



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκων στοιχείων  
μεταπτώσεως με παράγωγα του βενζοθειαζολίου. Μελέτη της  
αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με νουκλεοτίδια. In vitro  
διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης**

**ΒΑΡΒΑΡΑ ΜΑΥΡΟΕΙΔΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ, M.Sc.**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2016**

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκων στοιχείων μεταπτώσεως με παράγωγα του βενζοθειαζολίου. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με νουκλεοτίδια. In vitro διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης.

**ΒΑΡΒΑΡΑ ΜΑΥΡΟΕΙΔΗ**

**A.M.: 001004**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**Κων/νος Μεθενίτης**, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:**

**Κων/νος Μεθενίτης**, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

**Μαρία Πελεκάνου**, Ερευνήτρια Α΄, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

**Αθανάσιος Φιλιππόπουλος**, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Κων/νος Μεθενίτης**, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

**Μαρία Πελεκάνου**, Ερευνήτρια Α΄, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

**Αθανάσιος Φιλιππόπουλος**, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

**Χριστιάνα Μητσοπούλου**, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

**Παναγιώτης Κυρίσης**, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

**Μαρία Παραβατού-Πετσωτά**, Ερευνήτρια Β΄, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

**Μαρίνα Σαγνού**, Ερευνήτρια Γ΄, ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 01/04/2016



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή συνετέθησαν δύο υποκαταστάτες που φέρουν την αντικαρκινική ομάδα του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου συνδεδεμένη, μέσω ανθρακικής αλυσίδας, με την 2-αμινομεθυλοπυριδίνη. Τα ανωτέρω συμπλέχθηκαν επιτυχώς με Pd(II), Pt(II) και Cu(II) και ακολούθησε χαρακτηρισμός των υποκαταστατών και των συμπλόκων με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους (IR, NMR, MS, UV-Vis και EPR). Σε συνέχεια της μελέτης, πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το CT-DNA, με τη χρήση του κυκλικού διχρωϊσμού (CD), φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), φθορισμού, ιξωδομετρίας και μελετών θερμικής μετουσίωσης. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την ικανότητα των υποκαταστατών αλλά και των αντίστοιχων συμπλόκων να αλληλεπιδρούν ισχυρά με το DNA. Ο συνεργιστικός τρόπος δράσης των υπό μελέτη ενώσεων περιλαμβάνει αλληλεπίδραση μέσω δέσμησης στις αύλακες του DNA και μη κλασσικής παρεμβολής και, ενώ επιπροσθέτως για τα σύμπλοκα προτείνεται και ομοιοπολική αλληλεπίδραση των μετάλλων με το DNA. Τέλος, αξιολογήθηκε η *in vitro* βιολογική τους δράση, σε δυο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού (MCF-7 και MDA-MB-231) και στη φυσιολογική ανθρώπινη σειρά ινοβλαστών δέρματος DSF. Τα προκαταρκτικά βιολογικά αποτελέσματα είναι ιδιαίτερος ενθαρρυντικά αφού διαπιστώθηκε εκλεκτική κυτταρική πρόσληψη και αυξημένη κυτταροτοξική δράση των υπό μελέτη ενώσεων στις δοκιμαζόμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Βιοανόργανη Χημεία

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζόλιο, λευκόχρυσος(II), παλλάδιο(II), χαλκός(II), DNA, αντικαρκινική δράση

## ABSTRACT

In the present thesis two ligands, bearing the antitumor unit of 2-(4'-aminophenyl)benzothiazole bonded through a hydrocarbon chain with 2-aminomethylpyridine, were synthesized. Their corresponding Pd(II), Pt(II) and Cu(II) complexes were successfully synthesized and fully characterized by various spectroscopic methods (IR, NMR, MS, UV-Vis and EPR). In addition, their binding to CT-DNA was also been evaluated by UV-Vis spectroscopy, fluorescence, circular dichroism, viscometry and thermal denaturation studies. The data reveal that both ligands and complexes strongly interact with CT-DNA. Both ligands interact with CT-DNA via a combined mode of action involving both groove binding and non-classical intercalation, while in the case of the complexes covalent bond formation takes place as well. Finally, their in vitro biological activity was been investigated using two human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB 231) as well as healthy human skin fibroblasts (DSF). The encouraging preliminary in vitro biological results show uptake of the intact complexes by the breast cancer cells and increased selective anticancer activity.

**SUBJECT AREA:** Bioinorganic chemistry

**KEYWORDS:** 2-(4'-Aminophenyl)benzothiazole, platinum(II), palladium(II), copper (II), DNA, anticancer activity

*Αφιερώνω την παρούσα διατριβή σε όσους με στήριξαν με την αγάπη τους κατά τη διάρκεια εκπόνησής της και ιδιαίτερωσ στους γονείς μου, Αναστάσιο Μαυροειδή και Νίκη Μαυροειδή-Αυγερινού καθώς και στη γιαγιά μου Σταυρούλα Αυγερινού*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί το επιστέγασμα συστηματικής προσπάθειας έξι ετών, αφού είναι συνέχεια της ερευνητικής εργασίας διπλώματος ειδίκευσης που ολοκληρώθηκε επιτυχώς τη χρονική περίοδο 2008-2010. Ο σχεδιασμός και η αξιολόγηση των πειραμάτων αλλά των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Μεθενίτη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κ. Μεθενίτη όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος και την υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας, αλλά κυρίως για την άψογη συμπεριφορά, την πολύπλευρη υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Εν συνεχεία, οφείλω ένα πάρα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Μαρία Πελεκάνου, Ερευνήτρια Α', Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος", για τη συνεχή καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις εύστοχες υποδείξεις της που συνετέλεσαν στην ολοκλήρωση και την συγγραφή της εν λόγω μελέτης, όπως επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε τα τελευταία χρόνια ως μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Επίσης, ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή κ. Αθανάσιο Φιλιππόπουλο για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή της συγκεκριμένης διατριβής.

Το κομμάτι της βιολογικής αξιολόγησης της παρούσας εργασίας δεν θα ήταν δυνατό χωρίς τη συνεχή εκπαίδευση και καθοδήγηση που μου παρείχε η Δρ. Μαρία Παραβατού-Πετσωτά, Ερευνήτρια Β', Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Ερευνών, Ενέργειας και Ασφάλειας ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος" την οποία και θερμά ευχαριστώ για τη συνεχή βοήθεια και στήριξη όλο το χρονικό διάστημα που βρίσκομαι στο εργαστήριο της. Στο σημείο αυτό θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Δρ. Μαρίνα Σαγνού, Ερευνήτρια Γ', Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος", για τη σύνθεση των υποκαταστατών της εν λόγω εργασίας και για τη συνολική αρωγή και υποστήριξη της σε διάφορα πειραματικά ζητήματα που προέκυψαν.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά:

Την Καθηγήτρια και Διευθύντρια Εργαστηρίου κα. Χριστιάνα Μητσοπούλου για τις πολύτιμες συμβουλές, τις εύστοχες παρατηρήσεις αλλά και για τη συμμετοχή της στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κυρίτση για τη συμμετοχή του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή αλλά και για την άψογη συνεργασία αυτά τα χρόνια.

Τον Δρ. Κωνσταντίνο Σταματάκη, Ερευνητή Β΄, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος", για τη βοήθεια στη λήψη και την αξιολόγηση των φασμάτων φθορισμού.

Τον Δρ. Γεώργιο Μήτρικα, Ερευνητή Γ΄, Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος", για τη βοήθεια στη λήψη και την αξιολόγηση των φασμάτων EPR.

Τους συναδέλφους φοιτητές του Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας, του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών και του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Ερευνών, Ενέργειας και Ασφάλειας, ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος" για την άριστη συνεργασία, τις πολύτιμες συμβουλές, την ηθική υποστήριξη και την ειλικρινή φιλία που μου προσέφεραν αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη ΔΕΠ για την καλή συνεργασία και το όμορφο κλίμα σε όλο το χρονικό αυτό διάστημα της συνύπαρξης μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τους γονείς μου Αναστάσιο και Νίκη Μαυροειδή οι οποίοι αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη για την εκπόνηση της εν λόγω διατριβής και δίχως τη δική τους έμπρακτη υποστήριξη και αγάπη δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον σύντροφο μου Φώτη Καπίρη για την αγάπη, τη συνεχή στήριξη και την πλήρη κατανόηση που μου έχει δείξει όλα αυτά τα απαιτητικά χρόνια.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....</b>	<b>18</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟ 2-(4-ΑΜΙΝΟΦΑΙΝΥΛΟ)ΒΕΝΖΟΘΕΙΑΖΟΛΙΟ.....</b>	<b>19</b>
1.1 Το βενζοθειαζόλιο.....	19
1.2 Το 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζόλιο.....	20
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ .....</b>	<b>25</b>
2.1 Εισαγωγή.....	25
2.1.1 Ιατρική Ανόργανη Χημεία.....	25
2.2 Λευκόχρυσος.....	34
2.2.1 Αντικαρκινικά σύμπλοκα λευκοχρύσου.....	35
2.2.2 Η περίπτωση της σισπλατίνης.....	35
2.2.3 Νέας γενιάς αντικαρκινικά φάρμακα του λευκοχρύσου.....	39
2.2.4 Νέες προσεγγίσεις στο σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων λευκοχρύσου.....	43
2.3 Παλλάδιο.....	51
2.4 Χαλκός.....	55
2.4.1 Σύμπλοκα του χαλκού ως θεραπευτικοί παράγοντες.....	58
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΟ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΙΚΟ ΟΞΥ (DNA).....</b>	<b>65</b>
3.1 Η δομή του DNA.....	65
3.2 Αλληλεπιδράσεις DNA με μέταλλα.....	68
3.3 Αλληλεπιδράσεις DNA με μικρά οργανικά μόρια.....	69
3.3.1 Παρεμβολή.....	69
3.3.2 Δέσμευση στις αύλακες.....	70
3.3.3 Αλκυλίωση.....	71
3.3.4 Συνδυασμός παρεμβολής και αλκυλίωσης.....	71
3.3.5 Διάσπαση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας.....	71
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....</b>	<b>72</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ.....</b>	<b>74</b>
5.1 Όργανα και αντιδραστήρια.....	74
5.1.1 Όργανα.....	74
5.1.2 Αντιδραστήρια.....	76

5.2	Μεθοδολογία.....	78
5.2.1	Δομικός χαρακτηρισμός με φασματοσκοπικές μελέτες.....	78
5.2.2	Παρασκευή διαλυμάτων CT-DNA .....	79
5.3	Μεθοδολογία πειραμάτων αλληλεπίδρασης με CT-DNA.....	80
5.3.1	Φασματοσκοπία UV-Vis.....	80
5.3.2	Φασματοσκοπία φθορισμού.....	81
5.3.3	Φασματοπολωσιμετρία CD .....	83
5.3.4	Μελέτες θερμικής μετουσίωσης.....	83
5.3.5	Μελέτες ιξωδομετρίας.....	83
5.4	Αρχές μεθόδων βιολογικής αξιολόγησης.....	84
5.4.1	Κυτταρικές σειρές MCF-7, MDA-MB-231 και DSF.....	84
5.4.2	Μελέτη κυτταρικής πρόσληψης.....	86
5.4.3	Μελέτη in vitro κυτταροτοξικότητας (μέθοδος MTT).....	86
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ</b>	
	<b>ΕΝΩΣΕΩΝ.....</b>	<b>88</b>
6.1	Σύνθεση και χαρακτηρισμός υποκαταστατών <b>1</b> και <b>2</b> .....	88
6.2	Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκων Pt(II) και Pd(II).....	89
6.2.1	Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου <b>Pd-1</b> .....	89
6.2.2	Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου <b>Pd-2</b> .....	90
6.2.3	Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου <b>Pt-1</b> .....	90
6.2.4	Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου <b>Pt-2</b> .....	91
6.3	Αποτελέσματα χαρακτηρισμού συμπλόκων Pd(II) και Pt(II).....	91
6.3.1	Φάσματα NMR.....	91
6.3.2	Φάσματα IR και ESI-MS.....	96
6.3.3	Φάσματα απορρόφησης UV-Vis.....	99
6.4	Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκων Cu(II).....	100
6.4.1	Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου <b>Cu-1</b> .....	100
6.4.2	Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου <b>Cu-2</b> .....	100
6.5	Αποτελέσματα χαρακτηρισμού συμπλόκων Cu(II).....	101
6.5.1	Φάσματα IR και ESI-MS.....	101
6.5.2	Φασματοσκοπία EPR.....	103
6.5.3	Μέθοδος συνεχών μεταβολών .....	105

6.5.4	Προσδιορισμός σταθεράς σχηματισμού συμπλόκων χαλκού.....	107
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ CT-DNA.....</b>	<b>110</b>
7.1	Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης με CT-DNA.....	110
7.1.1	Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση UV-Vis.....	110
7.1.2	Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση φθορισμού.....	114
7.1.3	Φασματοπολωσιμετρία CD.....	122
7.1.4	Μελέτες θερμικής μετουσίωσης.....	129
7.3.5	Ιξωδομετρία.....	132
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ.....</b>	<b>136</b>
8.1	Αποτελέσματα μελέτης κυτταρικής πρόσληψης.....	136
8.2	Αποτελέσματα μελέτης in vitro κυτταροτοξικότητας.....	138
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>141</b>
	<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....</b>	<b>144</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.....</b>	<b>145</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II.....</b>	<b>149</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III.....</b>	<b>152</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV.....</b>	<b>153</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V.....</b>	<b>155</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI.....</b>	<b>156</b>
	<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>	<b>157</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1:</b> Δομή βενζοθειαζολίου.....	19
<b>Σχήμα 2:</b> Γενική δομή παραγώγων του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου .....	20
<b>Σχήμα 3:</b> Δομή Phortress.....	23
<b>Σχήμα 4:</b> Πορεία υδρόλυσης της σισπλατίνης .....	37
<b>Σχήμα 5:</b> Προτεινόμενες θέσεις σύνδεσης του Pt(II) με το DNA.....	38
<b>Σχήμα 6:</b> Σχηματική αναπαράσταση ζευγών αζωτούχων βάσεων και δεσμών υδρογόνου στο DNA .....	67
<b>Σχήμα 7:</b> Σχηματική παρουσίαση της γενικής δομής του διλειτουργικού υποκαταστάτη .....	72
<b>Σχήμα 8:</b> Σχηματική αναπαράσταση μοριακής δομής υποκαταστατών <b>1</b> και <b>2</b> .....	76
<b>Σχήμα 9:</b> Αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη .....	87
<b>Σχήμα 10:</b> Γενική δομή συμπλόκων Pd(II) και Pt(II).....	92
<b>Σχήμα 11:</b> <sup>1</sup> H NMR φάσμα των υποκαταστατών <b>1</b> και <b>2</b> σε DMSO-d <sub>6</sub> στους 25 °C στη περιοχή 10,50 -1,45 ppm .....	93
<b>Σχήμα 12:</b> HMBC φάσμα συμπλόκου <b>Pd-1</b> ( <sup>1</sup> H περιοχή 11 - 3 ppm, <sup>13</sup> C περιοχή 173 - 115 ppm) σε DMSO-d <sub>6</sub> στους 25 °C. ....	94
<b>Σχήμα 13:</b> HSQC φάσμα συμπλόκου <b>Pt-1</b> ( <sup>1</sup> H περιοχή 9,3 – 3,6 ppm, <sup>13</sup> C περιοχή 158 - 52 ppm) σε DMSO-d <sub>6</sub> στους 25 °C .....	95
<b>Σχήμα 14:</b> HSQC φάσμα συμπλόκου <b>Pd-2</b> ( <sup>1</sup> H περιοχή 10,5 – 1,3 ppm, <sup>13</sup> C περιοχή 160 - 6 ppm) σε DMSO-d <sub>6</sub> στους 25 °C .....	95
<b>Σχήμα 15:</b> IR φάσματα ενώσεων <b>1</b> , <b>Pd-1</b> και <b>Pt-1</b> .....	97
<b>Σχήμα 16:</b> Φάσματα μάζας ενώσεων <b>1</b> και <b>2</b> .....	98
<b>Σχήμα 17:</b> Φάσματα απορρόφησης ενώσεων <b>1</b> , <b>Pd-1</b> , <b>Pt-1</b> , <b>2</b> , <b>Pd-2</b> και <b>Pt-2</b> (10 <sup>-5</sup> M) σε DMSO .....	99

<b>Σχήμα 18:</b> Προτεινόμενος τύπος συμπλόκων Cu(II).....	101
<b>Σχήμα 19:</b> IR φάσματα ενώσεων <b>Cu-1</b> και <b>Cu-2</b> .....	102
<b>Σχήμα 20:</b> Φάσμα X-band EPR συμπλόκων <b>Cu-1</b> και <b>Cu-2</b> στην περιοχή 2500-3500 G .....	104
<b>Σχήμα 21:</b> Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων ανάμιξης υποκαταστάτη <b>1</b> ( $2 \cdot 10^{-4}$ M) και Cu(II) ( $2 \cdot 10^{-3}$ M) στην περιοχή των 250-500 nm και 500-900 nm. Μεταβολή της απορρόφησης στα 320 και 650 nm συναρτήσει του λόγου $R = [Cu(II)] / [1]$ .....	106
<b>Σχήμα 22:</b> Μεταβολή του μεγίστου των ταινιών απορρόφησης συναρτήσει με το λόγο $R = [Cu(II)] / [1]$ .....	107
<b>Σχήμα 23:</b> Φάσματα ηλεκτρονικής απορρόφησης στην περιοχή των 400 - 900 nm των μιγμάτων υποκαταστάτη <b>1</b> και Cu(II).....	108
<b>Σχήμα 24α:</b> Φάσματα UV-Vis υποκαταστατών <b>1</b> και <b>2</b> ( $10^{-5}$ M) απουσία και παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA ( $0 - 5 \times 10^{-4}$ ) M. Ένθετο γράφημα: $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times 10^8$ συναρτήσει $[DNA] \times 10^5$ .....	110
<b>Σχήμα 24β:</b> Φάσματα UV-Vis συμπλόκων <b>Pd-1</b> , <b>Pd-2</b> , <b>Pt-1</b> , <b>Pt-2</b> , <b>Cu-1</b> και <b>Cu-2</b> ( $10^{-5}$ M) απουσία και παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA ( $0 - 5 \times 10^{-4}$ ) M. Ένθετο γράφημα: $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times 10^8$ συναρτήσει $[DNA] \times 10^5$ .....	112
<b>Σχήμα 25α:</b> Φάσματα εκπομπής φθορισμού υποκαταστατών <b>1</b> και <b>2</b> ( $10^{-5}$ M) απουσία και παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA ( $0 - 5 \times 10^{-4}$ ) M.....	115
<b>Σχήμα 25β:</b> Φάσματα εκπομπής φθορισμού συμπλόκων <b>Pd-1</b> , <b>Pd-2</b> , <b>Pt-1</b> , <b>Pt-2</b> , <b>Cu-1</b> και <b>Cu-2</b> ( $10^{-5}$ M) απουσία και παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA ( $0 - 5 \times 10^{-4}$ ) M.....	116
<b>Σχήμα 25γ:</b> Φάσματα εκπομπής φθορισμού συστήματος DNA-EtBr ( $[DNA] = 5 \cdot 10^{-5}$ M και $[EtBr] = 6,25 \cdot 10^{-6}$ M) με αυξανόμενη προσθήκη υποκαταστατών <b>1</b> και <b>2</b> . Ένθετο γράφημα: $F_0/F$ συναρτήσει $[Q] \times 10^{-6}$ .....	119
<b>Σχήμα 25δ:</b> Φάσματα εκπομπής φθορισμού συστήματος DNA-EtBr ( $[DNA] = 5 \cdot 10^{-5}$ M και $[EtBr] = 6,25 \cdot 10^{-6}$ M) με αυξανόμενη προσθήκη συμπλόκων <b>Pd-1</b> , <b>Pd-2</b> , <b>Pt-1</b> , <b>Pt-2</b> , <b>Cu-1</b> και <b>Cu-2</b> . Ένθετο γράφημα: $F_0/F$ συναρτήσει $[Q] \times 10^{-6}$ .....	121

<b>Σχήμα 26α:</b> Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού DNA ( $5 \times 10^{-5}$ M) με αυξανόμενη προσθήκη υποκαταστατών <b>1</b> και <b>2</b> .....	123
<b>Σχήμα 26β:</b> Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού DNA ( $5 \times 10^{-5}$ M) με αυξανόμενη προσθήκη συμπλόκων <b>Pd-1</b> , <b>Pd-2</b> , <b>Pt-1</b> , <b>Pt-2</b> , <b>Cu-1</b> και <b>Cu-2</b> .....	125
<b>Σχήμα 27:</b> Διάγραμμα επίδρασης αυξανόμενων ποσοτήτων υποκαταστατών και αντίστοιχων συμπλόκων στο ιξώδες του CT-DNA ( $5 \times 10^{-5}$ M) στους 25 °C, όπου $R = [\text{ένωση}] / [\text{DNA}]$ (0 – 0,5).....	135

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1:</b> Η δραστικότητα του CJM 126 στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-468.....	21
<b>Εικόνα 2:</b> Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του Phortress σε "ευαίσθητες" και "ανθεκτικές" καρκινικές σειρές.....	24
<b>Εικόνα 3:</b> Δομή των αντιαρθρικών φαρμάκων του Au(I).....	27
<b>Εικόνα 4:</b> Δομή των συμπλόκων του Gd(III) και Mn(II).....	28
<b>Εικόνα 5:</b> Προτεινόμενη δομή του κολλοειδούς υποκιτρικού Bi(III).....	29
<b>Εικόνα 6:</b> Δομές ορισμένων ραδιοφαρμάκων του τεχνητίου.....	30
<b>Εικόνα 7:</b> Δομές των συμπλόκων του Ru(III).....	32
<b>Εικόνα 8:</b> Δομές των συμπλόκων του Ti(IV).....	32
<b>Εικόνα 9:</b> Δομές συμπλόκων του Ga(III) .....	33
<b>Εικόνα 10:</b> Νέας γενιάς αντικαρκινικά φάρμακα του λευκοχρύσου.....	40
<b>Εικόνα 11:</b> Αντικαρκινικά φάρμακα του λευκοχρύσου για τα οποία δεν συνεχίστηκε η περαιτέρω ανάπτυξη τους.....	41
<b>Εικόνα 12:</b> Αντικαρκινικά φάρμακα του λευκοχρύσου που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές.....	42
<b>Εικόνα 13:</b> Σχηματική περιγραφή ενός νανοσωματιδίου Liporlatin.....	43
<b>Εικόνα 14:</b> Σύμπλοκα του Pt(II) με δικαρβοξυλικούς υποκαταστάτες.....	45
<b>Εικόνα 15:</b> Σύμπλοκα του Pt(II) με διαμινο υποκαταστάτες.....	47
<b>Εικόνα 16:</b> Σύμπλοκα του Pt(II) με αντικαρκινικούς παράγοντες.....	49
<b>Εικόνα 17:</b> Trans-σύμπλοκα του Pt(II) με αντικαρκινική δράση.....	50
<b>Εικόνα 18:</b> Ενδεικτικά παραδείγματα συμπλόκων του παλλαδίου με αντικαρκινική δράση.....	53
<b>Εικόνα 19:</b> Ενδεικτικά παραδείγματα συμπλόκων του παλλαδίου με αντικαρκινική δράση.....	54

