



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ $[\text{Ni}(\text{qdt})(\text{dppz})]$. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
ΤΟΥ ΜΕ ΤΟ DNA ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΚΑΙ MDA231

ΜΠΑΛΟΥ ΣΟΦΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ [Ni(qdt)(dppz)]. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕ ΤΟ DNA ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΚΑΙ MDA 231

ΜΠΑΛΟΥ ΣΟΦΙΑ

A.M.: 161810

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΧΡΙΣΤΙΝΑ – ANNA ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
ΧΡΙΣΤΙΝΑ – ANNA ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΜΕΘΕΝΙΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΕΥΘΥΜΙΑΔΟΥ ΕΛΕΝΗ, Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

11/10/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)], όπου ο υποκαταστάτης dppz είναι η διπύριδο [3,2-a:2'.3'-c] φαιναζίνη (dipyrido [3,2-a:2'.3'-c] phenazine), ενώ ο υποκαταστάτης qdt είναι η κινόξαλίνη-2,3-διθειόλη (quinoxaline-2,3-dithiol). Το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπικές τεχνικές όπως UV-Vis φασματοσκοπία απορρόφησης, FT-IR, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπία εκπομπής, κυκλική βολταμμετρία και θερμοστατική ανάλυση. Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο τρόπος αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με φυσικό DNA, από θύμο αδένος βοοειδούς (CT-DNA), με φασματοσκοπία απορρόφησης UV-Vis, φασματοσκοπία εκπομπής, ιξωδομετρία, φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού και κυκλική βολταμμετρία. Επιπλέον μελετήθηκε η ικανότητά του συμπλόκου για φωτο-διάσπαση του DNA με ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης, χρησιμοποιώντας πλασμιδιακό DNA, pBR322. Επιπροσθέτως, εξετάστηκε η κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου του νικελίου, καθώς και των υποκαταστατών με τη χρήση της δοκιμασίας MTT και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το αντικαρκινικό φάρμακο cis-platin.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανόργανη Χημεία, Ανόργανη Βιοχημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Σύμπλοκο Ni(II), DNA δεσμευτικές μελέτες, Κυτταροτοξική Δράση

ABSTRACT

In this thesis, we present the synthesis of the complex [Ni(dppz)(qdt)], where the ligand dppz is the dipyrido [3,2-a:2',3'-c] phenazine and qdt is the ligand quinoxaline-2,3-dithiol. The aforementioned complex was characterized in the laboratory of Inorganic Chemistry by spectroscopic methods such as UV-vis spectroscopy, FT-IR spectroscopy, NMR spectroscopy and fluorescence. It was also characterized by cyclic voltammetry and Thermogravimetric analysis. Moreover, binding of the complex with Calf thymus DNA (C.T.-DNA) has been investigated by UV-visible absorption spectra, Viscosity analysis, Cyclic Voltammetry, Fluorescence and Cyclic Dichroism. DNA cleavage experiments have been also investigated by agarose gel electrophoresis using pBR322 DNA both in dark and after illumination with $\lambda > 400\text{nm}$. Furthermore, MTT assay was used, aiming at the investigation of cell viability after incubation with the complex and the anticancer drug cis-platin.

SUBJECT AREA: Inorganic Chemistry, Inorganic Biochemistry

KEYWORDS: Nickel complex, DNA binding, cell-toxicity

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια μου Χ. Α. Μητσοπούλου, Καθηγήτρια του Τομέα ΙΙΙ του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και Πρόεδρο του τμήματος Χημείας, για την ανάθεση και την επίβλεψη του θέματος της ερευνητικής εργασίας, την επιστημονική της καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το εργαστήριο Ανόργανης Χημείας που με φιλοξένησε όλο αυτό το διάστημα και μπόρεσα να πραγματοποιήσω τα πειράματά μου.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω το ακαδημαϊκό προσωπικό του εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας και ιδιαιτέρως τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μεθενίτη Κωνσταντίνο και την Επίκουρο Καθηγήτρια κ.α. Ευθυμιάδου Ελένη.

Ένα θερμό ευχαριστώ οφείλω στις υποψήφιες διδάκτορες Θεοδοσίου Μαρία και Προκοπίου Δανάη για τη διεξαγωγή των κυτταροτοξικών πειραμάτων στο εργαστήριο Γέλη-Πηκτής του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας, του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, υπό την επίβλεψη της κ. Ευθυμιάδου Ελένης.

Επιπλέον, ευχαριστώ τη Μαυροειδή Βαρβάρα, συνεργαζόμενη ερευνήτρια στο Ινστιτούτο Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων κυκλικού διχρωϊσμού καθώς και την κ.α. Γιαννακοπούλου, ερευνήτρια στο ίδρυμα Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, για τη λήψη των φασμάτων NMR.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διδάκτορα Ζαρκαδούλα Αθανάσιο και τους υποψήφιους διδάκτορες Ιωαννίδη Γεώργιο, Καμάτσο Φώτη, Δρόσου Μαρία και Λιώλη Ευτυχία για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια που μου παρείχαν. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και την υπόλοιπη ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε κατά τη διεξαγωγή της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Τέλος και πάνω από όλα ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένεια μου για την υποστήριξη τους και την συμπαράστασή τους όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	22
1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΤΟ DNA.....	22
1.1 Εισαγωγικά Στοιχεία για το DNA	22
1.2 Τρόποι αλληλεπίδρασης χημικών ενώσεων με το DNA	24
1.2.1 Εισαγωγή.....	24
1.2.2 Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις	25
1.2.3 Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις	28
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	32
3. Φάρμακα που περιέχουν μέταλλα.....	32
2.1 Τα μέταλλα στα βιολογικά συστήματα.....	32
2.2 Φωτοδυναμική θεραπεία.....	34
2.2.1 Εισαγωγή	34
2.2.2 Υπόβαθρο φωτοδυναμικής θεραπείας	36
2.3 Βιομιμητικά μέσα (Biomimetics)[19]	39
2.4 Μέσα απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού (MRI agents).....	39
2.5 Ραδιοδιαγνωστικοί και ραδιοφαρμακευτικοί παράγοντες	41
2.6 Μεταλλικά σύμπλοκα που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία	42
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	43
5. Το νικέλιο στα βιολογικά συστήματα	43
3.1 Εισαγωγή.....	43
3.2 Σημασία του νικελίου στα βιολογικά συστήματα	45

3.2 Μεταβολισμός και τοξικότητα νικελίου/ Μοριακός Μηχανισμός τοξικότητα νικελίου	48
3.3 Σύμπλοκα του νικελίου με βιολογική δράση.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	57
Υλικά και Πειραματικές τεχνικές	57
4.1 Υλικά	57
4.2 Παρασκευή διαλύματος CT-DNA	57
4.3 Παρασκευή Ρυθμιστικών Διαλυμάτων.....	58
4.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	59
4.5 Σύνθεση του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)].....	62
4.6 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου.....	63
4.6 Μελέτη παρακολούθησης του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)] με C.T.-DNA.....	70
4.6.1 Τιτλοδότηση UV-vis.....	73
4.6.2 Ιξωδομετρία.....	76
4.6.3 Φθορισμομετρία	79
4.6.4 Κυκλική βολταμετρία	85
4.6.5 Κυκλικό διχρωισμό	87
4.6.6 Ηλεκτροφορηση	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	92
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ ΜΕ CT-DNA	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	98
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ	98
6.1 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MTT (MTT assay)	98
6.2 Κυτταρικές καλλιέργειες	99

6.2.1 Μέθοδος.....	100
Συμπεράσματα	108
Πίνακας Ορολογίας.....	109
Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια.....	111
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	113

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: (Α) Σύμπλεξη του cisplatin με την έλικα του DNA.....	26
Σχήμα 2: Η δομή του cisplatin και του carbopaltin.....	26
Σχήμα 3: Μουστάρδες αζώτου, Chlorambucil, Melphalan	27
Σχήμα 4: Μεθανοσουλφονικός εστέρας, Busulphan.....	27
Σχήμα 5: Νιτροσοουρία, Carmustine.....	27
Σχήμα 6: Τριαζένια, Dacarbazine	27
Σχήμα 7: Μηχανισμός ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ και Mg^{2+} [5]	29
Σχήμα 8: Δομές της προφλαβίνης (αντιβιοτικό) και της αμασακρίνης (αντικαρκινικό) ...	31
Σχήμα 9: Είσοδος, μεταφορά, δέσμευση και συσσώρευση μετάλλων στα όργανα	33
Σχήμα 10: Η δομή του prosalen	35
Σχήμα 11: Στάδια φωτοδυναμικής θεραπείας	36
Σχήμα 12: Δομή της Photofrin	37
Σχήμα 13: Διάγραμμα Jablonski των φωτοφυσικών διεργασιών δια μέσου φωτοξείδωσης του φωτοευαισθητοποιητή.....	38
Σχήμα 14: Παράγοντες αντίθεσης για απεικόνιση του ήπατος σε υποκατεστημένα άλκυλο σύμπλοκα του γαδολινίου[4, 25, 26].....	40
Σχήμα 15: Χημική δομή του MnDPDP (magnese dipyridolxyl diphosphate (generic name mangafodipir)	41
Σχήμα 16: Βιολογικές διεργασίες εξαρτώμενες από το νικέλιο	48
Σχήμα 17: Οι μοριακές δομές με μεταλλικό κέντρο το νικέλιο.....	51
Σχήμα 18: Δομή του νικελίου με υποκατάστατη salen.....	51
Σχήμα 19: Δομές συμπλόκων του νικελίου (II) όπου παρουσιάζουν ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το DNA	52

Σχήμα 20: Γενικό σχήμα της οξειδωτικής αλκυλίωσης των νουκλεοβάσεων από ενεργά οξειδωτικά μεταλλικά σύμπλοκα.....	53
Σχήμα 21: Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου νικελίου με υποκαταστάτες πυριδίνης, φαινανθρολίνης και διβενζο1,8-ναφθοπυριδίνης	53
Σχήμα 22: Η δομή του συμπλόκου $[NiCR]^{2+}$	54
Σχήμα 23: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4 και pH=5.6 στους 37°C.	58
Σχήμα 24: Φάσμα FT-IR του υποκαταστάτη quinoxaline-2,3-dithiolate σε δισκίο KBr ..	60
Σχήμα 25: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis του υποκαταστάτη quinoxaline-2,3-dithiolate σε διαλύτη DMSO	61
Σχήμα 26: Φάσμα FT-IR του υποκαταστάτη dipyrido[3,2-a;2',3'-c] phenazine σε δισκίο KBr	61
Σχήμα 27: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis του υποκαταστάτη dipyrido[3,2-a;2',3'-c] phenazine σε διαλύτη DMSO	62
Σχήμα 28: Συνθετική πορεία του συμπλόκου	63
Σχήμα 29: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου $[Ni(dppz)(qdt)]$ σε δισκίο KBr	64
Σχήμα 30: Φάσμα NMR του συμπλόκου σε d6-DMSO	65
Σχήμα 31: Φάσμα απορρόφησης του $[Ni(dppz)(qdt)]$ σε διαλύτη DMF	66
Σχήμα 32: Φασματοσκοπική μελέτη του $[Ni(dppz)(qdt)]$ σε διαλύτη DMSO	67
Σχήμα 33: Κυκλικό βολταμογράφημα του συμπλόκου $[Ni(dppz)(qdt)]$ σε διαλύτη DMSO	68
Σχήμα 34: Θερμογράφημα του συμπλόκου $[Ni(dppz)(qdt)]$	69
Σχήμα 35: Φασματοσκοπική μελέτη του συμπλόκου $[Ni(dppz)(qdt)]$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4	70
Σχήμα 36: Φασματοσκοπία απορρόφησης UV-Vis του συμπλόκου $[Ni(dppz)(qdt)]$ σε διάλυμα φωσφορικών pH=5.6	71

Σχήμα 37: Φασματοσκοπική μελέτη UV-Vis του συμπλόκου με DNA σε διάλυμα φωσφορικών σε pH=7.4, 37°C	72
Σχήμα 38: Φασματοσκοπική μελέτη του συμπλόκου με το DNA σε διάλυμα φωσφορικών pH=7.4, 37°C.....	72
Σχήμα 39: Φάσμα τιτλοδότησης [Ni(dppz)(qdt)] σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4, 37°C.....	74
Σχήμα 40: Φάσμα τιτλοδότησης του [Ni(dppz)(qdt)] σε διαλύτη ρυθμιστικών pH=5.8, στους 37°C	75
Σχήμα 41: Μεταβολή του $L/L_0 = (n/n_0)^{1/3}$ συναρτήση του λόγου R, $\theta=37^\circ\text{C}$, pH=7.4.....	78
Σχήμα 42: Μεταβολή του $L/L_0 = (n/n_0)^{1/3}$ συναρτήση του λόγου R, $\theta=37^\circ\text{C}$, pH=5.8.....	79
Σχήμα 43: Φάσμα εκπομπής του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)] σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=5.8	80
Σχήμα 44: Φάσμα εκπομπής του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)] σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.4	81
Σχήμα 45: Απόσβεση του φθορισμού του EB αυξανόμενης της συγκέντρωσης του [Ni(dppz)(qdt)] σε pH=5.8.....	83
Σχήμα 46: Γραφική παράσταση του λόγου I_0/I συναρτήσεως της συγκέντρωσης του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)] σε pH=5.8.....	83
Σχήμα 47: Απόσβεση του φθορισμού του EB αυξανόμενης της συγκέντρωσης του [Ni(dppz)(qdt)] σε pH=7.4.....	84
Σχήμα 48: Γραφική παράσταση του λόγου I_0/I συναρτήσεως της συγκέντρωσης του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)] σε pH=7.4.....	84
Σχήμα 49: Κυκλικό βολταμμογράφημα του [Ni(dppz)(qdt)] σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία DNA σε pH=7.4	86
Σχήμα 50: Κυκλικό βολταμμογράφημα του [Ni(dppz)(qdt)] σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία DNA σε pH=5.8.....	87
Σχήμα 51: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού του συμπλόκου με το C.T. DNA σε pH 5.8	88

Σχήμα 52: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού του συμπλόκου με το C.T. DNA σε pH 7.4	88
Σχήμα 53: Φασματοσκοπική μελέτη του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)] σε buffer tris-HCl, pH=7.4, 25°C.....	90
Σχήμα 54: Φασματοσκοπική μελέτη του υποκαταστάτη qdt σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4, 37°C.....	92
Σχήμα 55: Φασματοσκοπική μελέτη του υποκαταστάτη qdt σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=5.6, 37°C.....	93
Σχήμα 56: Φασματοσκοπική μελέτη του υποκαταστάτη dppz σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4, 37°C.....	94
Σχήμα 57: Φασματοσκοπική μελέτη του υποκαταστάτη dppz σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=5.6, 37°C.....	95
Σχήμα 58: Φάσμα αποδιέγερσης του υποκαταστάτη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH=7.4, 37°C.....	95
Σχήμα 59: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του υποκαταστάτη qdt σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.4	96
Σχήμα 60: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του υποκαταστάτη qdt σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=5.6.....	97
Σχήμα 61: Αντίδραση μετατροπής του MTT σε φορμαζάνη από το ένζυμο αφυδρογενάση	99
Σχήμα 62: Φασματοσκοπική παρακολούθηση του συμπλόκου σε θρεπτικό υλικό DMEM στους 37°C.....	101
Σχήμα 63: Επίδραση των υποκαταστατών dppz, qdt έναντι της καρκινικής σειράς MCF7.	102
Σχήμα 64: Επίδραση των υποκαταστατών dppz, qdt έναντι της καρκινικής σειράς MDA 231	102
Σχήμα 65: Επίδραση του NiCl ₂ και του [Ni(dppz)(qdt)] έναντι της καρκινικής σειράς MCF7	103

Σχήμα 66: Επίδραση του NiCl_2 και του $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ έναντι της καρκινικής σειράς MDA231	103
Σχήμα 67: Επίδραση του υποκαταστάτη qdt έναντι των καρκινικών σειρών	104
Σχήμα 68: Επίδραση του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ έναντι των καρκινικών σειρών..	105
Σχήμα 69: Επίδραση των υποκαταστατών qdt, dppz και του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ έναντι της καρκινικής σειράς MCF7	105
Σχήμα 70: Επίδραση των υποκαταστατών qdt, dppz και του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ έναντι της καρκινικής σειράς MDA 231	106

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Οι τρεις διαμορφώσεις A-, B-, Z- του DNA.....	22
Εικόνα 2: Δέσμευση μορίου στην μικρή αύλακα του DNA.....	30
Εικόνα 3: Παρεμβολή μορίου στο DNA	31
Εικόνα 4: Εικόνα ηλεκτροφόρησης του συμπλόκου με πλασμίδιο PBR322	91

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Δομικά χαρακτηριστικά και παράμετροι των τριών διαμορφώσεων του DNA	23
Πίνακας 2: Σύμπλοκα του νικελίου με βιολογική δράση	55
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικός πίνακας δονήσεων και τάσεων του qdt	60
Πίνακας 4: Χαρακτηριστικός πίνακας δονήσεων και τάσεων του υποκαταστάτη dppz	62
Πίνακας 5: Χαρακτηριστικός πίνακας δονήσεων και τάσεων του συμπλόκου	64
Πίνακας 6: Πίνακας χαρακτηριστικών μεταωπίσεων του $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$	65
Πίνακας 7: In vitro δραστηριότητα του συμπλόκου και των υποκαταστατών έναντι της καρκινικής σειράς MCF7 (τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC_{50} μM)	107
Πίνακας 8: In vitro δραστηριότητα του συμπλόκου και των υποκαταστατών έναντι της καρκινικής σειράς MDA231 (τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC_{50} μM)	107

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η φαρμακευτική ανόργανη χημεία χρησιμοποιείται για περισσότερο από 5000 χρόνια. Το 3000 π.Χ. οι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν το χαλκό για να αποστειρώσουν το νερό, ενώ η ιατρική χρήση του χρυσού ήταν γνωστή στην Αραβία και στην Κίνα από το 2000 π.Χ.. Ο Ιπποκράτης χρησιμοποίησε ως φάρμακο τον υδράργυρο, ενώ τα χλωρίδια του υδραργύρου χρησιμοποιήθηκαν ως διουρητικά στην εποχή της Αναγέννησης στην Ευρώπη. Ο Ehrlich, στις αρχές του 20^{ου} αιώνα έδωσε εκ νέου ώθηση στη χρήση μετάλλο-ενώσεων στην ιατρική, μετά την ανακάλυψη της οργανομεταλλικής ένωσης του αρσενικού Salvarsan ως φάρμακο για τη θεραπεία της σύφιλης. Συγχρόνως και άλλες ενώσεις μετάλλων χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών, όπως του χρυσού για τη φυματίωση και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

Οι φαρμακευτικές ενώσεις μπορούν να περιέχουν είτε χημικά στοιχεία απαραίτητα για τη ζωή, είτε μη απαραίτητα ή τοξικά στοιχεία, τα οποία επιτελούν συγκεκριμένο φαρμακευτικό σκοπό. Το 1991 ο Sadler κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα περισσότερα στοιχεία στον περιοδικό πίνακα μπορούν να χρησιμοποιηθούν δυνητικά ως φάρμακα ή ως διαγνωστικά μέσα.

Τις τελευταίες δεκαετίες η ανάπτυξη της Ανόργανης Βιολογικής Χημείας ωθείται από παράγοντες όπως:

- Η κατανόηση του τρόπου αλληλεπίδρασης των μεταλλικών ιόντων με τα πεπτίδια, τα νουκλεϊκά οξέα, τις πρωτεΐνες, τις βιταμίνες
- Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα μεταλλικά ιόντα απορροφώνται, μεταφέρονται, μεταβολίζονται καθώς και την τοξικότητά τους
- Ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη μεταλλοφαρμάκων
- Ο σχεδιασμός και η σύνθεση βιομιμικών συστημάτων προκειμένου να κατανοηθούν διάφορες βιολογικές διεργασίες, για τη δημιουργία πιο αποτελεσματικών καταλυτών
- Η καλύτερη απεικόνιση δομών όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και άλλων βιομορίων

- Η χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών, οι οποίες θα επιτρέπουν τη μελέτη των δομών και των δυναμικών των βιολογικών διεργασιών

Η συνεισφορά γενικότερα των μετάλλων στη λειτουργία του οργανισμού είναι ζωτικής σημασίας είτε αυτά είναι απαραίτητα σε μεγάλες ποσότητες είτε ως ιχνοστοιχεία. Επίσης, ιδιαίτερης σημασίας αποτελεί η συμπλοκοποίηση τους με φαρμακευτικές ουσίες προκειμένου να εκδηλωθεί ή και να βελτιωθεί η δράση των τελευταίων. Η δράση των περισσότερων αντικαρκινικών ουσιών είναι συνδεδεμένη με την αλληλεπίδραση τους με το DNA. Η αλληλεπίδραση των μεταλλικών κέντρων με οργανικά παράγωγα μπορεί να δώσει νέα σύμπλοκα με ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Το μεταλλικό ιόν μπορεί να συμμετέχει στη σύνδεση του υποκαταστάτη με το DNA κάνοντας πιο αποτελεσματική τη δράση του, να σταθεροποιεί το οργανικό παράγωγο ή ακόμη και να μειώσει την τοξικότητα του. Επιπλέον, στην περίπτωση που τα μεταλλικά κέντρα παρουσιάζουν και αντικαρκινική δράση, ο συνδυασμός δύο διαφορετικών βιολογικών μηχανισμών σε ένα απλό μόριο λειτουργώντας συνεργιστικά είναι πιθανό να αυξήσει τη δραστηριότητα και να διευρύνει το φάσμα δράσης τέτοιων συμπλόκων.

Στόχος λοιπόν, στην παρούσα ερευνητική εργασία είναι ο σχεδιασμός νέου συμπλόκου του νικελίου που να αλληλεπιδρά με το μόριο του DNA και η διερεύνηση πιθανών χημειοθεραπευτικών του ιδιοτήτων. Επιπλέον μελετήθηκε η ικανότητα του στη φωτοεπαγόμενη διάσπαση του νουκλεϊνικού οξέος, ενώ μελετήθηκε και η *in vitro* αντικαρκινική του δράση έναντι δύο καρκινικών σειρών ανθρώπινης προέλευσης. Ως υποκαταστάτες επιλέχθηκαν τα επίπεδα μόρια του dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine (dppz) και της quinoxaline-2,3-dithiol (qdt). Ο υποκαταστάτης dppz έχει μελετηθεί ως προς τη βιολογική του δράση με άλλα ακριβότερα μεταλλικά ιόντα, οπότε στόχος μας ήταν να δούμε εάν ενισχύεται ή όχι η αντικαρκινική του δράση με ένα φθηνότερο και ποιο άφθονο σε περιεκτικότητα στη γη μέταλλο όπως είναι το νικέλιο. Επιπλέον είναι γνωστά διάφορα σύμπλοκα κιννοξαλινών με αντικαρκινική και αντιμικροβιακή δράση, οπότε διαλέξαμε ένα παράγωγο κιννοξαλίνης που δεν έχει μελετηθεί η δράση του και που για μας θα ήταν μια πρόκληση.

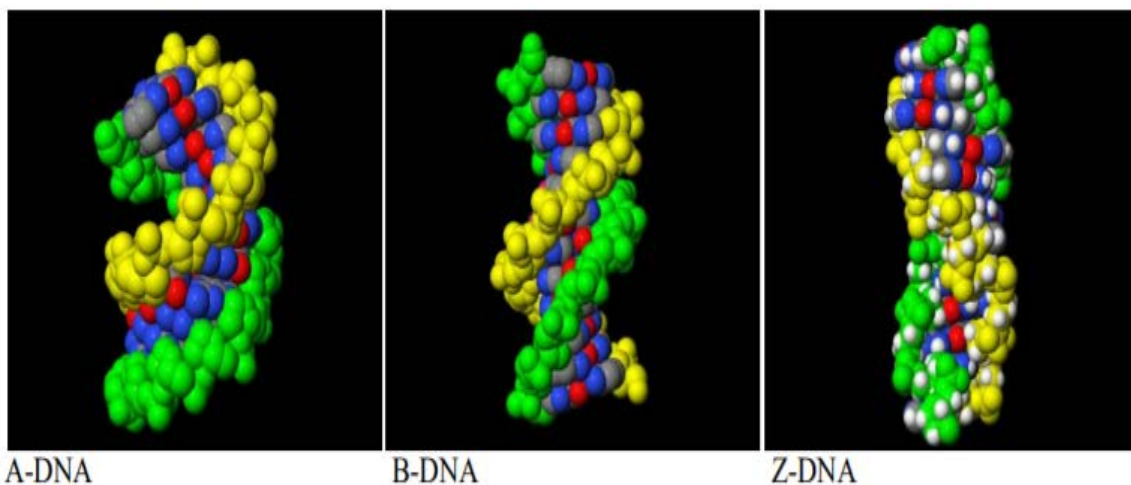
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΤΟ DNA

1.1 Εισαγωγικά Στοιχεία για το DNA

Το δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (Deoxyribonucleic acid, DNA) είναι ένα βιοπολυμερές που περιέχει τις γενετικές πληροφορίες που καθορίζουν τη βιολογική ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής και των περισσότερων ιών. Το DNA είναι ο φορέας των γενετικών πληροφοριών, όχι μόνο με την έννοια της μεταβίβασης των χαρακτηριστικών, αναλλοίωτων από γενιά σε γενιά, αλλά και της ρύθμισης και της εξειδίκευσης κάθε κυττάρου για την επιτέλεση των ιδιαίτερων λειτουργιών του. Αξίζει να σημειωθεί ότι το DNA επιτρέπει τη δημιουργία γενετικής ποικιλότητας, υφιστάμενο τις μεταλλάξεις.

Η δομή του προτάθηκε από τους δύο Βρετανούς ερευνητές James D. Watson και Francis Crick το 1953, οι οποίοι πρότειναν το μοντέλο της διπλής έλικας, αναλύοντας αφυδατωμένες ίνες του DNA μέσω περίθλασης ακτίνων Χ. Το DNA μπορεί να απαντηθεί σε πολλές διαμορφώσεις, παρ' όλα αυτά μόνο τρεις διαμορφώσεις έχουν παρατηρηθεί στους οργανισμούς, οι A-, B-, Z- μορφές (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Οι τρεις διαμορφώσεις A-, B-, Z- του DNA.

Η διαμόρφωση του DNA εξαρτάται από την ακολουθία των βάσεων, το μέγεθος και τη διεύθυνση της υπερελίκωσης, από τις χημικές τροποποιήσεις των βάσεων, τις συνθήκες του διαλύματος όπως τη συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων. Η B- διαμόρφωση απαντάται πιο συχνά στα κύτταρα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε νερό. Η A- διαμόρφωση παρατηρείται κυρίως κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες σε αφυδατωμένα δείγματα, ενώ η Z-μορφή παρατηρείται σε περιπτώσεις όπου τμήματα του DNA έχουν υποστεί χημική τροποποίηση με μεθυλίωση. Δύο από αυτές είναι δεξιόστροφες (A-DNA και B-DNA) και μια αριστερόστροφη (Z-DNA). Οι δεξιόστροφες έλικες διαφέρουν:

- Στην απόσταση που απαιτείται για να γίνει μία πλήρη στροφή έλικας
- Στον τρόπο που οι σακχαρικές ομάδες «λυγίζουν» ή «ζευγαρώνουν»
- Στη γωνία που σχηματίζουν τα ζευγάρια με τον ελικοειδή άξονα
- Στις διαστάσεις των αυλάκων

Πίνακας 1: Δομικά χαρακτηριστικά και παράμετροι των τριών διαμορφώσεων του DNA

ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ	A	B	Z
Σχήμα	Ευρύ	Κανονικό	Επιμηκυμένο
Απόσταση μεταξύ διαδοχικών βάσεων	2.3 Å	3.4 Å	3.8 Å
Διάμετρος της έλικας	25.5 Å	23.7 Å	18.4 Å
Στροφή	Δεξιόστροφη	Δεξιόστροφη	Αριστερόστροφη
Ζεύγη βάσεων ανά στροφή έλικας	11	10.4	12

Απόκλιση από τον κανονικό άξονα της έλικας	19°	1°	9°
Κύρια αύλακα	Στενή και βαθιά	Ευρεία και βαθιά	Επίπεδη
Δευτερεύουσα αύλακα	Ευρεία και ρηχή	Στενή και βαθιά	Στενή και βαθιά
Γλυκοζιτικός δεσμός	Κατεύθυνση anti	Κατεύθυνση anti	Κατεύθυνση anti στις πυριμιδίνες και syn στις πουρίνες

1.2 Τρόποι αλληλεπίδρασης χημικών ενώσεων με το DNA

1.2.1 Εισαγωγή

Η μεγάλη σημασία του DNA για τη ζωή έχει καταστήσει αυτό το πολυνουκλεοτιδικής φύσης μακρομόριο σημαντικότερο στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων. Τα φάρμακα που στοχεύουν το DNA μπορούν να δράσουν κατά δύο τρόπους. Ο ένας είναι να αναστέλλουν τη σύνθεση του DNA και γενικότερα των νουκλεϊνικών οξέων, τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας χαρακτηρίζονται ως αντιμεταβολίτες και αναστολείς ενζύμων. Ο δεύτερος είναι να αλληλεπιδρούν με τα υπάρχοντα νουκλεϊνικά οξέα με διάφορους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης. Το μόριο του DNA δύναται να αλληλοεπιδράσει με διάφορες ενώσεις λόγω της ποικιλομορφίας του ως προς τα δομικά του χαρακτηριστικά, καθώς και ως προς τις χημικές ομάδες που διαθέτει. Έτσι το μόριο εμφανίζει τρεις ομάδες ικανές για σύνδεση με μέταλλα, τις φωσφορικές ομάδες, τα σάκχαρα και τις ετεροκυκλικές βάσεις. Τα μόρια που αλληλεπιδρούν μπορούν να εμφανίσουν εκλεκτικότητα ως προς την εκάστοτε ακολουθία βάσεων ή να δράσουν

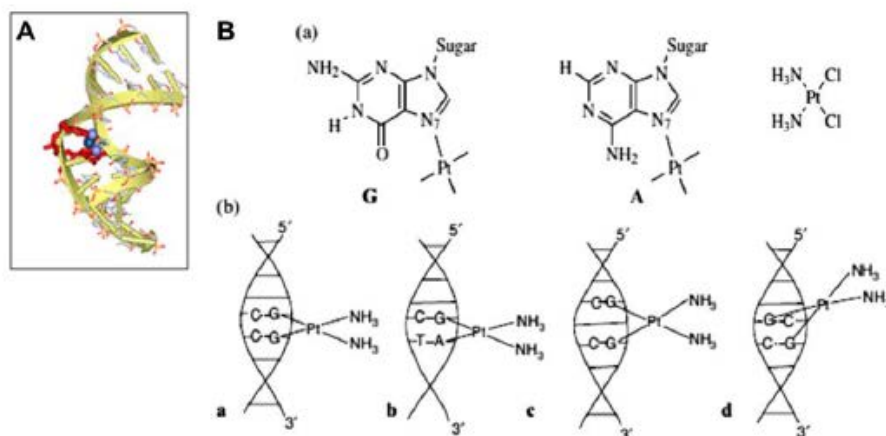
ανεξάρτητα σε οποιοδήποτε σημείο κατά μήκος του μακρομορίου. Η σύμπλεξη αυτή με το DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τρόπο μη αντιστρεπτό είτε αντιστρεπτά, όπου η πρώτη περίπτωση συνεπάγεται τη δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού. Παραδείγματα μόνιμων δεσμεύσεων με το DNA αποτελούν τόσο ισχυρές καρκινογόνες ουσίες, όπως η αφλατοξίνη B1, όσο και φάρμακα κατά των καρκινικών όγκων όπως το cisplatin. Η αντιστρέψιμη σύνδεση στο νουκλεϊκό οξύ περιλαμβάνει μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, συνήθως ηλεκτροστατικής φύσης μέσω της κύριας ή δευτερεύουσας αύλακας, π-π αλληλεπιδράσεις, δεσμοί Van der Waals.

1.2.2 Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

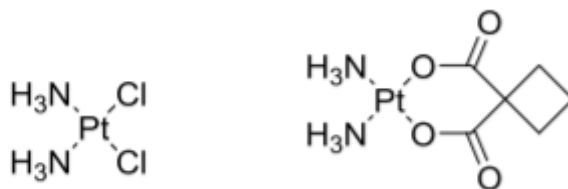
Ο ομοιοπολικός τρόπος σύμπλεξης ενός μορίου με το βιοπολυμερές είναι μη αντιστρέψιμος και αμετάβλητος προκαλώντας την πλήρη αναστολή των διεργασιών του. Το κύριο πλεονέκτημα του συγκεκριμένου τρόπου αλληλεπίδρασης είναι η υψηλή δεσμευτική ισχύ. Ομοιοπολική αλληλεπίδραση μπορεί να επιτευχθεί μέσω αλκυλιωτικών παραγόντων ή μέσω αντίδρασης με μεταλλικά ιόντα. Επίσης, ογκώδη μόρια που συνδέονται μέσω ομοιοπολικών δεσμών είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην αλλοίωση της ραχοκοκαλιάς του DNA, η οποία με τη σειρά της μπορεί να επηρεάσει τόσο την αντιγραφή όσο και την μεταγραφή[1].

