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{E})\text{Ph}_2]^-$ (E=S or Se) complexes of palladium(II) and platinum(II), *Polyhedron*, Vol. 19, 2000, pp. 695-704.
93. A. M. Z. Slawin, M. B. Smith, Late transition-metal complexes of $[\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{NP}(\text{E})\text{Ph}_2]^-$ (E=S or Se) with a P,N-hybrid ligand: synthesis and structure, *New J.Chem.*, Vol. **23**, 1999, pp. 777-783.
94. H. Pratsinis, D. Kletsas, E. Melliou, I. Chinou, Antiproliferative Activity of Greek Propolis, *J. Med. Food*, Vol. 13, 2010, pp. 286-290.
95. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc. 2001.
96. C. Bailly, C. O. Huigin, R. Houssin, P. Colson, C. Houssier, C. Rivalle, E. Bisagni, J.-P. Henichart, M. Waring, DNA-binding properties of a distamycin-ellipticine hybrid molecule, *Molec. Pharm.*, 41, 1992, pp.845-855.
97. 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.

98. 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.
99. C H. 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.
100. K. E. Reinert, Adenosine thymidine cluster-specific elongation and stiffening of DNA induced by the oligopeptide antibiotic netropsin, *J. Mol. Biol.*, Vol. 72, 1972, pp.593-607.
101. 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.*, Vol. 99, 2005, pp.2299–2307.
102. J. L. Breslof, D. M. Brothers, DNA-ethidium reaction kinetics: Demonstration of direct ligand transfer between DNA binding sites, *J. Mol. Biol.*, Vol. 95, 1975, pp.103-123.
103. 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, Vol. 106, 2002, pp.4838-4843.
104. 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.*, Vol. 111, 1989, pp. 3051–3058.
105. 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.*, Vol. 1001, 2011, pp. 104–110.
106. 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.*, Vol. 55, 2007, pp. 996–1001.
107. Ι. Ρούπα, «Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου του Cu(II) με παράγωγο κουρκουμίνης. Μελέτη αλληλεπίδρασης με CT- DNA και *in vitro* αξιολόγηση της βιολογικής δράσης», Ερευνητική εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην

Ανόργανη Χημεία και Τεχνολογία, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
2015.