<b>Εικόνα 20:</b> Η δομή του συμπλόκου 2-κετο-3-αιθοξυβουτυραλδεϋδο-δισ(θειοσεμικαρβαζόνη)χαλκός(II).....	59
<b>Εικόνα 21:</b> Η δομή της σαλικυλαλδεϋδο-βενζούλουδραζόνη (SBH) .....	59
<b>Εικόνα 22:</b> Δομή των τριπυρηνικών συμπλόκων του Cu(II).....	61
<b>Εικόνα 23:</b> Δομή των διπυρηνικών συμπλόκων του Cu(I).....	61
<b>Εικόνα 24:</b> Πιθανές γεωμετρίες συμπλόκων του Cu(II) με διμίνες.....	62
<b>Εικόνα 25:</b> Δομή του Cu(II) με τριπυριδίνη.....	63
<b>Εικόνα 26:</b> Δομή συμπλόκου Casiopeinas II-gly.....	64
<b>Εικόνα 27:</b> Η δομή του συμπλόκου υπερχλωρικός (δοξουκυκλίνη)-υδατο-(1,10 φαινανθρολίνη)υπερχλωρατοχαλκός(II).....	64
<b>Εικόνα 28:</b> Μορφολογία κυττάρων καρκίνου του μαστού MDA-MB-231, MCF-7 και φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλαστών δέρματος DSF.....	85
<b>Εικόνα 29:</b> Χημική δομή ενώσεων Lucigenin και Δακαρβαζάνης.....	120
<b>Εικόνα 30:</b> Ενδεικτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων MCF-7 μετά από 24 ώρες επώασης με τις ενώσεις <b>1</b> και <b>2</b> .....	136
<b>Εικόνα 31:</b> Ενδεικτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων MCF-7 μετά από 24 ώρες επώασης με τις ενώσεις <b>Pd-1</b> , <b>Pt-1</b> , <b>Cu-1</b> , <b>Pd-2</b> , <b>Pt-2</b> και <b>Cu-2</b> .....	137



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1:</b> Διαμόρφωση της έλικας A-, B- και η Z-μορφής του DNA.....	68
<b>Πίνακας 2:</b> Παράμετροι φάσματος EPR για τα συμπλόκων Cu(II).....	103
<b>Πίνακας 3:</b> Σταθερές σχηματισμού $K_f$ ( $L \cdot mol^{-1}$ ) και $\ln K_f$ σε DMSO στους 25 °C συμπλόκων Cu(II).....	109
<b>Πίνακας 4:</b> Σταθερές σύνδεσης υποκαταστατών και αντίστοιχων συμπλόκων με DNA ( $K_b$ ).....	114
<b>Πίνακας 5:</b> Σταθερές $K_{sn}$ και $K_{app}$ υποκαταστατών και αντίστοιχων συμπλόκων .....	122
<b>Πίνακας 6:</b> $\Delta T_m$ και %h του CT-DNA παρουσία υποκαταστατών και αντίστοιχων συμπλόκων .....	131
<b>Πίνακας 7:</b> Τιμές $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) των υπό μελέτη ενώσεων στις δοκιμαζόμενες κυτταρικές σειρές .....	140

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

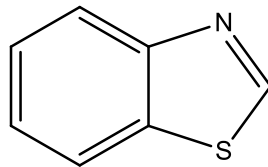
Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε το χρονικό διάστημα 2010-2014 στα πλαίσια του Διδακτορικού Προγράμματος Σπουδών (Τμήμα Χημείας-ΕΚΠΑ). Τα πειράματα έλαβαν χώρα κυρίως στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, ενώ σημαντικό κομμάτι των μελετών πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών (ΙΒΕ) και στο Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ), ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος". Η εν λόγω μελέτη συγχρηματοδοτήθηκε εν μέρει από την Δράση «Ταυτοποίηση στόχων για τη διάγνωση και αντιμετώπιση ασθενειών" του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών & Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος" (Αναπτυξιακές προτάσεις Ερευνητικών Φορέων-ΚΡΗΠΙΣ-ΔΙΑΣ).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΤΟ 2-(4'-ΑΜΙΝΟΦΑΙΝΥΛΟ)ΒΕΝΖΟΘΕΙΑΖΟΛΙΟ

### 1.1 Το βενζοθειαζόλιο

Το βενζοθειαζόλιο είναι ένα άχρωμο παχύρευστο υγρό με πυκνότητα 1,238 g/mL, σημείο τήξεως 2 °C και σημείο βρασμού 227 - 228 °C (Σχήμα 1). Πρόκειται για μια ετεροκυκλική αρωματική ένωση που χρησιμοποιείται για την σύνθεση μεγάλου αριθμού παραγώγων τα οποία εμφανίζουν πλατύ εύρος εφαρμογών. Η μελέτη της βιολογικής δράσης του βενζοθειαζολίου και των παραγώγων του ξεκίνησε τη δεκαετία του '50, ενώ τα τελευταία χρόνια παράγωγα του βενζοθειαζολίου μελετώνται εις βάθος με σκοπό την εκμετάλλευση τόσο των χημικών όσο και των βιολογικών τους εφαρμογών για την παρασκευή νέων φαρμάκων. Πληθώρα ενώσεων του βενζοθειαζολίου απαντάται σε πάρα πολλά σκευάσματα με αντικαρκινική, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντικαταθλιπτική και αγχολυτική δράση [2].



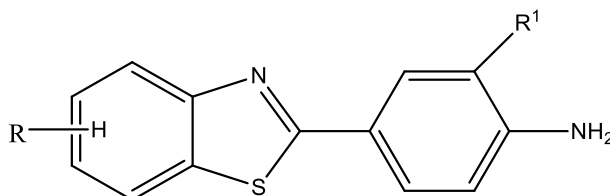
Σχήμα 1: Δομή βενζοθειαζολίου

Τα πυριδινοβενζοθειαζόλια και τα βενζοθειαζόλια με κιναζολίνες διαθέτουν αντιπικρές ιδιότητες, ενώ κάποια παράγωγα του 2-βενζοθειαζολο-3-οξικού οξέος έχουν αντιφλεγμονώδη δράση. Η ριλουζόλη (Riluzole, 6-τριφθορομεθοξυ-2-αμινοβενζοθειαζόλιο) εμπλέκεται στη νευροδιαβίβαση του γλουταμικού οξέος και χρησιμοποιείται ως αντικαταθλιπτικό και αγχολυτικό φάρμακο [3].

Η σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση διαφόρων βενζοθειαζολίων ανέδειξε ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων παρεμποδίζοντας την διάδοση τους σε υγιείς ιστούς. Το 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζόλιο είναι μέρος της δομής της χρωστικής θειοφλαβίνη T (ThT), η οποία χρησιμοποιείται στην μετά θάνατον διάγνωση της νόσου Alzheimer, ενώ πολλά από τα παράγωγα του διαθέτουν αντικαρκινική δράση [4].

## 1.2 Το 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζόλιο

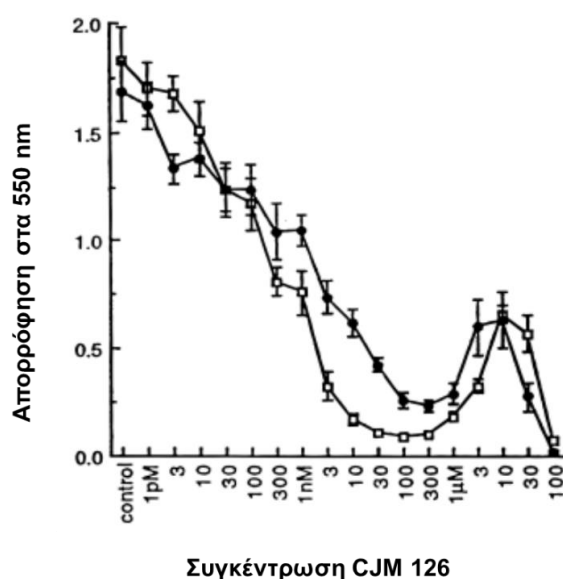
Τα 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζόλια αποτελούν μια ομάδα χημικών μορίων με απλή δομή αλλά εξαιρετικά ενδιαφέρουσα αντικαρκινική δράση. Υποκατεστημένα παράγωγα του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου έχουν συντεθεί και εξεταστεί *in vitro* για την αντικαρκινική τους δράση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, ωοθηκών, πνευμόνων, νεφρών και εντέρου (Σχήμα 2). Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ξεκίνησε για πρώτη φορά η σύνθεση των πρώτων παραγώγων αλλά και η αξιολόγηση της αντικαρκινικής τους δραστηριότητας, από την ερευνητική ομάδα των Bradshaw, Stevens και Westwell, στο Πανεπιστήμιο του Nottingham [1].



Σχήμα 2: Γενική δομή παραγώγων του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου,

όπου R=H ή F, R<sup>1</sup>=Me, H, Cl ή I

Το 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζόλιο (CJM 126, R=H, R<sup>1</sup>=H) υπήρξε το πρώτο μόριο το οποίο έδειξε εκλεκτική δραστηριότητα έναντι της καρκινικής σειράς MCF-7, που είναι θετική σε υποδοχείς οιστρογόνων (ER+, Estrogen Receptor positive) και μάλιστα με μια ασυνήθιστη διφασική απόκριση στην δοσολογία, με την μέγιστη δραστηριότητα να εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις 100 nM - 300 nM αλλά και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (100 μM), ενώ στο εύρος συγκεντρώσεων 1 μM - 30 μM παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 1).



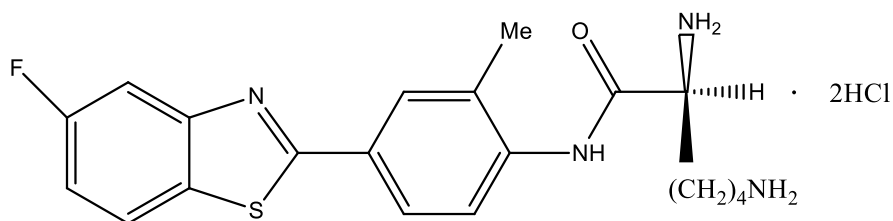
**Εικόνα 1: Η δραστηριότητα του CJM 126 στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-468 [1]**

Τα ευρήματα για την εκλεκτικότητα και την διφασική δόση επιβεβαιώθηκαν και σε άλλες ανθρώπινες καρκινικές σειρές καρκίνου του μαστού, τόσο θετικές όσο και αρνητικές σε υποδοχείς οιστρογόνων, όπως οι MDA-MB-468, T47D και SKBR3 [5]. Οι μελέτες σχέσεων δομής-δραστηριότητας έδειξαν ότι διάφορες τροποποιήσεις τόσο στον βενζοθειαζολικό πυρήνα όσο και στον 2' υποκαταστάτη οδηγούν σε μείωση της αντικαρκινικής δραστηριότητας. Η τροποποίηση του βενζοθειαζολικού πυρήνα (π.χ. η μετατροπή σε βενζοξαζόλιο ή βενζιμιδαζόλιο), όπως επίσης και η υποκατάσταση του με αλκοξυ- ή υδροξυ- ομάδες στην αρυλαμίνη είχε αρνητική επίδραση στην δραστηριότητα. Αντιθέτως, η υποκατάσταση με αλογόνα ή αλκυλομάδες στην

3' θέση της αρυλαμίνης ( $R^1 = \text{Cl, Br, I, -CH}_3, \text{-CH}_2\text{CH}_3$ ) έδωσε παράγωγα με αυξημένη δραστικότητα και διευρυμένο φάσμα δράσης σε καρκινικές σειρές μαστού, ωοθηκών, νεφρών, παχέος εντέρου, μελανώματος και μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων. Επιπλέον, η δραστικότητα έναντι κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού αλλά και άλλων μορφών καρκίνου, αποδείχθηκε ανεξάρτητη από τους υποδοχείς κυττάρων για οιστρογόνα ή αυξητικούς παράγοντες.

Από τα συντεθημένα παράγωγα αυτό που είχε την υψηλότερη δραστικότητα ήταν το 2-(4'-αμινο-3-μεθυλοφαινυλο)βενζοθειαζόλιο (DF 203,  $R^1 = \text{-CH}_3, R = \text{H}$ ) [5]. Η εισαγωγή μιας μεθυλομάδας ή ενός αλογόνου στη θέση 3' της 2-φαινυλομάδας ενισχύει αυτή την δραστικότητα και αυξάνει το φάσμα δράσης σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, πνεύμονα, εντέρου, νεφρών και του μελανώματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι στις κυτταρικές σειρές στις οποίες τα βενζοθειαζόλια εμφανίζουν ισχυρή και εκλεκτική κυτταροτοξική δράση, όπως οι MCF-7, T47D, MDA-MB-468, IGROVE1, το DF 203 εμφανίζει τιμές  $\text{IC}_{50}$  της τάξεως των 100 nM. Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς απενεργοποίησης της ένωσης DF 203 από το κύτταρο είναι μεταβολικά, μέσω υδροξυλίωσης στην 6 θέση του βενζοθειαζολίου προς σχηματισμό της ένωσης 2-(4'-αμινο-3'-μεθυλοφαινυλο)-6-υδροξυβενζοθειαζόλιο (6OH-203). Η ένωση αυτή είναι το κύριο μεταβολικό προϊόν του DF 203 και δεν εμφανίζει αντικαρκινική δράση, αλλά αντιθέτως επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε συγκεντρώσεις 1  $\mu\text{M}$  - 30  $\mu\text{M}$ , όπως φαίνεται στο Σχήμα 3 [6].

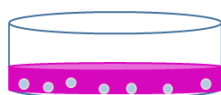
Κορωνίδα αυτής της συνθετικής βελτιστοποίησης αποτέλεσε η εισαγωγή ενός ατόμου φθορίου στην θέση 5' του βενζοθειαζολίου που είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία του 5-φθορο-παραγώγου 2-(4'-αμινο-3'-μεθυλοφαινυλο)-5-φθοροβενζοθειαζόλιο (5F-203,  $R^1 = \text{-CH}_3, R = \text{F}$ ) το οποίο δεν μεταβολίζεται προς το 6-OH. Η συμπύκνωση του 5F-203 με ένα μόριο λυσίνης οδήγησε στο σχηματισμό ενός πρόδρομου φαρμάκου, του Phortress (Σχήμα 3). Το Phortress διατηρεί την εκλεκτικότητα και την δραστικότητα του DF 203 ενώ παράλληλα διαθέτει και επιθυμητά φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Το 2004 ξεκίνησε κλινική δοκιμή φάσης I για το Phortress [7, 8].



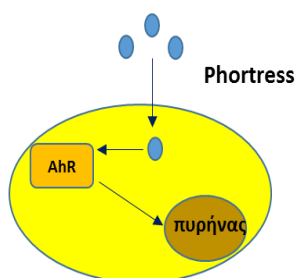
**Σχήμα 3: Δομή Phortress**

Ο μηχανισμός δράσης της οικογένειας των φαινυλοβενζοθειαζολικών παραγώγων είναι πρωτότυπος και περιλαμβάνει τον μεταβολισμό τους σε δραστικά παράγωγα, ικανά να προκαλέσουν βλάβες στο DNA των ευαίσθητων κυττάρων (Εικόνα 2). Όλα τα παράγωγα έδειξαν υψηλή συγγένεια σύνδεσης για τον υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων (Aryl Hydrocarbon Receptor, AhR) ο οποίος μολονότι εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα, στις "ευαίσθητες" καρκινικές σειρές εδράζεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ στις "ανθεκτικές" στον πυρήνα.

Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το Phortress παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης αυτού στο θρεπτικό υλικό μόνο των "ευαίσθητων" κυττάρων. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην πρόσδεση του Phortress με τον υποδοχέα AhR που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και τη μεταφορά του στο πυρήνα. Εκεί το σύμπλοκο Phortress-AhR επάγει την ενεργοποίηση του γονιδίου CYP1A1 και την έκφραση πρωτεϊνών που οδηγούν στην βιομετατροπή του παραγώγου [9]. Οι βλάβες προκαλούνται στο DNA από ένα δραστικό ηλεκτρονιόφιλο ενδιάμεσο το οποίο σχηματίζει ενώσεις προσθήκης με το DNA οδηγώντας στην καταστροφή του και στον κυτταρικό θάνατο.



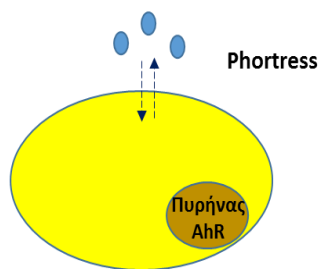
Στα "ευαίσθητα" κύτταρα MCF-7, MDA-468 και T47D, ο AhR εδράζεται στο κυτταρόπλασμα και συμπλέκεται με το Phortress



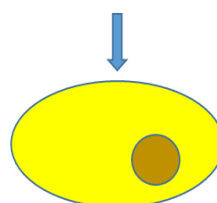
Το σύμπλοκο AhR-Phortress εισέρχεται στον πυρήνα και επάγει την καταστροφή του DNA



Στα "ανθεκτικά" κύτταρα MDA-435 ο AhR εδράζεται πυρήνα και δεν μπορεί να τον προσεγγίσει το Phortress



Δεν σχηματίζεται σύμπλοκο AhR-Phortress και το κύτταρο παραμένει ζωντανό



**Εικόνα 2: Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του Phortress σε "ευαίσθητες" και "ανθεκτικές" καρκινικές σειρές**

Αντίθετα στις "ανθεκτικές" σειρές το Phortress ακόμα και αν μπαίνει παθητικά στο κυτταρόπλασμα δεν επάγει κυτταρικό θάνατο επειδή δεν υπάρχει ο υποδοχέας AhR στο κυτταρόπλασμα και κατά συνέπεια δεν σχηματίζεται το σύμπλοκο Phortress-AhR το οποίο τελικά θα οδηγήσει το Phortress στον πυρήνα του κυττάρου [9].

Γίνεται επομένως αντιληπτό, ότι η αλληλεπίδραση αυτού του τύπου των παραγώγων με διάφορα μεταλλικά ιόντα θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία συμπλόκων ενώσεων ικανών να παρουσιάζουν διττή δράση, η οποία θα απορρέει αφενός από την εκλεκτική στόχευση του βενζοθειαζολίου αφετέρου από την τοξικότητα του μετάλλου.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ**

#### **2.1 Εισαγωγή**

Μολονότι τα μέταλλα και τα σύμπλοκα αποτελούν τομέα της Ανόργανης Χημείας, ήδη από τις αρχές του 20ου αιώνα έγινε γνωστή η καθοριστική σημασία των μεταλλικών ιόντων στα βιολογικά συστήματα. Το 1970 κατά τη διάρκεια του MIB GRC συμποσίου (Gordon Research Conference on Metals in Biology) αναγνωρίστηκε η στενή σύνδεση μεταξύ Βιολογίας, Βιοχημείας και Ανόργανης Χημείας και εισήχθη για πρώτη φορά ο όρος Βιοανόργανη Χημεία. Με τον ευρύτερο όρο Βιολογική Ανόργανη Χημεία περιγράφεται η ερευνητική δραστηριότητα που αφορά τη μελέτη ανόργανων ενώσεων που συναντώνται σε βιολογικά συστήματα δίνοντας έμφαση στη διερεύνηση της *in vivo* δράσης τους. Ανόργανα στοιχεία εισάγονται τεχνητά σε βιολογικά συστήματα για την διερεύνηση της δομής και δράσης αυτών (probes). Βαρέα μέταλλα όπως ο υδράργυρος και ο λευκόχρυσος χρησιμοποιούνται στην κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, για την εύρεση της δομής βιομακρομορίων. Σύμπλοκες ενώσεις μετάλλων χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικά και θεραπευτικά φάρμακα. Η σημασία των ανόργανων στοιχείων στη διατροφή, η παρουσία μετάλλων στο περιβάλλον, η τοξικότητά τους και οι τρόποι απομάκρυνσης τόσο από τα ίδια τα συστήματα όσο και μετά από παρέμβαση, καθώς και η μεταφορά και αποθήκευσή τους στους οργανισμούς είναι επίσης ένα μεγάλο κεφάλαιο της Βιοανόργανης Χημείας [10].

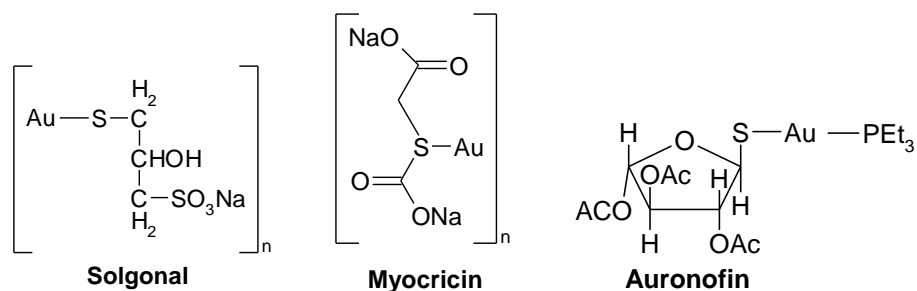
#### **2.1.1 Ιατρική Ανόργανη Χημεία**

Με τον όρο Ιατρική Ανόργανη Χημεία προσδιορίζεται το πεδίο έρευνας που σκοπό έχει να σχεδιάσει, να μελετήσει και να συνδυάσει φυσικές και χημικές ιδιότητες μεταλλικών ιόντων και ενώσεων αυτών, με σκοπό να εμφανίζουν συγκεκριμένη βιολογική δράση [11]. Η παρουσία των κατάλληλων μετάλλων στις σωστές ποσότητες είναι όχι μόνο ευεργετική αλλά και απαραίτητη για την λειτουργία των οργανισμών. Το κύριο πλεονέκτημα των φαρμακευτικών

ενώσεων με βάση το μεταλλικό κέντρο, εν συγκρίσει με τις αντίστοιχες οργανικές, είναι η δυνατότητα του μεταλλικού συμπλόκου να αλλάζει τον αριθμό συναρμογής του, τη γεωμετρία και την οξειδωτική του κατάσταση, γεγονός που επιτρέπει τη ρύθμιση της χημικής του ενεργότητας τόσο κινητικά (ταχύτητα εναλλαγής των υποκαταστατών), όσο και θερμοδυναμικά (ισχύς δεσμών μετάλλου-υποκαταστάτη, οξειδοαναγωγικά δυναμικά κ.α.) [12].