Όσον αφορά τη δράση των αλκυλιωτικών παραγόντων, αυτοί μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς είτε ανάμεσα στην ίδια αλυσίδα (intrastrand), είτε στις δύο αλυσίδες (intrestrand link), διότι μπορούν να δημιουργήσουν ένα ισχυρό δραστικό ηλεκτρονιόφιλο σύστημα. Στην πρώτη περίπτωση σχηματίζεται μια γέφυρα ανάμεσα σε δύο μέρη της ίδιας αλυσίδας, αυτό έχει σαν συνέπεια τη στρέβλωση της αλυσίδας και αναστολή της μεταγραφής. Στη δεύτερη περίπτωση σχηματίζονται δεσμοί ανάμεσα στις δύο διαφορετικές αλυσίδες με αποτέλεσμα να συγκρατούνται σταθερά μεταξύ τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πολύ γνωστό για την αντικαρκινική του δράση σύμπλοκο του λευκοχρύσου $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ (cisplatin), το οποίο αποβάλλει δύο ιόντα χλωρίου όταν υδρολυθεί και αντικαθίστανται από τα άτομα αζώτου N7 της γουανίνης, προκαλώντας κάμψη 26° στην κύρια αύλακα του DNA. Συγκεκριμένα τα αντικαρκινικά

φάρμακα που ακολουθούν αυτό τον τρόπο ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης πιστεύεται ότι αντιδρούν κυρίως με τη θέση N7 της γουανίνης στη διπλή αλυσίδα του DNA σχηματίζοντας χιαστές συνδέσεις (cross linking). Έχουν μελετηθεί πολλά ανάλογα σύμπλοκα του λευκοχρύσου, ένα από αυτά είναι το carboplatin[1], όπου αποτελεί σημαντικότερο φάρμακο για την καταπολέμηση καρκίνου των ωοθηκών και των όρχεων.

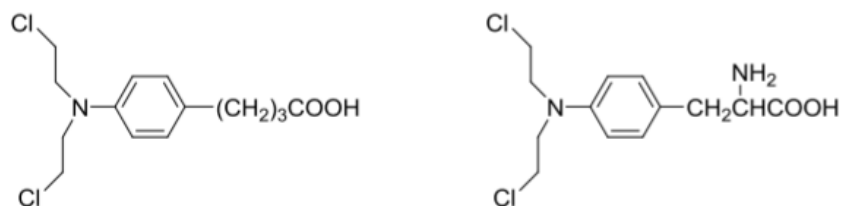


Σχήμα 1: (Α) Σύμπλεξη του cisplatin με την έλικα του DNA
(Β) Τρόποι σύνδεσης του cisplatin με τη γουανίνη και την αδενίνη

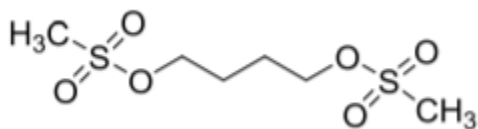


Σχήμα 2: Η δομή του cisplatin και του carboplatin

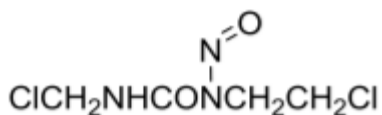
Έχουν βρεθεί και άλλες ενώσεις που δρουν ως αλκυλιωτικοί παράγοντες όπως οι μουστάρδες αζώτου και θείου, οι μεθανοσουλφονικοί εστέρες, οι νιτροσοουρίες και τα τριαζένια.



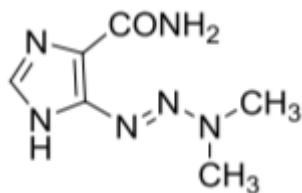
Σχήμα 3: Μουστάρδες αζώτου, Chlorambucil, Melphalan



Σχήμα 4: Μεθανοσουλφονικός εστέρας, Busulphan



Σχήμα 5: Νιτροσοουρία, Carmustine.



Σχήμα 6: Τριαζένια, Dacarbazine

Ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το μόριο του DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω ιόντων μετάλλων[2]. Οι βάσεις των νουκλεοτιδίων μπορούν να δράσουν ως υποκαταστάτες σε σύμπλοκα μετάλλων μεταπτώσεως[3], όταν αυτά βρεθούν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις στο περιβάλλον του DNA. Οι θέσεις N7 της γουανίνης και της

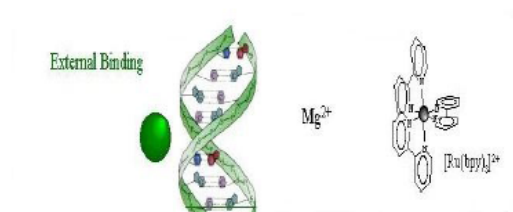
αδενίνης στην μεγάλη αύλακα, καθώς και η N3 της αδενίνης και το O3 της θυμίνης στη μικρή αύλακα είναι προσβάσιμες από τα μεταλλικά ιόντα. Η σταθεροποίηση του DNA εξαρτάται από την συγκέντρωση των ιόντων, δηλαδή χαμηλή συγκέντρωση οδηγεί σε σταθεροποίησή του, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις μεταλλικών ιόντων έχουν ως αποτέλεσμα την αποέλιξη της έλικας[3].

1.2.3 Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

Στην περίπτωση των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνονται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, η παρεμβολή (intercalation) που πραγματοποιείται με την εισχώρηση των αρωματικών ετεροκυκλικών δακτυλίων των υποκαταστατών μεταξύ των βάσεων του DNA και την επιφανειακή συναρμογή τους στην εξωτερική πλευρά της έλικας του DNA μέσω της κύριας ή δευτερεύουσας αύλακας. Γενικά, οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις συμπεριλαμβανομένων και της υδρόφοβης επίδρασης οδηγούν σε σταθεροποίηση της διπλής έλικας του DNA[1, 3].

1.2.3.1 Μοντέλο εξωτερικής συναρμογής (external binding)

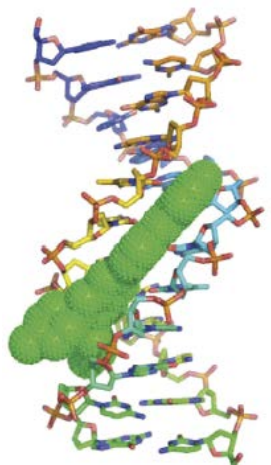
Αυτός ο τρόπος αλληλεπίδρασης είναι κυρίως ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης[1, 4]. Έχει παρατηρηθεί ότι επειδή οι φωσφορικές ομάδες φορτίζουν αρνητικά τον εξωτερικό σκελετό του DNA, η αλληλεπίδραση εξαρτάται από τις ιοντικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των αντίθετων φορτίων. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι λοιπόν, η ύπαρξη θετικού φορτίου στη χημική ένωση[5]. Παραδείγματα τέτοιου είδους αλληλεπίδρασης αποτελούν τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) και το σύμπλοκο του ρουθενίου (II) $[Ru(bipy)_3]^{2+}$.



Σχήμα 7: Μηχανισμός ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ και Mg^{2+} [5]

1.2.3.2 Μοντέλο συναρμογής στις αύλακες

Η συναρμογή στις αύλακες δεν απαιτεί μεγάλες δομικές αλλαγές στο μόριο του DNA. Θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι αυτό το είδος αλληλεπίδρασης μοιάζει με το μοντέλο σύνδεσης κλειδιού-κλειδαριάς[1] (Εικόνα 2). Ο συγκεκριμένος τρόπος σύνδεσης σταθεροποιείται με διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, ενώ δεν απαιτείται καθόλου ενεργειακό κόστος[6] για τη δημιουργία θέσης δέσμευσης[5] και γι' αυτό εμφανίζουν πολύ μεγάλη σταθερά σύνδεσης, περίπου $10^{11}M^{-1}$. Το μοντέλο συναρμογής στην αύλακα περιλαμβάνει δύο στάδια[2]. Πρώτα απ' όλα λαμβάνει χώρα υδρόφοβη μετακίνηση του υποκαταστάτη από το διάλυμα προς την έλικα και σε δεύτερο στάδιο αναπτύσσονται μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις όπως δεσμοί υδρογόνου με τα ζεύγη βάσεων αδεΐνης-θυμίνης και δεσμοί Van der Waals με τα τοιχώματα της αύλακας[4]. Σημαντικό χαρακτηριστικό των ενώσεων αυτών είναι ότι μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να έχουν υψηλό βαθμό αναγνώρισης ακολουθίας νουκλεϊκών οξέων. Γεωμετρικοί και στερεοχημικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο[1].

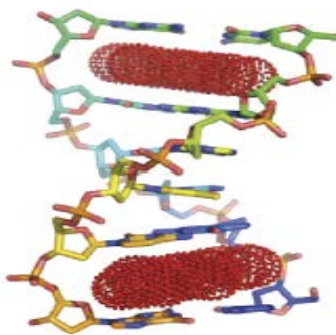


Εικόνα 2: Δέσμευση μορίου στην μικρή αύλακα του DNA

1.2.3.3 Μοντέλο παρεμβολής

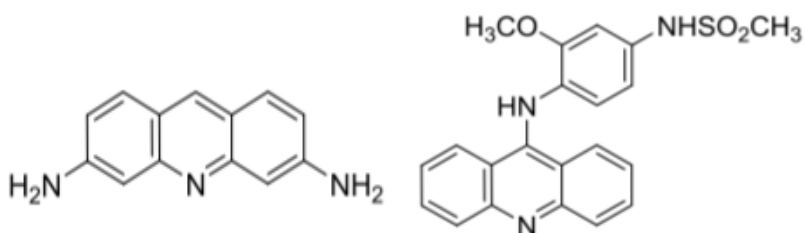
Ένας επιπλέον μηχανισμός μη ομοιοπολικής σύνδεσης των μορίων, είναι η παρεμβολή (intercalation), δηλαδή όταν ένα φάρμακο ή ένας μεταλλαξιογόνος παράγοντας μπορέσει να παρενυρεθεί ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων ενός πολυνουκλεοτιδίου (Εικόνα 3). Το αποτέλεσμα της παρεμβολής είναι η αναστολή της αντιγραφής εμποδίζοντας την πορεία αναδιπλασιασμού του κυττάρου. Γενικά επίπεδα συμπυκνωμένα αρωματικά ή ετεροαρωματικά μόρια μπορούν να προσδένονται στο DNA με εισαγωγή και επιστοίβαση ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων[1]. Όταν ένα μόριο παρεμβάλλεται δεν καταστρέφει τους δεσμούς υδρογόνου της διπλής έλικας του DNA, καταστρέφει όμως την κανονική δομή της, ξεδιπλώνοντας το DNA στο σημείο πρόσδεσης, πράγμα που επηρεάζει τη δραστικότητα ενζύμων, όπως οι DNA τοποϊσομεράσες και οι DNA πολυμεράσες[4]. Παρ' όλο που απαιτείται σημαντικό ενεργειακό ποσό για τη δημιουργία κοιλότητας παρεμβολής[6], η συνεισφορά από υδρόφοβες, ιοντικές και Van der Waals αλληλεπιδράσεις, καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου, έχουν σαν αποτέλεσμα η σταθερά σύνδεσης συμπλόκου φαρμάκου να κυμαίνεται από 10^5 - 10^{11} M^{-1} [2, 7]. Η παρεμβολή περιορίζεται από την αρχή του αποκλεισμού των γειτονικών θέσεων (neighbor exclusive principle), η οποία αναφέρει ότι τα μόρια του φαρμάκου δεν μπορούν να καταλάβουν δύο διαδοχικές θέσεις[1, 7]. Αυτό σημαίνει ότι

όταν ένα μόριο παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA, αποκλείει τη σύνδεση άλλου μορίου στις γειτονικές θέσεις[8].



Εικόνα 3: Παρεμβολή μορίου στο DNA

Παραδείγματα τέτοιων φαρμάκων είναι η προφλαβίνη (proflavine), η αμασακρίνη (amasaacrine) που όπως φαίνονται από τις δομές τους, χαρακτηρίζονται από επίπεδα αρωματικά συστήματα[7].



Σχήμα 8: Δομές της προφλαβίνης (αντιβιοτικό) και της αμασακρίνης (αντικαρκινικό)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Φάρμακα που περιέχουν μέταλλα

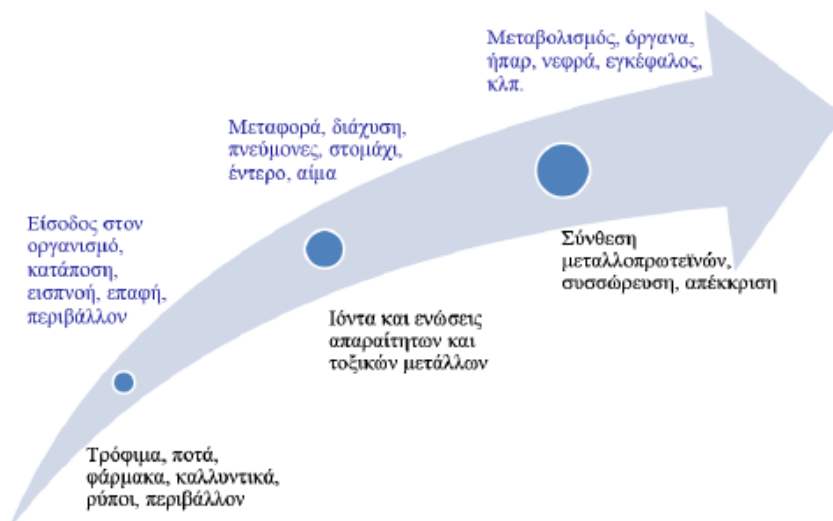
2.1 Τα μέταλλα στα βιολογικά συστήματα

Τα μέταλλα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα. Από τα μεταλλικά στοιχεία άλλα είναι κύρια και βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (μακροστοιχεία) όπως Ca, Na, K, Mg, ενώ άλλα είναι δευτερεύοντα (ιχνοστοιχεία) όπως ο Fe, Zn, Cu. Τα μέταλλα, ανάλογα με τις δράσεις τους, μπορούμε να τα ταξινομήσουμε σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες:

- Απαραίτητα μέταλλα στον οργανισμό (essential elements). Κάποια από αυτά είναι αναγκαία σε μεγάλες συγκεντρώσεις (π.χ. νάτριο, ασβέστιο) και άλλα είναι απαραίτητα σε μικρότερες συγκεντρώσεις (π.χ. σίδηρος, σελήνιο), αλλά είναι τοξικά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.
- Τοξικά μέταλλα στον οργανισμό (toxic elements). Μέταλλα τα οποία είναι επιβλαβή σχεδόν για όλους τους οργανισμούς όπως ο υδράργυρος. Αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν και μέταλλα που δεν είναι απαραίτητα και δεν είναι ιδιαιτέρως τοξικά για τον οργανισμό, όπως το πυρίτιο, το τιτάνιο, αυτά χαρακτηρίζονται ως μη ουσιώδη (non-essentials).
- Μεταλλοφάρμακα (metallo drugs). Η χρήση μετάλλων που εισάγονται στον οργανισμό στα πλαίσια της ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης είναι σημαντική και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων όπως ως αντιελκωτικά, για νευροεκφυλιστικές ασθένειες και ως χημειοθεραπευτικά. Επιπλέον πολλά μέταλλα χρησιμοποιούνται και σε σκευάσματα συμπληρωμάτων διατροφής (πολυβιταμινούχα σκευάσματα).
- Μέταλλα με άλλες ιατρικές εφαρμογές. Η χρήση μετάλλων, είτε σε μορφή αλάτων είτε ως οργανομεταλλικές ενώσεις σε διαγνωστικές τεχνικές, σκιαγραφικά μέσα,

ακόμη και ως μεταλλικά υλικά και κράματα σε προσθετικές τεχνικές τόσο στην ορθοπεδική όσο στη χειρουργική και στην οδοντιατρική, είναι ευρεία.

Οι τρόποι εισόδου των τοξικών αλλά και των απαραίτητων μετάλλων φαίνονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 9).



Εικόνα 4: Είσοδος, μεταφορά, δέσμευση και συσσώρευση μετάλλων στα όργανα

Η τοξική δράση των μετάλλων μπορεί να εκδηλωθεί με διαφορετικούς μηχανισμούς που αρχίζουν με την πρόκληση οξειδωτικού στρες, την απελευθέρωση ενεργού οξυγόνου, υπεροξειδίων και σουπεροξειδικών ριζών και φθάνουν μέχρι την παρεμβολή του μετάλλου σε διαδικασίες αντιγραφής, μεταγραφής του DNA και την πρόκληση γενετικών ανωμαλιών[9].

Η ανάπτυξη, λοιπόν, νέων φαρμακευτικών προϊόντων μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω της κατανόησης του τρόπου δράσης σε μοριακό επίπεδο των φαρμάκων. Πρέπει να μελετηθεί η (βιο)χημεία των μεταλλικών συμπλόκων, δηλαδή οι χημικές και φυσικές ιδιότητες των θερμοδυναμικά σταθερών προϊόντων, οι κινητικοί μηχανισμοί και η οξειδοαναγωγική δράση[2]. Μετά την ανακάλυψη της αντικαρκινικής δράση των συμπλόκων του λευκοχρύσου και άλλων μεταλλικών συμπλόκων, η ανόργανη φαρμακευτική χημεία άνοιξε το δρόμο για την ανακάλυψη φαρμάκων με νέους

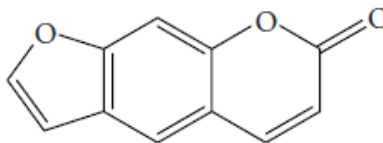
μηχανισμούς δράσης[9] όπως συμπληρώματα θεμελιωδών μεταλλικών στοιχείων (π.χ. Fe, Cu, Zn, Se), διαγνωστικά μέσα (π.χ. Gd, Fe, Mn), ενζυμικοί αναστολείς, θεραπευτικά μέσα (π.χ. Pt, Au, Bi, Ga), ραδιοφάρμακα (που εκπέμπουν ακτίνες γ για διαγνωστική απεικόνιση π.χ. ^{92m}Tc , ^{201}Tl , ^{111}Ga , ^{53}Co , ή εκπέμπουν ακτίνες β για θεραπευτικούς λόγους π.χ. ^{80}Sr , ^{135}Sm , ^{186}Re).

Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως τα μεταλλικά ιόντα μπορούν να επηρεάσουν με άμεσους ή έμμεσους τρόπους πολλές αντιδράσεις σε πολύπλοκα βιολογικά συστήματα[10, 11], καθιστώντας την βιοανόργανη χημεία ένα πολύπλοκο αλλά ταυτόχρονα εξαιρετικά ενδιαφέρον πεδίο έρευνας[2]. Η κατανόηση των παραγόντων που επιδρούν στις βιολογικές διεργασίες και της σύνδεσης των μεταλλικών ιόντων με τα βιολογικά συστήματα είναι ένα σημαντικό βήμα για τη γνώση διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, αλλά και για το σχεδιασμό πιθανών θεραπειών.

2.2 Φωτοδυναμική θεραπεία

2.2.1 Εισαγωγή

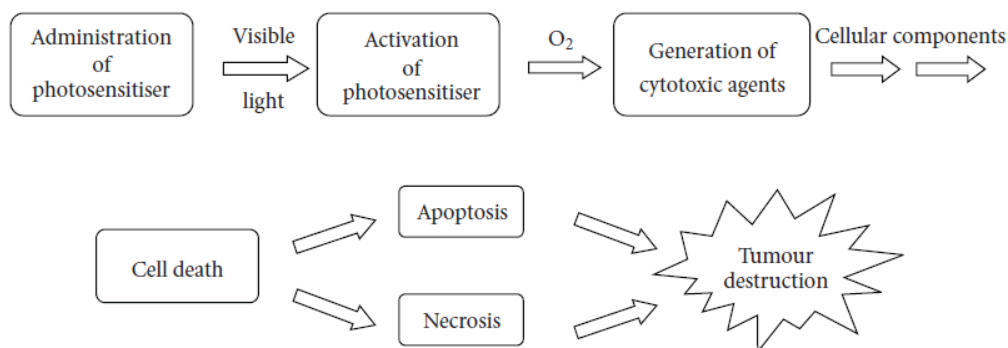
Η χρήση του φωτός για θεραπευτικούς σκοπούς είναι γνωστή για περισσότερο από 4000 χρόνια. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποίησαν το φως σε συνδυασμό με το φυτό *Amni Majus* για να θεραπεύσουν τη λεύκη. Το ενεργό συστατικό που απομονώθηκε από το συγκεκριμένο φυτό είναι το *prosalen*, όπου χρησιμοποιείται ευρέως για τη ψωρίαση (Σχήμα 9). Τα τελευταία 100 χρόνια οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο συνδυασμός φωτός με διάφορες ενώσεις μπορούσε να επιφέρει κυτταρικό θάνατο[12]. Η φωτοδυναμική θεραπεία πλέον χρησιμοποιείται όχι μόνο για την αντιμετώπιση του καρκίνου, αλλά και για διάφορες άλλες ασθένειες όπως η ψωρίαση, η ραχίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα κ.α.[13].



Σχήμα 9: Η δομή του prosalen

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μία επιλεκτική θεραπεία για την τοπική καταστροφή βλαβερών κυττάρων και ιστών[14, 15]. Η εκλεκτικότητα στηρίζεται στην ικανότητα των ενώσεων να συσσωρεύονται κατά προτίμηση στους πάσχοντες ιστούς και να παράγουν μονήρες οξυγόνο ή άλλες δραστικές ουσίες όπως ρίζες, οι οποίες προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Η φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές θεραπείες. Είναι μια μη επεμβατική θεραπεία, είναι ανώδυνη για τον ασθενή, δεν εμφανίζει σημαντικές παρενέργειες ενώ μπορεί να επαναληφθεί εάν χρειαστεί και το σημαντικότερο είναι ότι δεν επηρεάζει τους υγιείς ιστούς.

Η αρχή της φωτοδυναμικής θεραπείας (Photodynamic Therapy, PDT) είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων. Το πρώτο στάδιο είναι η χορήγηση ενός φαρμάκου-φωτοευαισθητοποιητή (photosensitizer) με αμελητέα τοξικότητα απουσία φωτός. Σε επόμενο στάδιο πρέπει να επιτευχθεί η επιθυμητή αναλογία φαρμάκου-φωτοευαισθητοποιητή στους πάσχοντες ιστούς σε σχέση με τους υγιείς. Όταν αυτό επιτευχθεί ο πάσχοντας ιστός εκτίθεται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος φωτός και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ώστε το φάρμακο να ενεργοποιηθεί, χωρίς όμως να επηρεαστούν οι υγιείς ιστοί[15]. Η επιτυχία της φωτοδυναμικής θεραπείας στηρίζεται στη μεγάλη συσσώρευση του φαρμάκου στους πάσχοντες ιστούς και στην πιο γρήγορη απομάκρυνσή του από τους υγιείς ιστούς[15].

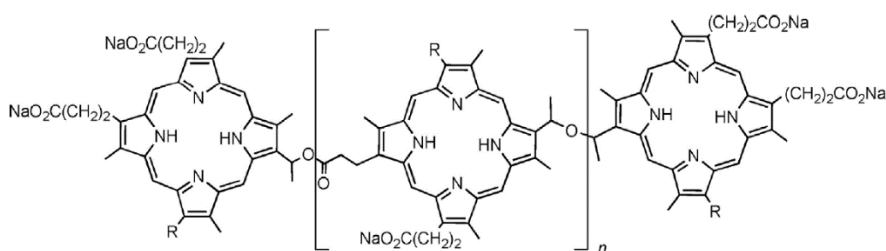


Σχήμα 10: Στάδια φωτοδυναμικής θεραπείας

2.2.2 Υπόβαθρο φωτοδυναμικής θεραπείας

Ο όρος φωτοδυναμική δράση (photodynamic action) χρησιμοποιήθηκε για να διαχωρίσει τις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στην βιολογία με τις φυσικοχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε γαλακτώματα φωτογραφικών φιλμ. Ο Blum πρότεινε ο όρος φωτοδυναμική δράση να χρησιμοποιείται μόνο όταν το οξυγόνο συμμετέχει σε φωτοχημικές αντιδράσεις. Η εποχή για την φωτοδυναμική θεραπεία ξεκίνησε το 1960 με τις μελέτες των R. L. Lipson και S. Schwartz στην κλινική Mayo (Mayo Clinic)[12], οι οποίοι παρατήρησαν φωταύγεια σε νεοπλασματικές αλλοιώσεις κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων όταν χορηγούσαν ενέσιμο διάλυμα ακατέργαστων παρασκευασμάτων αιματοπορφυρίνης, προκειμένου να απεικονίσουν την έκταση των αλλοιώσεων αυτών[15]. Ο Schwartz επεξεργάστηκε την αιματοπορφυρίνη με οξικό οξύ (acetic acid) και θειϊκό οξύ (sulfuric acid) και παρέλαβε ένα μίγμα πορφυρίνης[16], το οποίο ονόμασε “παράγωγο αιματοπορφυρίνης” (hematoporphyrin derivative, HPD)[12]. Το μίγμα αυτό περιείχε μονομερείς, διμερείς και ολιγομερείς πορφυρίνες[13] και χρησιμοποιήθηκε από τον Lipson για την ανίχνευση καρκινικών όγκων. Το μίγμα HPD επεξεργάστηκε στη συνέχεια προκειμένου να απομακρυνθούν τα μονομερή τμήματα, δηλαδή οι λιγότερο “ενεργές” πορφυρίνες, ώστε τελικά να καταλήξουν στη Photofrin (Σχήμα 11), τον πιο διαδεδομένο φωτοευαισθητοποιητή που χρησιμοποιήθηκε σε

κλινικές μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας. Λόγω της μακρόχρονης φωτοτοξικότητας (phototoxicity) στο δέρμα, οι επιστήμονες άρχισαν να σχεδιάζουν νέα μόρια φωτοευαισθητοποιητών, όπου απορροφούν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από την Photofrin[12] (η Photofrin απορροφά στα 650 nm, φως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος διεισδύει περισσότερο στους ιστούς)[13].

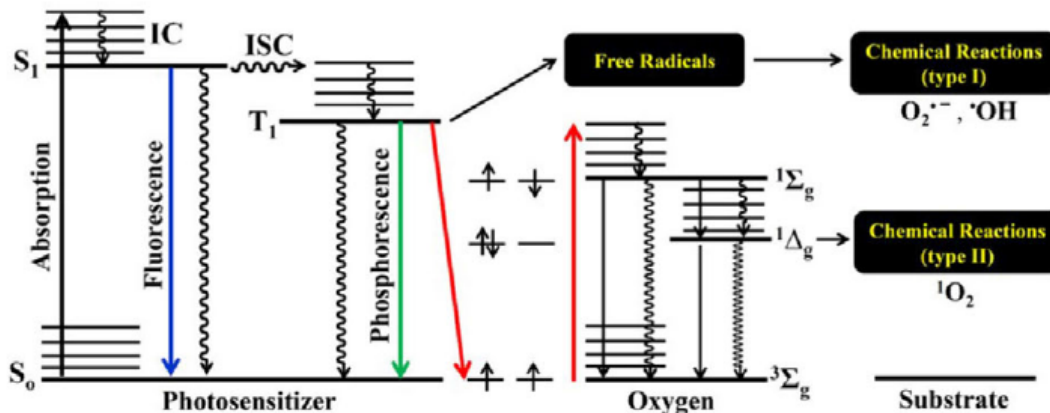


Σχήμα 11: Δομή της Photofrin

Η φωτοδυναμική θεραπεία απαιτεί την ταυτόχρονη παρουσία τριών βασικών συστατικών, του φωτοευαισθητοποιητή (photosensitizer), του οξυγόνου και του φωτός[14]. Πιο συγκεκριμένα ένας επιθυμητός φωτοευαισθητοποιητής εισέρχεται σε καρκινικά κύτταρα, ενεργοποιείται με το φως και παράγει δραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες το κύτταρο με αποτέλεσμα να πυροδοτούν το θάνατό του[17]. Τέτοιες αντιδράσεις λέγονται φωτοευαισθητοποιήσεις και διακρίνονται σε αντιδράσεις τύπου I και τύπου II[18], ανάλογα με τη φύση των πρωταρχικών σταδίων. Στις αντιδράσεις τύπου I όπου τα αρχικά ριζικά ενδιάμεσα απομακρύνονται από το οξυγόνο και στις αντιδράσεις τύπου II όπου παράγεται το άκρως κυτταροτοξικό οξυγόνο σε απλή κατάσταση (singlet oxygen, $^1\text{O}_2$) με μεταφορά ενέργειας από το φωτοοξειδωμένο φωτοευαισθητοποιητή[14, 16].

Οι δύο πιο σημαντικές πτυχές της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι οι διεργασίες απορρόφησης φωτός και η μεταφορά ενέργειας[16]. Πιο αναλυτικά ο φωτοευαισθητοποιητής διεγείρεται μέσω συγκεκριμένου κύματος φωτός στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση (singlet state S_1). Όμως η πρώτη διεγερμένη κατάσταση έχει μικρό χρόνο ζωής και γι' αυτό το λόγο ο φωτοευαισθητοποιητής αποδιεγείρεται είτε μέσω φθορισμού είτε μέσω μη ακτινοβολητικών διεργασιών (radiationless relaxation)[18]. Σε μερικές περιπτώσεις ενέργεια μεταφέρεται από την απλή κατάσταση S_1 του

φωτοευαισθητοποιητή στην πιο σταθερή τριπλή διεγερμένη κατάσταση (triple state, T_1) μέσω διασυστηματικής διασταύρωσης (intersystem crossing). Σε αυτή την περίπτωση, επειδή η αποδιέγερση του καθυστερεί έχουμε φωσφορισμό. Στη φωτοδυναμική θεραπεία εκμεταλλευόμαστε την αλληλεπίδραση του φωτοευαισθητοποιητή με το οξυγόνο που υπάρχει στους ιστούς. Στις αντιδράσεις τύπου I έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίου ή πρωτονίου από τον διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή σε κάποιο από τα συστατικά του κυττάρου όπως σε ένα μόριο ή στην κυτταρική μεμβράνη και έτσι έχουμε το σχηματισμό ριζικών μορφών. Στη συνέχεια αυτές οι ρίζες αντιδρούν με το οξυγόνο δημιουργώντας δραστικά είδη οξυγόνου όπως ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) ή υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$)[18]. Στις αντιδράσεις τύπου II έχουμε απευθείας μεταφορά ενέργειας από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή στην βασική τριπλή κατάσταση του οξυγόνου ($^3\text{O}_2$), με αποτέλεσμα να δημιουργείται η απλή κατάσταση του οξυγόνου (Singlet oxygen, $^1\text{O}_2$)[14]. Η απλή κατάσταση είναι η κατάσταση του οξυγόνου με την υψηλότερη ενέργεια, 95KJ mol^{-1} , και εξαιτίας της διαφορετικής κατανομής των ηλεκτρονίων στα τροχιακά, είναι πάρα πολύ ισχυρό οξειδωτικό[18]. Οι ρίζες που παράγονται μέσω αυτών των διεργασιών, έχουν πολύ μικρό χρόνο ζωής και γι' αυτό το λόγο προλαβαίνουν να δράσουν μόνο στην περιοχή που δημιουργούνται, χωρίς έτσι να επηρεάζονται τα υγιή γειτονικά κύτταρα [15](Localized PDT).



Σχήμα 12: Διάγραμμα Jablonski των φωτοφυσικών διεργασιών δια μέσου φωτοοξειδωσης του φωτοευαισθητοποιητή

2.3 Βιομιμητικά μέσα (Biomimetics)[19]

Τα μεταλλοένζυμα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD)[11] μπορούν να καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$). Ωστόσο η χρήση του SOD είναι περιορισμένη λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του πλάσματος και της αδυναμίας να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες. Συνεπώς, μιμητικά των SOD με μικρότερα μοριακά βάρη εμφανίζουν φαρμακευτικό ενδιαφέρον.

2.4 Μέσα απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού (MRI agents)

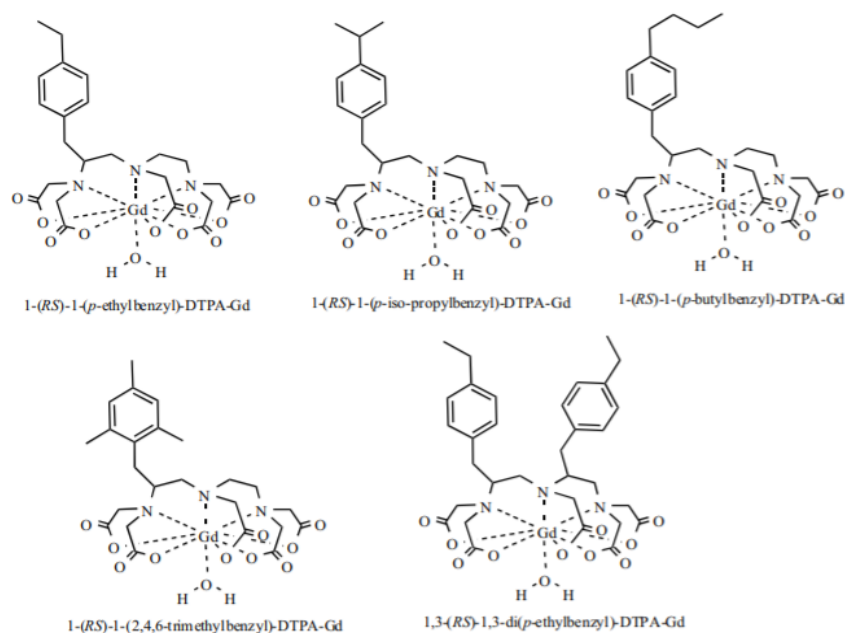
Πολλές διαφορετικές τεχνικές έχουν την ικανότητα να απεικονίζουν τα μόρια *in vivo*. Εκτός από τη φυσική τους βάση (δηλαδή ανίχνευση μαγνητικών συχνοτήτων συντονισμού, ραδιονουκλεοϊτιδίων, εκπεμπόμενου φωτός κλπ., οι τεχνικές αυτές διαφέρουν σε πολλές πτυχές, όπως από τη διεύθυνσή τους, την αποτελεσματικότητά τους και το κόστος τους. Η επιλογή της τεχνικής δεν εξαρτάται μόνο από τα μόρια ή τα κύτταρα που επιθυμεί κανείς να ανιχνεύσει, αλλά επίσης επηρεάζεται από την εξέταση, εάν αυτή δηλαδή πρόκειται να μεταφραστεί σε κλινική εικόνα ή το υποκείμενο υποβληθεί σε επαναλαμβανόμενες θεραπείες[20]. Από όλες τις υπάρχουσες τεχνικές μοριακής απεικόνισης, η τομογραφία απεικόνισης ποζιτρονίων (PET) και η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI), είναι οι πιο προηγμένες και διαθέσιμες τόσο σε πειραματικό όσο και σε κλινικό περιβάλλον[20]. Σε αντίθεση με τις τεχνικές που εξαρτώνται από το φως, όπως η απεικόνιση με βιοφωταύγεια, και οι δύο τεχνικές έχουν εξαιρετικές ιδιότητες στην ικανότητα διεύθυνσης στους ιστούς και στην απεικόνιση ενός ολόκληρου αντικειμένου[21].