Η παρουσία του μετάλλου είναι δυνατόν να μεταβάλλει τις ιδιότητες οργανικών φαρμακευτικών παραγόντων, σχηματίζοντας σύμπλοκα με αυτούς [13-15]. Η κατανόηση του τρόπου δράσεως των μεταλλο-φαρμάκων σε μοριακό επίπεδο, έγινε η αφετηρία για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων μεταλλικών ενώσεων με επιθυμητή βιολογική δραστικότητα, κάτι που οδήγησε στην ανακάλυψη μορίων με ευρύ φάσμα φαρμακευτικών εφαρμογών [16, 17]. Τα σύμπλοκα κατατάσσονται σε επτά κύριες κατηγορίες, ανάλογα με τη λειτουργικότητα του μεταλλικού κέντρου και του υποκαταστάτη [18]: 1) Το σύμπλοκο είναι ενεργό ως έχει, 2) Το σύμπλοκο είναι ένα πρόδρομο φάρμακο και είναι ενεργό μετά από μετασχηματισμό, 3) Το μεταλλικό κέντρο λειτουργεί ως ενισχυτής της ακτινοβολίας, 4) Το σύμπλοκο περιέχει ραδιονουκλίδιο, 5) Το μέταλλο ή τα προϊόντα της βιο-μετατροπής του είναι ενεργά, 6) Ο υποκαταστάτης είναι βιολογικά ενεργός και 7) Μόνο μέρος του συμπλόκου είναι ενεργό. Παρακάτω θα αναφέρουμε ορισμένες κύριες κατηγορίες συμπλόκων, λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται κλινικά ή έχουν εισέλθει σε κλινικές δοκιμές.

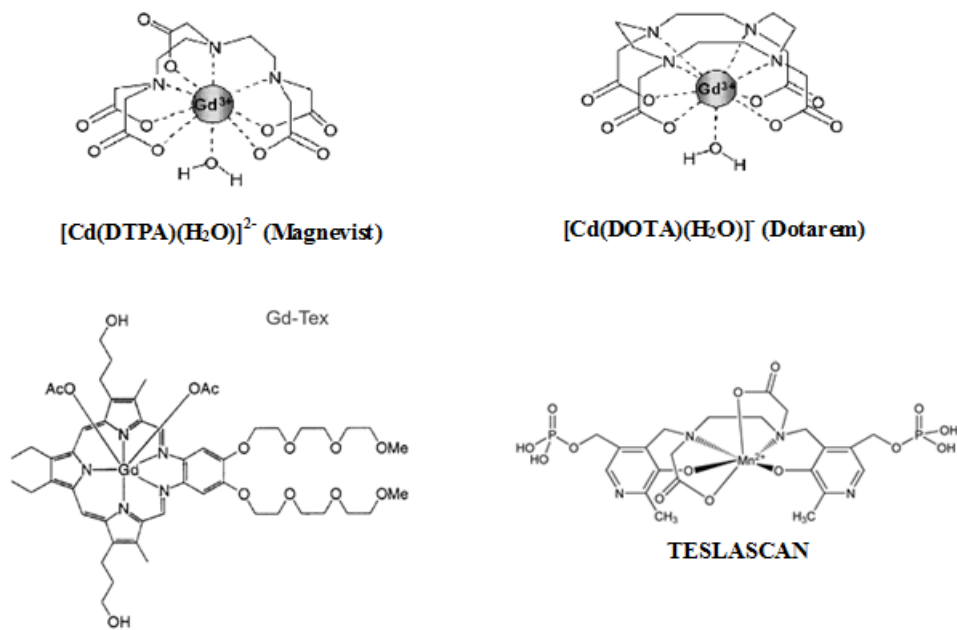
Σύμπλοκα του χρυσού χρησιμοποιούνται ως αντιαθροτικά φάρμακα, με κυριότερα τα υδατοδιαλυτά θειολικά σύμπλοκα του Au(I) [19]: χρυσοθειομηλικό (Myocrisin), χρυσοθειογλυκόζη (Solgonal), δις-(θειοσουλφατο)χρυσικό(I) νάτριο και το θειοπροπανολοθειοσουλφονατο-S-χρυσικό(I) νάτριο. Το πόσιμο φάρμακο Aurapofin είναι ένα κρυσταλλικό λευκό στερεό, ελάχιστα διαλυτό στο νερό, διαλυτό όμως σε οργανικούς διαλύτες και αποτελεί το πρώτο παράδειγμα χρήσης μιας τριαλκυλοφωσφίνης ως μέρος της δομής ενός φαρμάκου [20]. Στην Εικόνα 3 παρατίθενται χαρακτηριστικά παραδείγματα υδατοδιαλυτών φαρμάκων του Au(I).



**Εικόνα 3: Δομή των αντιαθροτικών φαρμάκων του Au(I), Solgonal, Myocricin και Auronofin**

Σύμπλοκα του Ag(I) και του Sb(V) χρησιμοποιούνται ως αντιμολυσματικά μέσα. Το σύμπλοκο του Ag(I) με σουλφαδιαζόνη (AgSD) χρησιμοποιείται ως αντιμικροβιακός και μικροβιοκτόνος παράγοντας [21], ενώ το Glucantime (N-μεθυλογλυκαμινοαντιμονικό(V)) χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της λεισμανίασης [22].

Σύμπλοκα του Gd(III) όπως τα  $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$  (Magnevist),  $[Gd(DOTA)(H_2O)]^-$  (Dotarem),  $[Gd(DTPA-BMA)(H_2O)]$  (Omniscan),  $[Gd(HP-DO_3A)(H_2O)]$  (ProHance), αλλά και σύμπλοκα του Mn(II) όπως το  $[Mn(DPDP)]$  (Teslascan) χρησιμοποιούνται ως παράγοντες απεικόνισης στην μαγνητική τομογραφία, MRI (Εικόνα 4) [23, 24]. Το σύμπλοκο του Gd(III) με την μοτεξαφρίνη (Motexafirin, παράγωγο πορφυρίνης), εφαρμόζεται κλινικά ως ραδιοευαισθητοποιητής (Xcytrin, Gd-Tex), για την ακτινοθεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του εγκεφάλου. Η παρουσία του ενισχύει την ανταπόκριση των όγκων στην ακτινοθεραπεία, μέσω ενός μηχανισμού καταλυτικής οξειδωσης των ενδοκυτταρικών αναγωγικών μεταβολιτών, όπως γλουταθειόνη, ασκορβικό, κ.α [25].

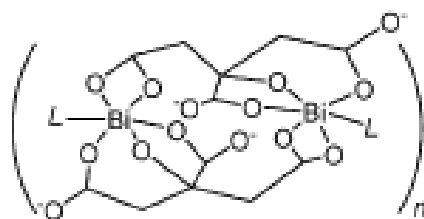


**Εικόνα 4: Δομή των συμπλόκων του Gd(III) (Magnevist, Dotarem) και του Mn(II) (Teslascan) που χρησιμοποιούνται ως παράγοντες απεικόνισης και του Gd(III) με την μοτεξαφρίνη (Xcytrin, Gd-Tex) που χρησιμοποιείται ως ραδιοαισθητοποιητής**

Παράγωγα των πορφυρινών με τις εμπορικές ονομασίες Photofrin, Levulan, Visudyne και Foscan χρησιμοποιούνται στην φωτοδυναμική θεραπεία. Σύμπλοκα διαφόρων μετάλλων με πορφυρίνες και φθαλοκυανίνες δρουν επίσης ως φωτοευαισθητοποιητές και αποτελούν την δεύτερη γενιά φωτοευαισθητοποιητών [26]. Σύμπλοκα των φθαλοκυανινών με διαμαγνητικά ιόντα, όπως π.χ. Zn(II), Al(III), Ga(III), δίνουν μεγαλύτερη απόδοση σε τριπλή κατάσταση εμφανίζοντας μεγαλύτερο χρόνο ζωής [26].

Ενώσεις του βισμούθιου χρησιμοποιούνται για περισσότερο από 200 χρόνια για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, όπως σύφιλη, υπέρταση, δερματικές μολύνσεις και γαστροεντερικές διαταραχές [11]. Η ανακάλυψη του *Helicobacter pylori*, ενός Gram(-) βακτηριδίου του γαστρικού βλεννογόνου υπεύθυνου για το έλκος του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου, έδωσε μεγάλη ώθηση στην έρευνα και στις ιατρικές εφαρμογές ενώσεων του Bi(III) [27]. Σήμερα κυκλοφορούν εμπορικά τρία φάρμακα του βισμούθιου: το υποσαλικυλικό Bi(III) (Pepto-Bismol<sup>®</sup>), το κολλοειδές υποκιτρικό Bi(III) (De-

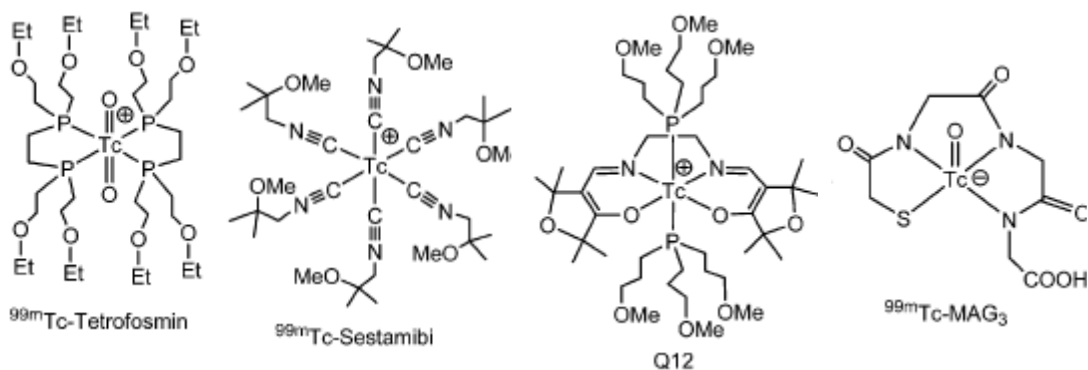
NoI®) και το ρανιτιδίνη-κιτρικό Bi(III) (Tritec, Pylorid®) [28]. Επιπλέον, έχουν συντεθεί πολλές νέες ενώσεις του Bi(III) με διαφορετικές δομές και ενεργότητες καθώς και νανοσωλήνες βισμούθιου με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα [29, 30]. Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται η προτεινόμενη δομή του δομή του κολλοειδούς υποκιτρικού Bi(III) σε pH=3, όπου πιστεύεται ότι προσομοιάζει περισσότερο στις συνθήκες του στομάχου. Προτείνεται ότι το κολλοειδές υποκιτρικό Bi(III), χρησιμοποιώντας ως δομικές μονάδες τα διμερή  $[Bi(cit)_2Bi]^{2-}$ , σχηματίζει προστατευτική μεμβράνη επί των ελκών. Η βιολογική δράση των ενώσεων του βισμούθιου πιθανώς να οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους και με ένζυμα [31, 32].



**Εικόνα 5: Προτεινόμενη δομή του κολλοειδούς υποκιτρικού Bi(III)**

Μια ιδιαίτερη κατηγορία με έντονο κλινικό ενδιαφέρον αποτελούν τα ραδιοφάρμακα, τα οποία είναι ραδιοϊσότοπα που χρησιμοποιούνται τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία [33, 34]. Ως διαγνωστικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν ακτινοβολία  $\gamma$ , όπως τα  $^{67}Ga$ ,  $^{111}In$ ,  $^{99m}Tc$ ,  $^{201}Tl$  για την τεχνική SPECT (Single-Photon Emission Computed Tomography) ή ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν ακτίνες  $\beta^+$  (ποσιτρόνια), όπως τα  $^{55}Co$ ,  $^{64}Cu$ ,  $^{66}Ga$ ,  $^{68}Ga$ ,  $^{82}Rb$ ,  $^{86}Y$  για την τεχνική PET (Positron Emission Tomography) [35, 36].

Το 80% των ραδιοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως, είναι ραδιοφάρμακα επισημασμένα με το ισότοπο  $^{99m}\text{Tc}$ . Αυτό οφείλεται όχι μόνο στις ιδιότητές του (μικρός χρόνος ημιζωής, χαμηλή ακτινοβολία ώστε να μην καταστρέφονται οι ιστοί, εύκολη και χαμηλού κόστους παραγωγή του από το ισότοπο  $^{99}\text{Mo}$ ) αλλά και από την επιτυχή ανάπτυξη παραγόντων απεικόνισης του  $^{99m}\text{Tc}$ , που στηρίχθηκε αποκλειστικά στο σχεδιασμό συμπλόκων του τεχνητίου. Η βιοκατανομή και η ικανότητα στόχευσης εξαρτάται άμεσα από την λιποφιλία, το μέγεθος και το φορτίο αυτών των συμπλόκων [37, 38]. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζονται ορισμένα από τα σύμπλοκα του τεχνητίου, που χρησιμοποιούνται κλινικά.



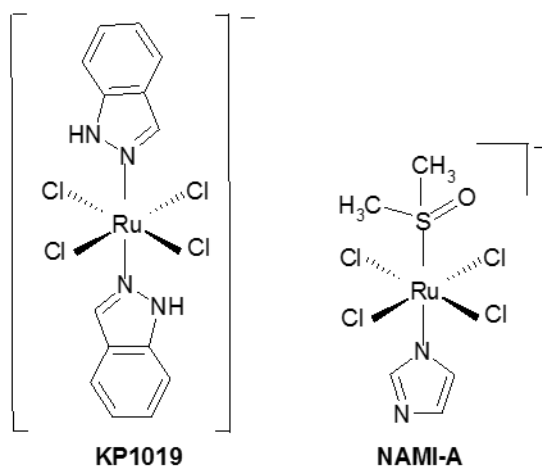
**Εικόνα 6: Δομές ορισμένων ραδιοφαρμάκων του τεχνητίου,  $^{99m}\text{Tc(V)}$ -Tetrofosmin,  $^{99m}\text{Tc(I)}$ -Sestamibi,  $^{99m}\text{Tc(III)}$ -Furifosmin ή  $\text{Tc-Q12}$  και  $^{99m}\text{Tc(V)}$ -MAG<sub>3</sub>**

Τα οκταεδρικά σύμπλοκα του  $^{99m}\text{Tc(V)}$ -Tetrofosmin (Myoview®), που περιέχουν την ομάδα  $\text{O}=\text{Tc}=\text{O}$ ,  $^{99m}\text{Tc(III)}$ -Furifosmin ή  $\text{Tc-Q12}$  (Tecnocard®), όπου οι τέσσερις ισημερινές θέσεις καταλαμβάνονται από τα άτομα αζώτου μιας τετρασχιδούς βάσης Schiff και οι δύο αξονικές από τριτοταγείς φωσφίνες, καθώς και τα  $^{99m}\text{Tc(I)}$ -Sestamibi (Cardiolite®), χρησιμοποιούνται στην καρδιακή απεικόνιση, μέσω διάχυσης αυτών στο μυοκάρδιο. Το σύμπλοκο [ $^{99m}\text{TcV(O)(MAG3)}$ ]<sup>-</sup>, (MAG3: μερκαπτοακετυλοτριγλυκίνη) συνδέεται σχεδόν με όλες τις πρωτεΐνες και μεταφέρεται στους νεφρούς. Το σύμπλοκο είναι χειρόμορφο και χρησιμοποιείται κλινικά στη απεικόνιση των νεφρών [39].

Τα ραδιοϊσότοπα που χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά εκπέμπουν ακτίνες β-(ηλεκτρόνια), όπως π.χ.  $^{32}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{89}\text{Sr}$  ή σωματίδια α (πυρήνες ηλίου,  $^{42}\text{He}^{2+}$ ). Οι κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι τα ισότοπα  $^{211}\text{At}$  και  $^{212}\text{Bi}$ . Για παράδειγμα σύμπλοκα των  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  και  $^{160}\text{Tb}$  με διφωσφορικούς υποκαταστάτες και σύμπλοκα του  $^{188}\text{Re}$  χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση και αντιμετώπιση του καρκίνου των οστών [40, 41].

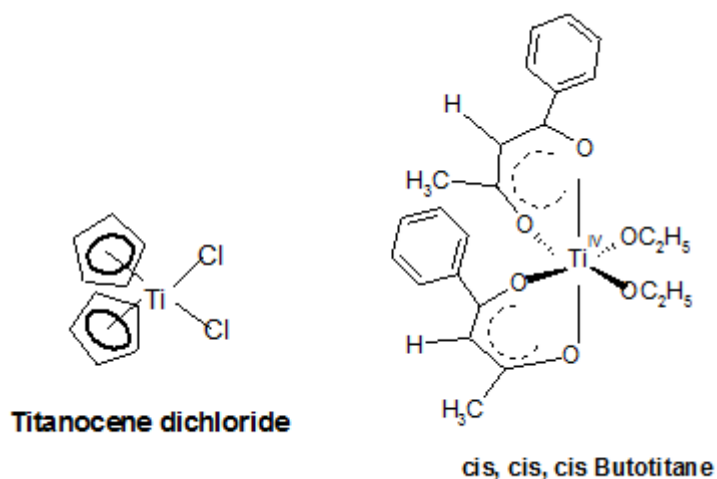
Αναμφισβήτητα το μεγαλύτερο μέρος των ερευνών του πεδίου της Ανόργανης Ιατρικής Χημείας αφορά τη σύνθεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων. Ο καρκίνος κατατάσσεται στις πρώτες τρεις αιτίες θανάτου παγκοσμίως και είναι δύσκολο, αν όχι αδύνατο, να βρεθούν φάρμακα τα οποία συγχρόνως να είναι δραστικά έναντι της ασθένειας και να εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα [42]. Επομένως καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια να σχεδιαστούν νέας γενιάς χημειοθεραπευτικά φάρμακα που θα εμφανίζουν εκλεκτική στόχευση των κακοήθων όγκων, γεγονός που θα έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση μόνο των καρκινικών κυττάρων και την μείωση ή ακόμα και την εξάλειψη των παρενεργειών [43]. Τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα με βάση το μέταλλο είναι αυτά του λευκοχρύσου, για τα οποία θα αναφερθούμε εκτενέστερα στη συνέχεια. Η προσπάθεια όμως για σύνθεση νέων μη-λευκοχρύσου συμπλόκων ενώσεων με αντικαρκινικές ιδιότητες, ανέδειξε τη σημασία αυτών και προσέφερε στην επιστημονική κοινότητα ένα πλούτο γνώσης [44]. Επομένως μπορούμε να σχεδιάζουμε με εκλεκτική στόχευση αντικαρκινικά σύμπλοκα, σε συγκεκριμένο χρόνο και με συγκεκριμένο μηχανισμό δράσεως [45].

Εκτός από τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου, ενώσεις του ρουθηνίου όπως τα  $\text{Ru(II)}$  και  $\text{Ru(III)}$ , θεωρούνται κατάλληλα για χρήση ως αντικαρκινικά φάρμακα, κυρίως λόγω της παρόμοιας, με αυτή του λευκοχρύσου, κινητικής αντικατάστασης των υποκαταστατών [46]. Σύμπλοκα του ρουθηνίου, όπως το  $\text{trans-[RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]\text{ImH}$  (NAMI-A, όπου Im = ιμιδαζόλιο) και το  $\text{trans-[RuCl}_4(\text{Ind})_2]\text{IndH}$  (KP1019, όπου Ind = ινδαζόλιο) έχουν εισέλθει σε φάση κλινικών δοκιμών [47] (Εικόνα 7).



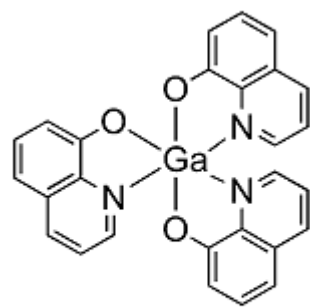
**Εικόνα 7: Δομές των συμπλόκων του Ru(III), NAMI-A και KP1019**

Η αντικαρκινική δράση του διχλώρο-τιτανοκενίου αναγνωρίστηκε το 1979 και το *cis, cis, cis* οκταεδρικό σύμπλοκο του Ti(IV) (Budotitane) έδειξε αντικαρκινική δραστηριότητα έναντι ορισμένων μορφών καρκίνου και εισήλθε σε φάση I κλινικών δοκιμών το 1986 (Εικόνα 8) [48]. Τα σύμπλοκα του Ga(III) τρις-(8-κινολινολατο)γάλλιο(III) (KP46) και το τρις-(3-υδροξυ-2-μεθυλ-4H-πυραν-4-ονατο)γάλλιο(III) (μαλτολικό γάλλιο) είναι πόσιμα αντικαρκινικά που εισήλθαν σε κλινικές δοκιμές το 2002 (Εικόνα 9) [49].

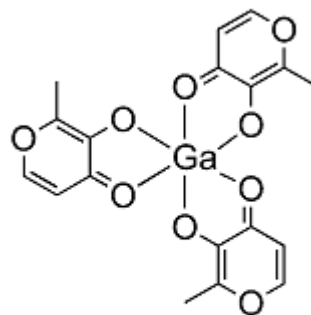


**Εικόνα 8: Οι δομές των συμπλόκων του Ti(IV), *cis*-διχλωρο-δισ(κυκλοπενταπενταδιενυλιο)τιτάνιο(IV) και *cis, cis, cis*-Butotitane**





**KP46**



**Μαλτολικό γάλλιο**

**Εικόνα 9: Δομές των συμπλόκων του Ga(III), τρις-(8-κινολινολατο)γάλλιο(III) (KP46) και του τρις-(3-υδροξυ-2-μεθυλ-4H-πυραν-4-ονατο)γάλλιο(III) (μαλτολικό γάλλιο)**

Εκτός των ανωτέρω ενδεικτικών παραδειγμάτων μεταλλοφαρμάκων και άλλα σύμπλοκα ή οργανομεταλλικές ενώσεις των Au(I), Au(III), Pt(IV), Pt(II), Ir(III), Os(II), La(III), Sn(IV), Rh(III), Ru(II), Ru(III), Mo(VI), As(III), Ga(III), Cu(II), Co(III), Fe(III), Ti(IV), έχουν συντεθεί, χαρακτηριστεί και έχει μελετηθεί η *in vitro* ή/και η *in vivo* βιολογική τους δραστηριότητα.