Η απεικόνιση MRI βασίζεται κυρίως στον μαγνητικό πυρηνικό συντονισμό (NMR), σε σήμα ατόμου (1H) μετά την εφαρμογή ενός παλμού κάποιας ραδιοσυχνότητας. Αυτή η μη επεμβατική τεχνική και η έλλειψη ραδιενέργειας την καθιστούν ικανή για επαναλαμβανόμενες μελέτες ακόμα και σε μικρά χρονικά διαστήματα μεταξύ των περιόδων απεικόνισης. Η ευελιξία αυτής της τεχνικής είναι ενδιαφέρουσα διότι υπάρχουν και άλλες τεχνικές MRI μοριακής και κυτταρικής απεικόνισης, όπως η

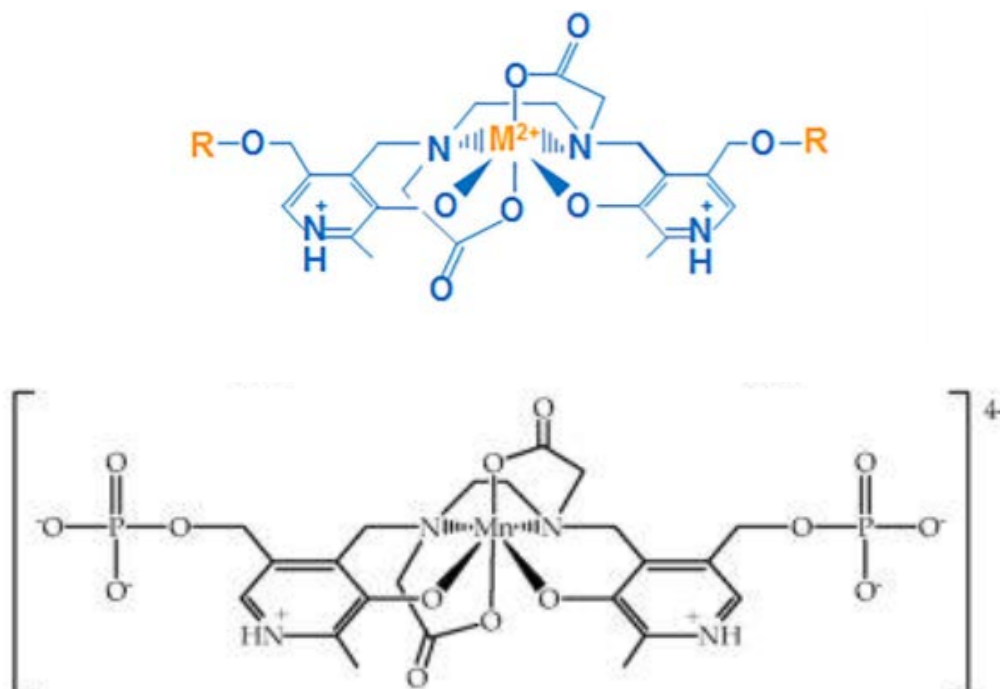
φαρμακολογική/λειτουργική MRI απεικόνιση (f/prhMRI), φασματοσκοπία MRI (MRS) και η επεμβατική MRI (iMRI)[22].

Οι παράγοντες αντίθεσης της μαγνητικής τομογραφίας προκαλούν αντίθεση μεταβάλλοντας το χρόνο χαλάρωσης πρωτονίων νερού σε διάλυμα καθιστώντας μια τυπική εικόνα MRI πιο φωτεινή[22] (θετικός παράγοντας) ή πιο σκοτεινή (αρνητική αντίθεση) παρουσία κάποιας ένωσης. Οι θετικοί παράγοντες αντίθεσης αντιπροσωπεύονται από παραμαγνητικά σύμπλοκα που περιέχουν ως επί το πλείστον ιόντα Gd(III) ή Mn(II), τα οποία συντομεύουν το χρόνο χαλάρωσης των πρωτονίων του νερού στους ιστούς με ταχεία ανταλλαγή με το νερό που συνδέεται στη εσωτερική σφαίρα των μορίων στους ιστούς[22-24].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αναπτυχθεί για τα σύμπλοκα του γαδολινίου (Gd(III)) ως προς τη χρήση τους ως συγκριτικών μέσων απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού. Κάποια από αυτά έχουν εγκριθεί για κλινικές μελέτες και χρησιμοποιούνται ευρέως όπως στην ανίχνευση ανωμαλιών αιμάτωσης του εγκεφάλου (Σχήμα 13). Ακόμη ένα σύμπλοκο του μαγγανίου (Mn(II))[21] έχει εγκριθεί για κλινική χρήση για την ανίχνευση ηπατικού κυτταρικού καρκινώματος[25].



Σχήμα 13: Παράγοντες αντίθεσης για απεικόνιση του ήπατος σε υποκατεστημένα άλκυλο σύμπλοκα του γαδολινίου[4, 25, 26]



Σχήμα 14: Χημική δομή του MnDPDP (magnese dipyridolxyl diphosphate (generic name mangafodipir)

2.5 Ραδιοδιαγνωστικοί και ραδιοφαρμακευτικοί παράγοντες

Τα ραδιοϊσότοπα χρησιμοποιούνται τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία. Για να είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στη ραδιοδιαγνωστική απεικόνιση θα πρέπει ο χρόνος ημιζωής τους ($t_{1/2}$) να είναι αρκετά μεγάλος για να σχηματίζονται ραδιοφάρμακα[24], αλλά και να προλαβαίνει να διεισδύσει στον ιστό, ταυτόχρονα θα πρέπει να είναι τόσο μικρός ώστε να ελαχιστοποιείται η δόση της ακτινοβολίας στον ασθενή[27]. Η τομογραφία απεικόνισης είναι ένα μια σημαντική τεχνική μοριακής απεικόνιση, καθώς τα ραδιοφάρμακα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση συγκεκριμένων μορίων είναι μικρά και έτσι μπορούν να διασχίσουν το άθικτο φράγμα αίματος-εγκεφάλου[20]. Αυτά τα ραδιοφάρμακα μπορούν εύκολα να συνδεθούν με άλλες ενώσεις και να στοχεύσουν συγκεκριμένα μόρια. Η θεραπευτική δράση των ραδιοφαρμάκων οφείλεται σε εκπομπή μιας κυτταροτοξικής ιονίζουσας ακτινοβολίας[28]. Τα ραδιοϊσότοπα που χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά μέσα εκπέμπουν ακτίνες β^- (ηλεκτρόνια) ή ακτίνες α (πυρήνες ηλίου, $^4_2\text{He}^{2+}$)[28].

2.6 Μεταλλικά σύμπλοκα που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία

Μέταλλα όπως ο χρυσός, το ρουθίνιο, το ρόδιο, το τιτάνιο και ο κασσίτερος έχουν δοκιμαστεί κατά καιρούς ως χημειοθεραπευτικά μέσα, ενάντια σε διάφορους τύπου καρκίνους. Τα μεταλλικά ιόντα μπορούν να προσδεθούν με τους υποκαταστάτες είτε ασθενώς είτε σταθερά. Το αν τα μεταλλικά σύμπλοκα διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες, πλησιάσουν το φορτισμένο DNA ή συμπλεχθούν με μία πρωτεΐνη εξαρτάται αποκλειστικά από τη φύση των συνδεδεμένων υποκαταστατών. Εφόσον τα μέταλλα του d τομέα εμφανίζουν ποικίλες και διαφορετικές ιδιότητες, υπάρχει η πιθανότητα κάποια από αυτά να εμφανίζουν αντικαρκινική δράση με μηχανισμό διαφορετικό από εκείνη του cisplatin, ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η οξειδοαναγωγική ενεργότητα, που αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό των μετάλλων του d τομέα. Τα early d-block μέταλλα τείνουν να βρίσκονται σε υψηλότερες οξειδωτικές καταστάσεις από τα μέταλλα του later d-block, όπου συχνά αποκτούν το μέγιστο σθένος τους σε υδατικά μέσα. Σε οξειδωτικές καταστάσεις άνω του 3+ μπορούν να σχηματιστούν τα μεταλλικά οξοϊόντα, όπως το ZrO^{2+} , VO^{2+} , MoO^{3+} . Έχουν συντεθεί οργανομεταλλικά σύμπλοκα των στοιχείων αυτών που παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση. Τα early d-block σχηματίζουν μια σειρά οργανομεταλλικών συμπλόκων που ονομάζονται metallocene dihalides (διαλογονούχα μεταλλιούχα σύμπλοκα, αυτά έχουν γενικό τύπο $[M(\eta^5-C_5H_5)_2X_2]$, όπου το X αποτελεί ένα αλογόνο και ταυτόχρονα δύο κυκλοπενταδιένυλο υποκαταστάτες ενώνονται μέσω των πέντε ατόμων άνθρακα σε ένα σχηματισμό με ένα μέταλλο (IV). Η φύση του μετάλλου παίζει βασικό ρόλο στην ενεργότητα των συμπλόκων που περιέχουν Ti, V, Mo και εμφανίζουν καλή δράση έναντι του καρκίνου του μαστού, των πνευμόνων και της γαστρεντερικής οδού[24].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Το νικέλιο στα βιολογικά συστήματα

3.1 Εισαγωγή

Το νικέλιο βρίσκεται στην ομάδα VIII_B μαζί με το παλλάδιο και το λευκόχρυσο. Η οξειδωτική κατάσταση II και 0 είναι οι προτιμητέες για τα στοιχεία της ομάδας αυτής, ενώ υπάρχουν και πληθώρα συμπλόκων του νικελίου με αριθμούς οξείδωσης III και IV. Έτσι το νικέλιο σχηματίζει μεγάλο αριθμό συμπλόκων ενώσεων με αριθμούς συναρμογής τέσσερα, πέντε και έξι. Η πλειονότητα των συμπλόκων του είναι οκταεδρικά και ακολουθούν τα επίπεδα τετραγωνικά. Σχηματίζει επίσης, σύμπλοκα με τετραεδρική διάταξη ή με διάταξη τριγωνικής διπυραμίδας[29]. Θεωρείται ότι ανήκει στην οικογένεια του σιδήρου. Το ισότοπό του, ⁶³Ni, που εκπέμπει β-ακτινοβολία, έχει χρόνο ημιζωής 92 χρόνια και ενέργεια αποσύνθεσης 0.067MeV, γεγονός που το καθιστούν χρήσιμο σε βιοχημικές διεργασίες, ιδίως από αυτές που πραγματοποιούνται από μικροοργανισμούς. Το νικέλιο αντιδρά με το H₂ και το CO και σχηματίζει τη δραστική μορφή NiH₂, υδρίδιο του νικελίου και το τερακαρβόνυλο νικέλιο Ni(CO)₄, το οποίο θεωρείται καλός καταλύτης για αντιδράσεις υδρογόνωσης και οξείδωσης του μονοξειδίου του άνθρακα.

Μέχρι πριν πέντε περίπου δεκαετίες, το νικέλιο θεωρούνταν ότι δεν είχε καμία βιολογική δράση, σε αντίθεση με τα στοιχεία της πρώτης μεταβατικής σειράς του περιοδικού πίνακα, για τα οποία ο βιολογικός ρόλος είχε ήδη διευκρινιστεί. Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι το νικέλιο είναι βασικό στοιχείο για ορισμένο αριθμό φυτών[30], ζώων και βακτηρίων[31]. Η δέσμευση του στα φυτά αποδίδεται σε διεργασίες όπως της ιοανταλλαγής, της απορρόφησης ηλεκτρολυτών και της παγίδευσης[26].

Στο ανθρώπινο σώμα η φυσιολογική ποσότητα του ιόντος του νικελίου είναι 7-10mg. Στο αίμα και στον ορό του αίματος τα επιτρεπτά επίπεδα για το νικέλιο είναι 3-7μg/L, ενώ στα ούρα είναι 1-5μg/L. Στον ανθρώπινο ορό το Ni(II) απαντάται σε τρία κλάσματα, το 40% βρίσκεται στο υπερδιήθημα, το 35% είναι συνδεδεμένο με την ανθρώπινη αλβουμίνη και το 26% είναι συνδεδεμένο με μία μεταλλοπρωτεΐνη,[32] η οποία ταυτοποιήθηκε ως η S α₁-γλυκοπρωτεΐνη. Οι ενώσεις του νικελίου που υπάρχουν

στο υπερδιήθημα δρουν ως μεταφορείς για τη νεφρική απέκκριση του και με αυτόν τον τρόπο παίζει σημαντικό ρόλο στον ομοιοστατικό του έλεγχο[31]. Αυτό εξηγεί και το στενό εύρος της συγκέντρωσης του στο ανθρώπινο αίμα, ορό και ούρα. Επίσης το νικέλιο έχει βρεθεί ότι μπορεί να συνδεθεί με το αμινοξύ ιστιδίνη, επιπλέον ανταγωνίζεται για τη θέση του χαλκού (Cu(II)) στην πρωτεΐνη HAS.

Στα μέσα της δεκαετίας του '70, οι φυσιολόγοι ανακάλυψαν πως κάποια είδη αλγών και βακτηρίων έχουν απόλυτη ανάγκη το νικέλιο για την επιβίωση τους. Διαπίστωσαν ότι το νικέλιο ήταν απαραίτητο συστατικό της ουρεάσης[29, 33], η δράση της οποίας είναι να καταλύει τη μετατροπή της ουρίας σε αμμωνία στους ιστούς των φυτών.

Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι το νικέλιο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση μιας υδρογονάσης στα βακτήρια *knallgas*[29], ενώ τα οξοπαραγωγικά βακτήρια και κάποια κλωστρίδια χρειάζονται το νικέλιο για τη σύνθεση της δεϋδρογονάσης του μονοξειδίου του άνθρακα, τα μεθαγόνα βακτήρια περιέχουν τέσσερα ένζυμα που έχουν νικέλιο, τις υδρογονάσες I και II, τη δεϋδρογονάση του CO και το μεθυλοσυνένζυμο της m-ρεδουκτάσης[31].

Ο ρόλος της πρωτεΐνης μεταφοράς του νικελίου, της νικελοπλασμίνης, στο ανθρώπινο αίμα παραμένει άγνωστη[31]. Εξαιτίας του καθημερινού διαιτολογίου και της περιβαλλοντικής έκθεσης, μικρές συγκεντρώσεις νικελίου παρατηρούνται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς, γι' αυτό οποιαδήποτε δυσλειτουργία μπορεί να συμβεί. Η σημασία του νικελίου σε κάποια ζώα έχει ελεγχθεί[26]. Αρουραίοι που τράφηκαν με δίαιτα χωρίς νικέλιο εμφάνισαν μειωμένη αναπαραγωγικότητα, αυξημένη περιγεννητική θνησιμότητα, μειωμένη υπατική λειτουργία, επιβράδυνση στην ανάπτυξη τους και μειωμένη διάρκεια ζωής. Η δεύτερη γενιά αρουραίων από αυτούς εμφάνισαν αναιμία λόγω της διαταραχής της απορρόφησης του σιδήρου, ενώ η αναιμία επιδεινώθηκε σημαντικά στην τρίτη γενιά[32]. Κατσίκες που τράφηκαν με δίαιτα φτωχή σε νικέλιο παρουσίασαν καθυστέρηση στην ανάπτυξη, αύξηση των θανάτων των απογόνων, παρακεράτωση του δέρματος, μειωμένη δραστηριότητα πολλών απαραίτητων ενζύμων στο ήπαρ, στα νεφρά και στην καρδιά, ενώ εμφάνισαν εκφυλισμό του καρδιακού μυ και των σκελετικών μυών.

3.2 Σημασία του νικελίου στα βιολογικά συστήματα

Το νικέλιο αποτελεί συστατικό σημαντικής θρεπτικής αξίας για τα ζώα. Το νικέλιο πληροί τα κριτήρια αναγκαιότητας και είναι τα εξής[32]:

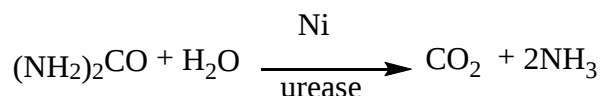
- Κατέχει μικρό ατομικό βάρος ενώ ταυτόχρονα αποτελεί μέταλλο μετάπτωσης το οποίο σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα, κατάλληλα για βιολογικές διεργασίες.
- Βρίσκεται σε αφθονία στο φλοιό και στα ύδατα της γης, συνεπώς ήταν και είναι διαθέσιμο κατά την εξελικτική πορεία των φυτών και ζώων.
- Είναι μη τοξικό στα ζώα (σε μικρές συγκεντρώσεις).
- Η έλλειψη του αποδεδειγμένα οδηγεί σε μη εύρυθμη λειτουργία των βιολογικών διεργασιών.

Μία ελκυστική προσέγγιση για την αναγκαιότητα του νικελίου στα έμβια όντα είναι ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό και στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών. Έλλειψη του νικελίου οδηγεί σε διόγκωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Επιπροσθέτως, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων των φωσφολιπιδίων. Ανεξάρτητες ομάδες ερευνητών έχουν αποδείξει ότι το νικέλιο δύναται να αντικαταστήσει το νάτριο σε διάφορες βιολογικές διεργασίες όπως στη σύσπαση των μυών του σώματος και στη διέγερση των νευρικών κυττάρων[32].

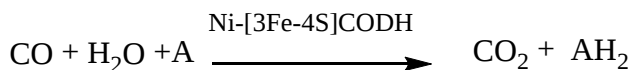
Εκτός αυτών, το νικέλιο έχει την ικανότητα να συνεισφέρει στη δομική σταθερότητα των νουκλεϊκών οξέων. Σταθεροποιεί το DNA και το RNA ενάντια στη θερμική μετουσίωση. Εκτός αυτών, σταθεροποιεί τη δομή των ριβοσωμάτων ενάντια στη καταστρεπτική μετουσίωση.

Τέλος, έχει βρεθεί ότι το νικέλιο κατέχει δομικής σημασίας ρόλο στην πρωτεΐνη νικελοπλάσμινη[29], της οποίας η βιολογική σημασία δεν είναι ακόμη γνωστή. Να σημειωθεί ότι το νικέλιο μπορεί να ενεργοποιήσει πληθώρα ενζύμων *in vitro* μεταξύ των οποίων την αργινάση, την τυροσινάση, τη δεσοξυριβονουκλεάση και τη συνθετάση του ακέτυλο-συνένζυμου Α.

Ο ρόλος του νικελίου στον άνθρωπο δεν έχει διευκρινιστεί, θεωρείται όμως ότι διαδραματίζει ρόλο στις φυσιολογικές διεργασίες ως συν παράγοντας στην απορρόφηση του σιδήρου από το έντερο. Συμμετέχει ακόμη στην παραγωγή της προλακτίνης[32] και συνεπώς συμβάλει με αυτό τον τρόπο στην παραγωγή του μητρικού γάλακτος, επίσης ενεργοποιεί κύρια ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση και το μεταβολισμό της της γλυκόζης και ίσως παίζει ρόλο στην παραγωγή των ερυθροκυττάρων. Απαντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα νουκλεϊνικά οξέα και κυρίως στο RNA, θεωρείται ότι κατά κάποιο τρόπο εμπλέκεται στη δομή των πρωτεϊνών καθώς και στην σταθεροποίηση της δομής του RNA. Όσον αφορά τα ένζυμα το νικέλιο περιέχεται είτε διότι σταθεροποιεί την τριτοταγή δομή είτε ευρισκόμενο στο ενεργό του κέντρο του. Ένα από τα πιο γνωστά ένζυμα που περιέχουν νικέλιο είναι η ουρεάση, η οποία καταλύει τη μετατροπή της ουρίας σε αμμωνία στους ιστούς των φυτών (Αντίδραση 1).

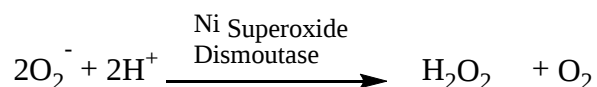


Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι το πρωτεολυτικό ένζυμο καρβοξυπεπτιδάση περιέχει ψευδάργυρο (Zn(II)) στο ενεργό κέντρο, απουσία του καθίσταται ανενεργή, όμως με την προσθήκη ιόντος νικελίου (Ni(II)) ενεργοποιείται ξανά. Ακόμη το νικέλιο είναι απαραίτητο για την αυτοτροφική ανάπτυξη και τη σύνθεση της υδρογονάσης στα βακτήρια knallgas, τα οξεοπαραγωγικά βακτήρια χρειάζονται νικέλιο για τη σύνθεση της δεϋδρογονάσης του μονοξειδίου του άνθρακα. Τα μεθαγόνα βακτήρια περιέχουν τέσσερα ένζυμα που περιέχουν νικέλιο: την υδρογονάση I και II, τη δεϋδρογονάση του μονοξειδίου του άνθρακα (CO) και το μέθυλοσυνένζυμο της m-ρεδουκτάσης. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ένα από τα ένζυμα μονοϋδριδίου του άνθρακα CODH, που αποτελείται από σύμπλεγμα Fe-Ni-S που βοηθά στην απομάκρυνση μέσω της οξείδωσης 108 τόνων μονοξειδίου του άνθρακα από τα χαμηλότερα στρώματα της γης συμβάλλοντας σε χαμηλότερα επίπεδα CO (Αντίδραση 2).



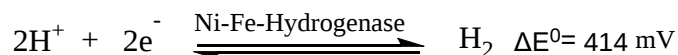
Το CODH καταλύει την αναστρέψιμη οξείδωση του CO σε CO₂. Σε χαμηλές όμως τιμές pH η αναγωγή του CO₂ σε CO μπορεί να υπερβεί την οξείδωση του τελευταίου.

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου του νικελίου (Ni-SOD)[11] είναι ένα μεταλλοένζυμο, όπου όπως και οι υπόλοιπες δισμουτάσες [29] του υπεροξειδίου προστατεύει τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη καταλύοντας την κυτταροτοξική ρίζα του υπεροξειδίου (O₂⁻) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο (Αντίδραση 3). Η ρίζα του υπεροξειδίου είναι ένα ενεργό είδος οξυγόνου όπου παράγεται σε τεράστιες ποσότητες κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης και κατά την αερόβια κυτταρική αναπνοή[26].



Το ένζυμο Ni-SOD[29] προέκυψε με την αύξηση των επιπέδων του O₂ περίπου πριν δύο δεκατομμύρια χρόνια, ως μέρος ενός κυτταρικού αμυντικού συστήματος κατά την παραγωγή των δραστικών ριζών του O₂, τα οποία παράγονται μέσω των μεταβολικών διεργασιών.

Οι υδρογενάσες σιδήρου νικελίου (Ni-Fe hydrogenase)[29], είναι οξειδωτικά ένζυμα που ενεργοποιούν με αντιστρεπτό τρόπο το μοριακό οξυγόνο. Οι μικροοργανισμοί που περιέχουν τα ένζυμα αυτά, λειτουργούν μέσω ενός οξειδωαναγωγικού μηχανισμού από τα οποία αποθηκεύουν και χρησιμοποιούν ενέργεια μέσω της αντίδρασης:



Η αντίδραση αυτή είναι σημαντική για τα αναερόβια αναγωγικά θειοβακτήρια του γένους Desulfonibrio. Η πρακτική εφαρμογή του ενζύμου αυτού, είναι η παραγωγή ενέργειας, φιλικής προς το περιβάλλον. Εν συνεχεία παρουσιάζεται ένας πίνακας[29] όπου παρουσιάζονται διάφορα βιολογικά συστήματα και η αναγκαιότητά τους για το νικέλιο (Σχήμα 15).

Organism	Nickel requirement for
Animals	Growth (?) Synthesis and/or activity of several enzymes (?)
Plant cells	Growth on urea as sole nitrogen source Urease synthesis
Rumen bacteria	Urease synthesis
'Knallgas' bacteria	Growth on H ₂ and O ₂ Hydrogenase synthesis
<i>Oscillatoria</i> sp.	Growth
<i>Clostridium</i> <i>pasteurianum</i>	Synthesis of 'carbon monoxide dehydrogenase'
Acetogenic bacteria	Synthesis of 'carbon monoxide dehydrogenase'
Methanogenic bacteria	Growth Synthesis of factor F ₄₃₀

Σχήμα 15: Βιολογικές διεργασίες εξαρτώμενες από το νικέλιο

3.2 Μεταβολισμός και τοξικότητα νικελίου/ Μοριακός Μηχανισμός τοξικότητα νικελίου

Παρ' όλο που το νικέλιο είναι ένα απαραίτητο μέταλλο για συγκεκριμένα βακτήρια, φυτά, η τοξικότητά του έχει απασχολήσει περισσότερο από ό,τι η έλλειψη του. Από τη στιγμή που το νικέλιο χρησιμοποιείται στις σύγχρονες βιομηχανίες, η έκθεση σε αυτό και τα συναφή προβλήματα υγείας που προκαλεί αποτελεί μείζον θέμα, παρ' όλο που η καθημερινή επαφή με προσωπικά αντικείμενα όπως τα κοσμήματα, χειρουργικές και οδοντιατρικές συσκευές έχουν αποδείξει ότι μπορεί να προκαλέσει μόνο αλλεργίες ή φλεγμονές σε συγκεκριμένες περιπτώσεις[26]. Η έκθεση σε υψηλά επίπεδα νικελίου έχει συνδεθεί με τον ρινικό καρκίνο και τον καρκίνο του πνεύμονα. Ο ακριβής μηχανισμός της

καρκινογένεσης του νικελίου δεν είναι γνωστός αλλά φαίνεται να περιλαμβάνει γενετικές αλλά και επιγενετικές αλλοιώσεις. Μπορεί να βλάψει το DNA άμεσα, παρουσία οξειδωτικών παραγόντων αλλά επηρεάζει επίσης τη δομή της χρωματίνης αφού μπορεί να δεσμευτεί με τις ιστόνες και τις πρωταμίνες. Πρωτεΐνες που μπορούν να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα μπορούν να αυξήσουν την τοξική του επίδραση όπως στην περίπτωση του χλωριούχου νικελίου (NiCl_2). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι το νικέλιο μπορεί να συμβάλει στο σχηματισμό καρκίνου ενισχύοντας την επίδραση άλλων καρκινογόνων ουσιών.

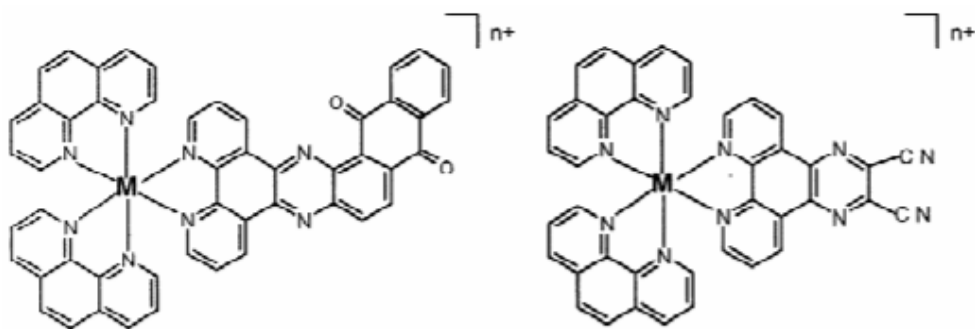
3.3 Σύμπλοκα του νικελίου με βιολογική δράση

Σήμερα πλέον έχουμε μια ουσιαστική λίστα με ένζυμα του νικελίου[34], η οποία συνεχώς μεγαλώνει, τα οποία καλύπτουν μια ποικιλία χημικών αντιδράσεων. Αυτά τα ένζυμα χρησιμοποιούνται από πολλούς και διαφορετικούς οργανισμούς που κατοικούν σε ποικίλα οικοσυστήματα στον πλανήτη. Όπως και με τα άλλα μεταβατικά στοιχεία, τα χημικά οφέλη από τη χρήση του νικελίου ως προς τη κατάλυση βιολογικών αντιδράσεων, συνοδεύεται από σημαντικούς κινδύνους τοξικότητας, γι' αυτό το μέταλλο αυτό πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή[33]. Η βιολογία του νικελίου επεκτείνεται πέρα από ένα απλό μεταλλικό κέντρο στα ένζυμα και πρέπει να συμπεριλάβουμε τους μηχανισμούς ομοιόστασης που χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούν νικέλιο, καθώς και πως αυτοί οι οργανισμοί προσαρμόζονται σε διακριτές θέσεις στο εκάστοτε περιβάλλον που ονομάζουν «σπίτι»[35].

Το διηλεκτρικό νικέλιο υπάρχει σε διάφορα περιβάλλοντα είτε ως εξαΰδατο νικέλιο, $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6$, είτε ως σύμπλοκα με οργανικούς ή ανόργανους υποκαταστάτες, τα τελευταία εκ των οποίων είναι ελάχιστα διαλυτά στο νερό. Τα σύμπλοκα του νικελίου στη σειρά Irving-Williams, σημαίνει ότι τα σύμπλοκα είναι σταθερά, εκτός κι αν συντονίζεται με διάφορους θειολικούς υποκαταστάτες, όπως συμβαίνει και στα περισσότερα αναγωγικά ένζυμα του νικελίου. Οπότε η μεταφορά των μεταλλικών ιόντων είναι πιθανόν ένας δυνητικός ανταγωνιστικός μηχανισμός μεταξύ του εξωκυτταρικού χώρου και της πρωτεϊνικής συγγένειας[17].

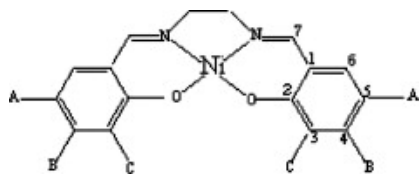
Ένας πολύ σημαντικός αριθμός σύμπλοκων ενώσεων έχουν μελετηθεί για τις αντι-πολλαπλασιαστικές τους ιδιότητες και έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του καρκίνου. Όμως διάφορες παρενέργειες έχουν αφήσει περιθώριο για την επιλογή άλλων μεταλλικών κέντρων και υποκαταστατών, γνωστά για την βιοδραστικότητά τους[33]. Ο βασικός στόχος των ενώσεων αυτών είναι η σύνδεση τους με το μόριο του DNA, μέσω εκλεκτικών αλληλεπιδράσεων με το οξυγόνο των φωσφορικών ομάδων ή με τα άζωτα των ετεροκυκλικών βάσεων του DNA, ή και μέσω των δύο οδών. Το νικέλιο έχει αναγνωριστεί ως ένα βασικό μεταλλικό ιχνοστοιχείο για τα βακτήρια και τα φυτά, όμως ο ρόλος του στη βιοχημεία των ζώων δεν έχει πλήρως καθοριστεί. Κάποια από τα σύμπλοκα του νικελίου(II) με υποκαταστάτες όπως το διμεθυλο-διθειοφωσφορικό (dimethyldithiophosphate ligand) έχουν βρεθεί να είναι ενεργά έναντι του καρκινοσαρκόματος της σειράς Walker 256, ενώ είναι ανενεργά κατά της λευχαιμίας της καρκινικής σειράς L1210. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα σύμπλοκα του νικελίου δρουν κυρίως μέσω παρεμβολής, ενώ έχει βρεθεί ότι προκαλούν και διάσπαση στο DNA. Παρά την τοξικότητα των συμπλόκων του δισθενούς νικελίου, τριμερή σύμπλοκα του νικελίου (II) έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με ολιγοπεπτίδια και με πρωτεΐνες κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες και μάλιστα είχαν αναστρέψιμη οξειδοαναγωγική συμπεριφορά $Ni(III)/Ni(II)$, ενώ κάποια ήταν ικανά να επάγουν και συνεργατικές διαμορφωτικές αλλαγές στο μόριο του DNA[36].

Η ερευνητική ομάδα του Bhaskar G. Maiya αποφάσισε να δοκιμάσουν πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες με μεταλλικό κέντρο το νικέλιο, αν και στη βιβλιογραφία είναι σπάνια. Οι συγκεκριμένοι υποκαταστάτες έχουν δοκιμαστεί με πληθώρα μεταλλικών κέντρων και έχουν εξετασθεί ως προς τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Έκπληκτοι διαπίστωσαν πως παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά με τα ανάλογα σύμπλοκα του ρουθηνίου[37, 38].

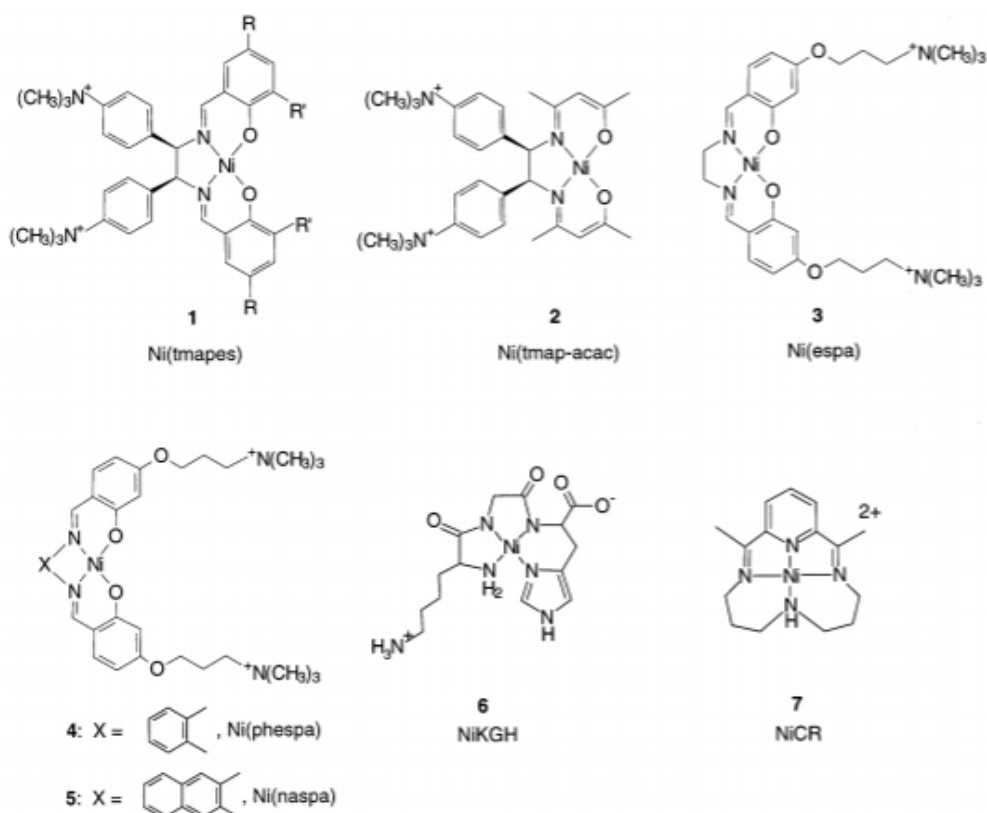


Σχήμα 16: Οι μοριακές δομές με μεταλλικό κέντρο το νικέλιο

Σύμπλοκα του νικελίου με υποκατάστατη την αιθυλενοδιαμίνη- N,N'-δισ(σαλικυλαλδιμίνη) (salen=ethylenediamine-N,N'-bis(salicylaldimine))[36] έχουν αποδειχθεί ότι εμφανίζουν ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το μόριο του DNA, εξαιτίας του οξειδοαναγωγικού ζεύγους Ni(II)/Ni(III) όπου βρίσκεται πολύ κοντά στο δυναμικό οξειδοαναγωγής του υποκαταστάτη περίπου 1V vs SCE. Επιπρόσθετα, η μη αντιστρεψιμότητα των κυκλικών βολταμμογραφημάτων των περισσοτέρων συμπλόκων νικελίου(II) τύπου salen υποδηλώνουν ότι η οξείδωση ενός ηλεκτρονίου οφείλεται στον υποκαταστάτη και οδηγεί σε φαινολικές ρίζες, ικανές για πολυμερισμό μέσω σχηματισμό του δεσμού C-C μεταξύ της όρθο- και πάρα- θέσης του φαινολικού δακτυλίου. Έτσι θα μπορούσαν τα ενδιάμεσα της ρίζας να αντιδράσουν με τις νουκλεοβάσεις του DNA και να οδηγήσουν σε ομοιοπολική τροποποίηση[38].

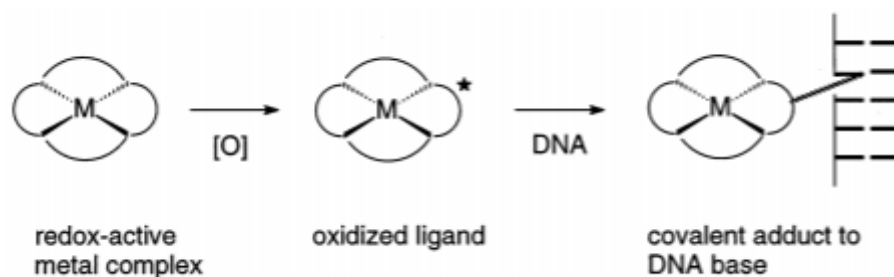


Σχήμα 17: Δομή του νικελίου με υποκατάστατη salen

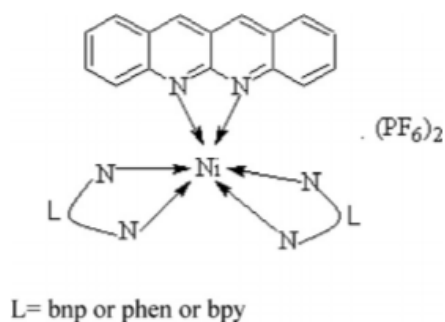


Σχήμα 18: Δομές συμπλόκων του νικελίου (II) όπου παρουσιάζουν ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το DNA

Όπως φαίνεται στην βιβλιογραφία, αποδεικνύεται να υπάρχει ενδιαφέρον και ποικίλη χημεία μεταξύ του νικελίου και του DNA[36]. Ενώσεις του νικελίου, όπως το Ni_2S_3 , μπορούν να εισέλθουν μέσα στο κύτταρο με φαγοκυττάρωση και βρίσκουν το «δρόμο» τους προς τον πυρήνα, προκαλώντας οξειδωτικά ρήγματα στο σκελετό του DNA ή στους δεσμούς DNA-πρωτεΐνης. Ο μηχανισμός αυτός παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους τοξικολόγους που ερευνούν το μηχανισμό της καρκινογένεσης, καθώς και των χημικών που σχεδιάζουν φάρμακα που στοχεύουν το DNA. Είναι γνωστό πως το δισθενές νικέλιο συνδέεται καλά με τη γουανίνη μέσω του N7 του δακτυλίου ιμιδαζόλης της πουρίνης. Αυτή η σύνδεση θεωρείται υπεύθυνη για το γεγονός ότι το ιόν του νικελίου (Ni(II)) δύναται να προκαλέσει μεταβολικές αλλαγές στο DNA, από δεξιόστροφη ελικοειδής μορφή B στην αριστερόστροφη ελικοειδή αλυσίδα Z. [38]

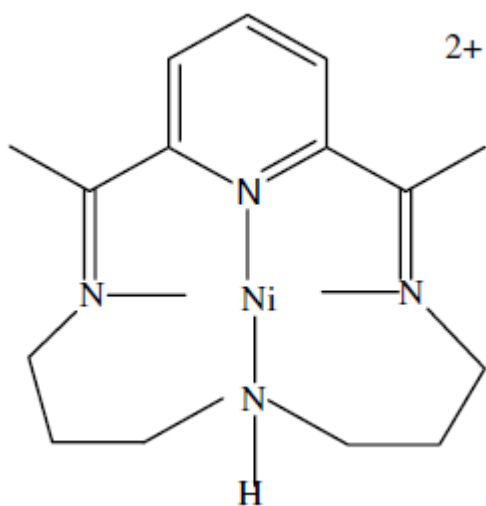


Σχήμα 19: Γενικό σχήμα της οξειδωτικής αλκυλίωσης των νουκλεοβάσεων από ενεργά οξειδωτικά μεταλλικά σύμπλοκα



Σχήμα 20: Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου νικελίου με υποκαταστάτες πυριδίνης, φαινανθρολίνης και διβενζο1,8-ναφθοπυριδίνης

Ένα από τα σύμπλοκα του νικελίου που περιέχει ως υποκατάστατη το 2,12-διμεθυλ-3,7,11,17-τετρααζαδικυκλο[11,3,1]επταδεκα-1(17),2,11,13,15-πενταένιο[36], γνωστό ως CR, έχει μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν, λόγω της ικανότητας του να καταλύει την περιορισμένη διάσπαση του νουκλεϊκού οξέος.



Σχήμα 21: Η δομή του συμπλόκου $[\text{NiCR}]^{2+}$

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990[30], χρησιμοποιήθηκε κυρίως ως ένα εξειδικευμένο αντιδραστήριο διάσπασης για ορισμένες μονόκλωνες δομές που βρίσκονται σε φυσικά RNAs και σε συνθετικά δεοξυ-ολιγονουκλεοτίδια. Όπως ήταν λογικό, αντίδραση μεταξύ του $[\text{NiCR}]^{2+}$ και του κυτταρικού DNA δεν είχε παρατηρηθεί, είτε γιατί ήταν πολύ αργή ή χρειαζόταν περισσότερη ποσότητα από το σύμπλοκο του νικελίου. Ίσως ήταν πολύ δύσκολο να εξασφαλιστούν οι απαραίτητοι οξειδοαναγωγικοί παράγοντες. Ο ακριβής μηχανισμός για το πως το σύμπλοκο του νικελίου κατέλυε το RNA ή το δίκλωνο DNA δεν είχε διευκρινιστεί. Οι φασματοσκοπικές μελέτες έχουν παράσχει αποδείξεις ότι σχηματίζεται ένα οξειδοαναγωγικό ζεύγος Ni(II)/Ni(III) . Η μελέτη της διάσπασης του DNA που καταλύεται από το νικέλιο *in vivo*, πιστεύεται σε μεγάλο βαθμό ότι θα διευκολυνθεί εάν το απαιτούμενο οξειδωτικό μέσο μπορούσε να εξαλειφθεί με την εισαγωγή μιας λειτουργικής ομάδας που μπορεί να αναχθεί εύκολα[17].

Πίνακας 2: Σύμπλοκα του νικελίου με βιολογική δράση

ΣΥΜΠΛΟΚΟ	ΤΡΟΠΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ DNA	ΣΤΑΘΕΡΑ ΣΥΝΔΕΣΗΣ K_B	ΑΝΑΦΟΡΑ
Ni(i-MNT)(2a-5mt) ²⁺	Παρεμβολή και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις	$2.94 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	[35]
Ni(i-MNT)(2a-2tzn) ²⁺	Παρεμβολή και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις	$1.68 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	[35]
Ni(i-MNT)(Im) ²⁺	Παρεμβολή και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις	$4.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	[35]
[Ni(phen)2(phendione)] ²⁺	Παρεμβολή		[39]
[Ni(phen)2(dppz)] ²⁺	Παρεμβολή	$1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	[39]
[Ni(phen) (dicnq)] ²⁺	Παρεμβολή	$2.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	[17]
Ni(phen) (qdppz)] ²⁺	Παρεμβολή		[2]
Ni(phen)2(bnp)](PF ₆) ²⁺	Παρεμβολή	$2.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	[30]
Ni(bpy)2(bnp)](PF ₆) ²⁺	Παρεμβολή	$1.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	[30]
[Ni(bnp)3](PF ₆) ²⁺	Παρεμβολή	$3.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	[30]
Ni(sf)2(phen)	Παρεμβολή	$1.13 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$	[34]
Ni(sf)2(bipy)	Παρεμβολή	$7.75 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	[34]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Υλικά και Πειραματικές τεχνικές

4.1 Υλικά

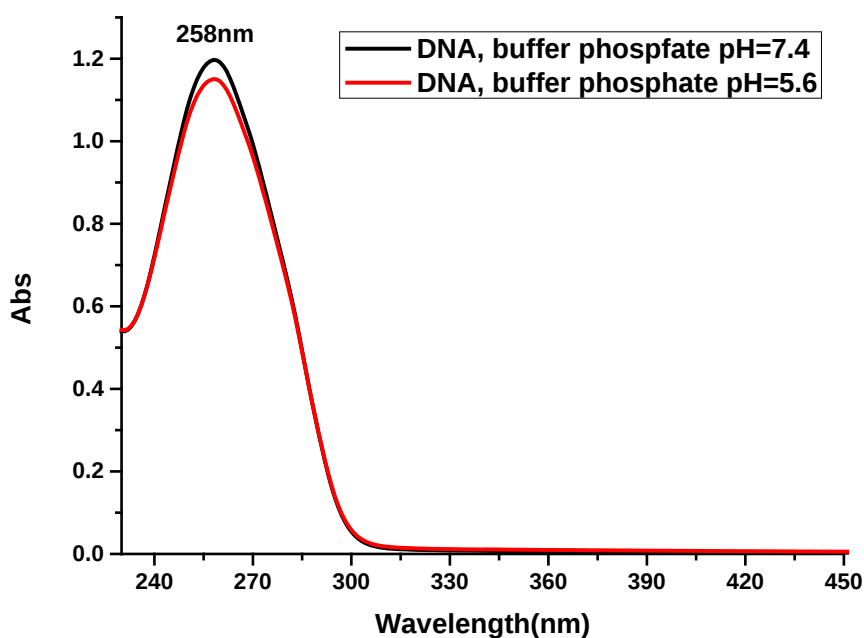
Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich και Alfa Aesar. Το άλας του νικελίου αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich ως εξαύδατο χλωριούχο νικέλιο $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Οι διαλύτες ήταν proanalysis και αγοράστηκαν από τις εταιρείες Merck και Carlo Erba, και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Όπου απαιτήθηκε καθαρισμός, έγινε με τυποποιημένες μεθόδους καθαρισμού.

Για τις DNA-δεσμευτικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε φυσικό DNA από θύμο αδένος βοοειδούς (calf thymus DNA, CT-DNA), που αγοράστηκε από την εταιρία Sigma Aldrich ως μετά νατρίου άλας. Για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε αгарόζη από την Sigma Aldrich, ενώ το πλασμίδιο pBR322 αγοράστηκε ως lyophilized powder από την Sigma Aldrich. Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ από την εταιρεία Farmitalia Carlo Erba, ενώ το tris-[hydroxymethyl]-aminomethane free base (Tris Base) και το αντίστοιχο υδροχλωρικό άλας (Tris-HCl) αγοράστηκαν από την εταιρεία Alfa Aesar. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν σε νερό milli Q.

4.2 Παρασκευή διαλύματος CT-DNA

Παρασκευάζεται διάλυμα DNA με διάλυση ινών φυσικού DNA από θύμο αδένος βοοειδούς (C.T.-DNA), περίπου 5mg σε 5 mL διαλύματος NaCl 0.1 M, υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος DNA ανά νουκλεοτίδιο που προκύπτει, υπολογίζεται με φασματοσκοπία απορρόφησης, αφού γνωρίζουμε το συντελεστή μοριακής απορρόφησης της κορυφής στα 258 nm, που είναι $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Ο λόγος της UV απορρόφησης στα 260:280 nm είναι 1.9:1, κάτι που υποδηλώνει ότι το DNA είναι ελεύθερο από πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση είναι της τάξης περίπου $\sim 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Η αραιώση μέρους από το πυκνό διάλυμα με μεγάλη ιοντική ισχύ

γίνεται με ρυθμιστικό διάλυμα, οπότε προκύπτει διάλυμα της τάξης του $\sim 1 \cdot 10^{-6}$ M. Να σημειωθεί ότι το πυκνό διάλυμα μπορεί να παραμείνει στο ψυγείο το πολύ για 4 ημέρες και πριν την επαναχρησιμοποίηση του ελέγχεται με φάσμα ηλεκτρονικής απορρόφησης.



Σχήμα 22: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4 και pH=5.8 στους 37°C.

4.3 Παρασκευή Ρυθμιστικών Διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer) pH = 7.4

Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάζεται ως εξής: διαλύονται 1.7867 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ σε 100 mL H_2O και 0.9073 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ σε 100 mL H_2O . Με προσθήκη 58.7 mL του διαλύματος $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ και 41.3 mL του διαλύματος $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ προκύπτουν 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με pH = 7.4. Η ιοντική ισχύς του διαλύματος ρυθμίζεται με προσθήκη άλατος NaCl.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer) pH = 5.8

Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάζεται ως εξής: διαλύονται 1.7867 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ σε 100 mL H_2O και 0.9073 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ σε 100 mL H_2O . Με προσθήκη 58.7 mL του διαλύματος $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ και 41.3 mL του διαλύματος $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ προκύπτουν 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με pH = 7.4. Η ιοντική ισχύς του διαλύματος ρυθμίζεται με προσθήκη άλατος NaCl.

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (5 mM) με NaCl (50 mM), pH = 7.4

Ζυγίζονται 0.394g Tris-HCl ($M_r=157.60$) και 1.461g NaCl και διαλύονται σε λιγότερο από 500 mL H_2O milli Q. Τέλος, το pH ρυθμίζεται με προσθήκη διαλύματος NaOH 1M στο 7.4 και συμπληρώνεται νερό μέχρι τα 500 mL.

Ρυθμιστικό διάλυμα «φόρτωσης» TBE 10x (Tris – Borate – EDTA) 100 mL (Loading buffer)

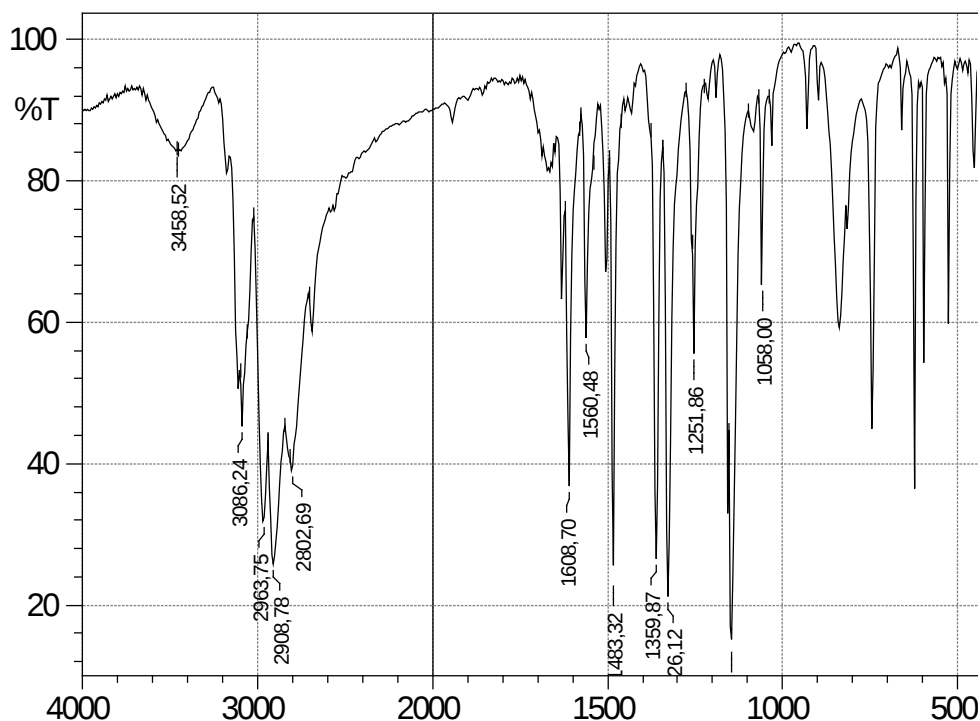
Το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης σε συγκέντρωση 1x, αφού παρέχει τους κατάλληλους ηλεκτρολύτες για τη διέλευση του ρεύματος. Διαλύονται 10.8g Tris base ($M_r=121.14$), 5.5 g βορικού οξέος και 0.75g δινάτριο EDTA ($M_r=372.24$) σε 100 mL νερό milli Q. Το πυκνό αυτό ρυθμιστικό διάλυμα έχει pH=8.3 (χωρίς ρύθμιση) και συγκέντρωση 890 mM Tris base, 890mM βορικού οξέος, 20mM EDTA. Μέρος αυτού του διαλύματος αραιώνεται 10 φορές για να προκύψει το επιθυμητό 1xTBE ρυθμιστικό διάλυμα, συγκέντρωσης 89mM Tris base, 89 mM βορικού οξέος, 2mM EDTA, που χρησιμοποιείται στη «φόρτωση» της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

4.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Στη παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση δύο υποκαταστατών, της dipyrrido[3,2-a;2',3'-c]phenazine (dppz)[40] και της quinoxaline-2,3-dithiolate (qdt)[41], ακολουθώντας τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές διαδικασίες. Στη

συνέχεια παρουσιάζονται τα φάσματα υπερύθρου FT-IR, και απορρόφησης UV-vis των δύο υποκαταστατών.

Όπως παρατηρούμε φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του υποκαταστάτη qdt. Οι κορυφές που απαντώνται στα 1359cm^{-1} και στα 1483cm^{-1} αποδίδονται στη δόνηση τάσης C=N και τη χαρακτηριστική κορυφή S-H στους 2908cm^{-1} .

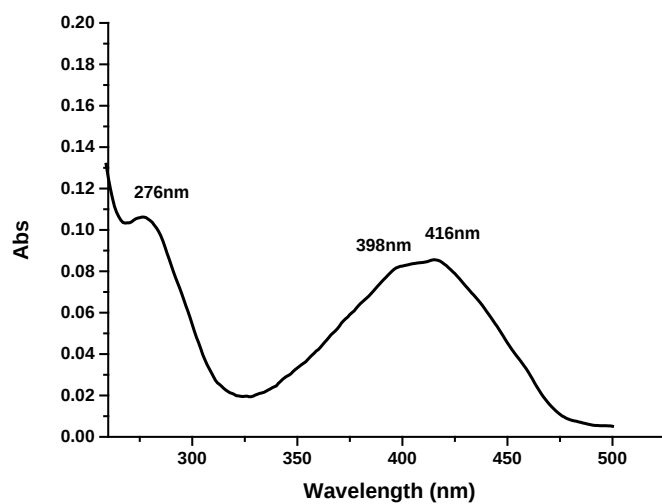


Σχήμα 23: Φάσμα FT-IR του υποκαταστάτη quinoxaline-2,3-dithiolate σε δισκίο KBr

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικός πίνακας δονήσεων και τάσεων του qdt

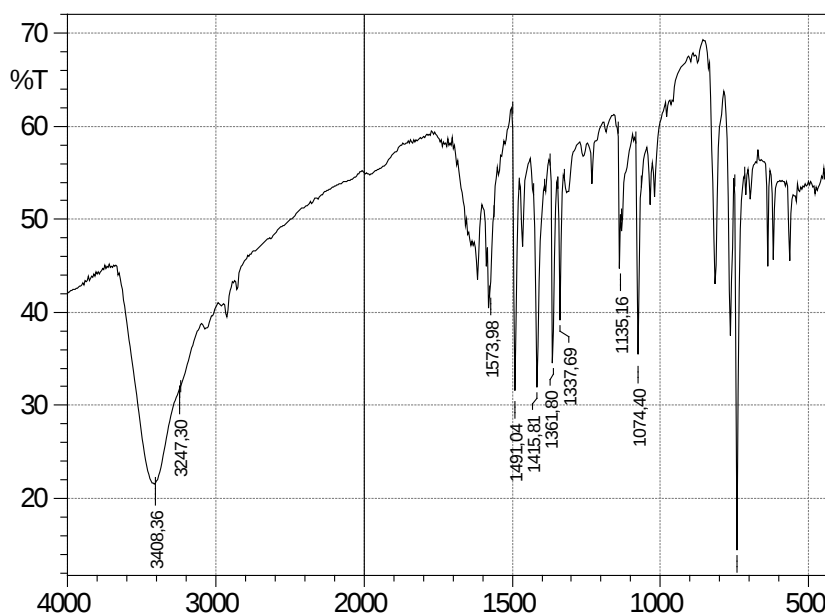
Δόνηση	Qdt
1359cm^{-1}	τάση C=N
1483cm^{-1}	τάση C=N
2908cm^{-1}	τάση S-H

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το χαρακτηριστικό φάσμα της 2,3-διθειόλη-κιννοξαλίνης. Βλέπουμε την απορρόφηση στα 398nm και 416nm όπου αποδίδονται στο αρωματικό σύστημα της κιννοξαλίνης καθώς και την απορρόφηση στα 276nm του βενζολικού δακτυλίου που αποδίδονται σε μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$.



Σχήμα 24: Φάσμα απορρόφησης UV-vis του υποκαταστάτη quinoxaline-2,3-dithiolate σε διαλύτη DMSO

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το φάσμα υπέρυθρου του υποκαταστάτη διπυριδο [3,2-α;2'3'-c] φαιναζίνης. Από το φάσμα παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές της τάσης του C=N στους 1415cm^{-1} και στους 1361cm^{-1} .

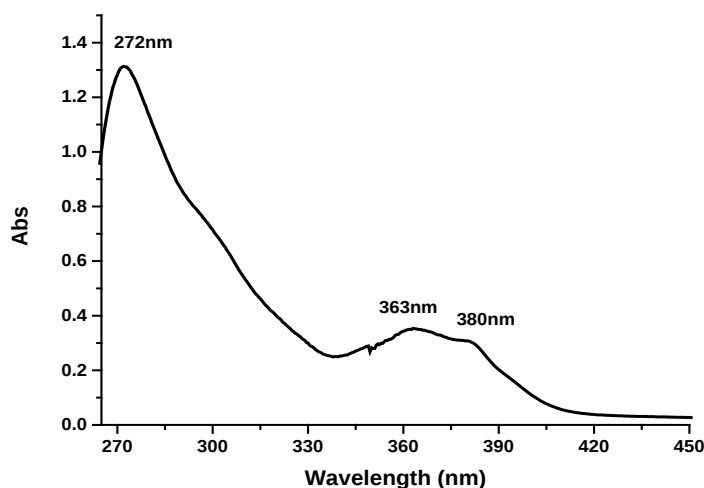


Σχήμα 25: Φάσμα FT-IR του υποκαταστάτη dipyrido[3,2-α;2'3'-c] phenazine σε δισκίο KBr

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικός πίνακας δονήσεων και τάσεων του υποκαταστάτη dppz

Δόνηση	dppz
1415cm ⁻¹	τάση C=N
1361cm ⁻¹	τάση C=N

Παρακάτω βλέπουμε το φάσμα απορρόφησης του dppz. Οι χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης που απαντώνται στα 363nm και 380nm που αποδίδονται στο σύστημα της φαιναζίνης και την απορρόφηση στα 272nm αποδίδεται στο αρωματικό σύστημα της φαινανθρολίνης.

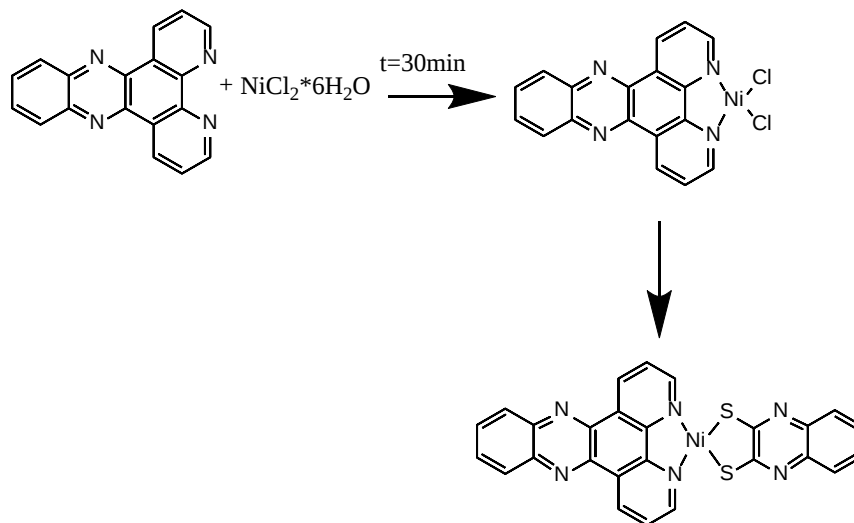


Σχήμα 26: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis του υποκαταστάτη dipyrido[3,2-a;2',3'-c] phenazine σε διαλύτη DMSO

4.5 Σύνθεση του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)]

Κατάλληλη ποσότητα του υποκαταστάτη dppz 0,173mmol διαλύονται σε 5mL διαλύτη μεθανόλη (MeOH) και στη συνέχεια προσθέτω 0,173mmol NiCl₂*6H₂O αφού προηγουμένως έχουν διαλυθεί σε 3mL διαλύτη MeOH και αναδεύονται για μισή ώρα, όπου παρατηρείται ένα κίτρινο έντονο διάλυμα. Έπειτα στο μίγμα προστίθενται 0,173mmol του υποκαταστάτη qdt, αφού έχουν διαλυθεί σε 5mL διαλύτη MeOH που

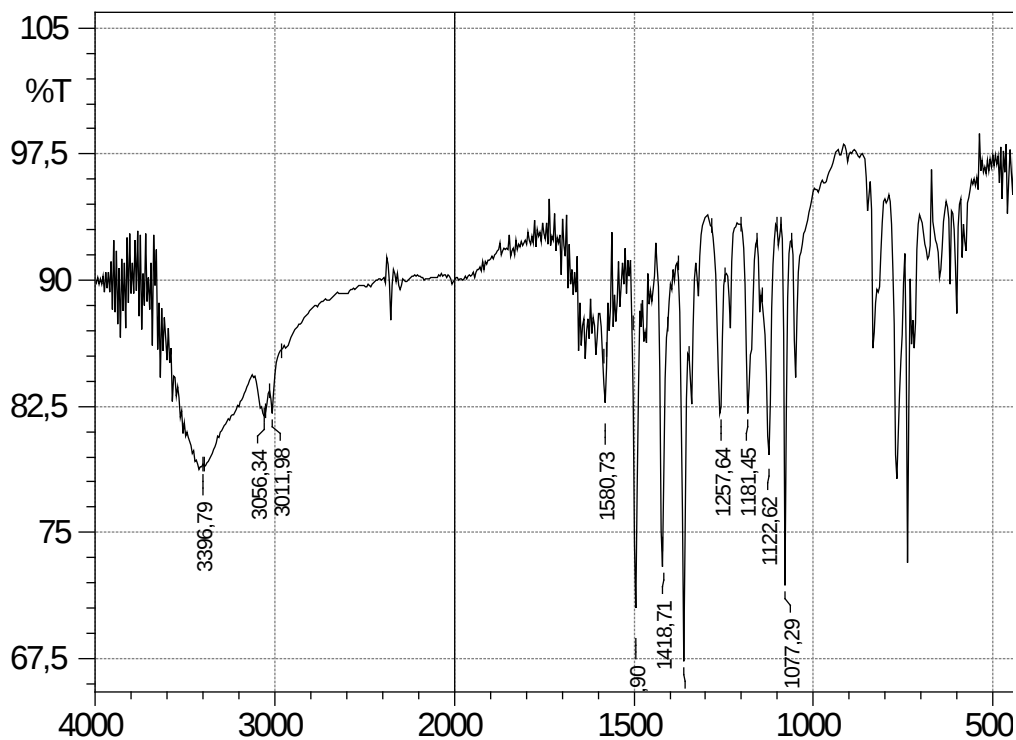
περιείχε 0,350 mmol KOH. Σχηματίζεται απευθείας ένα μελιτζανί χρώμα. Το διάλυμα αφέθηκε να αντιδράσει υπό ανάδευση για 7h. Ύστερα το διάλυμα διηθείται και παραλαμβάνεται ένα σκούρο κόκκινο στερεό. Αφήνεται για ξήρανση 24h και η καθαρότητα ελέγχθηκε με διάφορα συστήματα χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, (TLC). Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 68,8%.



Σχήμα 27: Συνθετική πορεία του συμπλόκου [Ni(qdt)(dppz)]

4.6 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου

Ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία απορρόφησης UV-vis, όπου μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης, όπου μέσω φασμάτων απορρόφησης ελέγχθηκε και η σταθερότητα του συμπλόκου. Μέσω φασματοσκοπία υπέρυθρου FT-IR πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου μέσω των χαρακτηριστικών κορυφών τάση ή κάμψη των δεσμών. Όπως διαπιστώνουμε δεν υπάρχει η χαρακτηριστική κορυφή τάσης του S-H, η οποία υπάρχει στον ελεύθερο υποκαταστάτη qdt, γεγονός που αποδεικνύει τη σύμπλεξη του με το νικέλιο.