Μια κατηγορία αντικαρκινικών, και όχι μόνο, φαρμάκων με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον αποτελούν τα νανοϋλικά. Με τη νανοτεχνολογία αναμένεται να αναπτυχθούν νέας γενιάς χημειοθεραπευτικά, που θα έχουν τη δυνατότητα να αντιμετωπίσουν τα προβλήματα της συμβατικής χημειοθεραπείας, όπως η βιοδιαθεσιμότητα, η ειδική στόχευση, η αποικοδόμηση, η διαλυτότητα κ.ά [50]. Ιδιαίτερα στον τομέα των αντικαρκινικών φαρμάκων, οι νανοϊατρικές ενώσεις θεωρούνται τα νέας γενιάς χημειοθεραπευτικά φάρμακα, κυρίως λόγω της εκλεκτικότητας που παρουσιάζουν για τα κύτταρα και τους ιστούς [51], ενώ ήδη χρησιμοποιούνται στην θεραπεία του καρκίνου, των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και της αποβολής οργάνων από μεταμόσχευση [52, 53].

Τέλος, η πλειοψηφία των συμπλόκων ενώσεων που αναφέρθηκαν έχει ως μόριο στόχο το DNA. Για το λόγο αυτό η μελέτη της αλληλεπίδρασης του DNA με σύμπλοκα των στοιχείων μεταπτώσεως παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας των ποικίλων εφαρμογών τους στη θεραπεία του καρκίνου [11, 12].

## 2.2 Λευκόχρυσος

Ο λευκόχρυσος (platinum, πλατίνα) ανήκει στην 6<sup>η</sup> περίοδο, στην 10<sup>η</sup> ομάδα και στο d-τομέα του περιοδικού πίνακα. Είναι ένα μεταλλικό στοιχείο και μαζί με τα ρουθίνιο (Ru), ρόδιο (Rh), παλλάδιο (Pd), όσμιο (Os) και ιρίδιο (Ir) αποτελούν τα ονομαζόμενα "μέταλλα της ομάδας του λευκοχρύσου". Ανακαλύφθηκε το 1736 από τον ισπανό αστρονόμο και ταξιδιωτικό υπάλληλο A. de Ulloa, όταν παρατήρησε ένα άγνωστο μέταλλο στα ορυχεία χρυσού στη σημερινή Κολομβία. Αναγνωρίστηκε ως στοιχείο το 1748 και έγινε γνωστό ως "λευκός χρυσός" ή το "όγδοο μέταλλο" (τα μέταλλα Au, Ag, Hg, Cu, Fe, Sn και Pd ήταν γνωστά από την αρχαιότητα). Το όνομα platinum προέρχεται από την ισπανική λέξη platina (μικρός άργυρος), υποκοριστικό του plata (άργυρος) [54].

Ο λευκόχρυσος είναι σχετικά αδρανές στοιχείο, όπως όλα τα ευγενή μέταλλα. Έχει ηλεκτρονική απεικόνιση  $[Xe] 4f^{14}5d^96s^1$  και εμφανίζεται στις οξειδωτικές καταστάσεις +2( $d^8$ ), +4( $d^6$ ) και σπανίως +3( $d^7$ )  $[Pt(C_6Cl_5)_4]^-$ , +5( $d^5$ )  $[PtF_6]^-$  και +6( $d^4$ )  $[PtF_6]$ . Ο λευκόχρυσος στην οξειδωτική κατάσταση +2 ( $d^8$ ), με βάση την θεωρία κρυσταλλικού πεδίου, σχηματίζει κυρίως διαμαγνητικά σύμπλοκα με αριθμό μοριακής σύνταξης 4, ενώ έχει επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Στις άλλες οξειδωτικές καταστάσεις σχηματίζει οκταεδρικά σύμπλοκα με αριθμό μοριακής σύνταξης 6, αλλά και τετραγωνικά ( $[PtIV(C_6Cl_5)_4]^-$ ) ή piano-stool ( $[PtIV(\eta^5-C_5H_5)Me_3]$ ). Η κινητική αδράνεια των συμπλόκων του λευκοχρύσου(II) διευκόλυνε τη μελέτη και τη κατανόηση τόσο της γεωμετρικής ισομέρειας όσο και του μηχανισμού των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα. Στην οξειδωτική κατάσταση +2 ο λευκόχρυσος συμπεριφέρεται ως "μαλακό" οξύ και προτιμά υποκαταστάτες που δρουν ως N-δότες. Τα σύμπλοκα του

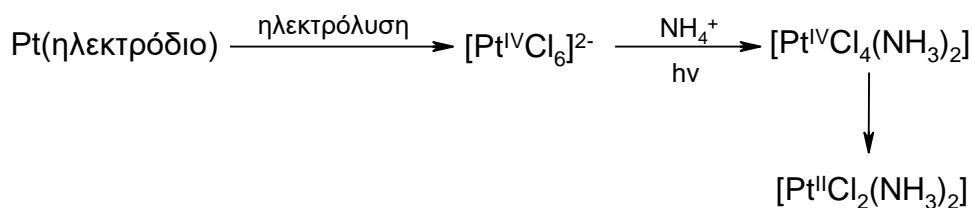
λευκοχρύσου (II) δίνουν πολλές αντιδράσεις αντικατάστασης και εμφανίζουν έντονα το φαινόμενο trans [13].

### 2.2.1 Αντικαρκινικά σύμπλοκα λευκοχρύσου

Ο λευκόχρυσος είναι το πρώτο μέταλλο που το σύμπλοκό του, cis-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος(II)  $[PtCl_2(NH_3)_2]$ , γνωστό και ως cisplatin (σισπλατίνη στην Ελληνική Φαρμακοποιία) αποδείχθηκε ότι έχει ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες και σήμερα θεωρείται ένα από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά. Η ανακάλυψη αυτή αποτέλεσε την απαρχή μιας τεράστιας προσπάθειας που οδήγησε στη σύνθεση και στη μελέτη ενός μεγάλου αριθμού συμπλόκων ενώσεων, όχι μόνο του λευκοχρύσου αλλά και άλλων μεταλλικών συμπλόκων (κυρίως μετάλλων στοιχείων μεταπτώσεως).

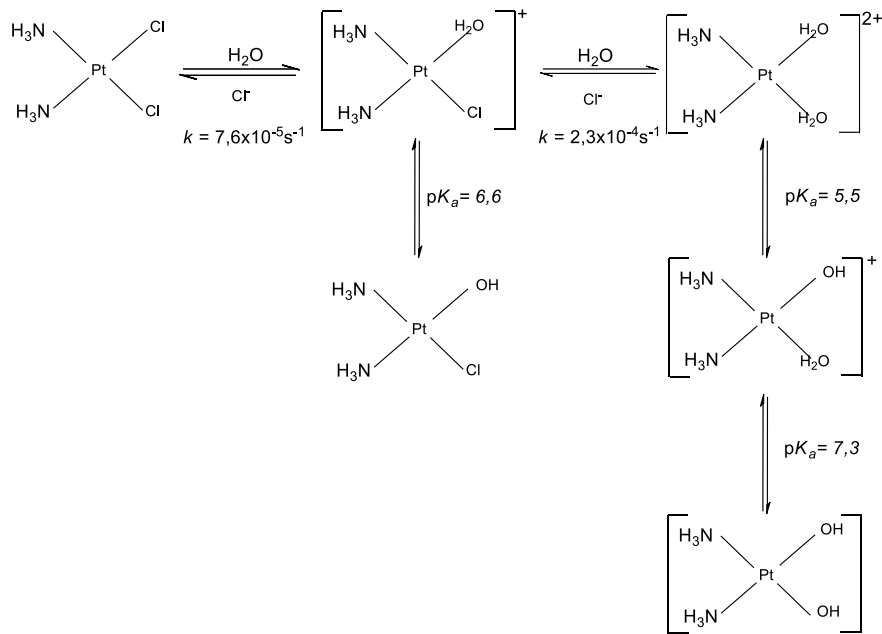
### 2.2.2 Η περίπτωση της σισπλατίνης

Το σύμπλοκο της σισπλατίνης παρασκευάστηκε για πρώτη φορά από τον Michele Peyron το 1845 και για μεγάλο διάστημα έμεινε γνωστό ως "άλας του Peyron". Δομικά χαρακτηρίστηκε από τον Alfred Werner το 1893. Η βιολογική του δραστηριότητα παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον βιοφυσικό Barnett Rosenberg και τους συνεργάτες του Loretta Van Champ και Thomas Krigas (Michigan State University) το 1965 [55] όταν μελέτησε την κυτταρική διαίρεση των βακτηριδίων *Escherichia coli* υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, διότι είχε διαπιστωθεί ότι η διαίρεση των ευκαριωτικών κυττάρων προσομοιάζει με τις γραμμές ενός ηλεκτρικού πεδίου μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων λευκοχρύσου της ηλεκτρολυτικής κυψέλης. Τα αποτελέσματα της ανωτέρω μελέτης έδειξαν νηματοειδή ανάπτυξη και αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, γεγονός που αποδόθηκε στις μικροποσότητες (1-10 ppm) των ενώσεων του λευκοχρύσου που παρήχθησαν κατά την αντίδραση των ηλεκτροδίων λευκοχρύσου με το  $NH_4Cl$  του ηλεκτρολυτικού διαλύματος:



Όταν δοκιμάστηκαν τα ισομερή του  $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)]$ , διαπιστώθηκε ότι μόνο το cis- οδηγούσε σε αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης με αποτέλεσμα το 1978 να εγκριθεί για κλινική χρήση σε καρκίνους του ουρογεννητικού συστήματος.

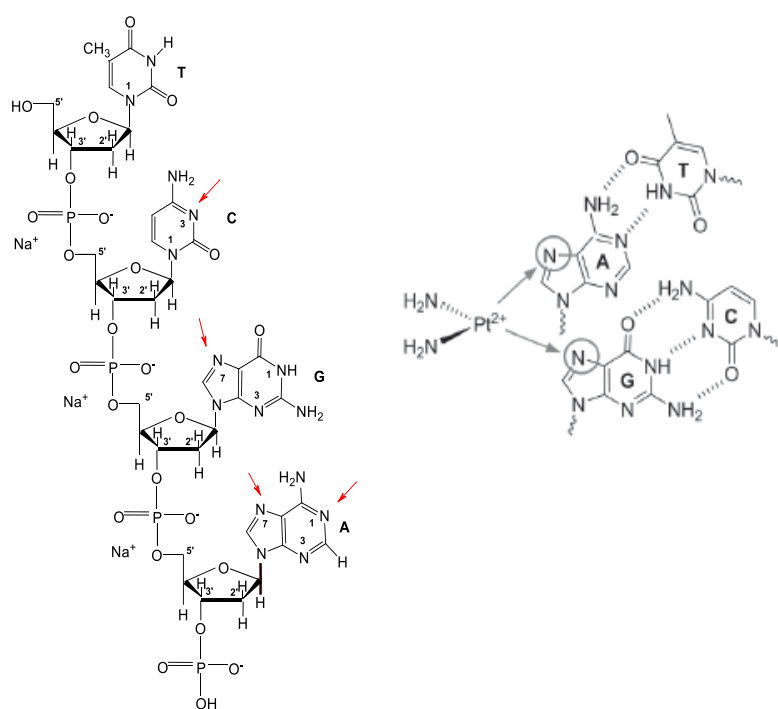
Η σισπλατίνη είναι ασταθής σε υδατικό διάλυμα ( $t_{1/2} = 2,5$  h στους 310 K) και υφίσταται υδρόλυση. Για τη χρήση της ως αντικαρκινικό φάρμακο πρέπει να αποφευχθεί η υδρόλυση και για το λόγο αυτό διατηρείται σε διαλύματα που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση ιόντων χλωρίου. Η αντικατάσταση των ιόντων χλωρίου από μόρια νερού έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία υδατοδιαλυτών συμπλόκων υψηλότερης δραστηριότητας από τη σισπλατίνη. Τα μόρια νερού μετά την σύμπλεξη τους καθίστανται όξινα με τιμές  $pK_a$  από 5 έως 8 (Σχήμα 4). Στο αίμα, όπου το pH είναι 7,4 και η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου είναι περίπου  $10^4$  M, τα κυρίαρχα μοριακά είδη είναι τα διχλωρο- και τα χλωρο-υδροξυ σύμπλοκα του λευκοχρύσου [19]. Αντιθέτως, στο εσωτερικό των κυττάρων, όπου η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου κυμαίνεται μεταξύ 4 - 20 M, κυριαρχούν τα υδατικά σύμπλοκα τα οποία τελικά αλληλεπιδρούν με το μόριο στόχο που είναι το DNA, ενώ σημαντική θεωρείται και η αλληλεπίδραση της σισπλατίνης με πρωτεΐνες πλούσιες σε ιστιδίνη ή θειόλες [56].



**Σχήμα 4: Πορεία υδρόλυσης σισπλατίνης**

Στο Σχήμα 5 που ακολουθεί, παρουσιάζεται σχηματικά η δομή τμήματος της μονής έλικας του DNA με τις τέσσερις νουκλεοβάσεις. Επειδή ο Pt(II) είναι ένα "μαλακό" οξύ κατά Lewis προτιμά τη δέσμευση μέσω των N του DNA. Αποκλείονται τα N3 της θυμίνης και N1 της γουανίνης, διότι σε φυσιολογικό pH τα αρωματικά N είναι πρωτονιωμένα, λόγω έλλειψης σ μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων καθώς κατά στερεοχημικά παρεμποδισμένα. Οι πιθανές θέσεις σύμπλεξης σημειώνονται στο σχήμα με τα βέλη. Η κύρια θέση σύνδεσης του Pt(II) με το DNA είναι το N7 της γουανίνης (G). Η συγκεκριμένη θέση βρίσκεται στην μεγάλη αύλακα του DNA, είναι εύκολα προσβάσιμη από το μέταλλο και επιπλέον είναι πλούσια ηλεκτρονιακά. Άλλες πιθανές θέσεις είναι το N7 της αδενίνης (A), το N1 της αδενίνης (A) και το N3 της κυτοσίνης (C), αν και οι δύο τελευταίες είναι δύσκολα προσβάσιμες από τον λευκόχρυσο [57].

Η προτίμηση για το N7 της γουανίνης μπορεί να αποδοθεί στην έντονη βασικότητά του καθώς και στη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με το O της C6 καρβονυλικής ομάδας. Την υδάτωση της σισπλατίνης ακολουθεί η μονοσχιδής σύνδεση του DNA με τον Pt(II) και κατόπιν ο σχηματισμός χηλικού συμπλόκου. Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ του συστήματος Pt-NH και των φωσφορικών ομάδων των κλώνων ή του C6 της καρβονυλικής ομάδας σταθεροποιούν τους σχηματιζόμενους σταυροδεσμούς (cross-links). Η σύνδεση αυτή προκαλεί κάμψη του DNA κατά 35 - 40°. Με αυτή την κυρτή μορφή του DNA συνδέονται ισχυρά ορισμένες πρωτεΐνες, εμποδίζοντας έτσι την επιδιόρθωση και κατά συνέπεια την σωστή λειτουργία του ως παράγοντας μεταγραφής. Τα κύτταρα υφίστανται μια διαδικασία που ονομάζεται απόπτωση (προγραμματισμένος θάνατος) και τελικά πεθαίνουν [58].



**Σχήμα 5: Προτεινόμενες θέσεις σύνδεσης του Pt(II) με το DNA**

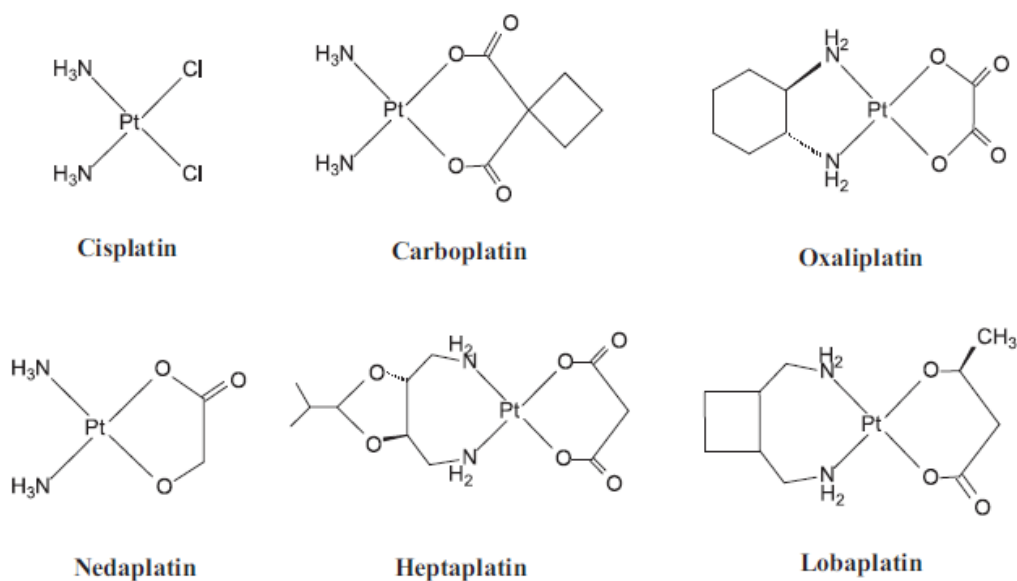
### 2.2.3 Νέας γενιάς αντικαρκινικά φάρμακα του λευκοχρύσου<sup>1</sup>

Η σισπλατίνη (1978 Ηνωμένες Πολιτείες, Platinol<sup>®</sup>, Plitine<sup>®</sup>, Platiblastin<sup>®</sup>, Abilatin<sup>®</sup>), αν και έχει αποδειχθεί από τα πιο αποτελεσματικά αντικαρκινικά φάρμακα, τα μειονεκτήματά της είναι αρκετά σημαντικά. Έχει διαπιστωθεί ότι η παρατεταμένη χορήγηση της καθιστά τα καρκινικά κύτταρα ανθεκτικά αφού αναπτύσσουν μηχανισμούς αντίστασης με αποτέλεσμα να μειώνεται η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου [59]. Επιπροσθέτως, δεν θεωρείται ευρέως φάσματος αντικαρκινικό φάρμακο και οι παρενέργειες από την λήψη του είναι πολλές και δυσάρεστες για τους καρκινοπαθείς (νεφροτοξικότητα, νευροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, κ.α) [60]. Για τους ανωτέρω λόγους αναπτύχθηκαν νέας γενιάς αντικαρκινικά φάρμακα του λευκοχρύσου [61, 62]. Στα 50 χρόνια μετά την πρώτη κλινική χρήση της σισπλατίνης, άλλα 23 σύμπλοκα του λευκοχρύσου εισήχθησαν σε κλινικές δοκιμές. Πέντε από αυτά έχουν εγκριθεί και χρησιμοποιούνται κλινικά, δύο παγκοσμίως και τρία σε μεμονωμένες χώρες, για δεκατέσσερα έχουν σταματήσει οι κλινικές δοκιμές, ενώ επί του παρόντος, για τέσσερα από αυτά συνεχίζονται οι κλινικές δοκιμές.

Τα αντικαρκινικά σύμπλοκα του λευκοχρύσου που χρησιμοποιούνται κλινικά (εκτός της σισπλατίνης) είναι τα: Carboplatin (1989, Paraplatin<sup>®</sup>, Carbomedac<sup>®</sup>), Oxaliplatin (1996, Eloxatin<sup>®</sup>, Dacotin<sup>®</sup>, Dacplat<sup>®</sup>, Elplat<sup>®</sup>), nedaplatin (1995, Aqupla<sup>®</sup>), Heptaplatine (1999, Sunpla) και Lobaplatin (2003). Τα σκευάσματα Carboplatine και Oxaliplatin χρησιμοποιούνται κλινικά σε όλες τις χώρες του κόσμου, το Nedaplatin στην Ιαπωνία, το Heptaplatine στην Κορέα και το Lobaplatin στην Κίνα [62-66] (Εικόνα 10). Πρόκειται για ιδιαίτερα αποτελεσματικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα και στα βασικά πλεονεκτήματά τους είναι οι λιγότερες παρενέργειες όπως επίσης και η μεγάλη δραστηριότητα που εμφανίζουν έναντι καρκινικών κυττάρων ανθεκτικών στη σισπλατίνη.

---

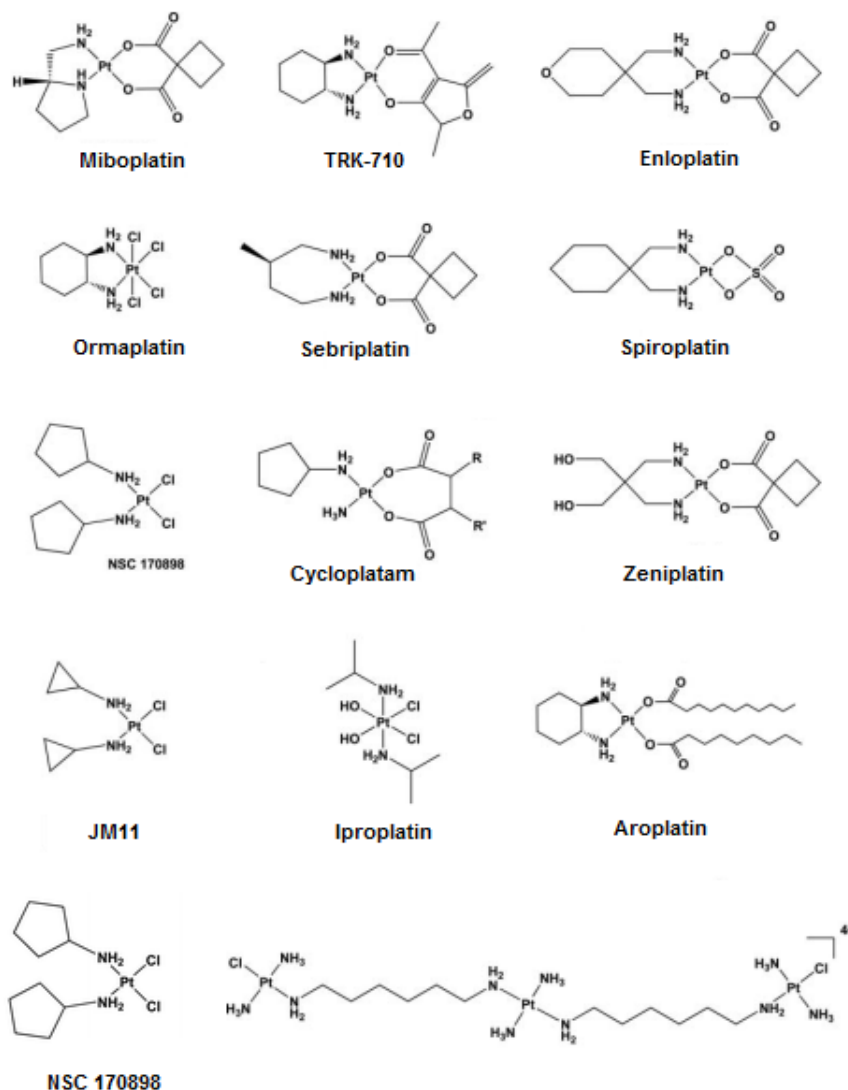
<sup>1</sup> Στην παρένθεση αναφέρεται η χρονολογία που επετράπη η κλινική χρήση και οι εμπορικές τους ονομασίες (brand names<sup>®</sup>).