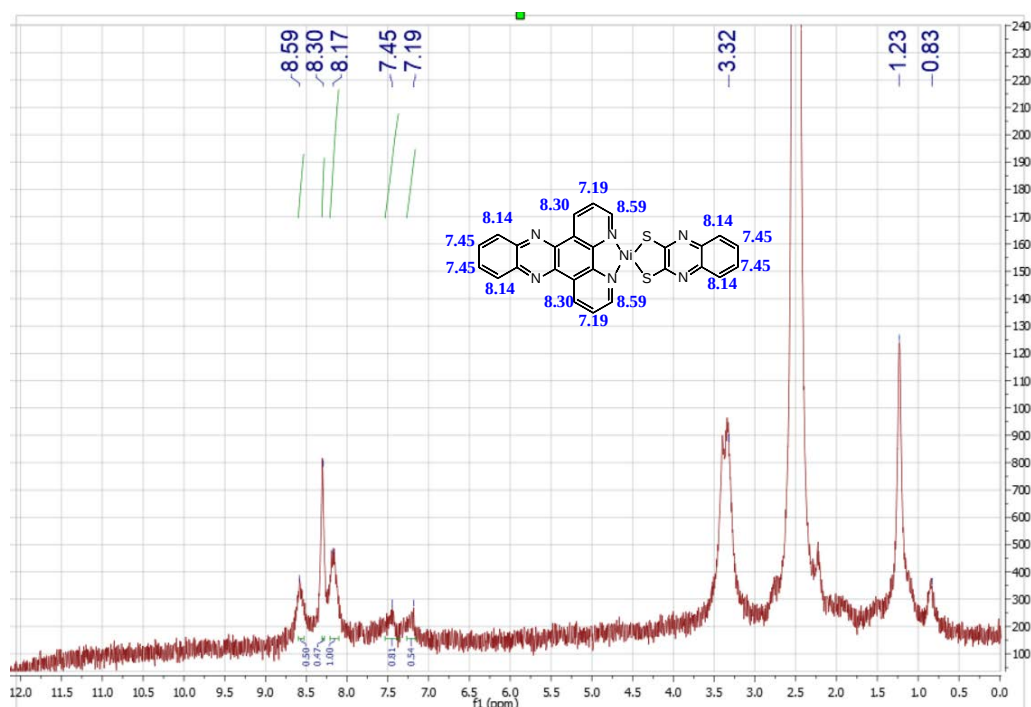
Σχήμα 28: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ σε δισκίο KBr

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικός πίνακας δονήσεων και τάσεων του συμπλόκου

Δόνηση	$[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$
τάση C-H αρωματικών	3056cm^{-1}
τάση C=C αρωματικών	1580cm^{-1}
τάση C=N	1494cm^{-1}
τάση C=N	1418cm^{-1}

Εν συνεχεία παρουσιάζεται το φάσμα H-NMR του συμπλόκου προκειμένου να ταυτοποιηθεί η ένωση. Οι μετατοπίσεις στην αρωματική περιοχή (πάνω από τα 7ppm) που αποδίδονται στα αρωματικά πρωτόνια των υποκαταστατών. Ακόμη βλέπουμε δύο έντονες κορυφές στα 3.34ppm και στα 1.21ppm όπου αποδίδονται στα πρωτόνια του

νερού και του εξανίου, αφού χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες για την έκπλυση του στερεού.



Σχήμα 29: Φάσμα NMR του συμπλόκου σε d₆-DMSO

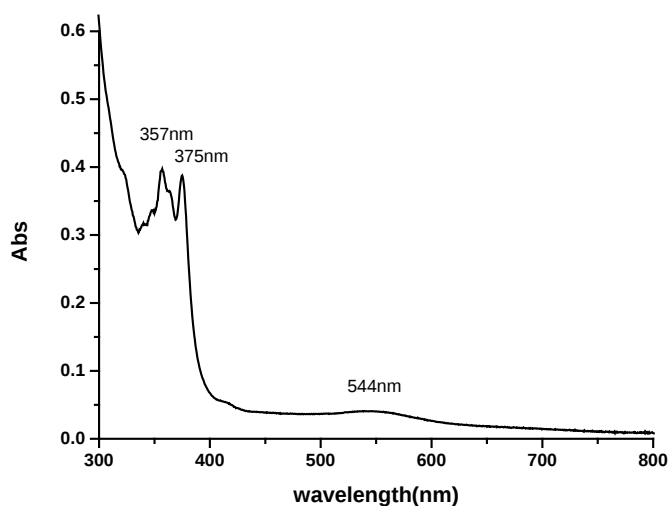
Πίνακας 6: Πίνακας χαρακτηριστικών μετατοπίσεων του [Ni(dppz)(qdt)]

δppm	Αποδόσεις
0.87	CH ₃ -Hexane
1.23	CH ₂ -Hexane
3.33	H-H ₂ O

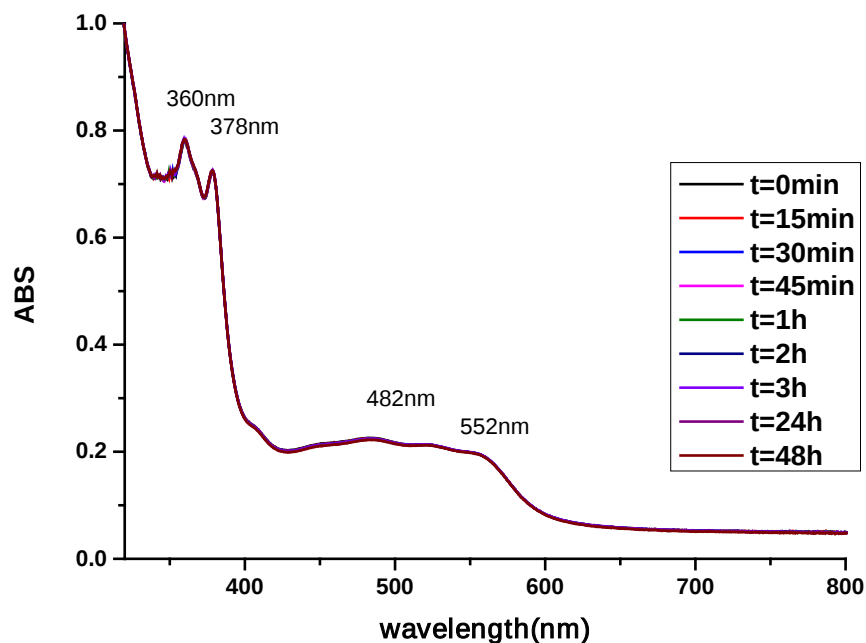
Η φασματοσκοπία UV-vis χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η σταθερότητα του συμπλόκου (M_r=533.29 g/mol) σε διαλύτη DMF και DMSO. Τα φάσματα σε διαλύτη DMSO λήφθηκαν σε διάφορες χρονικές στιγμές και όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, μεταξύ των διαλυτών έχουμε μία μικρή μετατόπιση, γεγονός που αποδεικνύει ότι το σύμπλοκο παρουσιάζει ένα μικρό διαλυτοχρωμισμό.

Τα μέγιστα των απορροφήσεων που αντιστοιχούν σε μήκη κύματος 332nm, 357nm και 375nm αντιστοιχούν σε $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεις εντός των αρωματικών δακτυλίων του υποκαταστάτη (ILCT), ενώ η κορυφή στα 544nm αντιστοιχεί σε μεταφορά φορτίου από το μέταλλο στον υποκαταστάτη (MLCT). Επίσης στο διαλύτη DMSO παρουσιάζεται αλλαγή στη κορυφή που αποδίδεται σε MLCT. Η μεταβολή αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στη συμπλεκτική ικανότητα του DMSO.

Σύμφωνα με το νόμο του Lambert-Beer ($A=\epsilon bc$) υπολογίστηκε η γραμμομοριακή απορροφητικότητα του συμπλόκου, $\epsilon=16.344\text{cm}^{-1}$ μέσα από τη μέτρηση της με φασματοσκοπία ορατού – υπεριώδους.



Σχήμα 30: Φάσμα απορρόφησης του $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ σε διαλύτη DMF



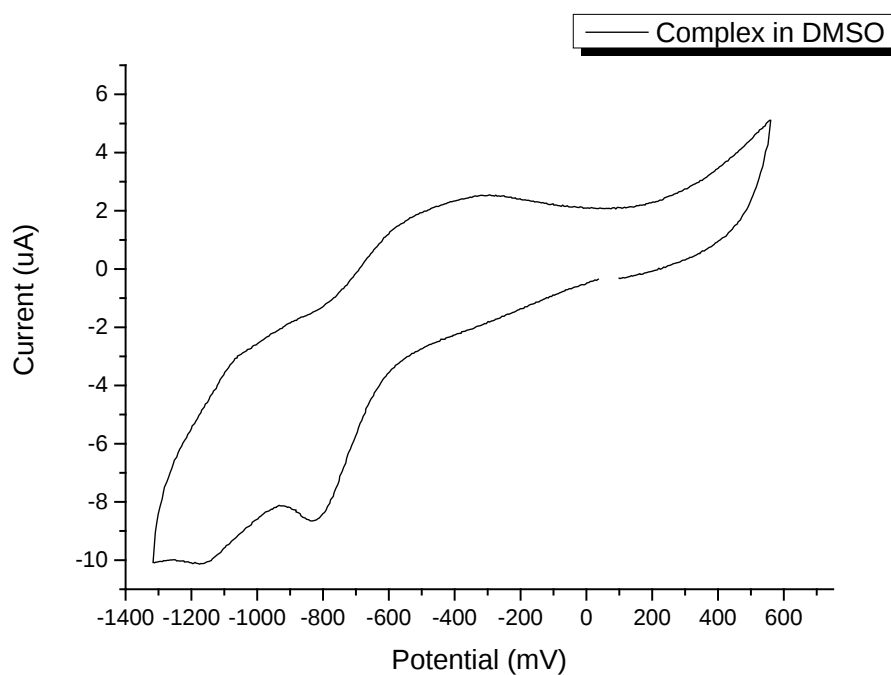
Σχήμα 31: Φασματοσκοπική μελέτη του $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ σε διαλύτη DMSO

Στα πλαίσια του χαρακτηρισμού του συμπλόκου εξετάστηκε κατά πόσο αυτό έχει την ικανότητα να εκπέμπει φθορισμό κατά την αποδιέγερσή του. Τελικά παρατηρήθηκε ότι δεν παρουσιάζει φωταύγεια στους διαλύτες που μελετήθηκε, δηλαδή στο DMF και στο DMSO.

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του συμπλόκου μελετήθηκε με τη χρήση της κυκλικής βολταμμετρίας (CV), σε διαλύτη DMSO, χρησιμοποιώντας υαλώδη άνθρακα (glassy carbon) ως ηλεκτρόδιο εργασίας και Ag/AgCl ως ηλεκτρόδιο αναφοράς. Ο φέροντας ηλεκτρολύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TBAPF_6 , σε τελική συγκέντρωση $1 \times 10^{-2} \text{M}$, ενώ η συγκέντρωση του συμπλόκου αντιστοιχούσε σε $1 \times 10^{-4} \text{M}$. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το φεροκκένιο το οποίο υπόκειται σε μία αντιστρεπτή οξειδοαναγωγική αντίδραση ενός ηλεκτρονίου. Πριν από κάθε μέτρηση, τα δείγματα απαερώθηκαν για τουλάχιστον 5 min, με διαβίβαση αερίου N_2 .

Στο Σχήμα 33 παρουσιάζεται το κυκλικό βολταμμογράφημα του συμπλόκου, το οποίο λήφθηκε με ταχύτητα σάρωσης 80 mV/s. Το αναγωγικό κύμα στα -1166mV

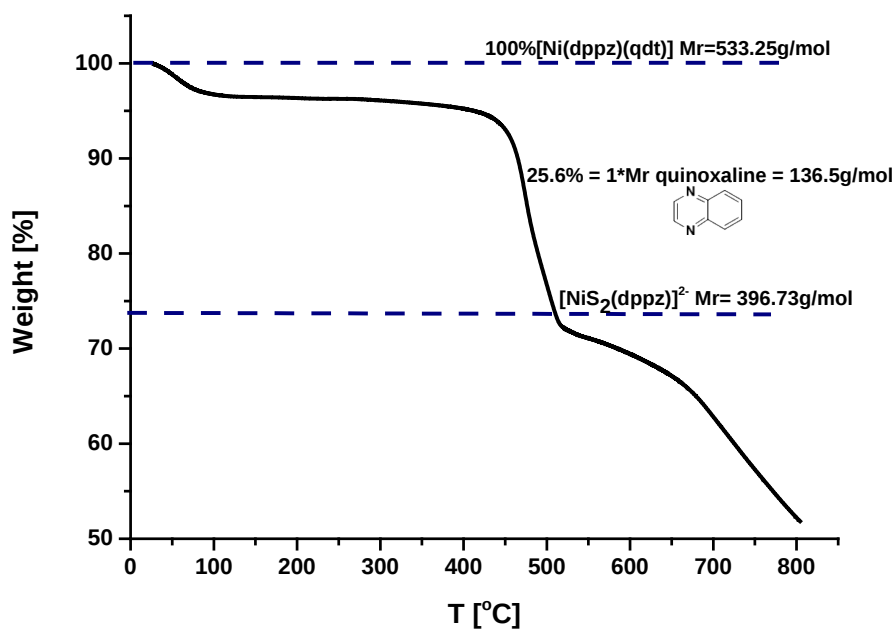
αποδίδεται σε αναγωγή του συμπλεγμένου υποκαταστάτη και συγκεκριμένα στην διπυριδοφαιναζίνη, ενώ η αναγωγή στα -830.14mV είναι χαρακτηριστική του ζεύγους Ni(II) σε Ni(III) .



Σχήμα 32: Κυκλικό βολταμογράφημα του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ σε διαλύτη DMSO

	E_c (mV)	E_a (mV)
$\text{Ni(II)} \rightarrow \text{Ni(III)}$	-837	-547
dppz	-1175	-1060

Προκειμένου το σύμπλοκο $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ να χαρακτηριστεί πλήρως, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA), με την οποία παρατηρήθηκε η μεταβολή της μάζας του συμπλόκου συναρτήσει της θερμοκρασίας, μέσα σε ελεγχόμενη και αδρανή ατμόσφαιρα, υπό σταθερή ροή αερίου N_2 . Μελετώντας τις απώλειες μάζας του θερμογραφήματος μπορούμε να εξαγάγουμε συμπεράσματα για τη δομή του συμπλόκου, θεωρώντας ότι στο 100% αντιστοιχεί το συνολικό μοριακό βάρος της ένωσης (533.25g/mol). Συγκεκριμένα, η πρώτη αμελητέα απώλεια αντιστοιχεί σε τυχόν υγρασία. Στη συνέχεια παρατηρείται μία έντονη πτώση που ξεκινά από τους 100°C και φθάνει έως στους 500°C, η οποία αντιστοιχίζεται στο 25.4% της συνολικής μάζας. Η παραπάνω απώλεια μάζας αποδίδεται στην αποχώρηση του κιννοξαλικού δακτυλίου του υποκαταστάτη 2,3-διθειόλη- κιννοξαλίνης (qdt). Το τμήμα της ένωσης που υπολείπεται αντιστοιχεί στη δομή $[\text{Ni}(\text{dppz})\text{S}_2]^{2-}$ που αποτελεί το 74.50% της αρχικής δομής (MB=396.74 g/mol). Έπειτα, αναμένεται να αποχωρήσει ο υποκαταστάτης dppz, προς σχηματισμό κάποιου άλατος ή οξειδίου του μετάλλου. Η τελευταία διεργασία δεν ήταν δυνατόν να γίνει ορατή στις θερμοκρασίες που λήφθηκε το θερμογράφημα.



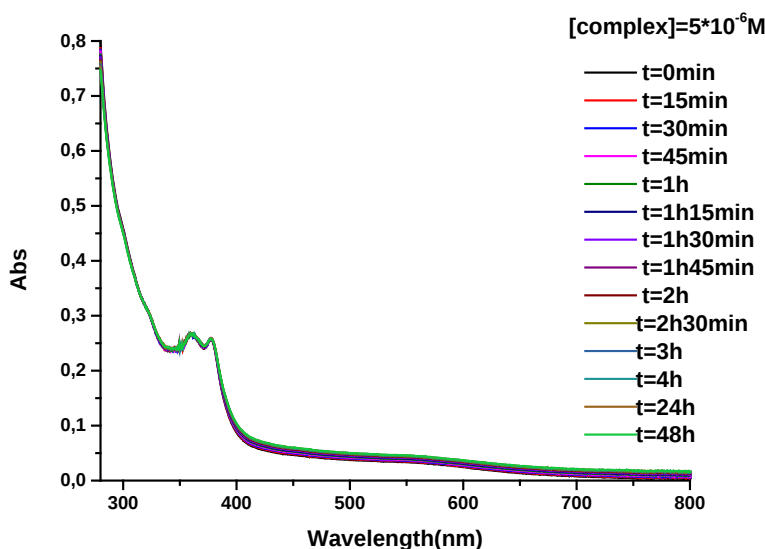
Σχήμα 33: Θερμογράφημα του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$

4.6 Μελέτη παρακολούθησης του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)] με C.T.-DNA

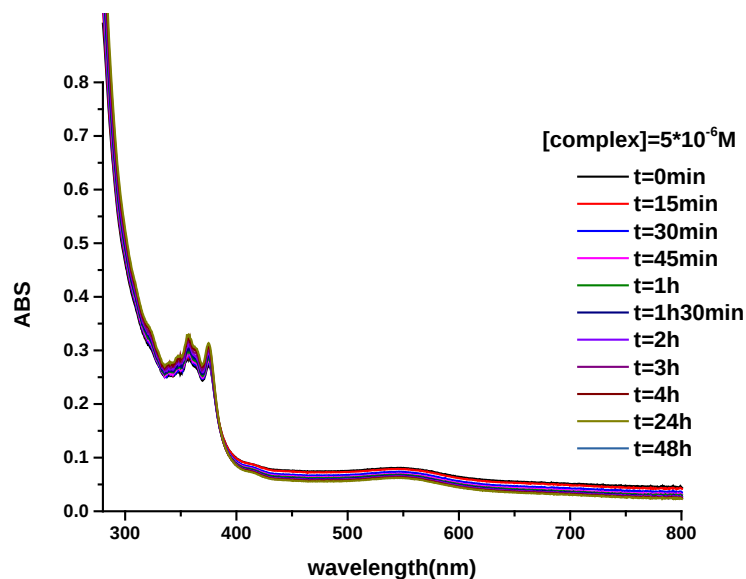
Το σύμπλοκο μελετήθηκε για την αλληλεπίδραση του με το C.T.-DNA (Calf Thymus DNA) με τεχνικές όπως τιτλοδότηση, ιξωδομετρία, κυκλική βολταμετρία, φασματοσκοπία εκπομπής, κυκλικός διχρωϊσμός και ηλεκτροφόρηση.

Στην αρχή το σύμπλοκο εξετάσθηκε με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis) ως προς τη σταθερότητα στα ρυθμιστικά του διαλύματα τόσο σε βασικό όσο και σε όξινο pH. Οι τιμές των δύο pH επιλέχθηκαν εξαιτίας του περιβάλλοντος των καρκινικών κυττάρων, όπου οι συνθήκες που επικρατούν είναι διαφορετικές από τα φυσιολογικά κύτταρα. Στα καρκινικά κύτταρα το pH είναι πιο όξινο σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα που είναι περίπου ελαφρώς βασικό (pH =7.4 για τα υγιή κύτταρα, pH =5.8 για τα καρκινικά κύτταρα).

Παρατηρώντας λοιπόν για τα φάσματα απορρόφησης UV-vis, διαπιστώνουμε μία πιο έντονη μείωση της MLCT του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)] στις όξινες συνθήκες, ενώ αντίθετα σε ελαφρώς βασικές συνθήκες το σύμπλοκο παραμένει πρακτικά σταθερό. Η συγκέντρωση του συμπλόκου είναι $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$, ενώ επειδή ως διαλύτης του συμπλόκου είναι το DMSO, ελέγχθηκε ώστε η περιεκτικότητα του διαλύτη στα ρυθμιστικά διαλύματα να μην υπερβαίνει το 2%.

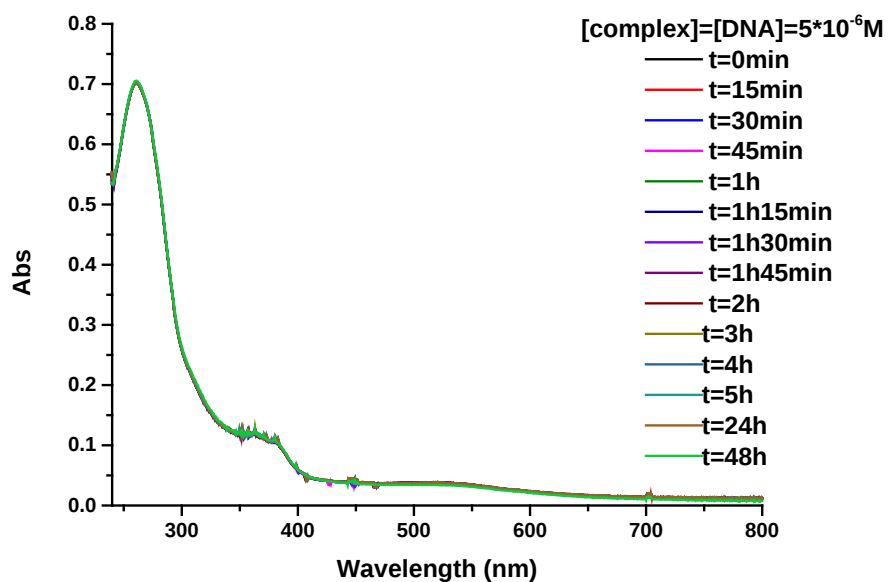


Σχήμα 34: Φασματοσκοπική μελέτη του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)] σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4

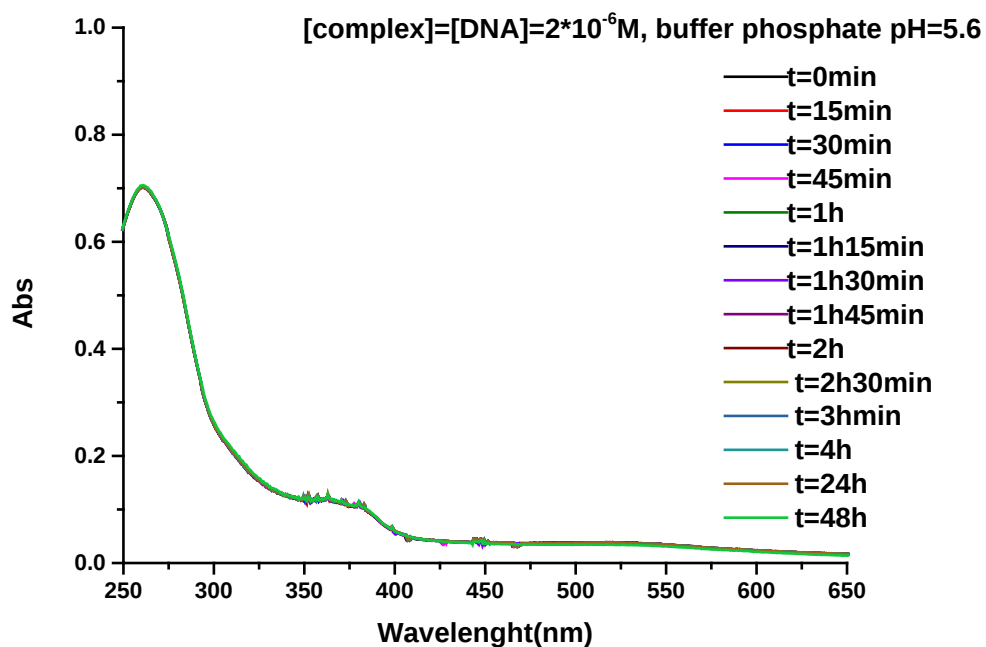


Σχήμα 35: Φασματοσκοπία απορρόφησης UV-vis του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ σε διάλυμα φωσφορικών pH=5.8, 37°C

Από τη φασματοσκοπική μελέτη UV-vis του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ με το DNA παρατηρείται ότι η τιμή της απορρόφησης του συμπλόκου παραμένει σχεδόν σταθερή μετά από μία ώρα επώασης, χωρίς να λαμβάνει καμία ιδιαίτερη μεταβολή ύστερα και από 48h επώασης στους 37°C, σε pH= 7.4 και σε pH=5.8.



Σχήμα 36: Φασματοσκοπική μελέτη UV-vis του συμπλόκου με DNA σε διάλυμα φωσφορικών σε pH=7.4, 37°C



Σχήμα 37: Φασματοσκοπική μελέτη του συμπλόκου με το DNA σε διάλυμα φωσφορικών pH=7.4, 37°C

Δεδομένου λοιπόν ότι δεν παρατηρείται μεταβολή στο φάσμα απορρόφησης του μετά το πέρας των 24h, συμπεραίνουμε ότι το σύμπλοκο δεν παρουσιάζει καμία μεταβολή, έτσι όλα τα πειράματα διεξήχθησαν με επώαση 24h με το διάλυμα του DNA.

4.6.1 Τιτλοδότηση UV-vis

Αρχικά, η πιθανή αλληλεπίδραση του συμπλόκου του νικελίου με το DNA σε όξινο pH μελετήθηκε με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα σύμπλοκα που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA μέσω παρεμβολής συνήθως παρουσιάζουν υποχρωμισμό, δηλαδή η απορρόφηση του διαλύματος του συμπλόκου με αύξηση της συγκέντρωσης του DNA, σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, μειώνεται καθώς αυξάνεται ο λόγος $[C.T.-DNA]/[σύνπλοκο]$. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα σε έναν αρωματικό χρωμοφόρο υποκαταστάτη και τα ζεύγη βάσεων του DNA. Αντίθετα, στην περίπτωση εξωτερικής συναρμογής παρατηρείται υπερχρωμισμός, δηλαδή αύξηση της απορρόφησης με αύξηση της συγκέντρωσης του C.T.-DNA[43][44].

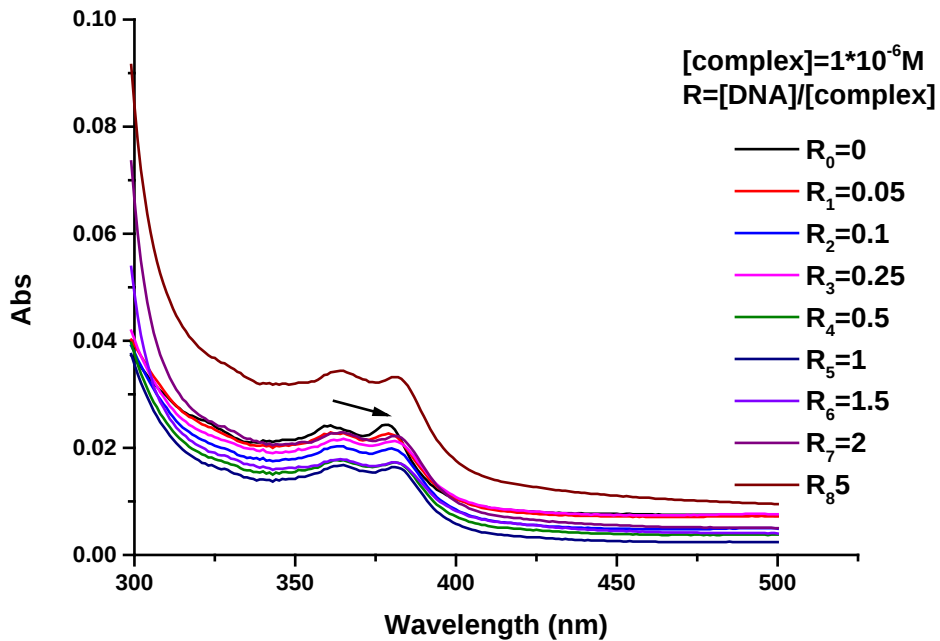
Για την παρασκευή των διαλυμάτων της τιτλοδότησης UV-vis διατηρήθηκε σταθερή η συγκέντρωση του συμπλόκου, ενώ η συγκέντρωση του DNA αυξάνεται. Τα διαλύματα επωάστηκαν για 24h, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών τόσο σε όξινο όσο και σε βασικό pH και μετρήθηκε η απορρόφηση τους. Τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόζονται στην παρακάτω εξίσωση και υπολογίζεται η σταθερά σύνδεσης, K_b [43][44].

$$\frac{[DNA]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$

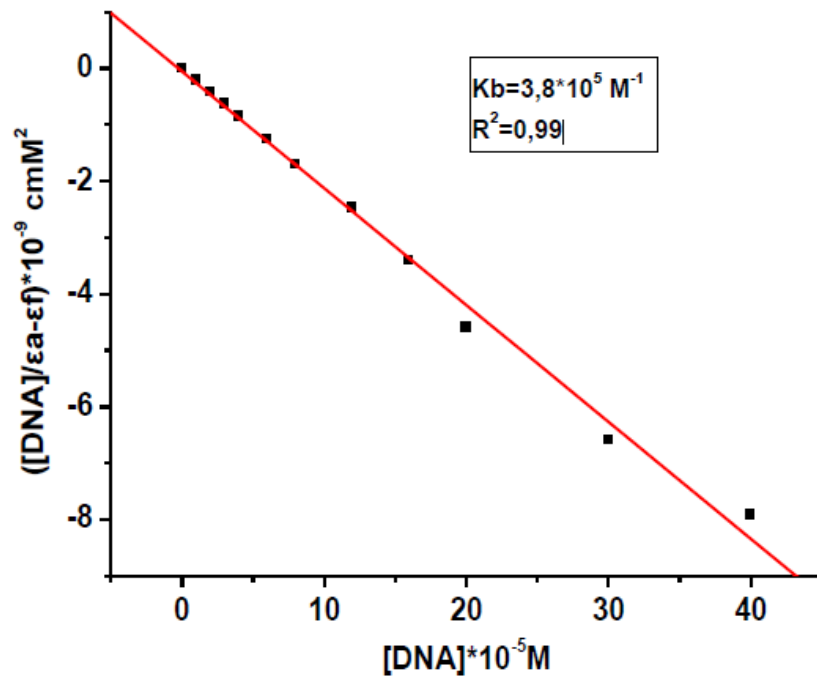
Όπου:

✓ $[DNA]$: η συγκέντρωση του DNA σε κάθε λόγο R,

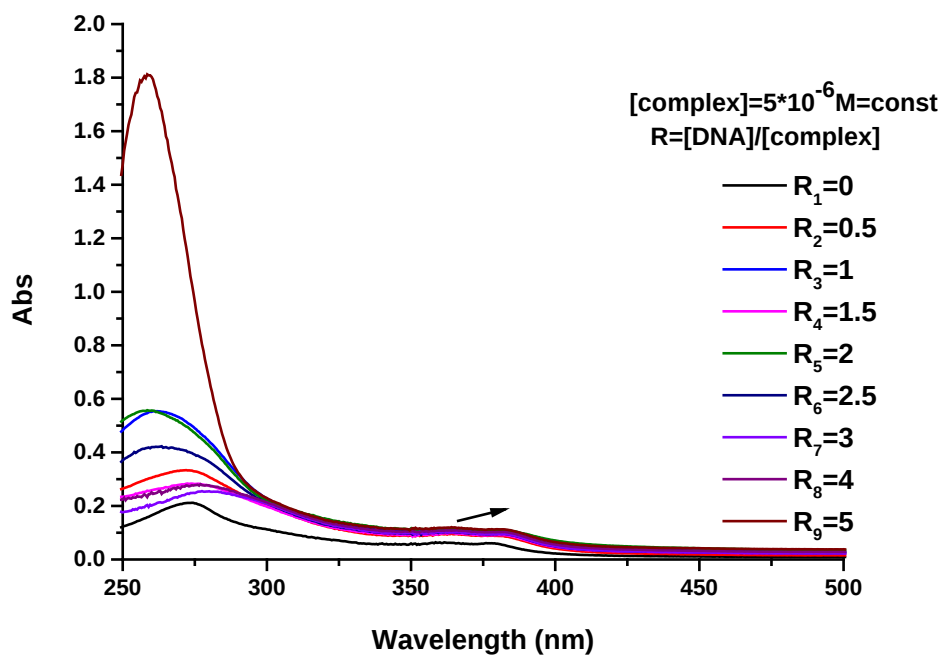
- ✓ εα: συντελεστής μοριακής απορρόφησης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος του κάθε διαλύματος (υπολογίζεται ως $A_{obs}/[complex]$),
- ✓ εβ: συντελεστής μοριακής απορρόφησης του δεσμευμένου με το DNA συμπλόκου
- ✓ εγ: συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ελεύθερου (μη δεσμευμένου) συμπλόκου.



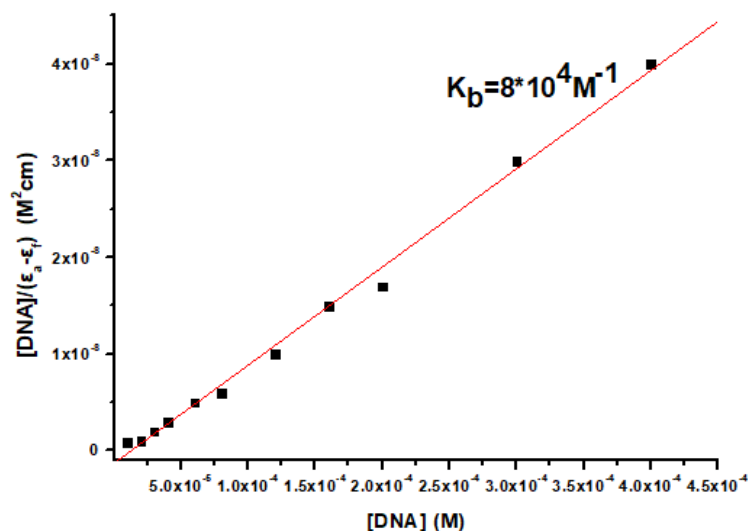
Σχήμα 38: Φάσμα τιτλοδότησης $[Ni(dppz)(qdt)]$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4, 37°C



Σχήμα 39: Γραφική παράσταση του λόγου $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ συναρτήσει του $[DNA]$



Σχήμα 40: Φάσμα τιτλοδότησης του $[Ni(dppz)(qdt)]$ σε διαλύτη ρυθμιστικών $pH=5.8$, στους 37°C



Σχήμα 41: Γραφική παράσταση του λόγου $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_t)$ συναρτήσει της συγκέντρωσης του DNA σε $pH=5.8$

Από το παραπάνω φάσμα φαίνεται ότι υπάρχει αύξηση για τους λόγους της απορρόφησης (υπερχρωτισμός), χωρίς να παρατηρείται όμως σταθερή μεταβολή, γεγονός που το καθιστά αμφίβολο να υπάρχει ενδεχόμενο ένας μοναδικός τρόπος αλληλεπίδρασης.