**Εικόνα 10: Νέας γενιάς αντικαρκινικά φάρμακα του λευκοχρύσου**

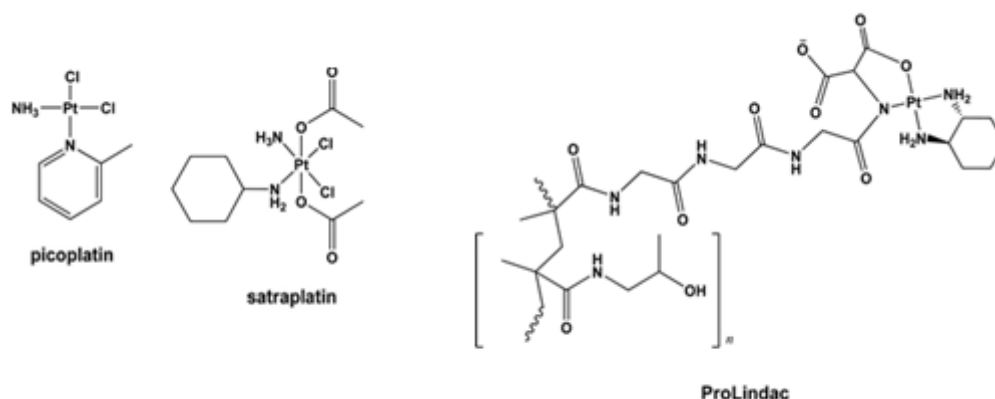
Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, 14 σύμπλοκα του λευκοχρύσου, παρόλο που εισήλθαν σε φάση κλινικών δοκιμών, η περαιτέρω ανάπτυξή τους δεν συνεχίστηκε διότι εμφάνισαν σοβαρές ή/και μη προβλέψιμες παρενέργειες κατά τη φάση I ή διότι εμφάνισαν χαμηλή δραστηκότητα κατά τις φάσεις II ή III, ή για οικονομικούς λόγους [15, 65]. Στην Εικόνα 11 που ακολουθεί παρουσιάζονται 13 από αυτά. Το δεκατοτέταρτο είναι το SPI-077 και πρόκειται για ένα στερεοχημικά σταθεροποιημένο λιπόσωμα που περιέχει σισπλατίνη [67].





**Εικόνα 11: Αντικαρκινικά φάρμακα του λευκοχρύσου για τα οποία δεν συνεχίστηκε η περαιτέρω ανάπτυξή τους (Cycloplatom: όταν  $R = OH$  τότε  $R' = H$  και όταν  $R = H$  τότε  $R' = OH$ )**

Σήμερα, τέσσερις ενώσεις του λευκοχρύσου βρίσκονται σε φάσεις κλινικών δοκιμών. Δύο από αυτές, το Satraplatin και το Picoplatinm βρίσκονται κοντά στο να εγκριθούν και να αρχίσουν να χρησιμοποιούνται κλινικά. Διερευνώνται, επίσης και άλλα δύο σκευάσματα (ProLindac™ και Liproplatin™) που αποτελούν τα πρώτα σύμπλοκα του λευκοχρύσου με πολυμερή ή εγκολπωμένα σε λιποσώματα.



**Εικόνα 12: Αντικαρκινικά φάρμακα του λευκοχρύσου που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές (δεν παριστάνεται το Lipoplatin™)**

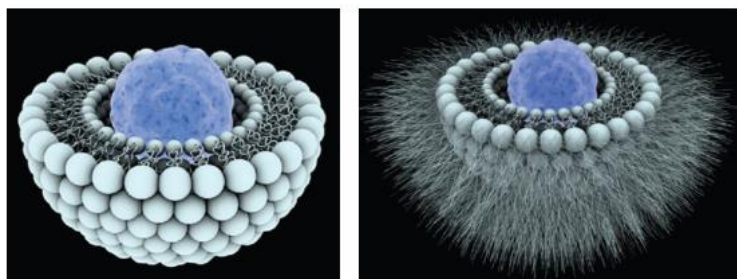
Το οκταεδρικό σύμπλοκο του Pt(IV), δις(ακετατο-Ο)αμμινο(κυκλοεξυλαμινη)-διχλωρολευκόχρυσος(IV) (Satraplatin), είναι πόσιμο φάρμακο που έχει αντικαρκινική δραστηριότητα έναντι ευαίσθητων και ανθεκτικών σε φάρμακα του λευκοχρύσου, κυτταρικών καρκινικών σειρών, όπως καρκίνου του πνεύμονα, των ωοθηκών, του εγκεφάλου και του προστάτη [68].

Το cis-αμμινο(2-μεθυλπυριδίνη)διχλωρολευκόχρυσος(II) (Picoplatin), αρχικά σχεδιάστηκε για να αντιμετωπιστεί η αντίσταση, μέσω της γλουταθειόνης, των καρκινικών κυττάρων έναντι των φαρμάκων λευκοχρύσου [69]. Ο πυριδινικός δακτύλιος είναι σχεδόν κάθετος στο επίπεδο του λευκοχρύσου με αποτέλεσμα η μεθυλομάδα να βρίσκεται ακριβώς πάνω από το μέταλλο (Εικόνα 12). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να λαμβάνουν χώρα στερεοχημικές παρεμποδίσεις που δεν επιτρέπουν την πυρηνόφιλη προσβολή του φαρμάκου [70].

Το ProLindac™, είναι ένα νανοπολυμερές, στο οποίο η δραστική ομάδα της Oxaliplatin ([Pt(R,R-dach)], συνδέεται με ένα υδρόφιλο βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές, το υδροξυλοπροπυλομεθακρυλαμίδιο (HPMA). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται στόχευση των καρκινικών όγκων, μέσω της αυξημένης διαπερατότητας και μεγαλύτερη κατακράτηση του φαρμάκου, ενώ είναι

δραστικό έναντι ανθεκτικών, σε φάρμακα του λευκοχρύσου, κυτταρικών καρκινικών σειρών [65].

Το Liporlatin™, είναι ένας λιποσωματικός σχηματισμός που εμπεριέχει σισπλατίνη και αναπτύχθηκε από την Regulon A.E. Σε σχέση με τη σισπλατίνη εμφανίζει μεγαλύτερη κυτταρική πρόσληψη και συγχρόνως λιγότερες παρενέργειες. Είναι δραστικό έναντι του φυλλώδους καρκίνου του εγκεφάλου και του λαιμού καθώς και στον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [71, 72]. Στο Liporlatin η σισπλατίνη επικαλύπτεται από τις λιπιδικές στοιβάδες και το νανοσωματίδιο, μετά από ενδοφλέβιο έκχυση στους ασθενείς με καρκίνο, λόγω της επικάλυψής του με την πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) δεν ανιχνεύεται από τα μακροφάγα και από το ανοσοποιητικό σύστημα (Εικόνα 13) [73].



**Εικόνα 13: Σχηματική περιγραφή ενός νανοσωματιδίου Liporlatin. Τα μόρια της σισπλατίνης παρουσιάζονται ως γαλάζια σφαίρα, που περιβάλλεται από την αντίστροφη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων [73]**

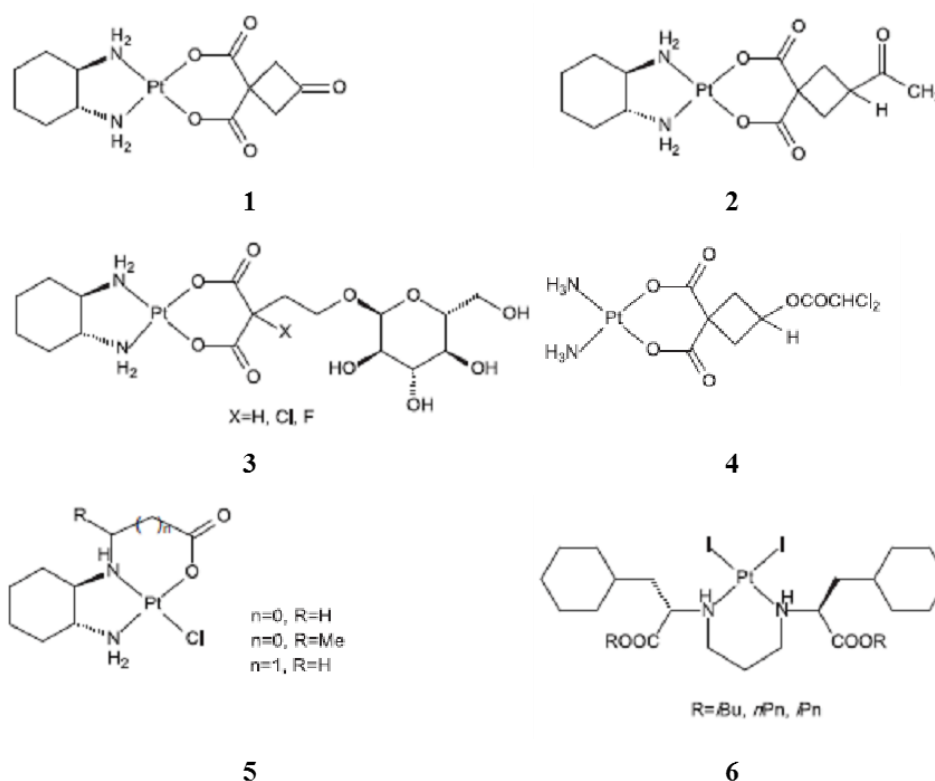
#### **2.2.4 Νέες προσεγγίσεις στο σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων λευκοχρύσου**

Οι γνώσεις που συσσωρεύθηκαν από την εντατική προσπάθεια διασαφήνισης του μηχανισμού δράσεως της σισπλατίνης και των φαρμάκων της ίδιας οικογενείας, οδήγησαν στη διατύπωση συγκεκριμένων γενικών αρχών που συνδέουν τη δομή με τη δραστηριότητα. Γενικότερα, οι κοινές χαρακτηριστικές ιδιότητες των συμπλόκων του λευκοχρύσου που εμφανίζουν αντικαρκινική δράση συνοψίζονται ως εξής [74, 75]:

Πρόκειται για σύμπλοκα ουδέτερα (με ικανοποιητική διαλυτότητα στο νερό), με γενικό τύπο  $[PtX_2A_n]$ , με τις δύο αποχωρούσες ομάδες (X) σε cis-θέση και οι άλλες δύο θέσεις της επίπεδης τετραγωνικής δομής να καταλαμβάνονται από άτομα αζώτου που προέρχονται από δύο μονοσχιδείς υποκαταστάτες (A,  $n=2$ ) ή έναν δισχιδή χηλικό υποκαταστάτη (A,  $n=1$ ) και μάλιστα να υπάρχει τουλάχιστον ένα άτομο υδρογόνου πάνω σε κάθε άτομο αζώτου (π.χ. αμμωνία, πρωτοταγείς ή δευτεροταγείς αμίνες). Το γεγονός ότι τα ιόντα Pt(II) συμπεριφέρονται ως "μαλακά οξέα", έχει ως αποτέλεσμα οι δεσμοί Pt-N να είναι θερμοδυναμικά σταθεροί και να μην διασπώνται, ακόμα και μετά από ομοιοπολική σύνδεση του μετάλλου με το ή τα άτομα αζώτου των βάσεων (N7 της γουανίνης) του DNA. Επιπλέον, το προϊόν της αλληλεπίδρασης με το DNA είναι κινητικά αδρανές, λόγω του ασθενούς φαινομένου trans του ατόμου αζώτου των αμινών ή των ετεροκυκλικών ενώσεων [76]. Οι αποχωρούσες ομάδες (X) δεν πρέπει να συνδέονται ισχυρά με τον λευκόχρυσο, διότι δεν απομακρύνονται εύκολα και καθιστούν το σύμπλοκο ανενεργό (π.χ. υποκαταστάτες με άτομα δότες θείου), αλλά όχι και πολύ ασθενώς διότι αποχωρούν εύκολα και καθιστούν το σύμπλοκο πολύ ενεργό (π.χ.  $H_2O$ ,  $SO_4^{2-}$ ). Οι αποχωρούσες ομάδες είναι συνήθως ιόντα  $Cl^-$ , καρβοξυλομάδες, κ.α.

Σήμερα, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται στο σχεδιασμό νέων αντικαρκινικών μορίων με βάση το λευκόχρυσο, ικανών να αντιμετωπίσουν τα προβλήματα που προκύπτουν από την κλινική χρήση των μέχρι τώρα φαρμάκων, δίχως να υστερούν ως προς την δραστικότητα [77-79]. Προς αυτή την κατεύθυνση, σημαντική είναι η συμβολή των γνώσεων τόσο της βασικής χημείας, όσο και αυτών που αποκτήθηκαν από τη διερεύνηση της δράσης και της δραστικότητας των ενώσεων του λευκοχρύσου σε μοριακό επίπεδο. Η τοξικότητα της σισπλατίνης είναι αποτέλεσμα της μεγάλης προτίμησης του Pt(II) για άτομα δότες S ή Se, που συναντώνται σε πολλές πρωτεΐνες του πλάσματος αλλά και στο περιβάλλον των κυττάρων (φυσιολογικών ή καρκινικών). Πράγματι, μόνο το 1% της σισπλατίνης που εισάγεται ενδοφλεβίως στους ασθενείς φθάνει στο μόριο στόχο που είναι το DNA. Το υπόλοιπο αντιδρά με διάφορες πρωτεΐνες και ένζυμα, παρεμποδίζοντας ή αναστέλλοντας τις λειτουργίες του με αποτέλεσμα να εμφανίζονται οι σοβαρές παρενέργειες που προαναφέρθηκαν.

Η χρήση δικαρβοξυλικών οξέων, ως εναλλακτικοί υποκαταστάτες για τα ιόντα Cl<sup>-</sup>, βελτίωσε την διαλυτότητα και/ή τη λιποφιλία σε σχέση με τη σισπλατίνη. Επιπλέον, ο σχηματισμός του χηλικού δακτυλίου κατέστησε τα σύμπλοκα σταθερότερα, μειώνοντας έτσι τις παρενέργειες (αφού τα δικαρβοξυλικά οξέα είναι O,O-δισχιδεΐς υποκαταστάτες), ενώ η φύση της αποχωρούσας ομάδας διαφοροποιεί την δραστικότητα έναντι διαφόρων καρκινικών σειρών [66]. Στην Εικόνα 14 που ακολουθεί δίδονται παραδείγματα συμπλόκων του Pt(II) με διάφορους δικαρβοξυλικούς υποκαταστάτες, ως αποχωρούσες ομάδες.



**Εικόνα 14: Σύμπλοκα του Pt(II) με δικαρβοξυλικούς υποκαταστάτες**

Τα ανωτέρω σύμπλοκα επιλέχθηκαν έτσι ώστε να αναδειχθούν τα πλεονεκτήματα του σχεδιασμού της αποχωρούσας ομάδας. Συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα (1) και (2) είναι αντιπροσωπευτικά μίας σειράς συμπλόκων, αντίστοιχων με το Oxaliplatin, στα οποία τα οξαλικά ανιόντα αντικαταστάθηκαν από παράγωγα του 1,1-κυκλοβουτανο-δικαρβοξυλικού οξέος, με σκοπό να

διατηρήσουν την ενεργότητα του Oxaliplatin και συγχρόνως να αποφύγουν τη νευροτοξικότητα των οξαλικών ανιόντων [80]. Οι χημικές και βιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η δραστικότητα και η χαμηλή τοξικότητα είναι αποτέλεσμα της αυξημένης διαλυτότητας στο νερό αλλά και της σταθερότητας του χηλικού δακτυλίου [81].

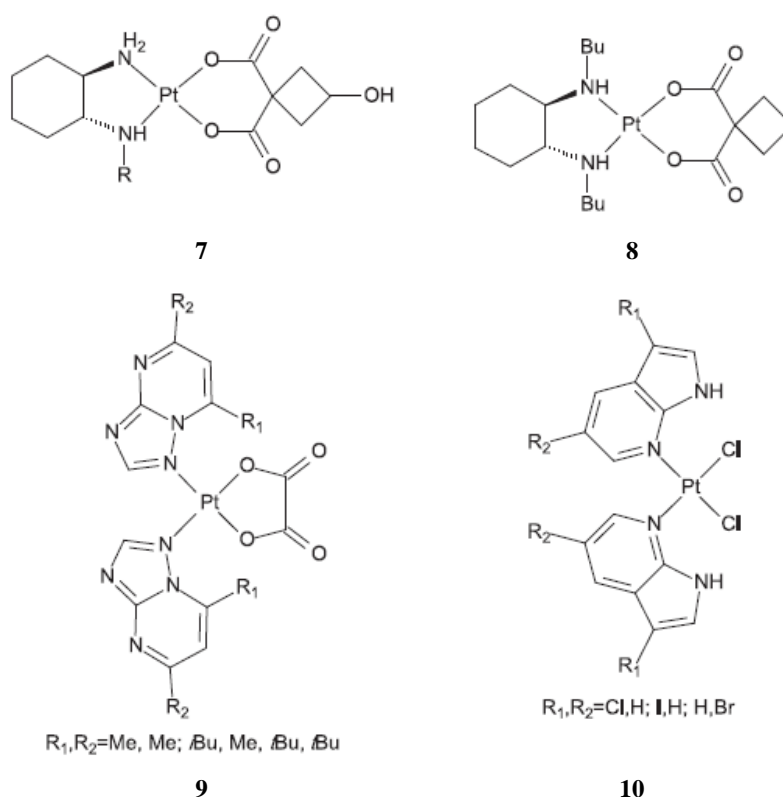
Με στόχο την αύξηση της διαλυτότητας στο νερό και της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών, συντετέθησαν και σύμπλοκα στα οποία έχει συνδεθεί γλυκόζη στην αποχωρούσα ομάδα. Τα σύμπλοκα (3) που φέρουν ως αποχωρούσα ομάδα ένα γλυκοζυλιωμένο μαλονικό διανιόν μεταφέρονται στα καρκινικά κύτταρα μέσω των ενεργών μεταφορέων γλυκόζης. Σε σχέση με το Oxaliplatin είναι 150 φορές πιο διαλυτό, 10 φορές πιο τοξικό και αυξάνει κατά 30 φορές τον θεραπευτικό δείκτη [82]. Το γεγονός ότι η αποχωρούσα ομάδα, μετά από υδρόλυση, απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, οδήγησε στο σχεδιασμό αντικαρκινικών συμπλόκων του Pt(II), στα οποία η αποχωρούσα ομάδα περιέχει ή είναι ένα βιοδραστικό μόριο. Με αυτόν τον τρόπο τα σύμπλοκα αλληλεπιδρούν με το DNA, μέσω του Pt(II) και συγχρόνως επάγουν και μηχανισμούς απόπτωσης, μέσω της βιοδραστικής αποχωρούσας ομάδας.

Τα σύμπλοκα (4) (αποχωρούσα ομάδα: 3-διχλωροακετοξυκυκλοβουτανο-1,1-δικαρβοξυλικό διανιόν), κατόπιν υδρόλυσης του εστερικού δεσμού, παράγουν ένα διχλωροοξικό παράγωγο που έχει την ιδιότητα να επάγει απόπτωση [83]. Το σύμπλοκο αυτό είναι υδατοδιαλυτό, εμφανίζει μεγάλη αντικαρκινική δραστικότητα, ενώ καταφέρνει να αντιμετωπίσει την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων έναντι της σισπλατίνης. Το σύμπλοκο (5) έχει ως αποχωρούσες ομάδες ανιόντα χλωρίου και καρβοξυλικά ανιόντα. Τα ανιόντα χλωρίου αποχωρούν γρήγορα, ενώ ο πενταμελής ή εξαμελής χηλικός δακτύλιος που σχηματίζεται από την συναρμογή με N, O άτομα δότες, ανοίγει αργά με διάσπαση των δεσμών Pt-O. Όλα εμφανίζουν τοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων, συγκρίσιμη με αυτή της σισπλατίνης και του Oxaliplatin [84].

Αντικαρκινικές σύμπλοκα με ανιόντα ιωδίου ως αποχωρούσες ομάδες είναι σπάνια λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητας και της μικρότερης ενεργότητας

του δεσμού Pt-I σε σχέση με τον Pt-Cl [85, 86]. Παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι το σύμπλοκο με ισοβουτυλ-, n-πεντυλ- και ισοπεντυλεστέρες του (S,S)-1,3-προπανεδιαμινο-N,N-[2-(3-κυκλοεξυλ)προπανοϊκού οξέος (6) [86, 87].

Οι παρεμβάσεις που αποσκοπούν στη βελτίωση των ιδιοτήτων των αντικαρκινικών φαρμάκων του λευκοχρύσου, δεν αφορούν μόνο τις αποχωρούσες ομάδες αλλά και τον ή τους υποκαταστάτες που είναι συνδεδεμένοι με το μεταλλικό κέντρο. Έχουν συντεθεί και μελετηθεί ως πιθανά αντικαρκινικά φάρμακα πολλά σύμπλοκα του Pt(II) με υποκαταστάτες παράγωγα του 1,2-διαμινοκυκλοεξανίου, γεγονός που έχει επίδραση στην ισορροπία μεταξύ λιποφιλίας και υδροφιλίας του συμπλόκου αλλά και στο τρόπο αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA. Στην Εικόνα 15 που ακολουθεί δίδονται παραδείγματα συμπλόκων του Pt(II) με διαμινο υποκαταστάτες.



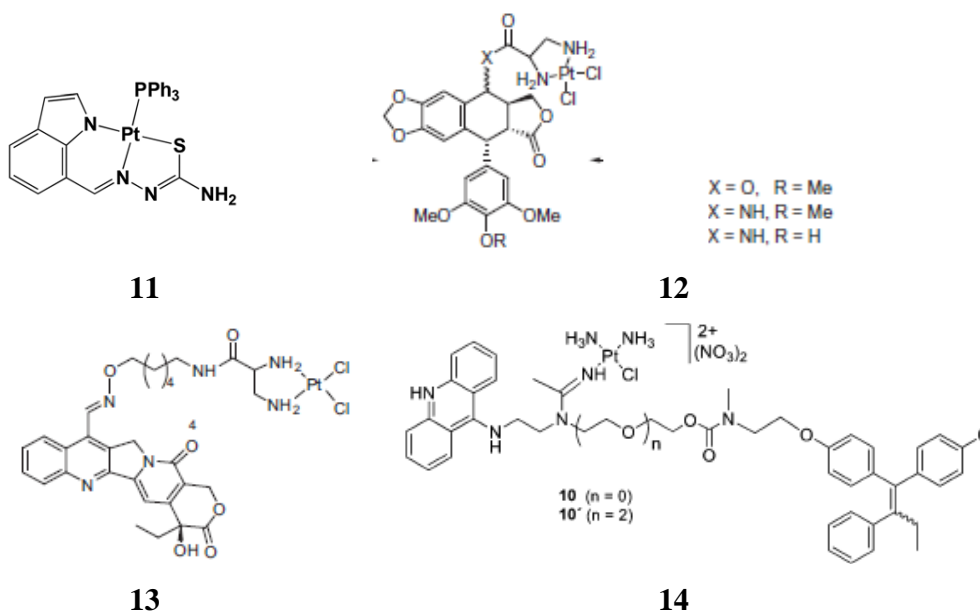
Εικόνα 15: Σύμπλοκα του Pt(II) με διαμινο υποκαταστάτες

Το σύμπλοκο (7) είναι ένα N-μονοαλκυλο παράγωγο του 1,2-διαμινοκυκλοεξανίου, με αποχωρούσα ομάδα το 3-υδροξυκυκλοβουτανο-1,1-δικαρβοξυλικό ιόν, το οποίο όταν R: sec-βουτύλιο, εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη τοξικότητα έναντι των MCF-7 και A549 καρκινικών σειρών, σε σχέση με τα Carboplatin και Oxaliplatin [88]. Το σύμπλοκο (8) είναι ένα N-διακυκλο παράγωγο του Oxaliplatin, που είναι πιο δραστικό από τη μητρική ένωση και λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, έχει διαφορετικό μηχανισμό δράσεως από τη σισπλατίνη [89].

Η αντικατάσταση των αλειφατικών διαμινο-υποκαταστατών με αρωματικές ετεροκυκλικές αμίνες, οδήγησε στη σύνθεση συμπλόκων με βελτιωμένες ιδιότητες. Τα σύμπλοκα (9) και (10) εμφανίζουν αυξημένη δραστικότητα έναντι ανθεκτικών στη σισπλατίνη κυτταρικών σειρών (Εικόνα 16) [90, 91]. Ο σχεδιασμός συμπλόκων με ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες και μια αμίνη, συντελεί στην εμφάνιση βέλτιστου φαινομένου trans και η εισαγωγή μιας αλειφατικής αλυσίδας στην ιμιδαζολο-ομάδα βελτιώνει τη λιποφιλία.

Η αλληλεπίδραση των μεταλλικών κέντρων του Pt(II), με παράγοντες που ήδη εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες (π.χ. θειοσεμικαρβαζόνες, αντικαρκινικά αντιβιοτικά, κ.α) έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκων με αντικαρκινικές ιδιότητες (Εικόνα 16). Οι θειοσεμικαρβαζόνες (TSCs), είναι μια κατηγορία ενώσεων με ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων [92-94]. Διάφορα παράγωγα των θειοσεμικαρβαζονών έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποκαταστάτες για σύμπλοκα του Pt(II), που εμφάνισαν υψηλή τοξικότητα, χαμηλή νεφροτοξικότητα έναντι ευαίσθητων και ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 7) [95]. Το σύμπλοκο (11) εμφάνισε αξιοσημείωτη αντικαρκινική δραστικότητα έναντι των καρκινικών σειρών, MDA-MB-231, MCF-7, HT-29, και HCT-116 αλλά όχι έναντι της φυσιολογικής WRL-68 κυτταρικής σειράς [96]. Τα σύμπλοκα (12), (13) και (14) περιέχουν τις αντικαρκινικές ενώσεις rodophyllotoxin, camptothecin και acridine–endoxifen αντίστοιχα και επιδεικνύουν αυξημένη αντικαρκινική δράση σε σχέση με τη σισπλατίνη ή των υποκαταστατών μόνων τους [97-100].

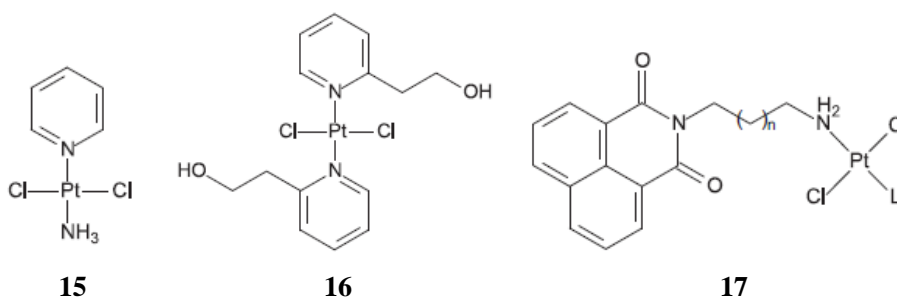




**Εικόνα 16: Σύμπλοκα του Pt(II) με αντικαρκινικούς παράγοντες**

Σύμπλοκα του Pt(II) με υποκαταστάτες που μπορούν να δράσουν ως παρεμβολείς του DNA αποτελούν μια κατηγορία με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Πληθώρα συμπλόκων του Pt(II) με υποκαταστάτες πυριδίνες, διπυριδίνες, τριπυριδίνες, φαινανθρολίνες, ναφθαλένια, ανθρακινόνες και παράγωγά αυτών, έχουν συντεθεί και μελετηθεί με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης και του τρόπου σύνδεσης με το DNA [63, 101-103].

Όπως αναφέρθηκε, το *trans* ισομερές της σισπλατίνης δεν εμφάνισε αντικαρκινικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να θεωρηθεί ότι όλα τα *trans* σύμπλοκα είναι ανενεργά ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Σήμερα, είναι γνωστά πολλά *trans* σύμπλοκα που επιδεικνύουν ικανοποιητική αντικαρκινική δραστηριότητα της τάξεως των μΜ [104-106]. Στην Εικόνα 17 παρουσιάζονται παραδείγματα *trans* συμπλόκων του Pt(II) με αντικαρκινική δράση.



**Εικόνας 17: Trans-σύμπλοκα του Pt(II) με αντικαρκινική δράση**

Τα οκταεδρικά σύμπλοκα του Pt(IV) θεωρούνται λιγότερο τοξικά από τα αντίστοιχα του Pt(II), ενώ οι διαφορετικές υποκαταστάσεις σε αξονικές και ισημερινές θέσεις δίνουν την δυνατότητα σχεδιασμού ενός μεγάλου αριθμού παραγώγων με πιθανή αντικαρκινική δράση. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής, η κινητική σταθερότητα, η υδροφιλικότητα/λιποφιλικότητα των συμπλόκων του Pt(IV) μπορεί να ρυθμιστεί μεταβάλλοντας το είδος των υποκαταστατών. Προτάθηκε ότι τα σύμπλοκα του Pt(IV) λειτουργούν ως πρόδρομα φάρμακα, τα οποία μετατρέπονται στα αντίστοιχα του Pt(II) αναγωγής [107A, B].

Η έλλειψη της εκλεκτικής στόχευσης συγκεκριμένων καρκινικών όγκων που επιδεικνύουν τα αντικαρκινικά φαρμάκα του λευκοχρύσου οδήγησε στην ανάπτυξη ειδικών μεταφορέων, οι οποίοι θα μεταφέρουν τα μόρια-φάρμακα του λευκοχρύσου σε καθορισμένα σημεία. Έχοντας αυτό ως στόχο, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μια πληθώρα προσεγγίσεων σχεδιασμού στόχευσης και μεταφοράς φαρμάκων (DTD - Drug Targeting and Delivery), οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε ενεργές και παθητικές στρατηγικές [78]. Στους ενεργούς μεταφορείς φαρμάκων του λευκοχρύσου συγκαταλέγονται τα οιστρογόνα, οι ολιγοσακχαρίτες, οι πολυσακχαρίτες, πεπτίδια και πρωτεΐνες. Αυτού του είδους οι μεταφορείς συνεισφέρουν στην εκλεκτικότητα των φαρμάκων του λευκοχρύσου όσο αφορά την ειδική στόχευση συγκεκριμένων όγκων, ανάλογα με τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Οι παθητικοί μεταφορείς των φαρμάκων του λευκοχρύσου είναι συνήθως λιποσώματα, νανοσωματίδια

και μακρομοριακά φάρμακα, τέτοιου μεγέθους που έχουν την ικανότητα να συσσωρεύονται σε καρκινικούς όγκους, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αυξημένη διαπερατότητα και κατακράτηση (Enhanced permeability and retention effect - EPR).

### 2.3 Παλλάδιο

Το παλλάδιο (Pd) ανήκει στην 5<sup>η</sup> περίοδο, στην 10<sup>η</sup> ομάδα και στο d-τομέα του περιοδικού πίνακα [108, 109]. Ανακαλύφθηκε και απομονώθηκε το 1803 από τον Άγγλο χημικό W. H. Wollaston στο Λονδίνο κατά τη διάρκεια καταβύθισης του  $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_6$  σε "βασιλικό ύδωρ" και πήρε το όνομα από τον αστεροειδή "Παλλάς" που είχε ανακαλυφθεί δυο χρόνια νωρίτερα. Έχει ηλεκτρονική απεικόνιση  $[\text{Kr}] 4d^{10}$  και εμφανίζεται στις ενώσεις του κυρίως στην οξειδωτική κατάσταση  $+2(d^8)$ , σπανιότερα στη  $+4(d^6)$  ( $\text{PdF}_4$ ,  $\text{PdCl}_4$ ,  $\text{Pd(II)[Pd(IV)F}_6]$ ) και σπανίως στην οξειδωτική κατάσταση  $+3(d^7)$  [ $\text{Pd(1,4,7-trithiacyclononane)}_2](\text{ClO}_4)_4 \cdot \text{H}_3\text{O} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Σε υδατικά διαλύματα το ιόν  $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$  είναι διαμαγνητικό και τετραγωνικής γεωμετρίας ( $d^8$ ). Τα ιόντα Pd(II) δείχνουν μικρή συγγένεια στους  $\text{F}^-$  και  $\text{O}^-$  υποκαταστάτες, προτίμηση στα αλογόνα και στους π-υποκαταστάτες όπως  $\text{R}_3\text{P}$ ,  $\text{R}_2\text{S}$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , αλκένια και αλκίνια. Εξαιτίας του υψηλού φορτίου σχηματίζουν κατιονικά σύμπλοκα με υποκαταστάτες που δεν κάνουν π-σύνδεση και ανιονικά σύμπλοκα με αλογόνα.

Στην κατάσταση οξειδώσεως  $+2$  το παλλάδιο συμπεριφέρεται ως "μαλακό" οξύ και προτιμά υποκαταστάτες N-δότες. Τα σύμπλοκα του Pd(II) είναι ασταθέστερα τόσο κινητικά όσο και θερμοδυναμικά από τα αντίστοιχα του Pt(II) με αποτέλεσμα οι αντιδράσεις αντικατάστασης να είναι πολύ πιο γρήγορες ( $10^4$  -  $10^5$  φορές ταχύτερες) και έτσι να αδρανοποιούνται πριν προλάβουν να αντιδράσουν με το DNA [110, 111]. Ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα της χημείας του Pd(II) είναι ότι προτιμά τα trans ισομερή και ορισμένες cis ενώσεις μετατρέπονται αυθόρμητα σε trans, γεγονός που δεν ευνοεί σταθερή σύνδεση με το DNA.

Τα τελευταία χρόνια αρκετές είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές για σύμπλοκα του Pd(II) που εμφανίζουν αξιόλογη αντικαρκινική δράση, συγκρίσιμη κατά περιπτώσεις με αυτή της σισπλατίνης [112, 113]. Η παρόμοια χημεία που παρουσιάζει το παλλαδίο με το λευκόχρυσο και το γεγονός ότι εμφανίζει καλύτερη διαλυτότητα έχει οδηγήσει στην περαιτέρω μελέτη αυτού του μετάλλου ως πιθανός αντικαρκινικός παράγοντας. Η σύμπλεξη του παλλαδίου με οργανικές ενώσεις (θειοσεμικαρβαζόνες, φαινυλοφωσφίνες, φαινανθρολίνη, πυριδίνες κ.α) έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία συμπλόκων που εμφανίζουν υψηλή αντικαρκινική δραστηριότητα έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου αποφεύγοντας έτσι τις αρνητικές επιπτώσεις της τοξικότητας των συμπλόκων του λευκοχρύσου [114-120].

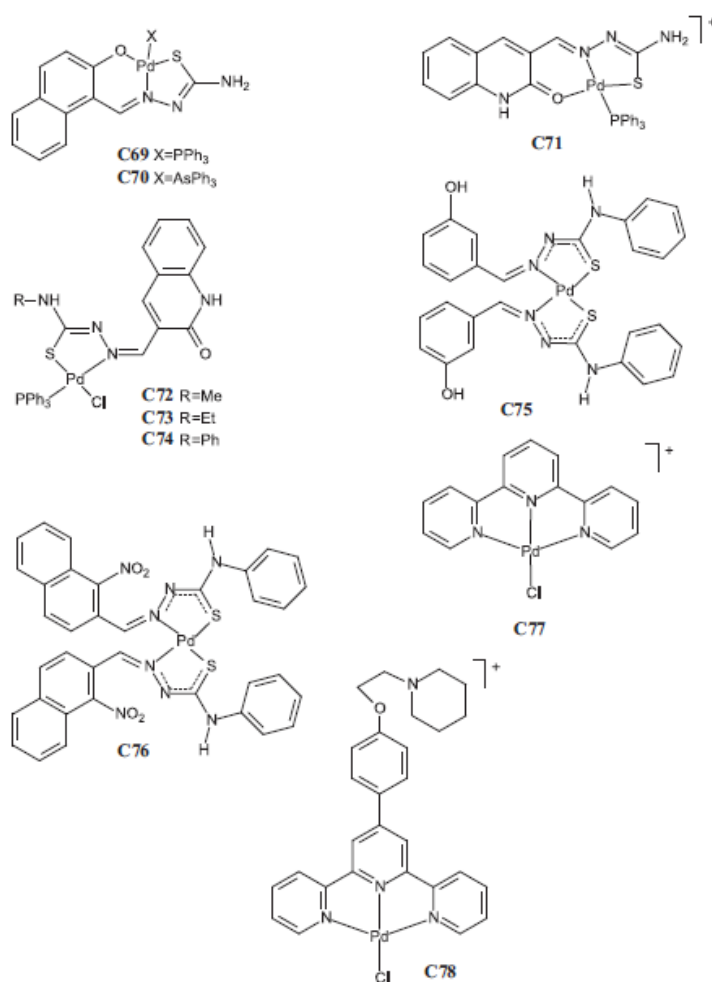
Για πολλά χρόνια τα διθειοκαρβαμιδικά παράγωγα μελετώνται εις βάθος όσο αφορά τη δυνατότητα αναστολής της επαγόμενης από τη σισπλατίνη νεφροτοξικότητας, η οποία δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση του μετάλλου με τις θειούχες νεφρικές πρωτεΐνες. Επιπροσθέτως σύμπλοκα του Pd(II) με αμινοθειοκαρβαμιδικούς υποκαταστάτες έδειξαν συγκρίσιμη με τη σισπλατίνη κυτταροτοξική δράση [121].

Η σύμπλεξη του παλλαδίου με θειοσεμικαρβαζόνες χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της αποδεδειγμένης φαρμακολογικής τους δράσης. Οι μελέτες αλληλεπίδρασης με CT-DNA έδειξαν ότι αυτού του είδους τα σύμπλοκα (**C69-C76**, Εικόνα 18) αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής, ενώ εμφάνισαν υψηλή τοξικότητα σε καρκινικές σειρές του πνεύμονα (A549) και του ήπατος (HepG2), η οποία είναι κατά περιπτώσεις συγκρίσιμη ή καλύτερη της σισπλατίνης [121].

Η σύμπλεξη του παλλαδίου με σακχαρινικά ανιόντα σε συνδυασμό με N-ετεροκυκλικές ενώσεις, όπως πυριδίνες και τριπυριδίνες έχει επίσης μελετηθεί όσο αφορά την αλληλεπίδραση τους με το μόριο του DNA αλλά και για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Το σύμπλοκο **C77** αλληλεπιδρά με το DNA μέσω συνδυασμού ομοιοπολικής σύνδεσης και παρεμβολής του μετάλλου και παρεμβολής του επίπεδου τριπυριδινικού δακτυλίου μεταξύ των ζευγών των αζωτούχων βάσεων. Τα αποτελέσματα της *in vitro* αξιολόγησης έδειξαν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης μέσω μηχανισμών απόπτωσης,

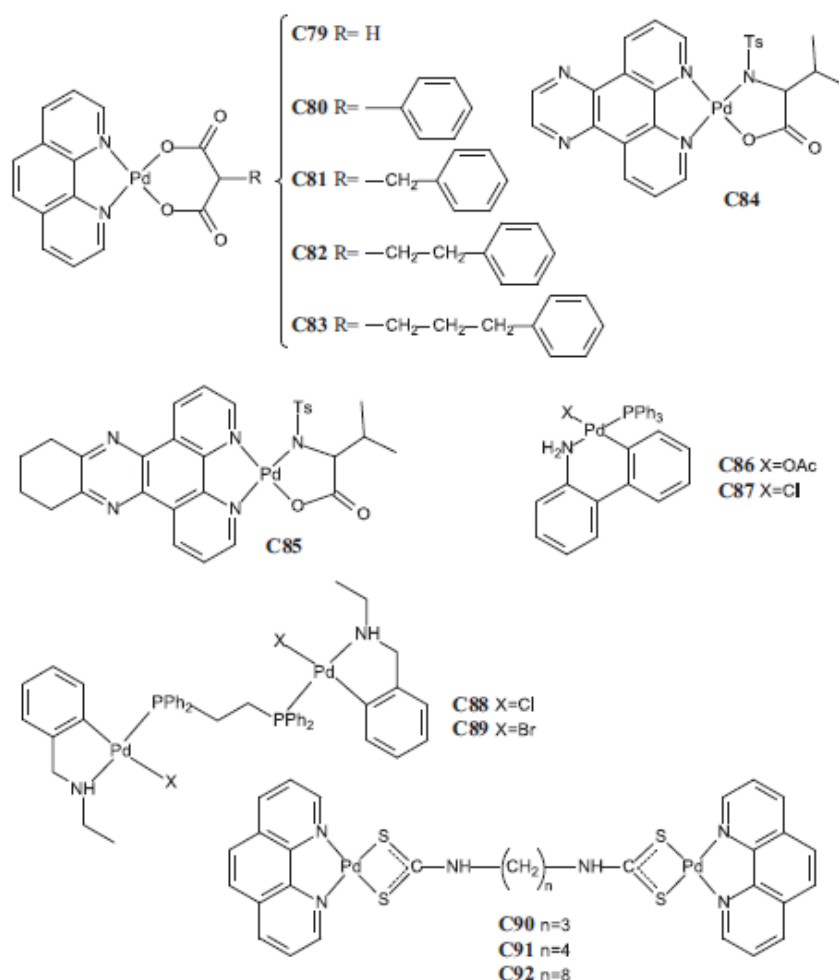
νέκρωσης και διάσπασης του DNA. Επιπροσθέτως, εμφάνισαν εκλεκτική κυτταροτοξική δράση στη καρκινική σειρά μαστού MCF-7, έναντι της MDA-MB-231, η οποία επάγεται μέσω αναστολής των ενζυματικών μονοπατιών των κασπασών [121].

Η χρήση της 1,10-φαινανθρολίνης (**C79-C83**) ως συμπλεκτικός παράγοντας με το παλλάδιο, ανέδειξε το ευρύ φάσμα της βιολογικής δράσης των ανωτέρω παραγώγων. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν την δυνατότητα να παρεμβάλλονται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA, με τρόπο άμεσα εξαρτώμενο από το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας, ενώ εμφάνισαν υψηλή κυτταροτοξική δραστηριότητα στις καρκινικές σειρές HeLa και KB.



**Εικόνα 18:** Ενδεικτικά παραδείγματα συμπλόκων του παλλάδιου με αντικαρκινική δράση

Η μελέτη των πολυπυρηνικών συμπλόκων του Pd(II) έχει αναδείξει την σημαντική *in vivo* και η *in vitro* δράση τους (Εικόνα 19). Τα διπυρηνικά σύμπλοκα του παλλαδίου (**C88-C89**) αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής, ενώ τα αποτελέσματα της *in vitro* τοξικότητας στις καρκινικές σειρές εντέρου (HT-29), μαστού (MCF-7) και λευχαιμίας (K562) έδειξαν ότι αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη, εμφανίζοντας, καλύτερες από τις αντίστοιχες της σισπλατίνης, τιμές IC<sub>50</sub> που κυμαίνονται μεταξύ των 2–9 μM, γεγονός που σχετίστηκε με την αυξημένη διαλυτότητα και λιποφιλικότητα των εν λόγω συμπλόκων [122].



**Εικόνα 19:** Ενδεικτικά παραδείγματα συμπλόκων του παλλαδίου με αντικαρκινική δράση

Τα διπυρηνικά σύμπλοκα του Pd(II) με πολυαμίνες εμφάνισαν υψηλή δραστικότητα και εκλεκτικότητα σε καρκινικές σειρές μαστού και ωοθηκών. Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης τους με το DNA είναι ακόμα υπό διερεύνηση, μολονότι έχει δειχθεί ότι επάγουν τοπική μετουσίωση της Β-μορφής της έλικας του DNA, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τον σχηματισμό ενδοκλωνικών και διακλωνικών σταυροδεσμών. Επίσης, τριπυρηνικά σύμπλοκα του Pd(II) με διάφορες τριαμίνες θεωρούνται ισχυρά αντινεοπλασματικά μόρια. Τα συγκεκριμένα σύμπλοκα είναι πιο δραστικά σε σχέση με τα αντίστοιχα του Pt(II) σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού [122].

## 2.4 Χαλκός

Ο χαλκός (Cu) ανήκει στην 4<sup>η</sup> περίοδο, στην 11<sup>η</sup> ομάδα και στον d-τομέα του περιοδικού πίνακα. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, θα πρέπει να ήταν γνωστό ως μέταλλο ήδη από το 5.000 π.Χ, διαπιστώθηκε όμως ότι από το 3.500 π.Χ άρχισε η παραλαβή του ως μέταλλο με την αναγωγή των ορυκτών του από άνθρακα. Η διεθνής ονομασία του, copper, προέρχεται από την λατινική Cuprum, το ρωμαϊκό όνομα της Κύπρου [108, 109, 123].