4.6.2 Ιξωδομετρία

Μια άλλη μέθοδος εξέτασης της μελέτης του τρόπου σύνδεσης του DNA με τις διάφορες ενώσεις αποτελεί η μέτρηση του ιξώδους σε διάλυμα DNA. Βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι στην περίπτωση της κλασικής παρεμβολής, τα ζεύγη βάσεων του DNA απομακρύνονται, καθώς ο παρεμβολέας στοιβάζεται ανάμεσά τους, επομένως η διπλή έλικα ξετυλίγεται με αποτέλεσμα την αύξηση του μήκους της, τελικά να οδηγεί στην αύξηση του ιξώδους του διαλύματος. Αντίθετα, η σύνδεση μιας ένωσης στην αύλακα του DNA οδηγεί σε κάμψη ή και περιστροφή της έλικας του DNA μειώνοντας έτσι το αποτελεσματικό μήκος της, με συνέπεια το ιξώδες του διαλύματος του DNA να μειώνεται.

Το ιξώδες είναι ευαίσθητο στη μεταβολή του μήκους του DNA και για το λόγο αυτό η ιξωδομετρία θεωρείται μια από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους για τον προσδιορισμό του τρόπου αλληλεπίδρασης ενώσεων με το DNA[43][44].

Το σχετικό ιξώδες υπολογίζεται από τη σχέση: $n = \frac{t-t_0}{t_0}$

Όπου,

- t: ο χρόνος ροής σε s του κάθε διαλύματος και
- t₀: ο χρόνος ροής του διαλύτη

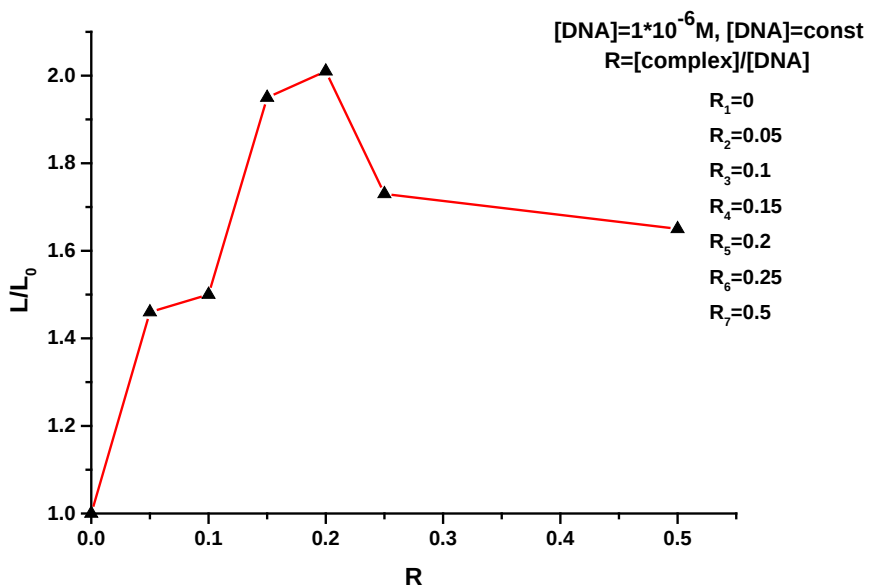
Η αύξηση του μήκους της έλικας του DNA υπολογίστηκε από τα πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με την προσεγγιστική σχέση:

$$\frac{L}{L_0} = \left(\frac{n}{n_0}\right)^{1/3} = \left(\frac{t - t_0}{t_{DNA} - t_0}\right)^{1/3}$$

Όπου,

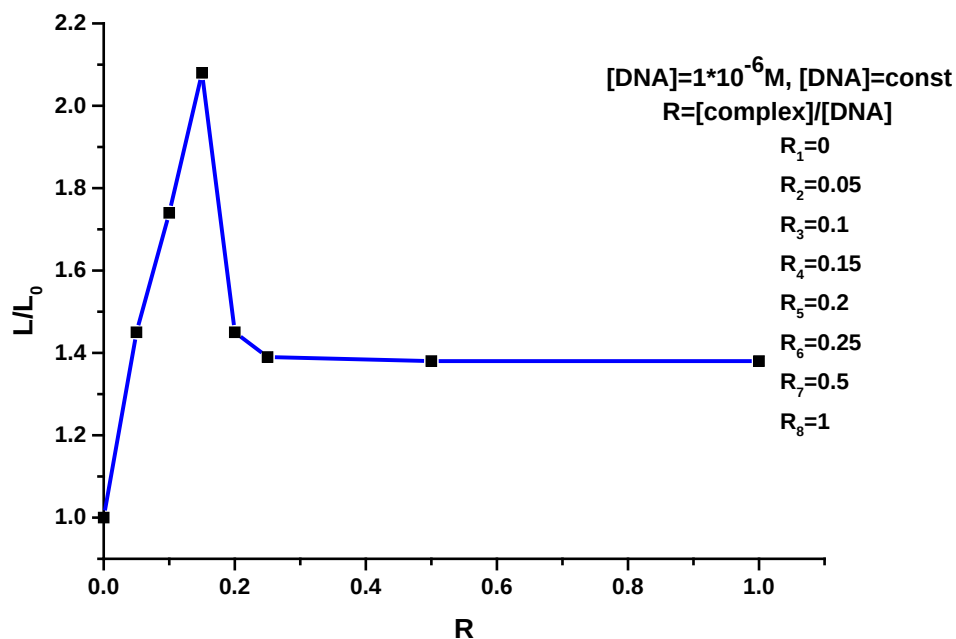
- L, L₀: το πειραματικό μήκος του DNA, παρουσία και απουσία συμπλόκου, αντίστοιχα
- n, n₀: τα σχετικά ιξώδη (για τις συγκεντρώσεις του πειράματος θεωρούνται κατά προσέγγιση ίσα με το ανηγμένο ιξώδες), παρουσία και απουσία συμπλόκου, αντίστοιχα
- t, t_{DNA}, t₀: οι χρόνοι ροής των διαλυμάτων DNA παρουσία του συμπλόκου, του διαλύματος DNA και απουσία του συμπλόκου και του διαλύτη (ρυθμιστικό διάλυμα), αντίστοιχα

Τα δείγματα παρασκευάστηκαν και εδώ με παρόμοιο τρόπο όπως και στην τιτλοδότηση UV-Vis σε θερμοκρασία στους 37°C, με τη διαφορά ότι σε αυτήν την περίπτωση διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση του DNA και μεταβάλλεται η συγκέντρωση του συμπλόκου. Το αποτέλεσμα είναι να δημιουργούνται δείγματα διαφορετικών λόγων $R = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$.



Σχήμα 42: Μεταβολή του $L/L_0 = (n/n_0)^{1/3}$ συναρτήσει του λόγου R, $\theta=37^\circ C$, $pH=7.4$

Από την ιζωδομετρία λοιπόν φαίνεται ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το DNA μέσω δύο διαφορετικών τρόπων. Η αύξηση που παρατηρείται στο ιζώδες για μικρές συγκεντρώσεις του $[Ni(dppz)(qdt)]$ πιθανότατα αποδίδεται σε μιας παρεμβολικής φύσης αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το μακρομόριο, ενώ η μείωση που παρουσιάζεται έπειτα υποδεικνύει μιας εξωτερικής φύσης αλληλεπίδραση. Το παραπάνω ίσως οφείλεται στην επιλεκτική κατάληψη των θέσεων του DNA από το σύμπλοκο και έτσι όταν οι θέσεις αυτές έχουν καλυφθεί πλήρως, ξεκινά η εξωτερική πρόσδεση του συμπλόκου στη διπλή έλικα.



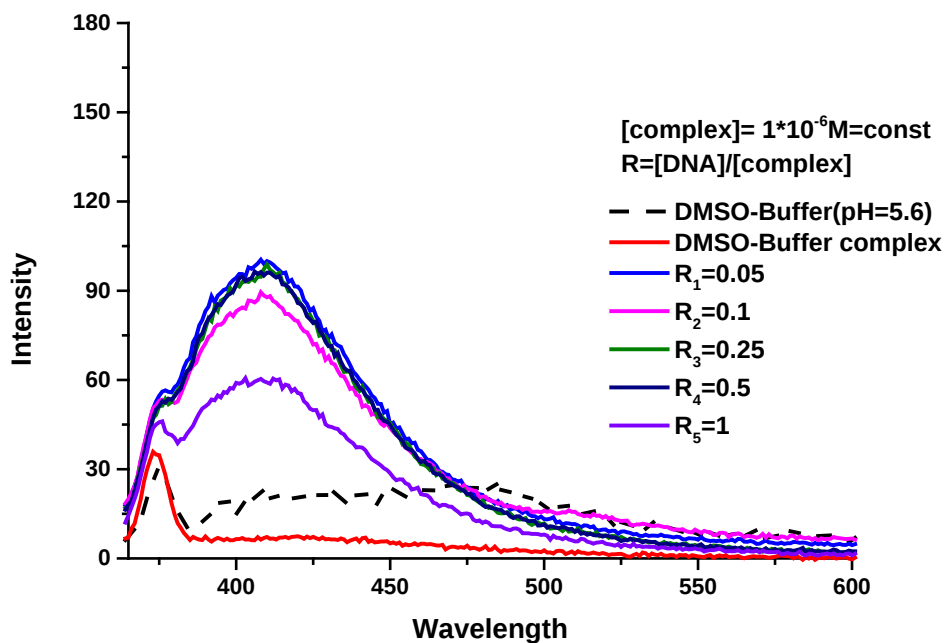
Σχήμα 43: Μεταβολή του $L/L_0 = (n/n_0)^{1/3}$ συναρτήσει του λόγου R , $\theta=37^\circ C$, $pH=5.8$

Από την ιξωδομετρία σε όξινες συνθήκες φανερώνει ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το DNA μέσω δύο διαφορετικών πάλι τρόπων. Η αύξηση που παρατηρείται στο ιξώδες για μικρές συγκεντρώσεις του συμπλόκου πιθανότατα αποδίδεται σε μιας παρεμβολικής παρεμβολή, ενώ η μείωση που παρουσιάζεται έπειτα υποδεικνύει μιας εξωτερικής φύσης αλληλεπίδραση ή σε σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA.

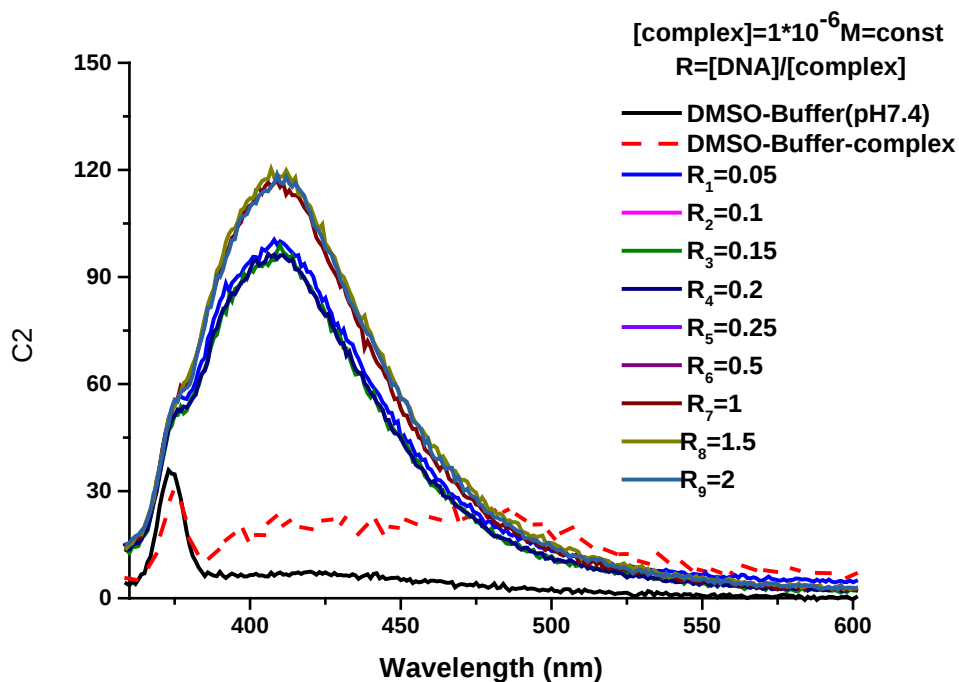
4.6.3 Φθορισμομετρία

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το σύμπλοκο δεν εμφανίζει φωταύγεια λόγω αποδιέγερσης. Παρατηρήθηκε όμως ότι αυξάνοντας τη συγκέντρωση του DNA διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του συμπλόκου $[Ni(dppz)(qdt)]$, εμφανίζετε φωταύγεια. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε τόσο σε όξινες όσο και σε ελαφρώς βασικές συνθήκες. Τα διαλύματα αυτά επωάστηκαν στους $25^\circ C$. Πολλά σύμπλοκα με dppz υποκαταστάτη, σε υδατικά διαλύματα παρουσιάζουν αμελητέο φθορισμό.

Παρουσία, όμως, DNA έχει παρατηρηθεί ότι η ένταση φθορισμού αυξάνεται, λόγω της παρεμβολής του dppz υποκαταστάτη ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα το περιβάλλον γύρω από τον υποκαταστάτη να γίνεται λιγότερο πολικό. Τα σύμπλοκα αυτά καλούνται μοριακοί διακόπτες φωτός. Αυτή η ιδιότητα των συμπλόκων, σε συνδυασμό με την ισχυρή δεσμευτική τους ικανότητα, καθιστούν αυτά τα σύμπλοκα σημαντικούς μοριακούς ανιχνευτές για το DNA. Επομένως, η φασματοσκοπία εκπομπής είναι μια ακόμα σημαντική ένδειξη της ύπαρξης αλληλεπίδρασης, και μπορεί να παρέχει πληροφορίες όχι μόνο για τη δεσμευτική ισχύ, αλλά και πολλά ακόμα χρήσιμα συμπεράσματα. Είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι η αύξηση της εκπομπής δεν σημαίνει αναγκαστικά την παρεμβολή του υποκαταστάτη. Έχει βρεθεί ότι δεν απαιτείται η παρεμβολή στα ζεύγη βάσεων για να συμπεριφερθεί ένα σύμπλοκο ως μοριακός διακόπτης φωτός[43][44].



Σχήμα 44: Φάσμα εκπομπής του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=5.8, 24°C



Σχήμα 45: Φάσμα εκπομπής του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.4, 24°C

Η τεχνική του φθορισμού είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ μικρών μορίων και του DNA. Οι ενώσεις εκείνες που η μελέτη τους ενδείκνυται για τη χρήση της φθορισμομετρίας περιέχουν στο μόριό τους αρωματικές ομάδες με χαμηλής ενέργειας $\pi \rightarrow \pi^*$ επίπεδα. Πειραματικά για να διαπιστωθεί ή να επιβεβαιωθεί ο τρόπος σύνδεσης μιας ένωσης με το DNA, πραγματοποιείται πολλές φορές η μελέτη ανταγωνιστικής δράσης με ένωση η οποία συνδέεται με το DNA με γνωστό τρόπο[43][44]. Ένα από τα πιο γνωστά φθορίζοντα μόρια είναι το Ethidium Bromide (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium, ενός κλασικού χρωμοφόρου που συνδέεται στο DNA. Το EB παρουσιάζει έντονο φθορισμό παρουσία DNA εξαιτίας του γεγονότος ότι υπάρχει παρεμβολή του επίπεδου δακτυλίου της φαιναθριδίνης μεταξύ δυο γειτονικών βάσεων της διπλής έλικας του DNA[42][45]. Οι φασματοσκοπικές αλλαγές που παρουσιάζονται στο EB στη συναρμογή του με το DNA χρησιμοποιούνται συχνά για να εξεταστεί η αλληλεπίδραση του DNA με άλλες ενώσεις

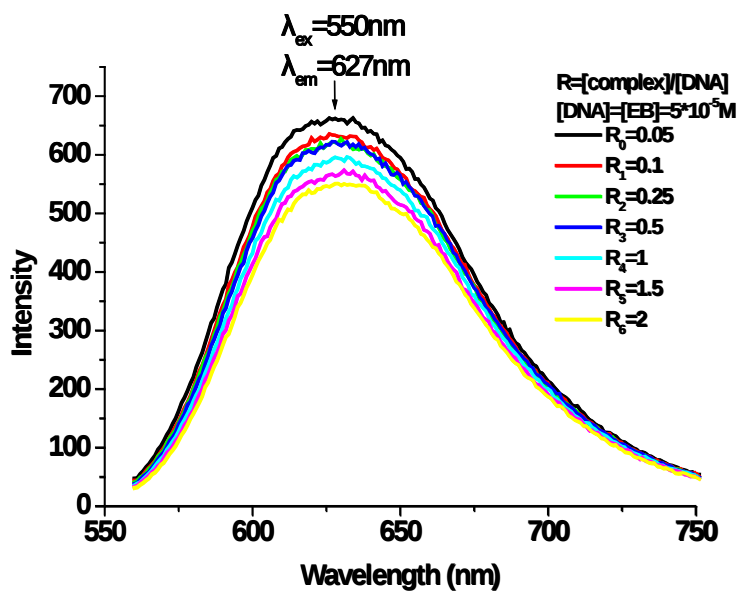
κυρίως οργανομεταλλικών συμπλόκων. Όπως έχει καταγραφεί, η ένταση στον φθορισμό του συμπλέγματος EB-DNA μειώνεται όταν ένα δεύτερο μόριο, δρώντας ανταγωνιστικά με το EB, αλληλεπιδρά με το μακρομόριο μέσω παρεμβολής[43][45]. Έτσι, για ένα σύμπλοκο-παρεμβολέα μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά απόσβεσης ή K_{sv} ακολουθώντας τη γραμμική εξίσωση Stern-Volmer:

$$\left(\frac{I}{I_0}\right) = 1 + K_{sv}[Q]$$

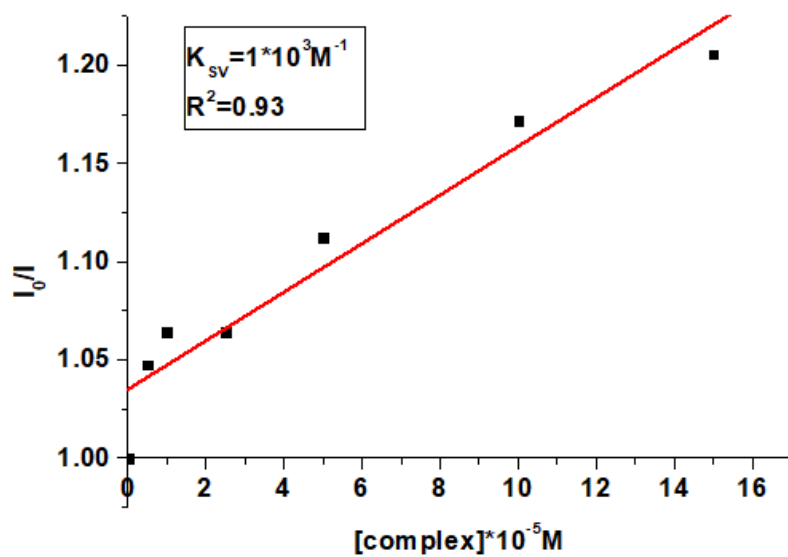
Όπου,

- I_0 : η ένταση φθορισμού απουσία συμπλόκου
- I : η ένταση φθορισμού παρουσία συμπλόκου
- K_{sv} : η Stern-Volmer σταθερά απόσβεσης
- $[Q]$: η συγκέντρωση του συμπλόκου.

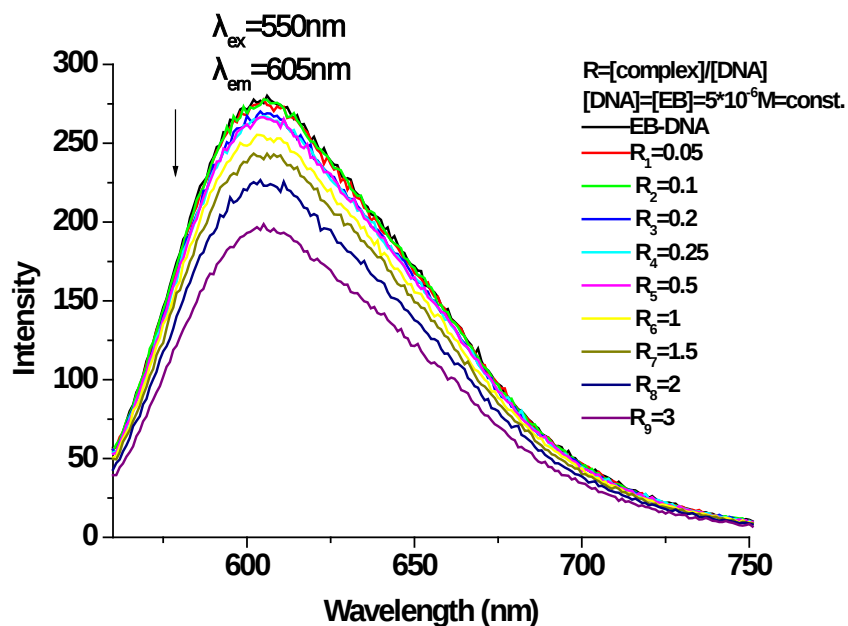
Διάλυμα EB, όταν διεγερθεί με ακτινοβολία μήκους κύματος $\lambda_{ex}=540\text{nm}$, εμφανίζει ασθενή σχετικά φθορισμό εκπομπής με $\lambda_{em}=600\text{nm}$. Κατά την προσθήκη DNA στο διάλυμα EB, εμφανίζεται σημαντικά αυξημένος φθορισμός στο $\lambda_{em}=592\text{nm}$ που οφείλεται στη συναρμογή του EB μέσω παρεμβολής του επιπέδου του δακτυλίου της φαινανδρίνης μεταξύ δύο γειτονικών βάσεων της διπλής έλικας του DNA. Τόσο σε όξινο όσο και σε βασικό pH παρατηρούμε την ανταγωνιστική δράση του συμπλόκου με το DNA. Σε $\text{pH}=7.4$, έχουμε ελαφρώς μεγαλύτερη σταθερά απόσβεσης K_{sv} , όπου φανερώνει την παρεβολική φύση του μορίου και σε ένα βαθμό την ανταγωνιστική του δράση ως προς EB. Το μέγεθος της τιμής της K_{sv} σχετίζεται με την ικανότητα σύνδεσης του συμπλόκου με το CT-DNA



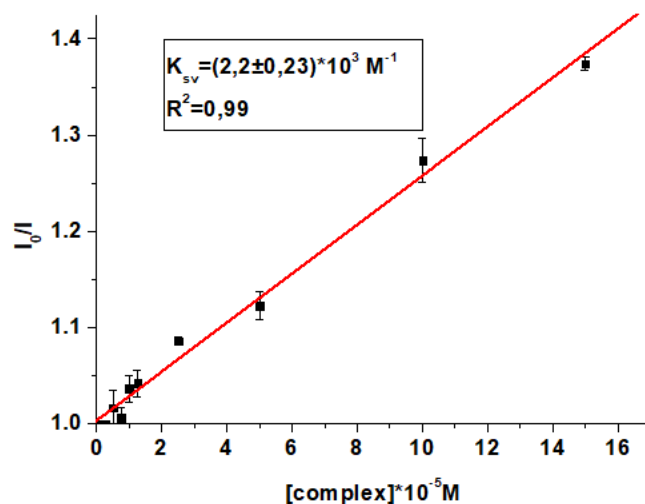
Σχήμα 46: Απόσβεση του φθορισμού του EB αυξανόμενης της συγκέντρωσης του [Ni(dppz)(qdt)] σε pH=5.8



Σχήμα 47: Γραφική παράσταση του λόγου I_0/I συναρτήσει της συγκέντρωσης του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)] σε pH=5.8



Σχήμα 48: Απόσβεση του φθορισμού του EB αυξανόμενης της συγκέντρωσης του $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ σε $\text{pH}=7.4$



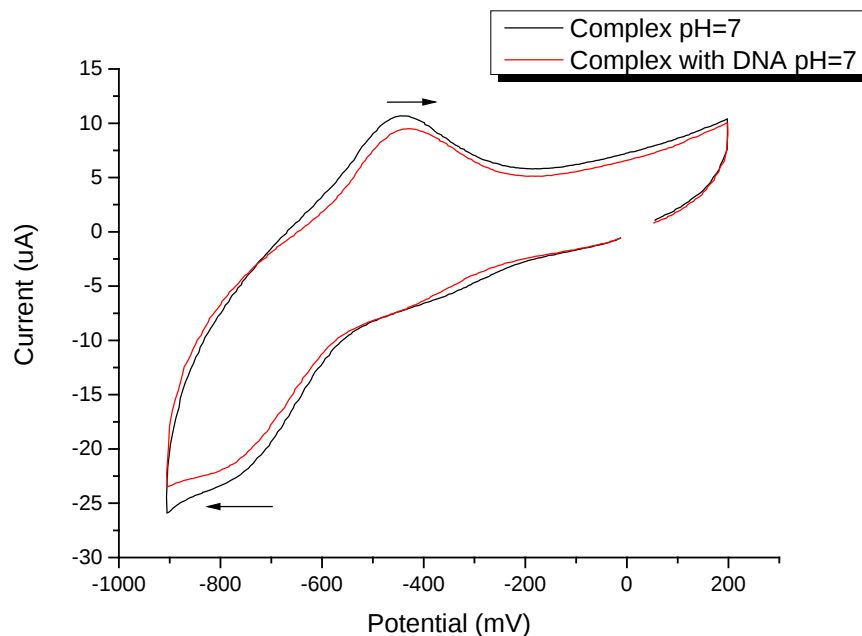
Σχήμα 49: Γραφική παράσταση του λόγου I_0/I συναρτήσει της συγκέντρωσης του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ σε $\text{pH}=7.4$

Όπως παρατηρούμε στα παραπάνω σχήματα το $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$, δρα ανταγωνιστικά ως προς το βρωμιούχο αιθίδιο, αποσβένοντας τον φθορισμό του. Η σταθερά απόσβεσης υπολογίστηκε ακολουθώντας της εξίσωση Stern-Volmer, έπειτα

από τρεις δεκτές επαναλήψεις του ιδίου πειράματος και βρέθηκε ίση με $(1.0 \pm 0.23) \times 10^3 \text{M}^{-1}$ σε pH=5.8, $(5.6 \pm 0.23) \times 10^3 \text{M}^{-1}$ σε pH=7.4. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε δεδομένου ότι η σύμπλοκη ένωση δεν διεγείρεται, αλλά και δεν εκπέμπει φθορισμό στην ίδια περιοχή με το βρωμιούχο αιθίδιο.

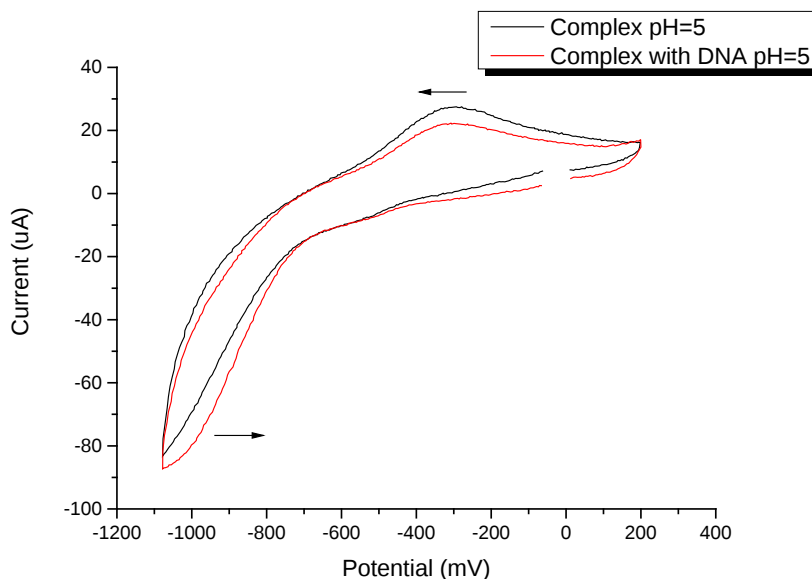
4.6.4 Κυκλική βολταμμετρία

Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA μελετήθηκε και με τη χρήση της κυκλικής βολταμμετρίας και όπως ήταν αναμενόμενο εντοπίστηκαν μεταβολές στα δυναμικά και προς θετικότερες αλλά και προς αρνητικότερες τιμές, ενισχύοντας για ακόμα μία φορά τον ισχυρισμό της ύπαρξης δύο διαφορετικών τρόπων αλληλεπίδρασης του μορίου με το DNA. Όπως έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία, για να θεωρηθεί μια αλληλεπίδραση παρεμβολικής φύσεως, θα πρέπει να επιφέρει, σε ένα τουλάχιστον δυναμικό, μετατόπιση προς θετικότερες τιμές. Αντίστοιχα, μια μετατόπιση δυναμικού προς αρνητικότερες τιμές θεωρείται αποτέλεσμα ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μακρομορίου και της ουσίας που μελετάται[43][44]. Το κυκλικό βολταμμογράφημα φαίνεται να είναι σε πλήρη συμφωνία με την ιξωδομετρία, καθώς παρατηρείται μετατόπιση του δυναμικού τόσο προς θετικότερες όσο και προς αρνητικότερες τιμές, υποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη δύο διαφορετικών τρόπων αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA.



Σχήμα 50: Κυκλικό βολταμμογράφημα του [Ni(dppz)(qdt) σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία DNA σε pH=7.4

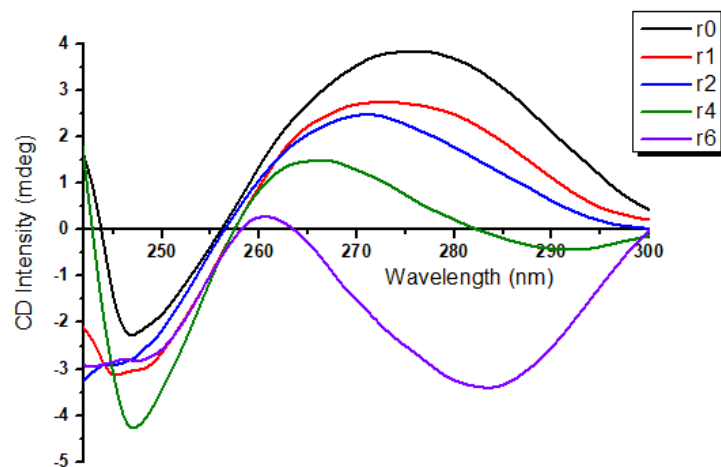
Παρατηρώντας και τα δύο βολταμμογραφήματα, τόσο σε όξινο όσο και σε ελαφρά βασικό περιβάλλον έχουμε μετατόπιση τόσο σε θετικότερες όσο και σε αρνητικότερες τιμές δυναμικών οξειδοαναγωγής. Γεγονός που φανερώνει την αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το μακρομόριο με περισσότερο από ένα τρόπο.



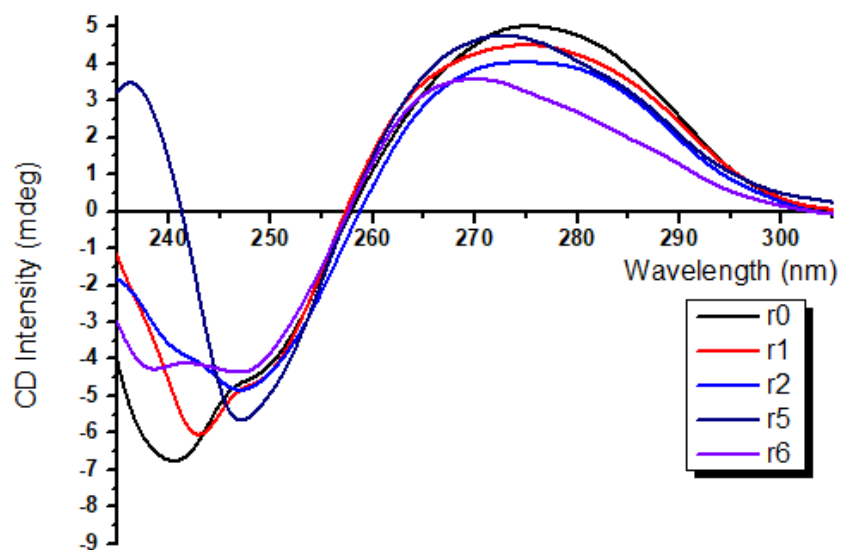
Σχήμα 51: Κυκλικό βολταμμογράφημα του $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία DNA σε $\text{pH}=5.8$

4.6.5 Κυκλικό διχρωισμός

Από τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού παρατηρούνται μεταβολές στο φάσμα του ελεύθερου DNA, γεγονός που καθιστά σαφή τη σύνδεση του συμπλόκου στο μακρομόριο. Ο κυκλικός διχρωισμός είναι μια σημαντική τεχνική προκειμένου να ανιχνευθούν αλλαγές που συμβαίνουν στη διαμόρφωση του B-DNA[43][44]. Το ελεύθερο DNA εμφανίζει μία θετική κορυφή στα 275nm, που οφείλεται στο στοίβαγμα των βάσεων και μία αρνητική στα 245nm εξαιτίας της δεξιόστροφης έλικας που εμφανίζει η B μορφή του C.T.-DNA. Η σύνδεση ενός συμπλόκου μέσω της αύλακας ή μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων επιφέρει ελάχιστη έως και μηδαμινή μεταβολή τόσο στο στοίβαγμα των βάσεων, όσο και στην ελικοειδή δομή του μακρομορίου, σε αντίθεση με μίας παρεμβολικής φύσης αλληλεπίδραση, η οποία επιδρά και στις δύο κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα του κυκλικού διχρωϊσμού. Σε κάθε περίπτωση, οποιαδήποτε παρατηρούμενη αλλαγή στο φάσμα του CD υποδεικνύει ότι η σύμπλοκη ένωση συνδέεται με το DNA.