Ο χαλκός σχηματίζει ενώσεις στις οξειδωτικές καταστάσεις +1 έως και +4, αλλά μόνο η +2 είναι σταθερή. Η κατάσταση οξείδωσης +4 ( $d^0$ ) εμφανίζεται σε ορισμένα οξείδια ενώ η κατάσταση οξείδωσης +3 ( $d^8$ ) θεωρείται ασυνήθιστη, διότι ανάγεται εύκολα. Ο Cu(III) είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας με  $E_{Cu^{III}/Cu^{II}}^0 = 2.4V$ , ωστόσο στη κατάσταση αυτή παρουσιάζει ενδιαφέρον επειδή εμπλέκεται σε συγκεκριμένες βιολογικές διαδικασίες.

Στην κατάσταση οξείδωσης +1 ( $d^{10}$ ) ο χαλκός είναι διαμαγνητικός και αν δεν είναι συμπλεγμένος με υποκαταστάτες που πολώνονται εύκολα, είναι άχρωμος. Σε υδατικά διαλύματα ο Cu(I) είναι πολύ ασταθής και διασπάται ( $2 Cu^I \rightleftharpoons Cu^{II} + Cu^0$ ) λόγω της μεγάλης ενέργειας υδατώσεως του δισθενούς κατιόντος. Η σταθερά ισορροπίας έχει μεγάλη τιμή ( $K \approx 5,4 \cdot 10^5$ ), τα δε δυναμικά αναγωγής είναι  $E_{Cu^+/Cu^0}^0 = 0.52V$  και  $E_{Cu^{2+}/Cu^0}^0 = +0.34V$ . Παρ' όλα αυτά ο Cu(I) μπορεί να σταθεροποιηθεί είτε σε μικρής διαλυτότητας ενώσεις, είτε με σύμπλεξη με υποκαταστάτες που έχουν π-δεκτικό χαρακτήρα. Ο

συνηθέστερος αριθμός σύνταξης είναι 4 (αλλά είναι δυνατοί και χαμηλότεροι όπως 3 ή 2), ενώ η γεωμετρία είναι τετραεδρική.

Στην κατάσταση οξειδωσης +2 ( $d^9$ ) ο χαλκός είναι παραμαγνητικός και σχηματίζει σύμπλοκα τα οποία είναι έγχρωμα λόγω των d-d μεταπτώσεων. Στα σύμπλοκα με αριθμό συναρμογής 4, 5 και 6 κυριαρχούν οι παραμορφωμένες γεωμετρίες με ποικίλα μήκη και γωνίες δεσμών. Στα σύμπλοκα με αριθμό συναρμογής 6 επικρατεί επίπεδη τετραγωνικά παραμορφωμένη οκταεδρική διαμόρφωση, λόγω φαινομένου Jahn-Teller, παρότι θα αναμενόταν κανονική οκταεδρική γεωμετρία. Σε μερικές σπάνιες περιπτώσεις αυτό οδηγεί σε συμπίεση του οκταέδρου, στη λεγόμενη «2+4» σύμπλεξη, όπως άλλωστε αναμένεται από τη διάταξη  $(d_{z^2})^2, (d_{x^2-y^2})^1$ , με πιο ακραία την περίπτωση απώλειας δύο αξονικών υποκαταστατών οπότε και προκύπτει επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία.

Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο  $d_{x^2-y^2}$  τροχιακό παράγει το χαρακτηριστικό S = 1/2 σήμα στο EPR φάσμα με  $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,0023$ . Τα δύο φυσικά ισότοπα του χαλκού  $^{63}\text{Cu}$  και  $^{65}\text{Cu}$  (φυσική αφθονία 69 % και 31 % αντίστοιχα) έχουν πυρηνικό spin I = 3/2 το οποίο συζευγνύεται με το ηλεκτρονιακό spin με αποτέλεσμα την δημιουργία  $2I + 1 = 4$  ταινιών υπέρλεπτης σύζευξης. Η σταθερά  $A_{\parallel}$  έχει γενικά μεγάλη τιμή που κυμαίνεται σ' ένα εύρος  $150-250 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ , ενώ η σταθερά  $A_{\perp}$  είναι κατά πολύ μικρότερη ( $A_{\perp} < 35 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ) [124].

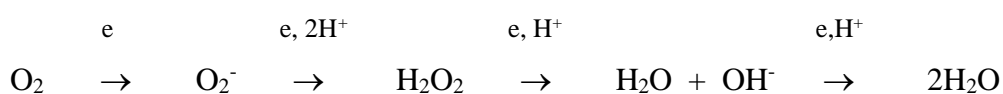
Το ιόν του Cu(II) θεωρείται οριακά "σκληρό" οξύ και είναι ιδιαίτερα σταθερό σε υδατικά διαλύματα. Στα σύμπλοκα του Cu(II) κυριαρχεί η συναρμογή μέσω σκληρών ατόμων-δοτών όπως O και N ενώ η πλειοψηφία των συμπλόκων του Cu(I) περιέχει υποκαταστάτες με P- και S- δότες [124]. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζουν οι μικτοί N-, O- δότες, όπως οι βάσεις Schiff, διότι δίνουν σύμπλοκα όχι μόνο τετραγωνικά αλλά και τετραγωνικά πυραμιδικά κατόπιν διμερισμού.

Εξαιτίας της σχετικά χαμηλής συμμετρίας που εμφανίζει ο Cu(II) σ' ένα δεδομένο χημικό περιβάλλον, η ακριβής ερμηνεία των φασμάτων UV-Vis είναι κάπως δύσκολη, αν και η δομή  $d^9$  είναι το αντίστροφο της απλής δομής  $d^1$ . Στο φάσμα UV-Vis για τα σύμπλοκα του Cu(II) η περιοχή των χαμηλών



ενεργειών κυριαρχείται από τις μεταπτώσεις από πλήρη d τροχιακά στο ημισυμπληρωμένο  $d_{x^2-y^2}$  τροχιακό. Τετραγωνικά σύμπλοκα του Cu(II) εμφανίζουν ταινίες απορρόφησης στην περιοχή από ~500 έως 1000 nm, ενώ τα τετραεδρικά σύμπλοκα εμφανίζουν ταινίες απορρόφησης στην περιοχή 1000 - 2000 nm. Οι μεταπτώσεις αυτές είναι γενικά απαγορευμένες (λόγω ηλεκτρικής διπολικής ροπής) με αποτέλεσμα να έχουν ασθενείς εντάσεις  $\epsilon < 200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Πρέπει να σημειωθεί πως οι  $d \rightarrow d$  μεταπτώσεις είναι συχνά μαγνητικά επιτρεπτές. Αυτός ο κανόνας επιλογής παίζει σπουδαίο ρόλο στην ερμηνεία των φασμάτων CD οπτικά ενεργών κέντρων χαλκού. Οι  $d \rightarrow d$  μεταπτώσεις εμφανίζουν συχνά υψηλής έντασης διχρωικά σήματα σε σχέση με την ένταση των ταινιών απορρόφησης (παράγοντας ανισοτροπίας του Kuhn).

Ο χαλκός είναι απαραίτητος για κάθε οργανισμό ως ιχνοστοιχείο. Το βασικό όργανο όπου συσσωρεύεται ο χαλκός, είναι το ήπαρ και δευτερευόντως τα νεφρά, ο εγκέφαλος και ο σπλήνας. Η αποθηκεύσιμη μορφή του χαλκού είναι η σερουλοπλασμίνη, η οποία απελευθερώνεται από το ήπαρ σε περίπτωση ανάγκης. Ο χαλκός μπορεί να βρεθεί στο αίμα, ως συστατικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων για την ενεργοποίηση του σιδήρου κατά το σχηματισμό της αιμοσφαιρίνης, σε ορισμένα ένζυμα, καθώς και στο μυϊκό, σκελετικό και νευρικό σύστημα, συμβάλλοντας στην καλή λειτουργία αυτών [115]. Ο δεύτερος σημαντικός βιολογικός ρόλος του χαλκού αφορά τη μεταφορά του στο σώμα, χάρη στην οποία ελέγχονται οι δύο σοβαρότερες ασθένειες που προκαλούνται από την έλλειψη χαλκού, δηλ. η νόσος του Wilson και το σύνδρομο Kroyky. Ο ρόλος του χαλκού στα βιολογικά συστήματα εστιάζεται κυρίως σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που σχετίζονται με την αναγωγή του οξυγόνου προς νερό και τη μεταφορά του οξυγόνου, σύμφωνα με τις εξής χημικές εξισώσεις:



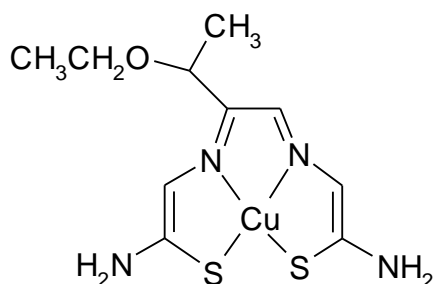
### 2.4.1 Σύμπλοκα του χαλκού ως θεραπευτικοί παράγοντες

Η συμμετοχή του χαλκού σε αυτό το πλήθος των βιολογικών διεργασιών έδωσε το έναυσμα για την παρασκευή και τη μελέτη διαφόρων συμπλόκων του χαλκού με πιθανή βιολογική δράση. Ένας μεγάλος αριθμός συμπλόκων Cu(I) και Cu(II) έχει συντεθεί και μελετηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς, όπως ως αντιμυκητιακοί και αντιβακτηριακοί παράγοντες, ως μέσα αντιμετώπισης της ελονοσίας, στη θεραπεία της νόσου Alzheimer και πρόσφατα ως πιθανό φάρμακο για την καταπολέμηση της νόσου Parkinson, της αμυοτροφικής σκλήρυνσης, του διαβήτη, διαφόρων φλεγμονών (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα, ελκών του δέρματος), καρδιαγγειακών παθήσεων αλλά και της λείσμανίασης [125].

Πολυάριθμες έρευνες πραγματοποιούνται με σκοπό την διερεύνηση της αντικαρκινικής δράσεως των συμπλόκων του χαλκού, αν και ο μηχανισμός δεν έχει πλήρως εξηγηθεί. Ένας μεγάλος αριθμός συμπλόκων Cu(II) έχει βρεθεί ότι προσδένονται στο DNA μέσω δεσμών συναρμογής του χαλκού με το N-7 των πουρίνων [126]. Παράγωγα του Cu(II) που φέρουν επίπεδα αρωματικά συστήματα δακτυλίων αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής, δίχως να αποκλείονται και οι περιπτώσεις ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης ή μέσω των αυλακών [127, 128]. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η δράση αυτών οφείλεται στον ενδοκυτταρικό σχηματισμό ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) κατά την αναγωγή του Cu(II) προς Cu(I), με τη διαμεσολάβηση θειολών [129]. Επίσης, διάσπαση του DNA έχει παρατηρηθεί από σύμπλοκα με πολυπυριδίνες και πολυφαινόλες [130].

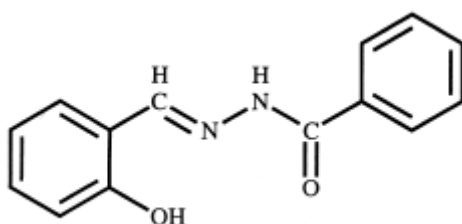
Σύμπλοκα του χαλκού (II) με θειοσεμικαρβαζόνες και δις(θειοσεμικαρβαζόνες) αναφέρεται ότι εμφανίζουν δραστηριότητα έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων [131-134]. Ο μηχανισμός της δράσης τους δεν οφείλεται σε σύνδεση με το DNA και είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Για παράδειγμα, το σύμπλοκο [Cu(II)(kts)], όπου kts: 2-κετο-3-αιθοξυβουτυραλδεϋδο-δισ(θειοσεμικαρβαζόνη), εμφανίζει ισχυρή τοξικότητα έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου και είναι δραστικότερο σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη (Εικόνα 20). Το σύμπλοκο [Cu(II)(kts)] αν και δεν αλληλεπιδρά με το DNA, παρεμποδίζει την ενσωμάτωση της θυμιδίνης στο DNA και της

ουριδίνης στο RNA. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει διακοπή της κυτταρικής αναπνοής και της σύνθεσης του RNA, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με τις κυτταρικές και διυδρολιποϊκές θειόλες.



**Εικόνα 20:** Η δομή του συμπλόκου 2-κετο-3-αιθοξυβουτυραλδεϋδο-δισ(θειοσεμικαρβαζόνη)χαλκός(II)

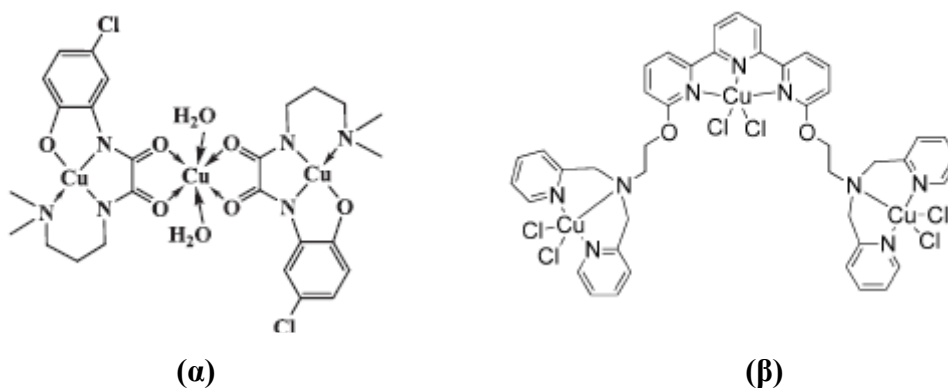
Τα τελευταία χρόνια διερευνάται έντονα η θεραπευτική δυναμική συμπλόκων του Cu(II) με βάσεις Schiff [135-137]. Η σαλικυλαλδεϋδο-βενζουΐλουδραζόνη (SBH) (Εικόνα 21), εμφανίζει παρεμποδιστική δράση στην σύνθεση του DNA καθώς και στην ανάπτυξη διαφόρων ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Τα σύμπλοκα του Cu(II) με τη SBH ή παράγωγα αυτής εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξικότητα και μάλιστα μεγαλύτερη απ' ό,τι του υποκαταστάτη μόνου του ή αντίστοιχων συμπλόκων άλλων μεταλλικών ιόντων [138-140].



**Εικόνα 21:** Η δομή της σαλικυλαλδεϋδο-βενζουΐλουδραζόνη (SBH)

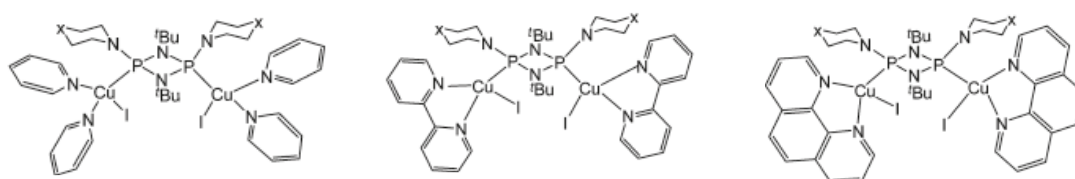
Σύμπλοκα του Cu(II) με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως παράγωγα του σαλικυλικού οξέος, φαινυλοαλκανοϊκά οξέα, ανθρανιλικά οξέα, σουλφοναμίδια και φουρανόνες, διερευνώνται ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες [141, 142]. Η συμπλοκοποίηση του Cu(II) με το αντιφλεγμονώδες φάρμακο diclofenac ( $[\text{Cu}(\text{diclofenac})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) είχε ιδιαίτερως εντυπωσιακά αποτελέσματα, εμφανίζοντας υψηλές τιμές in vitro κυτταροτοξικότητας στις κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος SW620 και HT29 [143]. Η εκλεκτικότητα και η υψηλή τοξικότητα των ανωτέρω συμπλόκων έναντι των καρκινικών σειρών μαστού, όπως η MCF-7, είναι επιβεβαιωμένη από πολλές επιστημονικές μελέτες [144, 145].

Μια άλλη κατηγορία που διερευνάται με ιδιαίτερως ενθαρρυντικά αποτελέσματα, είναι τα πολυπυρηνικά σύμπλοκα του χαλκού. Διπυρηνικά σύμπλοκα του Cu(II) με υποκαταστάτες N-(2)-L-αλανυλ-L-γλουταμίνης ή βάσεις Schiff ή παράγωγα της β-αλανίνης παρουσιάζουν σημαντικές αντιαγγειογενετικές ιδιότητες, επάγοντας απόπτωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μέσω σχηματισμού δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) [146]. Το διπυρηνικό σύμπλοκο  $[\text{Cu}_2(\text{l-terephthalate})(1,10\text{-phen})_4]^{2+}$ , είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας του DNA και εμφανίζει σημαντική in vitro κυτταροτοξικότητα, της τάξεως των nM, έναντι, ανθεκτικών στη σισπλατίνη, καρκινικών κυτάρων, επάγοντας ενδοκυτταρικά την δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου [147]. Τριμεταλλικά σύμπλοκα του Cu(II) που περιέχουν οξάμιδο γέφυρες είναι δραστικά στις καρκινικές κυτταρικές σειρές SMMC-7721 και A549 ενώ εκείνα που έχουν ως υποκαταστάτη ένα παράγωγο τριπυριδίνης εμφάνισαν δραστηριότητα έναντι συγκεκριμένων λευχαιμικών κυτταρικών σειρών (Εικόνα 22). Και στις δύο περιπτώσεις διαπιστώθηκε αλληλεπίδραση με το DNA μέσω παρεμβολής ή μέσω των αυλακών [148, 149].



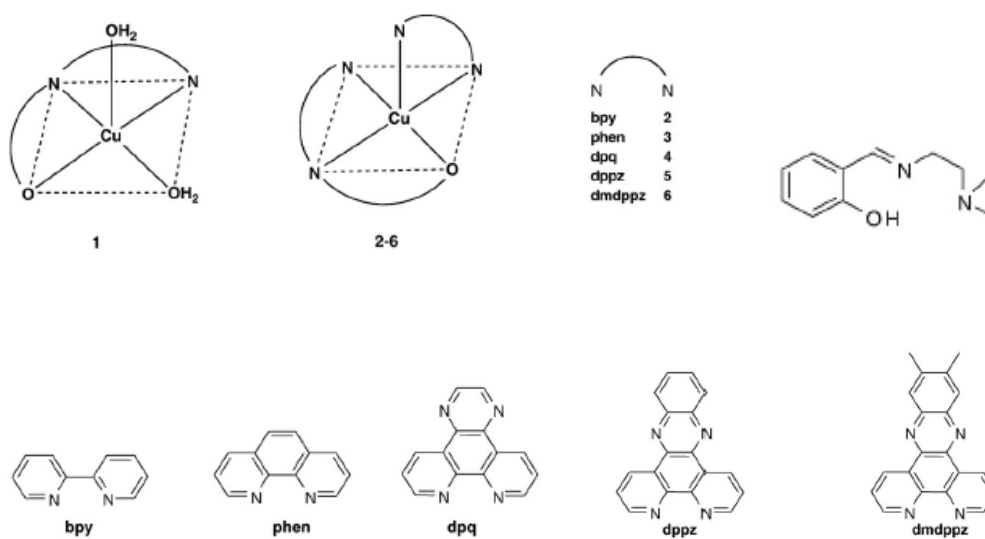
**Εικόνα 22: Δομή των τριπυρηνικών συμπλόκων του Cu(II). (α) Τα άτομα του Cu(II) συνδέονται μέσω οξοαμιδο-γεφυρών. (β) Ο υποκαταστάτης είναι παράγωγο της τριπυριδίνης**

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πολυπυρηνικά σύμπλοκα του Cu(I) με υποκαταστάτες κυκλοδιφωσφαζάνια και διάφορα πυριδίνια (Εικόνα 23). Τα σύμπλοκα αυτά είναι πιο δραστικά από τη σισπλατίνη έναντι διαφόρων καρκινικών σειρών καταστρέφοντας το DNA, εμποδίζοντας την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και επάγοντας απόπτωση μέσω του p53-εξαρτώμενου μονοπατιού [150].



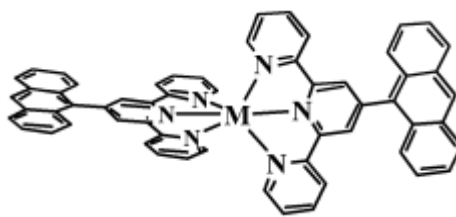
**Εικόνα 23: Δομή των διπυρηνικών συμπλόκων του Cu(I) με υποκαταστάτες κυκλοδιφωσφαζάνια και διάφορα πυριδίνια. X: O ή Me**

Οι πολυπυριδίνες (διπυριδίνη, φαινανθρολίνη κ.ά.) αποτελούν μια κατηγορία υποκαταστατών που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση μεταλλικών συμπλόκων του χαλκού για θεραπευτικούς σκοπούς. Το γεγονός ότι αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής, τα καθιστά εξαιρετικούς αντικαρκινικούς παράγοντες [151]. Σύμπλοκα του Cu(II) όπως  $[\text{Cu}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)$  (**1**)  $[\text{Cu}(\text{L})(\text{diimine})](\text{ClO}_4)$  (**2-6**) (Εικόνα 24), όπου L: 2-((2-διμεθυλαμινο)αιθυλιμινο)μεθυλφαινόλη και diimine: 2,2'-διπυριδίνη (bpy) (**2**), 1,10-φαινανθρολίνη (phen) (**3**), διπυριδο-[3,2-d:2',3'-f]-κινουξαλίνη (dpq) (**4**), διπυριδο-[3,2-d:2',3'-f]-φαιναζίνη (dppz) (**5**) και 11,12-διμεθυλδιπυριδο-[3,2-d:2',3'-f]-φαιναζίνη (dmdppz) (**6**), εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF-7 και ME180, με δραστηριότητα συγκρίσιμη της σισπλατίνης [152].



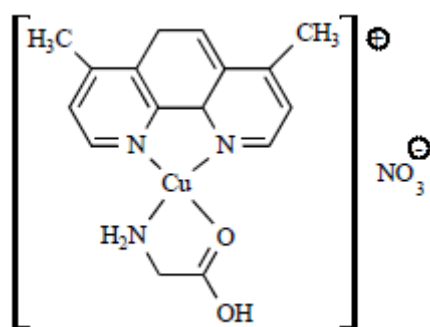
**Εικόνα 24:** Πιθανές γεωμετρίες συμπλόκων του Cu(II) με διάφορες διιμίμες (N-N)

Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα συμπλόκων του Cu(II) που περιέχουν τριπυριδίνες είναι το ανθρακενυλο-τριπυρινικό σύμπλοκο, Cu(II):4'-(9-ανθρυλ)-2,2':6'2'-τριπυριδίνη. Το σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρά με το CT-DNA μέσω μερικής παρεμβολής, ενώ έδειξε αξιοσημείωτη δραστικότητα έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως μαστού (MCF-7), ήπατος (HepG2), πνεύμονα (H1299) και τραχήλου (HeLa, SiHa, CaSki), επάγοντας κυτταρικό θάνατο μέσω αλληλεπίδρασης με ογκοπρωτεΐνες κονδυλωμάτων (Εικόνα 25) [153].