Σχήμα 52: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού του συμπλόκου με το C.T. DNA σε pH 5.8



Σχήμα 53: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού του συμπλόκου με το C.T. DNA σε pH 7.4

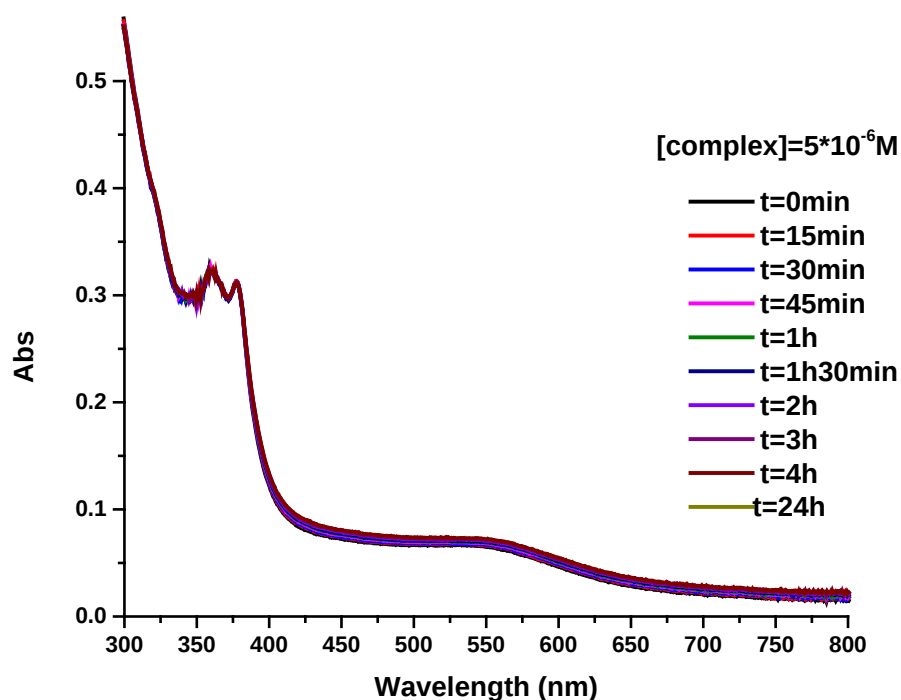
Παρατηρούμε και στα δύο φάσματα έντονες αλληλεπιδράσεις, που σημαίνει ισχυρή αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA. Μάλιστα σε pH=5.8 παρατηρούμε έντονη μεταβολή του θετικού τμήματος προς τις αρνητικές τιμές, γεγονός που αποδεικνύει τη μετατροπή της δεξιόστροφης έλικας σε αριστερόστροφη. Παρόμοιο φαινόμενο συναντάμε και στο ελαφρώς βασικό pH, όχι όμως σε τόσο έντονο βαθμό.

4.6.6 Ηλεκτροφόρηση

Η μελέτη της ικανότητας των συμπλόκων να φωτο-διασπούν το DNA δυστυχώς δεν ήταν εφικτό να γίνει εκτενώς, ωστόσο ένα αρχικό πείραμα έλαβε χώρα στο οποίο εξετάστηκε κατά πόσο το $[Ni(dppz)(qdt)]$ μπορεί να μεταβάλει τη δομή του πλασμιδιακού DNA, pBR322[45]. Η μελέτη έγινε τόσο σε σκοτεινές συνθήκες, όσο και έπειτα από ακτινοβολήση των δειγμάτων με προβολείς LED και μήκος κύματος ακτινοβολήσης $\lambda > 400\text{nm}$ για χρονικό διάστημα 2.5h, αφού πρώτα η ένωση είχε επωαστεί με το DNA για χρονικό διάστημα 24h. Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος (loading buffer) 1×TBE υπό σταθερή τάση 100V και για περίπου 2h. Υδατικά διαλύματα του κυκλικού πλασμιδιακού pBR322 DNA επωάστηκαν και ακτινοβολήθηκαν για 2.5h με διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου. Όταν κυκλικό υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA ηλεκτροφορηθεί μετακινείται σχετικά γρήγορα (Form I), όταν σπάσει ο ένας κλώνος του, τότε το DNA αποελικώνεται αποδίδοντας τη χαλαρή μορφή που κινείται πιο αργά (Form II) , όταν σπάσουν και οι δύο κλώνοι τότε παρατηρείται η γραμμική μορφή (Form III) που θα βρίσκεται μεταξύ της Form I και της Form II[45]. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί η ικανότητα της υπό μελέτη ένωσης να φωτο-διασπά το DNA. Το παρακάτω σχήμα απεικονίζει το πείραμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή, όπου στη lane 1 φαίνεται το κυκλικό υπερελικωμένο πλασμίδιο pBR322 απουσία του συμπλόκου. Με κάθε επιφύλαξη, θα μπορούσαμε να πούμε ότι σε αυτή τη συγκέντρωση το σύμπλοκο προκαλεί διάσπαση του ενός κλώνου του πλασμιδιακού pBR322 DNA.

Πρώτα απ' όλα έπρεπε να εξετάσουμε τη σταθερότητα του συμπλόκου στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήσαμε για την ηλεκτροφόρηση. Στην ηλεκτροφόρηση

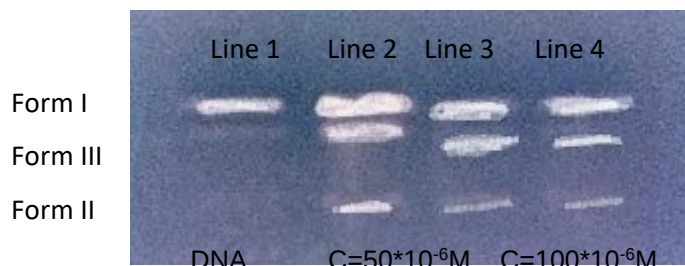
επειδή χρησιμοποιούμε πλασμιδιακό DNA, δεν ενδείκνυται η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών, γι' αυτό και επιλέχθηκε ως ρυθμιστικό διάλυμα το tris-HCl. Παρατηρώντας το φάσμα (Σχήμα 50) θα δούμε ότι το σύμπλοκο παραμένει σταθερό έως και τις 24h.



Σχήμα 54: Φασματοσκοπική μελέτη του συμπλόκου $[Ni(dppz)(qdt)]$ σε buffer tris-HCl, pH=7.4, 25°C

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα και όπως είναι εμφανές στα δείγματα που περιέχεται και το σύμπλοκο, ενισχύεται η εμφάνιση της κυκλικής μορφής του πλασμιδιακού DNA (form II), η οποία δημιουργείται από το σπάσιμο του ενός κλώνου της υπερελικωμένης μορφής (form I). Η πρώτη κινείται πιο αργά στην ηλεκτροφορητική πλάκα για αυτό και εμφανίζεται πιο πάνω σε σχέση με τη μορφή I. Στο πείραμα αυτό εμφανίστηκε η μορφή του γραμμικού DNA (form III), η οποία προέρχεται από το σπάσιμο και των δύο κλώνων της υπερελικωμένης μορφής. Η

συγκεκριμένη μορφή παρατηρείται τόσο σε σκοτεινές συνθήκες εφόσον το σύμπλοκο βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση.



Εικόνα 5: Εικόνα ηλεκτροφόρησης του συμπλόκου με πλασμίδιο PBR322

- line 1: αντιστοιχεί στο τυφλό διάλυμα (2 μ L πλασμιδίου, 15 μ L Buffer, 2 μ L χρωστική - τα υπόλοιπα διαλύματα περιλαμβάνουν 2 μ L πλασμιδίου, 10 μ L Buffer, 5 μ L complex και 2 μ L χρωστικής Green GoTaq).
- line 2 και 3: αντιστοιχούν στο σύμπλοκο σε συγκεντρώσεις των 50 μ M και 100 μ M αντιστοίχως μετά από ακτινοβόληση τριών ωρών.
- Line 4: αντιστοιχεί στο σύμπλοκο σε συγκέντρωση των 100 μ M χωρίς όμως ακτινοβόληση.

Στα τρία δείγματα του συμπλόκου φαίνεται να εμφανίζονται και οι τρεις μορφές:

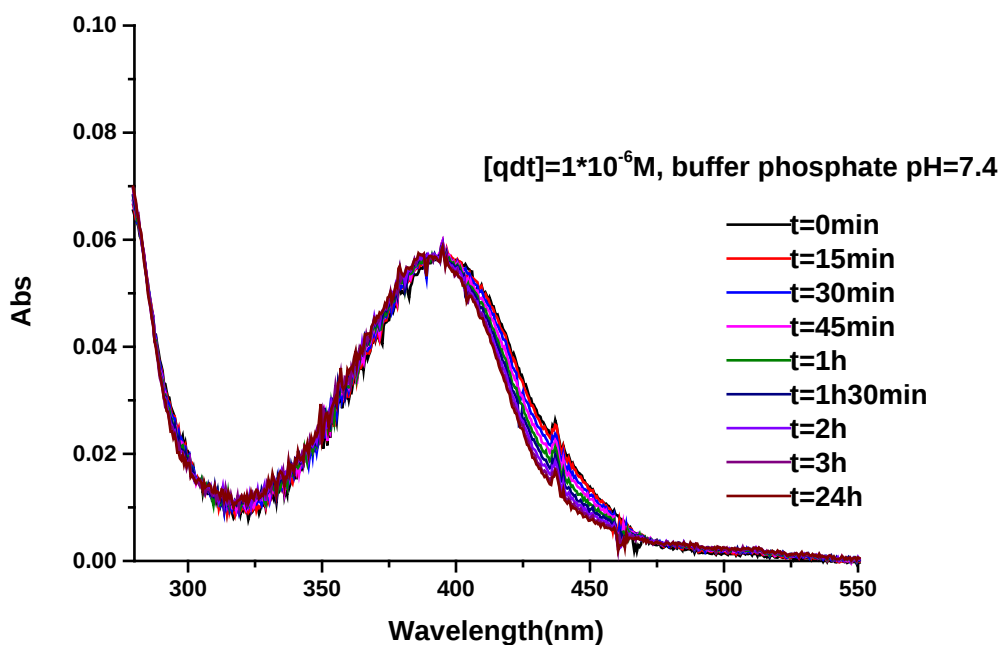
- Μορφή I (κυκλικό-υπερελικωμένο)
- Μορφή II (ανοιχτή δομή) εμφανίζεται κανονικά.
- Μορφή III (γραμμική μορφή)

Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο επιδρά στο πλασμιδιακό DNA PBR322 οδηγώντας και στις τρεις μορφές I, II και III. Το αποτέλεσμα αυτό πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω με νέα ηλεκτροφόρηση αλλά ταυτόχρονα είναι αποτέλεσμα που μας δίνει ελπίδες για τη χρήση του συγκεκριμένου συμπλόκου ως πιθανού συμπλόκου για PDT.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

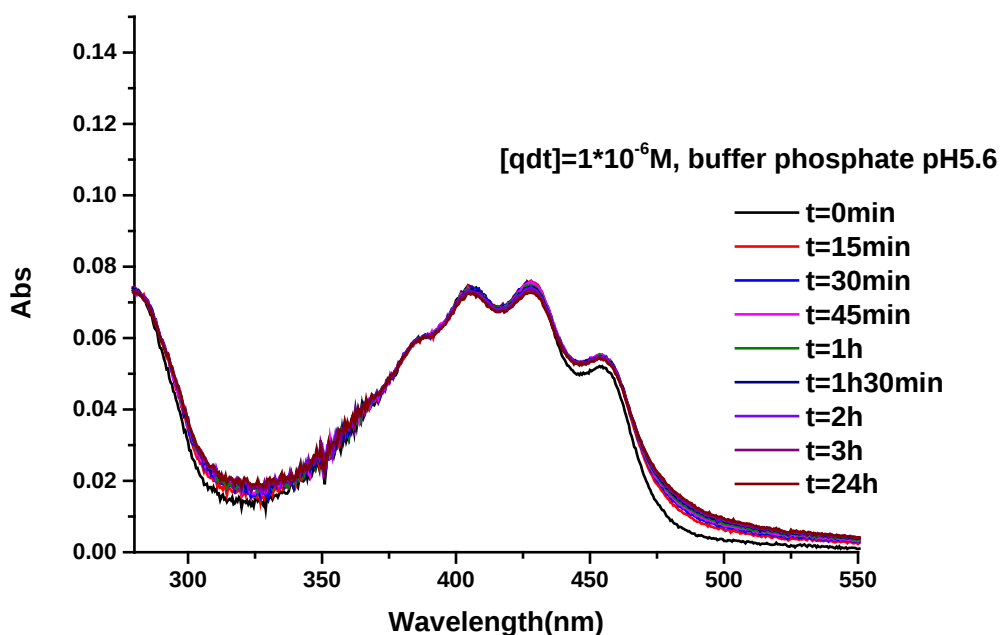
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ ΜΕ CT-DNA

Προκειμένου να αποκτήσουμε μια πιο ολοκληρωμένη άποψη της δράσης του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$, ξεκινήσαμε να μελετάμε τη δράση των υποκαταστατών με το CT-DNA. Αρχικά ξεκινήσαμε να μελετάμε με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδες τη σταθερότητα των υποκαταστατών στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών τόσο σε ελαφρώς όσο και στις όξινες συνθήκες. Παρατηρώντας τα φάσματα του υποκαταστάτη qdt παρατηρούμε ότι παραμένει σταθερό στο πέρασ 24h, σε ελαφρώς βασικό pH.



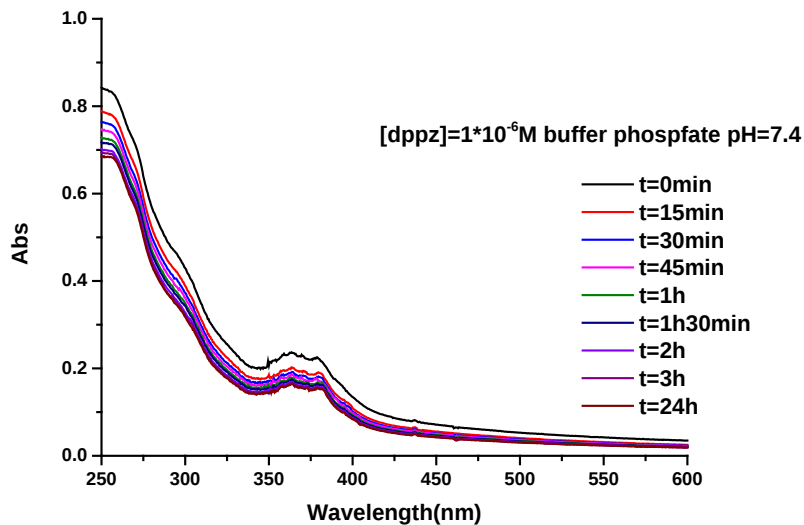
Σχήμα 55: Φάσματοσκοπική μελέτη του υποκαταστάτη qdt σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4, 37°C

Παρατηρώντας εν συνεχεία τη φασματοσκοπική σταθερότητα του υποκαταστάτη qdt παρατηρούμε αλλαγή στην απορρόφηση που αντιστοιχεί στον αρωματικό δακτύλιο της κινολαίνης. Η αλλαγή πιθανόν να οφείλεται σε πρωτονίωση των αζώτων που συμμετέχουν στο αρωματικό σύστημα του δακτυλίου της κινολαίνης. Παρατηρούμε ότι η αλλαγή στην απορρόφηση γίνεται απευθείας με το που διαλυθεί το σύμπλοκο στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH=5.6. Παρόλα αυτά ο υποκαταστάτης παραμένει σταθερός εντός 24h.



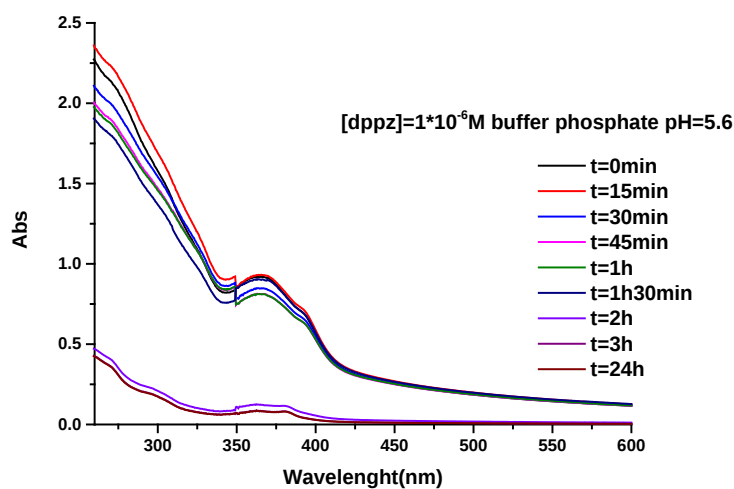
Σχήμα 56: Φασματοσκοπική μελέτη του υποκαταστάτη qdt σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=5.6, 37°C

Ομοίως διεξήχθησαν πειράματα φασματοσκοπικής μελέτης ορατού υπεριώδους και για το σύμπλοκο drrz και στα δύο pH. Παρατηρώντας βλέπουμε ότι οι απορροφήσεις του υποκαταστάτη drrz μειώνονται γεγονός που αποδεικνύει την καταβύθιση του. Αυτό παρατηρείται και οπτικά μέσα στην κυψελίδα.



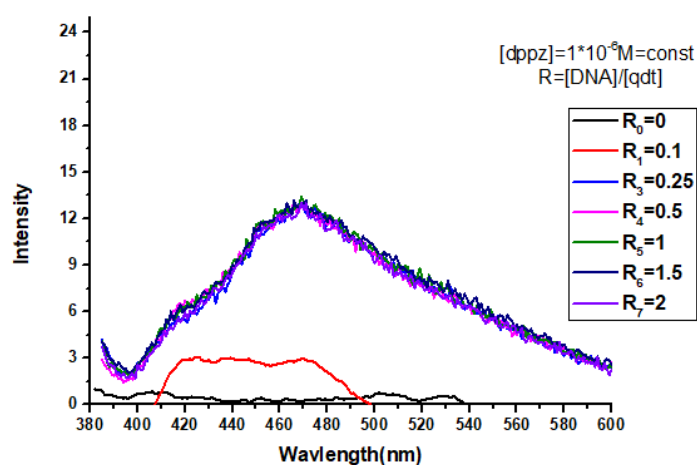
Σχήμα 57: Φασματοσκοπική μελέτη του υποκαταστάτη dppz σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7.4, 37°C

Η φασματοσκοπική μελέτη του υποκαταστάτη σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=5.6 έδειξε απευθείας αλλαγή στην απορρόφηση στα 363nm και στα 380nm. Η αλλαγή αυτή φανερώνει την πρωτονίωση των αζώτων της φαιναζίνης, λόγω όξινων συνθηκών. Ακόμη παρατηρούμε αισθητή μείωση της απορρόφησης του υποκαταστάτη λόγο του ότι καταβυθίζεται, γεγονός που παρατηρήθηκε με την καταβύθιση κρεμ στερεού στον πυθμένα της κυψελίδας.



Σχήμα 58: Φασματοσκοπική μελέτη του υποκαταστάτη dppz σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=5.6, 37°C

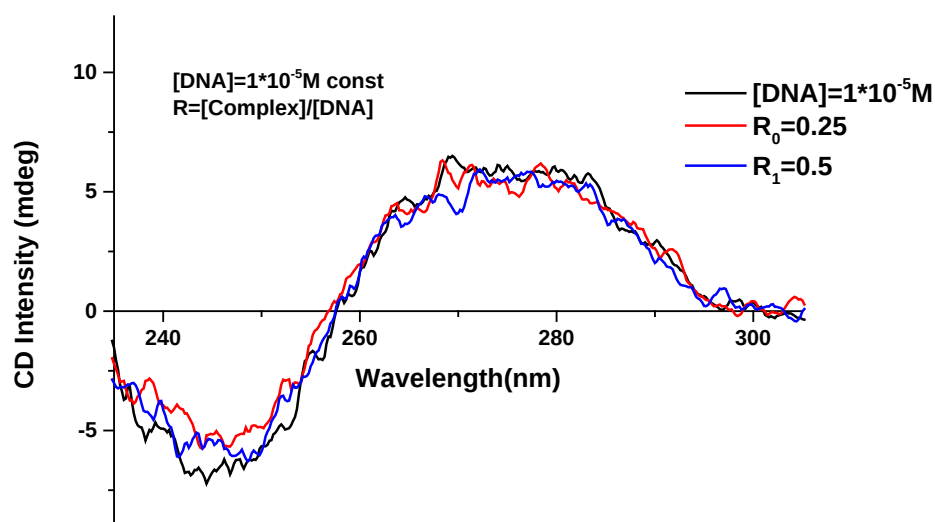
Εν συνεχεία εξετάσαμε εάν οι υποκαταστάτες dppz και qdt εμφανίζουν φωταύγεια αυξανόμενης συγκέντρωσης DNA. Ως γνωστό ο υποκαταστάτης dppz έχει ιδιότητες μοριακού διακόπτη φωτός, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με τη φασματοσκοπία εκπομπής. Όμως ο υποκαταστάτης qdt δεν εμφάνισε φωταύγεια αυξανόμενης συγκέντρωσης DNA, που υποδηλώνει ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός διακόπτης.



Σχήμα 59: Φάσμα αποδιέγερσης του υποκαταστάτη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH=7.4, 37°C

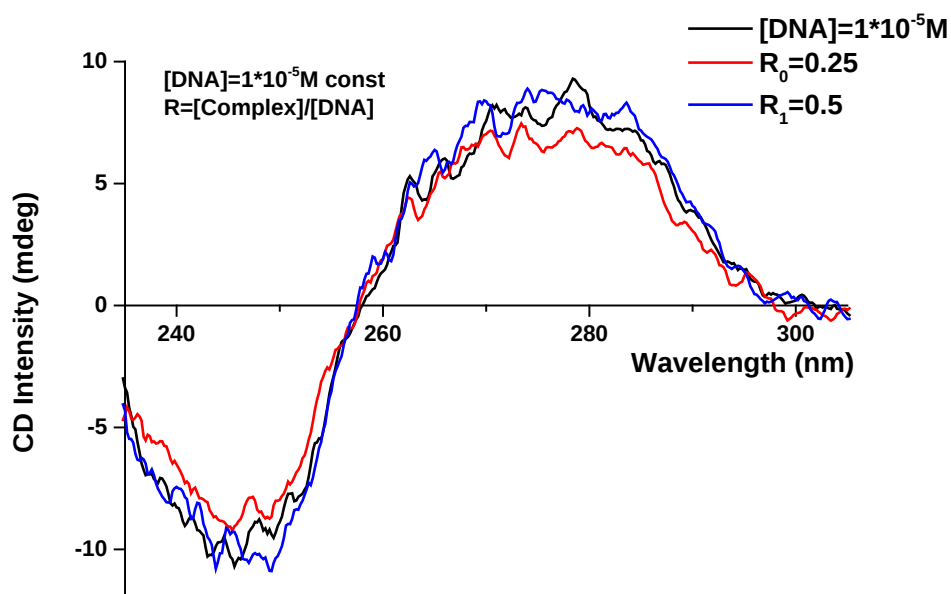
Το επόμενο πείραμα που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να δούμε τη δράση των συμπλόκων με το DNA είναι ο κυκλικός διχρωϊσμός. Όπως έχουμε προηγουμένως αναφέρει ο υποκαταστάτης drrz δρα δια μέσου παρεμβολής με το DNA. Ο υποκαταστάτης qdt αν και ανήκει στην οικογένεια των κινολινών δεν έχει μελετηθεί η δράση του με το DNA.

Τα πειράματα του κυκλικού διχρωϊσμού αποδεικνύουν μια πιο ασθενή δράση του υποκαταστάτη με το DNA.



Σχήμα 60: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του υποκαταστάτη qdt σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.4

Σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=7.4 βλέπουμε μία μικρή μείωση τόσο του αρνητικού κλάδου τόσο και του θετικού. Βέβαια δεν μπορούμε να πούμε ότι έχουμε ισχυρή αλληλεπίδραση του υποκαταστάτη με το CT-DNA.



Σχήμα 61: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του υποκαταστάτη qdt σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=5.8

Σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=5.6 βλέπουμε μία μικρή μείωση τόσο του αρνητικού κλάδου τόσο και του θετικού σε μικρό λόγο ενώ σε μεγαλύτερο λόγο βλέπουμε αύξηση και στους δύο κλάδους. Βέβαια δεν μπορούμε να πούμε ότι έχουμε ισχυρή αλληλεπίδραση του υποκαταστάτη με το CT-DNA διότι δεν είναι έντονες οι μεταβολές αυτές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

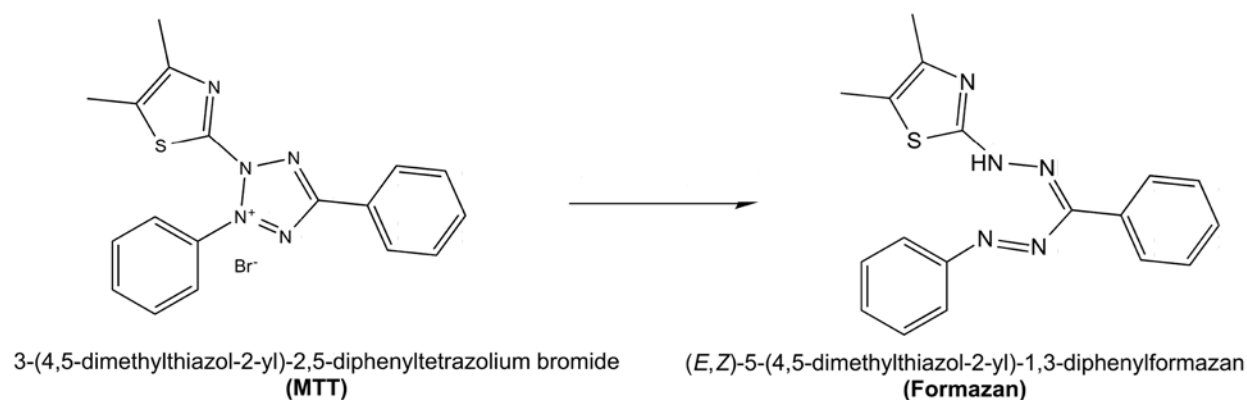
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν ως μία μέθοδο μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων ελεύθερων από πιθανές *in vivo* επιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό. Σκοπός των κυτταροκαλλιιεργειών είναι να διατηρηθούν τα κύτταρα βιώσιμα, μακριά από το φυσιολογικό οργανισμό από τον οποίο προήλθαν, κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες και να μελετηθούν τυχόν επιδράσεις συνθηκών αναλόγων.

Οι κυτταρικές σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού των σειρών MCF-7 και MDA-231 (human breast cancer cell line). Τα *in vitro* πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Πηκτής-Γέλης στο Ινστιτούτο Νανοτεχνολογίας και Νανοϋλικών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.

6.1 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MTT (MTT assay)

Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων έγινε με τη γνωστή μέθοδο ανάλυσης MTT, μια χρωματομετρική δοκιμασία, όπου βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να ανάγουν το υδατοδιαλυτό κίτρινο άλας του τετραζολίου (3-[4,5-Dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (MTT) σε αδιάλυτους χρωματιστούς κρυστάλλους φορμαζάνης (Formazan)[46], ενώ τα νεκρά κύτταρα δεν μπορούν. Συγκεκριμένα ο δακτύλιος του τετραζολίου μεταβολίζεται στα ενεργά μιτοχόνδρια από διάφορες αφυδρογονάσεις, λαμβάνοντας ηλεκτρόνια από το NADH και NADPH. Έτσι το κίτρινο χρώμα του υποστρώματος μετατρέπεται σε μωβ κρυστάλλους. Η διάλυση των κρυστάλλων σε οργανικό διαλύτη (π.χ. ισοπροπανόλη ή διμέθυλοσουλφοξείδιο) δίνει ένα σκούρο μωβ χρώμα, η συγκέντρωση του οποίου μπορεί να καθοριστεί φασματοφωτομετρικά. Η αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη αποτελεί μέτρο της βιωσιμότητας των κυττάρων των κυττάρων, αφού μπορεί να επιτευχθεί μόνο σε ενεργά μιτοχόνδρια, δηλαδή σε ζωντανά κύτταρα.



Σχήμα 62: Αντίδραση μετατροπής του MTT σε φορμαζάνη από το ένζυμο αφυδρογενάση

6.2 Κυτταρικές καλλιέργειες

Η *in vitro* καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε ειδικές πλαστικές φιάλες καλλιέργειας κυττάρων (φλάσκες), όπου τα κύτταρα προσκολλώνται στον πυθμένα της φιάλης και σε συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές της φυσιολογικής ανάπτυξης τους. Προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητες μολύνσεις, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με λάμπα υπεριώδους (UV) και φίλτρα αέρα ώστε να μειώνεται η πιθανότητα μόλυνσης. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C σε κορεσμένες συνθήκες υγρασίας και παρουσία 5% διοξειδίου του άνθρακα (CO₂).

Οι κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) υψηλής περιεκτικότητας γλυκόζης, εμπλουτισμένο με 10% απενεργοποιημένο εμβρυικό ορό μόσχου FBS (Fetal Bovine Serum). Σε αυτό έχουν προστεθεί 5mL διαλύματος L-Glutamine, καθώς και 5mL διαλύματος αντιβιοτικών Penicillin-Streptomycin. Η απενεργοποίηση του ορού γίνεται με θέρμανση στους 37°C για 35min.

Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιούνται με ισοτονικό διάλυμα φωσφορικών-χλωριούχων PBS (Phosphate Buffered Saline), pH=7.4, ενώ δεν περιέχει ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺.

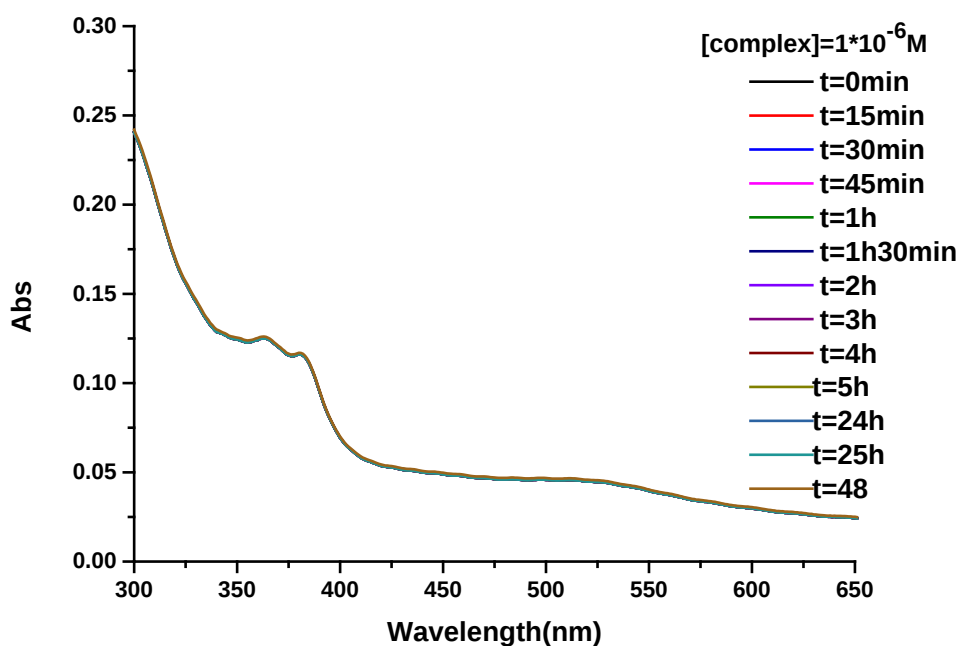
Για την αποκόλληση των κυττάρων από το ταπύτιο των φιαλών των κυττάρων καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θρυψίνης/EDTA σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Το EDTA έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα δισθενή ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου από τα κύτταρα καθιστώντας τα ανίκανα να παραμείνουν προσδεδεμένα στην επιφάνεια της φλάσκας. Η δράση της θρυψίνης είναι καταστρεπτική για τα κύτταρα όταν αυτά εκτεθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η δράση του ενζύμου αναστέλλεται με την προσθήκη στο κυτταρικό εναιώρημα διαλύματος εμπλουτισμένο με θρεπτικό υλικό (DMEM). Ακολουθεί καλή ανάδευση (πιπτετάρισμα), ώστε να επιτευχθεί η δημιουργία μονομερών κυττάρων και να αποφευχθεί η δημιουργία συσσωματωμάτων.

6.2.1 Μέθοδος

Γίνεται σπορά κυττάρων σε πλακίδια κυτταροκαλλιεργειών 96 φρεατίων (wells) (8x12), προσθέτοντας 100μL από το κυτταρικό εναιώρημα με θρεπτικό υλικό DMEM. Ακολουθεί επώαση στον κλίβανο για 24h, ώστε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν στο κατάλληλο αριθμό. Έπειτα αφαιρείται προσεκτικά το παλιό θρεπτικό υλικό και προστίθενται σε κάθε φρεάτιο 100μL διαλύματος της υπό μελέτης ένωσης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η υπό εξεταζόμενη ουσία διαλυτοποιείται σε διαλύτη DMSO και αραιώνεται σε θρεπτικό υλικό DMEM. Οι διάφορες συγκεντρώσεις προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις σε θρεπτικό υλικό DMEM, πρέπει να λάβουμε υπόψιν ότι η συγκέντρωση του DMSO δεν υπερβαίνει το 2% στα επιθυμητά διαλύματα. Στο πλακίδιο η κάθε συγκέντρωση προστίθενται από τρεις φορές ενώ σε κάποια φρεάτια προσθέτουμε μόνο θρεπτικό υλικό ώστε να τα έχουμε ως διάλυμα αναφοράς (control). Τα πλακίδια τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο για 24h στους 37°C. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τοποθετείται σε κάθε φρεάτιο από 100μL διαλύματος MTT (1mg/mL DMEM) και το πλακίδιο επωάζεται 4h. Κατά τη διάρκεια της επώασης αφαιρείται προσεκτικά το διάλυμα MTT, χωρίς να αφαιρεθούν οι μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης, ενώ ταυτόχρονα πρέπει να αφαιρεθεί όλο το υγρό καλλιέργειας. Μετά προσθέτουμε 100μL DMSO (ή ισοπροπανόλης) σε κάθε φρεάτιο. Η απορρόφηση του διαλύματος μετράται σε

μήκος κύματος 540nm με φασματοφωτόμετρο Eliza Reader, με διόρθωση ως προς ακτινοβολία αναφοράς στα 620nm.

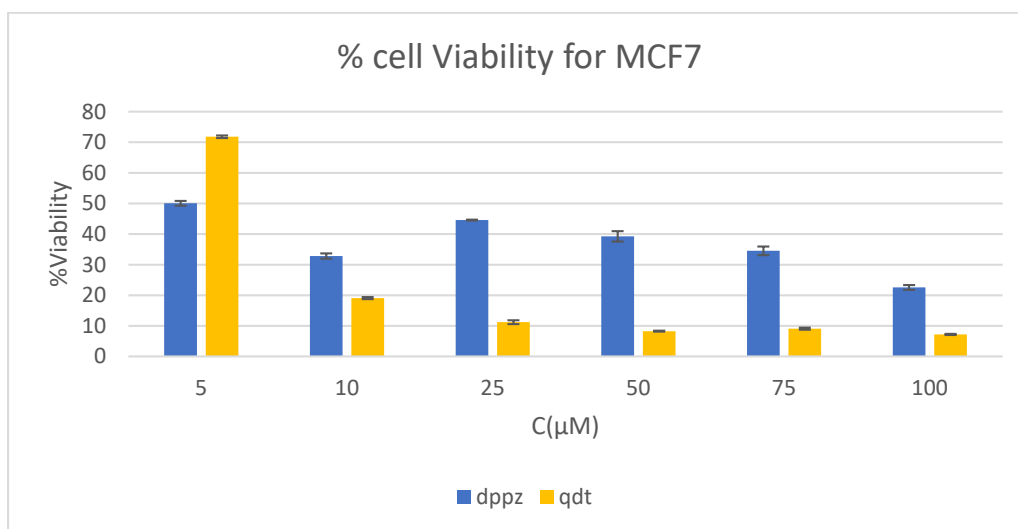
Αρχικά παρουσιάζεται η σταθερότητα του συμπλόκου μέσα στο θρεπτικό υλικό επώασης των κυττάρων. Διαπιστώνουμε ότι το σύμπλοκο παραμένει σταθερό και αναλλοίωτο κατά την επώαση των κυττάρων, στη μέγιστη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της κυτταροτοξικής του δράση.



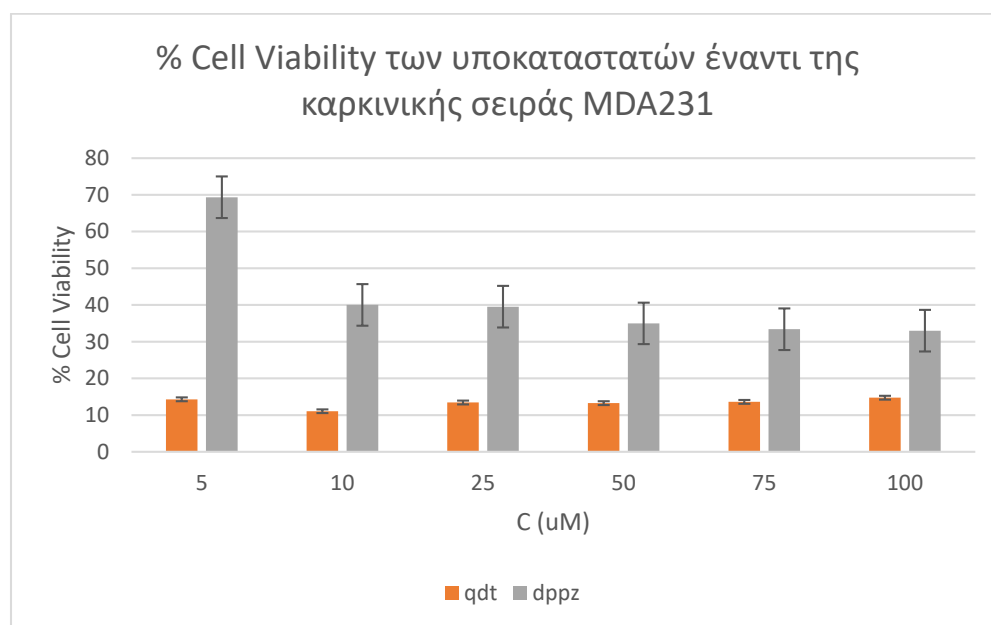
Σχήμα 63: Φασματοσκοπική παρακολούθηση του συμπλόκου σε θρεπτικό υλικό DMEM στους 37°C

Με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT, υπολογίστηκε η % κυτταρική βιωσιμότητα η οποία μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του συμπλόκου [Ni(dppz)(qdt)]. Με τη δοκιμασία του MTT, ελέγχθηκαν και οι υποκαταστάτες προκειμένου να διαπιστώνουμε εάν η ύπαρξη του μεταλλικού κέντρου ενισχύει ή μειώνει τη δράση των υποκαταστατών.

Αρχικά διαπιστώνουμε πως ο υποκαταστάτης quinoxaline-2,3-dithiolate παρουσιάζει μεγαλύτερη *in vitro* κυτταροτοξική δράση σε σχέση με τον υποκαταστάτη dipyrido[3,2-a;2',3'-c]phenazine (dppz) έναντι και των δύο καρκινικών σειρών.

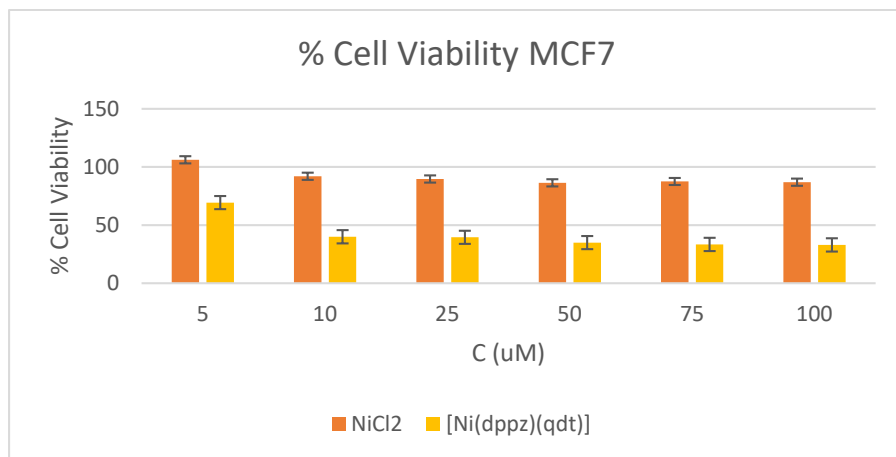


Σχήμα 64: Επίδραση των υποκαταστατών dppz, qdt έναντι της καρκινικής σειράς MCF7.

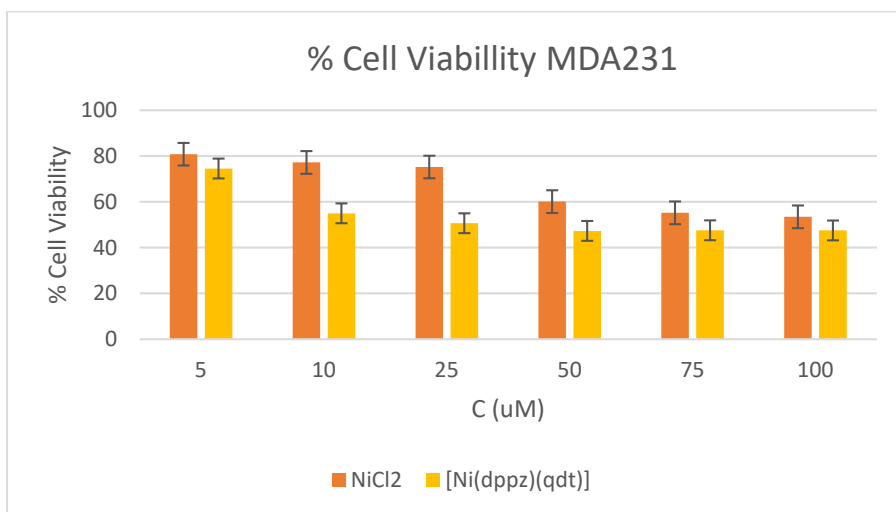


Σχήμα 65: Επίδραση των υποκαταστατών dppz, qdt έναντι της καρκινικής σειράς MDA 231

Στη συνέχεια συγκρίνουμε την *in vitro* κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου με το starting που χρησιμοποιήθηκε (NiCl_2). Διαπιστώνουμε πως το σύμπλοκο εμφανίζει εμφανώς μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση έναντι και των δύο κυττάρων.



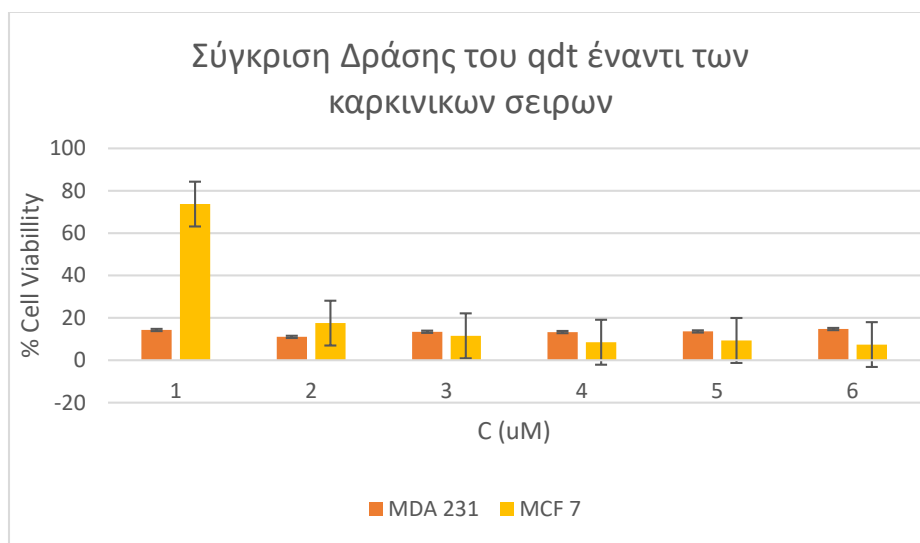
Σχήμα 66: Επίδραση του NiCl_2 και του $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ έναντι της καρκινικής σειράς MCF7



Σχήμα 67: Επίδραση του NiCl_2 και του $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ έναντι της καρκινικής σειράς MDA231

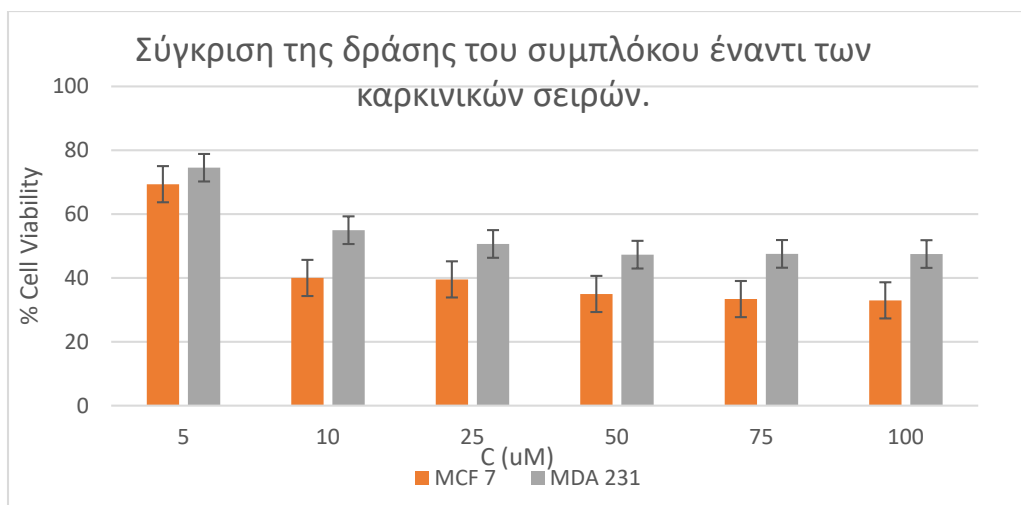
Έπειτα ελέγξαμε εάν υπάρχει κάποια εκλεκτικότητα έναντι του υποκαταστάτη quinoxaline-2,3-dithiolate ως προς κάποια κυτταρική σειρά. Από το παρακάτω γράφημα

διαπιστώνουμε πως ο υποκαταστάτης εμφανίζει ιδιαίτερη εκλεκτικότητα προς την καρκινική σειρά MDA 231, ενώ μπορούμε να πούμε ότι εμφανίζει ιδιαίτερος κυτταροτοξική δραστηριότητα.



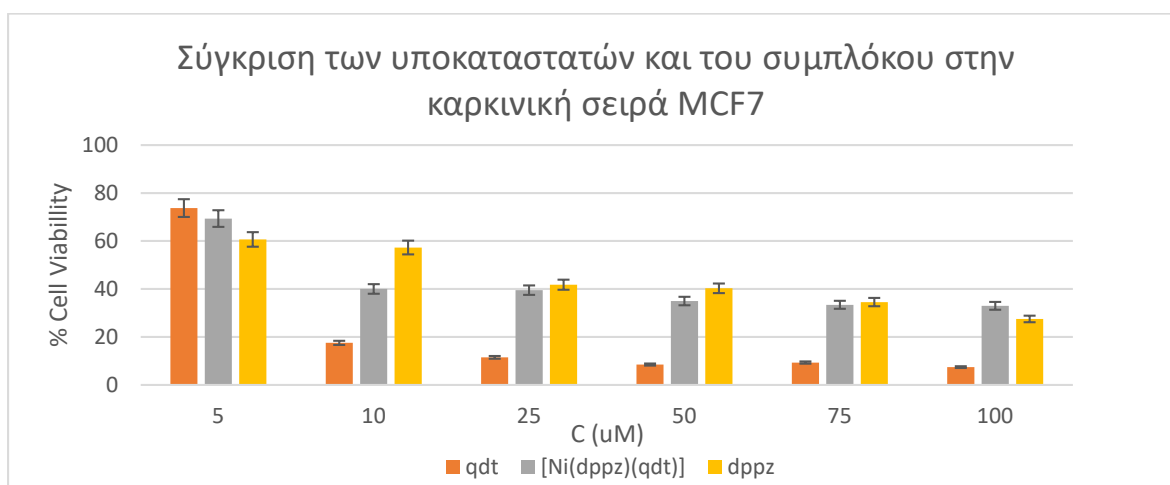
Σχήμα 68: Επίδραση του υποκαταστάτη qdt έναντι των καρκινικών σειρών

Ομοίως ελέγξαμε για τυχόν εκλεκτικότητα του συμπλόκου. Σύμφωνα με το παρακάτω γράφημα διαπιστώνουμε πως το σύμπλοκο $[Ni(dppz)(qdt)]$ έχει μάλλον εκλεκτικότητα ως προς την καρκινική σειρά MCF7.

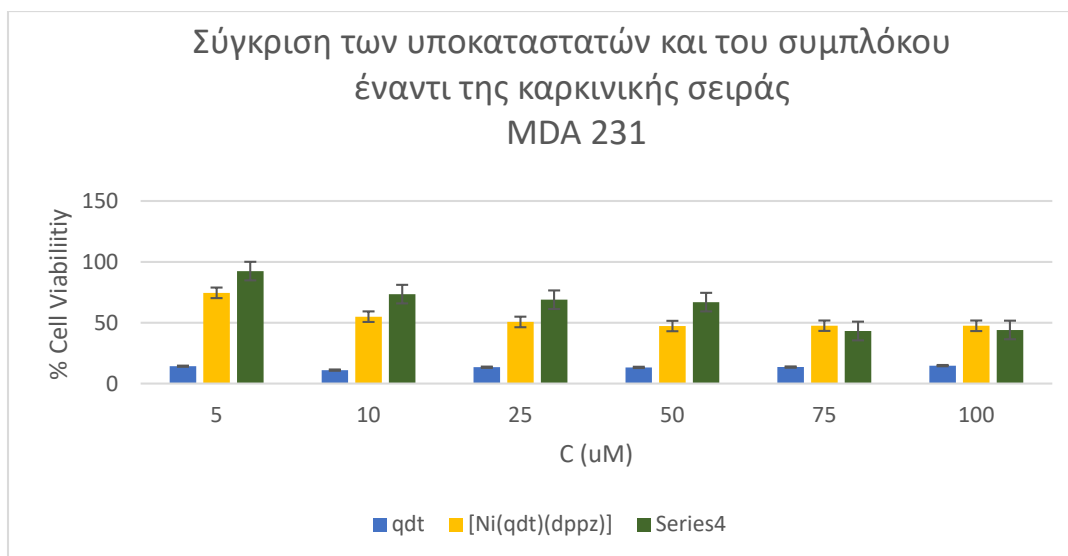


Σχήμα 69: Επίδραση του συμπλόκου $[Ni(dppz)(qdt)]$ έναντι των καρκινικών σειρών

Στο επόμενο γράφημα συγκρίνουμε την κυτταροτοξική δράση και των δύο υποκαταστατών με του συμπλόκου. Όπως παρατηρείται η κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου και για τις δύο καρκινικές σειρές του μαστού, βρίσκεται ανάμεσα στην κυτταροτοξική δράση των υποκαταστατών.



Σχήμα 70: Επίδραση των υποκαταστατών qdt, dppz και του συμπλόκου $[Ni(dppz)(qdt)]$ έναντι της καρκινικής σειράς MCF7



Σχήμα 71: Επίδραση των υποκαταστατών qdt, dppz και του συμπλόκου $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ έναντι της καρκινικής σειράς MDA 231

Για τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} κατασκευάζεται γραφική παράσταση της % βιωσιμότητας των κυττάρων συναρτήσει του λογαρίθμου της συγκέντρωσης, και με προσαρμογή των δεδομένων σε σιγμοειδή καμπύλη υπολογίζεται η τιμή IC_{50} . Η τιμή αυτή είναι η συγκέντρωση (σε μM) στην οποία παρατηρείται θνησιμότητα των κυττάρων σε ποσοστό 50%, και εκφράζει το μέτρο της κυτταροτοξικότητας μιας ένωσης. Είναι προφανές λοιπόν, ότι όσο χαμηλότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο τοξικότερο θεωρείται ένα μόριο. Στο σημείο αυτό πρέπει να θυμίσουμε ότι η συγκέντρωση του DMSO στο τελικό διάλυμα δεν μπορεί να ξεπερνά το 1% διότι σε υψηλότερα ποσοστά το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα.

Παρατηρώντας τους παρακάτω πίνακες παρατηρούμε ότι το σύμπλοκο $[\text{Ni}(\text{dppz})(\text{qdt})]$ εμφανίζει μία πολύ καλή κυτταροτοξική δράση έναντι των δύο κυτταρικών σειρών MDA231 και MCF7, μάλιστα παρατηρούμε μία εκλεκτικότητα ως προς τη καρκινική σειρά MCF7.

Πίνακας 7: *In vitro* δραστηριότητα του συμπλόκου και των υποκαταστατών έναντι της καρκινικής σειράς MCF7 (τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC₅₀ μM)

COMPOUNDS	IC ₅₀
[Ni(dppz)(qdt)]	7μM
qdt	5μM
dppz	10μM
NiCl ₂ *6H ₂ O	>100μM
cis-platin	65μM

Πίνακας 8: *In vitro* δραστηριότητα του συμπλόκου και των υποκαταστατών έναντι της καρκινικής σειράς MDA231 (τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τιμές IC₅₀ μM)

COMPOUNDS	IC ₅₀
[Ni(dppz)(qdt)]	24μM
qdt	<5μM
dppz	62μM
NiCl ₂ *6H ₂ O	>100μM
cis-platin	99μM

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου νικελίου με υποκαταστάτες το $dprz$ και το qdt . Το σύμπλοκο και οι υποκαταστάτες χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές. Ακόμα μελετήθηκε η ικανότητα του συμπλόκου να αλληλεπιδρά με το C.T. DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές όπως η φασματοσκοπία απορρόφησης UV-vis, η φασματοσκοπία εκπομπής FT-IR, η ιξωδομετρία, η κυκλική βολταμμετρία, η φασματοσκοπία εκπομπής, ο κυκλικός διχρωϊσμός και η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Επίσης το σύμπλοκο και οι υποκαταστάτες μελετήθηκαν ως προς την *in vitro* κυτταροτοξική τους δράση.

Πίνακας Ορολογίας

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
UV-Vis φασματοσκοπία	Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους
Fourier transform infrared spectroscopy	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
Calf thymus DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ από θύμο αδένα βοοειδούς
pBR322	Πλασμιδιακό DNA από το βακτήριο E. Coli
trans	Γεωμετρία ισομερών ενώσεων που δηλώνει την ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων σε αντίθετες πλευρές του μορίου
syn	Στερεοχημικός όρος που υποδηλώνει από την ίδια πλευρά
Intra strand crosslink	Διασταυρούμενη σύνδεση μεταξύ δύο τμημάτων της αλυσίδας
Inter strand crosslink	Διασταυρούμενη σύνδεση μεταξύ δύο διαφορετικών αλυσίδων
Groove binding	Συναρμογή στις αύλακες
External binding	Εξωτερική συναρμογή
intercalation	Παρεμβολή
Photodynamic Therapy	Φωτοδυναμική θεραπεία
Singlet oxygen	Μονήρες οξυγόνο

Singlet state	Μονήρης κατάσταση, Πρώτη διεγερμένη
Ground state	Θεμελιώδης κατάσταση
Intersystem crossing	Ενδοσυστηματική διασταύρωση
Spin-orbit coupling	Σύζευξη της τροχιακής στροφορμής και της στροφορμής των spin
<i>In vitro</i>	Δοκιμασία σε δοκιμαστικό σωλήνα
<i>In vivo</i>	Εσωσωματική διαδικασία
microseconds	Μικροδευτερόλεπτα

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

UV-Vis	Ultraviolet-Visible
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
DNA	Deoxyribonucleic acid
C.T.-DNA	Calf thymus DNA
λ	Μήκος κύματος
nm	Nanometers
pBR322	Plasmid Bolivar and Rodriguez 322
A	Adenine
G	Gouanine
C	Cytosine
T	Thymine
RNA	Ribonucleic acid
Å	Ångström
mRNA	Messenger RNA
tRNA	Transfer RNA
A-, B-, Z-, C-, D-	Διαφορετικές διαμορφώσεις της διπλής έλικας του DNA

ISC	Intersystem crossing
$^3\text{O}_2$	Molecular oxygen
$\text{O}_2^\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$	Oxygen radicals
MeOH	Μεθανόλη
CV	Cyclic voltammetry
EB	Βρωμιούχο αιθίδιο
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MCF-7	human breast cancer cell line

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Juan Carlos García-Ramos, R.G.-M., Fernando Cortés-Guzmán and Lena Ruiz-Azuara, *Metal-Based Drug-DNA Interactions*. J. Mex. Chem. Soc., 2013. 57(3).
2. Komor, A.C., Barton, J. K., *The path for metal complexes to a DNA target*. Chem Commun (Camb), 2013. 49(35): p. 3617-30.
3. Muhammad Sirajuddin, S.A., Amin Badshah, *Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2013. 124: p. 1-19.
4. Jin-Gang Liu, Q.-L.Z., Xian-Fa Shi, and Liang-Nian Ji, *Interaction of [Ru(dmp)2(dppz)]²⁺ and [Ru(dmb)2(dppz)]²⁺ with DNA: Effects of the Ancillary Ligands on the DNA-Binding Behaviors*. Inorg. Chem., 2001. 40(19): p. 5045-5050.
5. Eimer Tuite, P.L., and Bengt Nordén, *Photophysical Evidence That Δ- and Λ-[Ru(phen)2(dppz)]²⁺ Intercalate DNA from the Minor Groove*. J. Am. Chem. Soc., 1997. 119(1): p. 239-240.
6. Palchaudhuri, R. and P.J. Hergenrother, *DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action*. Curr Opin Biotechnol, 2007. 18(6): p. 497-503.
7. Kathryn E. Erkkila, D.T.O., and Jacqueline K. Barton, *Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA*. Chem. Rev., 1999. 99(9): p. 2777-2796.
8. S. Satyanarayana, J.C.D., and Jonathan B. Chaires, *Neither .DELTA.- nor .LAMBDA.-tris(phenanthroline)ruthenium(II) binds to DNA by classical intercalation*. Biochemistry, 1992. 31(39): p. 9319–9324.
9. Soldevila-Barreda, J.J. and P.J. Sadler, *Approaches to the design of catalytic metallodrugs*. Curr Opin Chem Biol, 2015. 25: p. 172-83.
10. Metzler-Nolte, N. and Z. Guo, *Themed Issue on "Metallodrugs: Activation, Targeting, and Delivery"*. Dalton Trans, 2016. 45(33): p. 12965.
11. Schrapers, P., et al., *The binuclear nickel center in the A-cluster of acetyl-CoA synthase (ACS) and two biomimetic dinickel complexes studied by X-ray absorption and emission spectroscopy*. Journal of Physics: Conference Series, 2016. 712: p. 12029.

12. Frédéric Schmitt, P.G., Georg Süss-Fink, Wee Han Ang, Paul J. Dyson, Lucienne Juillerat-Jeanneret and Bruno Therrien, *Ruthenium Porphyrin Compounds for Photodynamic Therapy of Cancer*. J. Med. Chem., 2008. 51(6): p. 1811-1816.
13. Kilger, R.M., Max & Szeimies, Rolf-Markus & Bäumlér, *Bidirectional energy transfer between the triplet T1 state of photofrin and singlet oxygen in deuterium oxide*. Chemical Physics Letters, 2001. 343: p. 543-548.
14. Huang H., B.S., Sadler P. J., *Recent Advances in the Design of Targeted Iridium(III) Photosensitizers for Photodynamic Therapy*. Chembiochem, 2018. 19(15): p. 1574-1589.
15. Josefsen, L.B., Boyle, R. W., *Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers*. Met Based Drugs, 2008. 2008: p. 276109.
16. Dougherty TJ, G.C., Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q, *Photodynamic therapy*. PubMed, 1998. 90: p. 889-905.
17. Gomathi Ramadoss, A.R., A. Murugan, *Evaluation of DNA Binding, Cleavage, and Cytotoxic Activity of Cu(II), Co(II), and Ni(II) Schiff Base Complexes of 1-Phenylindoline-2,3-dione with Isonicotinohydrazide*. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2014.
18. Robertson, C.A., D.H. Evans, and H. Abrahamse, *Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT*. J Photochem Photobiol B, 2009. 96(1): p. 1-8.
19. A. Maldotti, R.A., C.Bartocci, V.Carassiti, E.Polo, G.Varani, *Photochemistry of Iron-porphyrin complexes. Biomimetics and catalysis*. Coordination Chemistry Reviews, 1993. 125(1-2): p. 143-154.
20. TW, R., *MRI developments in perspective*. PubMed, 1997.
21. Gallez B, B.G., Swartz HM, *Evidence for the dissociation of the hepatobiliary MRI contrast agent Mn-DPDP*. PubMed, 1996. 35(1).
22. Placidi, M.P., et al., *Aryl-phosphonate lanthanide complexes and their fluorinated derivatives: investigation of their unusual relaxometric behavior and potential application as dual frequency ¹H/¹⁹F MRI probes*. Chemistry, 2013. 19(35): p. 11644-60.

23. Scott M. Rocklage, W.P.C., Steven C. Quay, F. Ekkehardt Hahn and Kenneth N. Raymond, *Manganese(II) N,N'-Dipyridoxylethylenediamine-N,N'-diacetate 5,5'-Bis(phosphate). Synthesis and Characterization of a Paramagnetic Chelate for Magnetic Resonance Imaging Enhancement*. Inorg. Chem., 1988. 48(3): p. 477-485.
24. Philip J. Blower, J.S.L.a.J.Z., *Copper Radionuclides and Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine*. Nuclear Medicine and Biology, 1996. 23(8): p. 957-980.
25. Zhang Z, N.S., McMurry TJ, *Gadolinium meets medicinal chemistry: MRI contrast agent development*. PubMed, 2005. 12: p. 751-778.
26. Zamble, D.B., *Nickel in biology*. Metallomics, 2015. 7(4): p. 588-9.
27. Sundararajan, C., et al., *Synthesis and characterization of rhenium and technetium-99m labeled insulin*. J Med Chem, 2010. 53(6): p. 2612-21.
28. Schibli, R. and P.A. Schubiger, *Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002. 29(11): p. 1529-42.
29. Rudolf K.Thauer, G.D., Peter Schönheit, *Biological role of nickel*. Trends in Biochemical Sciences, 1980. 5(11): p. 304-306.
30. Sudhamani, C.N., et al., *Synthesis, DNA binding and cleavage studies of Ni(II) complexes with fused aromatic N-containing ligands*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2009. 72(3): p. 643-7.
31. PT., C., *Nickel recognition by bacterial importer proteins*. Metallomics, 2015. 7(4): p. 590-5.
32. Nielsen, F.H., *Essentiality and function of nickel*. Trace Element Metabolism in Animals, 1974.
33. Flamme, M., et al., *Induction of Necroptosis in Cancer Stem Cells using a Nickel(II)-Dithiocarbamate Phenanthroline Complex*. Chemistry, 2017. 23(40): p. 9674-9682.
34. Skyrianou, K.C., et al., *Nickel-quinolones interaction. Part 1 - Nickel(II) complexes with the antibacterial drug sparfloxacin: structure and biological properties*. J Inorg Biochem, 2009. 103(12): p. 1617-25.
35. Cox, P.J., G. Psomas, and C.A. Bolos, *Characterization and DNA-interaction studies of 1,1-dicyano-2,2-ethylene dithiolate Ni(II) mixed-ligand complexes with*

- 2-amino-5-methyl thiazole, 2-amino-2-thiazoline and imidazole. Crystal structure of [Ni(i-MNT)(2a-5mt)(2)]. Bioorg Med Chem, 2009. 17(16): p. 6054-62.*
36. James G.Muller, L.A.K., Sari J. Paikoff, Victor Duarte, Ning Tang, Ronelito J. Perez, Steven E. Rokita, Cynthia J. Burrows, *Formation of DNA adducts using nickel(II) complexes of redox-active ligands: a comparison of salen and peptide complexes.* Coordination Chemistry Reviews, 1999. 185-186: p. 761-774.
 37. Mejía, C., S. Ortega-Rosales, and L. Ruiz-Azuara, *Mechanism of Action of Anticancer Metallodrugs.* Biomedical Applications of Metals, 2018: p. 213-234.
 38. Matkar, S.S., et al., *Two closely related nickel complexes have different effects on DNA damage and cell viability.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. 343(3): p. 754-61.
 39. Sastri, C.V., et al., *DNA interactions of new mixed-ligand complexes of cobalt(III) and nickel(II) that incorporate modified phenanthroline ligands.* Journal of Inorganic Biochemistry, 2003. 94(1-2): p. 138-145.
 40. Collins, J. G.; Sleeman, A. D.; Aldrich-Wright, J. R.; Greguric, I.;Hambley, T. W. *A ¹H NMR Study of the DNA Binding of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes* Inorg. Chem. 1998, 37, 3133
 41. Scott D. Cummings and Richard Eisenberg *Luminescent Platinum Complexes of Quinoxaline-2,3-dithiolate* Inorg. Chem. 1995, 34, 2007-2014
 42. M.J. Warning *Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids* J. Mol. Biol. (1965) 13, 269-282
 43. G. Dougherty, W. J. Pigramb, *Spectroscopic analysis of drug-nucleic acid interaction,* CRC Crit. Rev. Biochem., 12, 1982, 103-132.
 44. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry,* J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 124, 2013, 1-19.
 45. V. Uma, M. Kanthimathi, T. Weyhermuller, B. U. Nair, *Oxidative DNA cleavage mediated by a new copper(II) terpyridine complex: crystal structure and DNA binding studies,* J. Inorg. Biochem., 99, 2005, 2299-2307. R. Gomathi, A. Ramu, A. Murugan, *Evaluation of DNA binding, cleavage, and cytotoxic activity of Cu(II),*

- Co(II), and Ni(II) Schiff base complexes of 1-phenylindoline-2,3-dione with isonicotinohydrazide*, Bioinorg. Chem. Appl., 2014, 2014.
46. T. Mosmann, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*, J. Immunological Methods, 65, (1983), 55-63