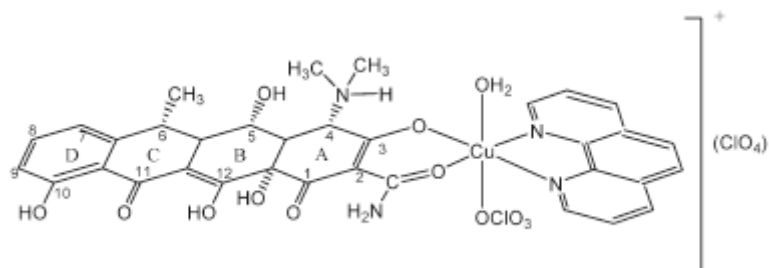
**Εικόνα 25:** Η δομή του συμπλόκου του Cu(II) με υποκαταστάτη την 4'-(9-ανθρυλ)-2,2':6'2'-τριπυριδίνη

Στην κατηγορία των συμπλόκων του Cu(II) με πολυπυριδίνες εντάσσονται και αυτά που περιέχουν υποκαταστάτη την 1,10-φαινανθρολίνη ή παράγωγα αυτής, τα οποία και εμφανίζουν την μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση, ενώ πρόσφατα απεδείχθη ότι η παρουσία της σε σύμπλοκα του Cu(II) αυξάνει την ικανότητα των συμπλόκων να εισέρχονται στα καρκινικά κύτταρα και να επάγουν απόπτωση [154]. Μικτά σύμπλοκα του Cu(II) με υποκαταστάτες διάφορες 1,10-φαινανθρολίνες ή διπυριδίνες και ένα αμινοξύ, εμφανίζουν κυτταροστατική, κυτταροτοξική και αντινεοπλαστική δραστικότητα. Έχουν κατοχυρωθεί με την ονομασία Casiopeinas και το [(4,7-διμεθυλ-1,10 φαινανθρολίνη)(γλυκίνατο)χαλκός(II) ή Casiopeinas II-gly, παρουσιάζεται στην Εικόνα 26 [155]. Οι μελέτες για τον μηχανισμό δράσης τους έδειξαν ότι επάγουν οξειδωτικό στρες και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, μέσω σχηματισμού δραστικών ριζών οξυγόνου, ως αποτέλεσμα της αναγωγής του Cu(II) [156, 157].



**Εικόνα 26: Δομή του συμπλόκου [(4,7-διμεθυλ-1,10 φαινανθρολίνη)(γλυκίνατο)χαλκός(II) ή Casiopeinas® II-gly**

Είναι επίσης δυνατόν να συμβεί φωτοχημική διάσπαση του DNA ακτινοβολώντας με UV ακτινοβολία Σύμπλοκα του Cu(II) με 1,10-φαινανθρολίνη και τετρακυκλίνες ή δοξοκυκλίνη έχουν αναφερθεί ως ισχυροί παράγοντες φωτοχημικής διάσπασης του DNA (Εικόνα 27) [158, 159].



**Εικόνα 27: Η δομή του συμπλόκου υπερχλωρικός (δοξοκυκλίνη)-υδατο-(1,10 φαινανθρολίνη)-υπερχλωρατοχαλκός(II)**

Συνοψίζοντας, η έρευνα για σύμπλοκα του χαλκού με αντινεοπλασματικές ιδιότητες ανέδειξε το ευρύ φάσμα της αντικαρκινικής τους δραστηριότητας. Οι λιγότερες παρενέργειες που έχουν διαπιστωθεί σε σχέση με αντίστοιχα αντικαρκινικά φάρμακα του λευκοχρύσου, ενδεχομένως υποδεικνύει την ικανότητα αυτών των συμπλόκων να αντιμετωπίζουν την επίκτητη ή συμφυή αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη σιπλατίνη [160].



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΤΟ ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΟ ΟΞΥ

#### 3.1 Η δομή του DNA

Τα νουκλεϊνικά οξέα (DNA και RNA) είναι μεγαλομοριακά βιοπολυμερή τα οποία φέρουν, εκφράζουν και διατηρούν αναλλοίωτη τη γενετική πληροφορία. Αυτή η ικανότητα οφείλεται στην δυνατότητα που έχουν να καθορίζουν την πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Αν και ο μηχανισμός που ακολουθείται είναι εκπληκτικά ακριβής, παρατηρούνται συχνά βλάβες οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφόρων προβλημάτων, μεταξύ αυτών την καρκινογένεση.

Το DNA (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ) είναι ένα γραμμικό επίμηκες δίκλωνο πολυμερές, οι δομικές μονάδες του οποίου είναι τα δεοξυριβονουκλεοτίδια τα οποία αποτελούνται από μία αζωτούχο ετεροκυκλική βάση, ένα μόριο σακχάρου και μια φωσφοεστερική ομάδα. Η πρωτοταγής δομή αναφέρεται στην αλληλουχία των δεοξυριβονουκλεοτιδίων στην αλυσίδα του DNA και συγκεκριμένα αναφέρεται στην αλληλουχία των βάσεων, αφού ο κορμός σακχάρου-φωσφορικού δεν μεταβάλλεται κατά μήκος του μορίου [161]. Ειδικότερα, το 3'-υδροξύλιο του σακχάρου ενός δεοξυριβονουκλεοτιδίου ενώνεται με το 5'-υδροξύλιο του επόμενου σακχάρου με φωσφοδιεστερική γέφυρα. Το μεταβλητό τμήμα είναι μία αλληλουχία τεσσάρων ειδών αζωτούχων βάσεων. Οι αζωτούχες βάσεις του DNA είναι οι πουρίνες: αδενίνη (A) και γουανίνη (G) και οι πυριμιδίνες: κυτοσίνη (C) και θυμίνη (T).

Τον Απρίλιο του 1953 οι J. Watson και F. Crick στηριζόμενοι στις μελέτες του Chargaff, πρότειναν το μοντέλο της διπλής έλικας του DNA, τα κυριότερα χαρακτηριστικά του οποίου είναι τα εξής:

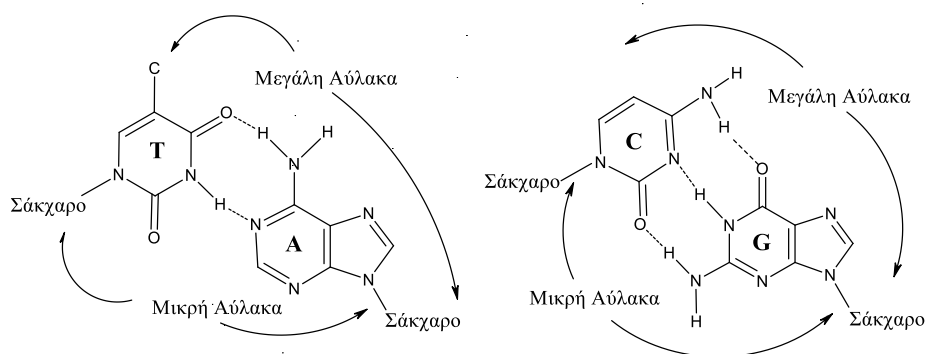
- Το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες με αντίθετες κατευθύνσεις που περιστρέφονται με δεξιόστροφη φορά γύρω από έναν κοινό άξονα σχηματίζοντας μία διπλή έλικα.

- Η διπλή έλικα έχει στο εξωτερικό της μέρος ένα σταθερό υδρόφιλο σκελετό που αποτελείται από τα φωσφορικά και τις μονάδες της δεοξυριβόζης, ενώ στο εσωτερικό της βρίσκονται οι υδρόφοβες πουρινικές και πυριμιδινικές βάσεις.
- Η ακριβής διάμετρος της διπλής έλικας είναι 23,7 Å. Δύο διαδοχικές βάσεις απέχουν 3,4 Å και η μεταξύ τους γωνία στροφής είναι 36°. Επομένως ανά 34 Å επαναλαμβάνεται η ελικοειδής δομή και η απόσταση αυτή καλείται βήμα της έλικας. Επιπροσθέτως, η έλικα είναι δεξιόστροφη και έχει 10,2 ζεύγη βάσεων ανά στροφή.
- Τα επίπεδα των βάσεων είναι κάθετα στον άξονα της διπλής έλικας. Οι αζωτούχες βάσεις της μίας αλυσίδας συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου με τις βάσεις της άλλης, σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, όπου σχηματίζονται δύο δεσμοί μεταξύ T και A και τρεις δεσμοί μεταξύ G και C. Αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου σταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή του μορίου.
- Οι δύο αλυσίδες ενός μορίου DNA είναι συμπληρωματικές και αυτό υποδηλώνει ότι η αλληλουχία της μίας καθορίζει την αλληλουχία της άλλης, μία ιδιότητα που καθιστά το DNA το καταλληλότερο μόριο για τη διατήρηση και μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας.

Οι Watson και Crick πρότειναν ότι το DNA βρίσκεται σε B-μορφή η οποία είναι η επικρατέστερη δομή σε φυσιολογικές συνθήκες (υψηλό ποσοστό υδάτωσης >85% και μέτρια συγκέντρωση ηλεκτρολυτών). Στην B-μορφή του DNA σχηματίζονται δύο ελικοειδείς αύλακες, μία μικρή και μία μεγάλη, οι οποίες εκτείνονται σπειροειδώς στην επιφάνειά του και η ύπαρξη τους οφείλεται στο γεγονός ότι οι γλυκοσιδικοί δεσμοί κάθε ζεύγους βάσεων δεν είναι διαμετρικά αντίθετοι ο ένας σε σχέση με τον άλλο.

Η μικρή αύλακα έχει άνοιγμα < 180°, πλάτος 6 Å και βάθος 7,5 Å. Η μικρή αύλακα περιέχει το πυριμιδινικό O2 και το πουρινικό N3 του ζεύγους των βάσεων, ενώ η μεγάλη αύλακα βρίσκεται στην αντίθετη πλευρά του ζεύγους. Στη μικρή αύλακα, το N3 της A και της G και το O2 της T και της C μπορούν να δράσουν σαν δέκτες υδρογόνου (να σχηματίσουν δηλαδή δεσμό υδρογόνου

με το υδρογόνο ενός άλλου μορίου), ενώ η αμινομάδα στον C2 της G είναι δότης υδρογόνου. Αντίστοιχα, η μεγάλη αύλακα έχει πλάτος 12 Å, άνοιγμα > 180° και βάθος 8,5 Å. Στη μεγάλη αύλακα, το N7 της G και της A είναι αποτελεσματικός δέκτης υδρογόνου όπως επίσης το O4 της T και το O6 της G. Η αμινομάδα στον C6 της A και στον C4 της C μπορεί να λειτουργήσει σαν δότης υδρογόνου (Σχήμα 6).



**Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση ζευγών αζωτούχων βάσεων και δεσμών υδρογόνου στο DNA**

Η Β-μορφή του DNA μετατρέπεται στην Α-Μορφή (Πίνακας 1) όταν η σχετική υγρασία των ινών του φυσικού Β-DNA μειωθεί στο 75% και η συγκέντρωση NaCl ελαττωθεί κάτω του 10%. Η Α-μορφή είναι επίσης δεξιόστροφη, αλλά περισσότερο ευρεία και μικρότερου μήκους σε σχέση με τη Β-μορφή. Το DNA εμφανίζει και μια τρίτη μορφή, τη Ζ-μορφή και αυτό συμβαίνει σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (3-4 M, NaCl) και σε πολυνουκλεοτίδια πλούσια σε ζεύγη G-C ή εναλλασσόμενης αλληλουχίας πουρίνης-πυριμιδίνης. Η Ζ-μορφή του DNA είναι μια αριστερόστροφη διπλή έλικα βήματος 45 Å, με 12 ζεύγη βάσεων ανά στροφή και είναι το αποτέλεσμα της στροφής του γλυκοσιδικού δεσμού από την syn- στην anti-διαμόρφωση, από όπου και προήλθε η ονομασία Ζ-DNA.

Πίνακας 1: Διαμόρφωση της έλικας A-, B- και η Z-μορφής του DNA

<u>Διαμόρφωση της έλικας</u>			
<u>Δομικές Παράμετροι</u>	<u>A-Μορφή</u>	<u>B-Μορφή</u>	<u>Z-Μορφή</u>
<b>Σχήμα</b>	Ευρεία	Μεσαία	Στενότατη
<b>Ανύψωση ανά ζεύγος</b>	2,3 Å	3,4 Å	3,8 Å
<b>Διάμετρος Έλικας</b>	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
<b>Τρόπος στρέψης</b>	Δεξιόστροφα	Δεξιόστροφα	Αριστερόστροφα
<b>Γλυκοσιδικός Δεσμός</b>	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i> για C,T <i>syn</i> για G
<b>Ζεύγη βάσεων/στροφή</b>	11	10.4	12
<b>Βήμα της έλικας</b>	25,3 Å	35,4 Å	45,6 Å
<b>Απόκλιση του επιπέδου των βάσεων από το κάθετο επίπεδο στον άξονα της έλικας</b>	19°	1°	9°
<b>Μεγάλη Αύλακα</b>	Στενή και πολύ βαθιά	Ευρεία και αρκετά βαθιά	Επίπεδη
<b>Μικρή Αύλακα</b>	Πολύ ευρεία και ρηχή	Στενή και αρκετά βαθιά	Πολύ στενή και βαθιά

### 3.2 Αλληλεπιδράσεις DNA με μέταλλα

Η ακριβής θέση σύνδεσης ενός συμπλόκου στο μόριο του DNA καθορίζεται από πολλούς παράγοντες και η σταθερότητα του συστήματος μετάλλου-DNA εξαρτάται άμεσα από το είδος του μετάλλου, αφού κάθε μέταλλο εμφανίζει συγκεκριμένη προτίμηση δέσμησης για κάθε άτομο δότη ηλεκτρονίων. Για φυσιολογικές τιμές pH, τα κυριότερα σημεία σύνδεσης των μεταλλικών ιόντων

με το μόριο του DNA είναι τα ακραία άτομα O των φωσφορικών, τα άτομα O του φωσφοδιεστερικού δεσμού, τα άτομα N3 και O2 της C και το άτομο του N7 της G. Χρησιμοποιώντας τον κατά Pearson διαχωρισμό των μεταλλικών ιόντων σε "σκληρά" και "μαλακά" μπορούμε να έχουμε μία ικανοποιητική πρόβλεψη των θέσεων σύμπλεξης του μετάλλου και της σταθερότητας του συστήματος μετάλλου-DNA [162].

Τα "σκληρά" μονοσθενή μεταλλικά ιόντα συνδέονται ιοντικά με τα άτομα O των φωσφορικών ενώ τα δισθενή και πολυσθενή μεταλλικά ιόντα μπορούν να δεσμευθούν απευθείας στο άτομο O των φωσφορικών (σύνδεση εσωτερικής σφαίρας) ή να δεσμευθούν σε αυτό μέσω ενός μορίου νερού (σύνδεση εξωτερικής σφαίρας). Αντίθετα, τα "μαλακά" μεταλλικά ιόντα προτιμούν το σχηματισμό μακροχηλικών δακτυλίων ή σταυροδεσμών μεταξύ των βάσεων. Το μεταλλικό ιόν σχηματίζει ένα δεσμό με κάθε μία βάση και σπάνια παρατηρείται σχηματισμός χηλικού δακτυλίου με δύο άτομα δότες από την ίδια βάση. Τα μεταλλικά ιόντα που εμφανίζουν ενδιάμεσες ιδιότητες μεταξύ "σκληρού" και "μαλακού" είναι ικανά να σχηματίσουν μεικτά τριαδικά σύμπλοκα με το O των φωσφορικών και το N των αζωτούχων βάσεων.

### **3.3 Αλληλεπιδράσεις του DNA με οργανικά μόρια**

Μπορούμε να κατατάξουμε τις ουσίες που αλληλεπιδρούν με το DNA σε δύο μεγάλες κατηγορίες: αυτές που αλληλεπιδρούν κάνοντας παρεμβολή (intercalation) και αυτές που δεσμεύονται με άλλους τρόπους.

#### **3.3.1 Παρεμβολή**

Πολλά επίπεδα οργανικά αρωματικά μόρια μπορούν να παρεμβάλλουν το σύστημα των δακτυλίων τους μεταξύ των ζευγών βάσεων. Το φαινόμενο της παρεμβολής, που προτάθηκε για πρώτη φορά στα 1961 από τον Lerman, προκαλεί τις ακόλουθες μεταβολές στο μόριο του DNA. Οι κυριότερες εκπρόσωποι των ενώσεων αυτών είναι η ακτινομυκίνη, η ακριδίνη, κ.α [163, 164].

### **i. Αποέλιξη και ταυτόχρονη επιμήκυνση της διπλής έλικας**

Το επίπεδο αρωματικό σύστημα του μορίου-παρεμβολέα διαχωρίζει τα ζεύγη των βάσεων μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται, κατά απόσταση περίπου ίση με το πάχος του, αποελίσσοντας τοπικά τη διπλή έλικα, η οποία και επιμηκώνεται. Η επαγόμενη διαταραχή της διαμόρφωσης των φωσφορικών ομάδων του DNA μπορεί να ανιχνευθεί με  $^{31}\text{P}$ -NMR.

### **ii. Ηλεκτρονική αλληλεπίδραση του παρεμβολέα μέσα στην έλικα**

Το επίπεδο αρωματικό σύστημα τοποθετείται παράλληλα προς τα επίπεδα των διαδοχικών ζευγών βάσεων σε απόσταση 3,4 Å από την καθεμία. Η τοποθέτηση αυτή επιτρέπει την αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου και την π-π αλληλεπίδραση μεταξύ των ηλεκτρονιακών νεφών των βάσεων και του παρεμβολέα. Οι μεταβολές αυτές ανιχνεύονται με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού και ηλεκτρονικής απορρόφησης.

### **iii. Ακαμψία και προσανατολισμός του παρεμβολέα μέσα στην έλικα**

Κατά την παρεμβολή δημιουργείται δομική επικάλυψη μεταξύ των βάσεων και του παρεμβολέα, ο οποίος συγκρατείται ισχυρά στο εσωτερικό της έλικας. Το μόριο του φαρμάκου γίνεται περισσότερο άκαμπτο και το επίπεδο αρωματικό σύστημα που διαθέτει προσανατολίζεται κάθετα ως προς τον άξονα της διπλής έλικας. Το παραπάνω φαινόμενο μπορεί να ανιχνευτεί με τις μεθόδους του γραμμικού διχρωϊσμού και της πολωσιμότητας φθορισμού.

### **3.3.2 Δέσμευση στις αύλακες**

Ένα μόριο μπορεί να αλληλεπιδράσει με το DNA μέσω της μεγάλης ή της μικρής αύλακας. Συνήθως, τα πρωτεϊνικά μόρια μεγάλου μοριακού βάρους δεσμεύονται στη μεγάλη αύλακα (με εξαίρεση την DNAase I), ενώ τα μικρά οργανικά αρωματικά μόρια ( $M.B < 1000$ ) δεσμεύονται κυρίως στη μικρή αύλακα που είναι περισσότερο εκτεθειμένη. Τα φάρμακα της κατηγορίας αυτής φέρουν συνήθως θετικό φορτίο και προτιμούν να δεσμεύονται σε περιοχές πλούσιες σε ακολουθίες A-T. Οι κυριότερες εκπρόσωποι των ενώσεων αυτών είναι η ανθραμυκίνη, οι δισταμυκίνες κ.α [165].

### 3.3.3 Αλκυλίωση

Τα αντικαρκινικά φάρμακα που συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA είναι συνήθως οργανικά μόρια κατάλληλης δομής που προκαλούν σημαντικές δομικές και βιολογικές αλλαγές στο DNA. Τα μόρια αυτά δημιουργούν ένα δραστικό ηλεκτρονιόφιλο σύστημα, όπου αλκυλιώνει τα πυρηνόφιλα άτομα N των βάσεων του DNA (μέσω  $S_N1$  και  $S_N2$  υποκατάστασης), τηρώντας την εξής σειρά προτίμησης: N7 της G>N1 της A>N3 της C>N3 της T. Το ποσοστό και το ακριβές σημείο της αλκυλίωσης μπορεί να καθοριστεί με τη μέθοδο NMR. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι είναι οι μυτομικίνες, οι μουστάρδες αζώτου και η σισπλατίνη [166].

### 3.3.4 Συνδυασμός παρεμβολής και αλκυλίωσης

Τα αντικαρκινικά/αντιβιοτικά των αλτρομυκινών (Akinomycin, Kidamycin, Rubiflanin, Hedamycin κ.α.) είναι οι πιο χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι των ενώσεων που αλκυλιώνουν και ταυτόχρονα παρεμβάλλονται στο DNA. Σύμφωνα με NMR μελέτες, κατά την παρεμβολή του μορίου στο εσωτερικό του DNA, το εποξειδίο του δακτυλίου αλκυλιώνει το N7 της G στη μεγάλη αύλακα του DNA [167].

### 3.3.5 Διάσπαση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας

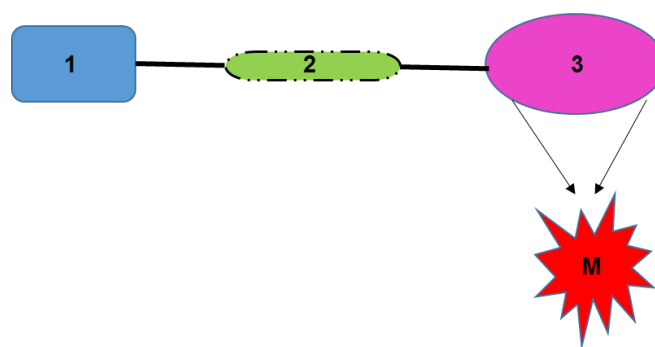
Πολλά φυσικά αντιβιοτικά με δομή ενεδιΐνιου (neocarzinostatin, keridicin, esperamycins, κ.α) όταν δεσμευτούν στο κυτταρικό DNA, προκαλούν θραύση ενός ή και των δύο κλώνων της διπλής έλικας λόγω της χαρακτηριστικής τους ομάδας  $-C\equiv C-C=C-C\equiv C-$  που συνήθως εμπεριέχεται σε έναν ενδεκαμελή δακτύλιο [168]. Η τοξικότητα των μορίων αυτών καθιστά απαγορευτική τη χρήση τους σε ασθενείς και το γεγονός αυτό έχει δώσει ώθηση στην έρευνα για συνθετικά ανάλογα με βελτιωμένη βιολογική δράση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι μπλεομυκίνες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η σύνθεση νέων αντικαρκινικών παραγόντων οι οποίοι θα παρουσιάζουν διττή αντικαρκινική δράση, ως αποτέλεσμα της συνδυαστικής τοξικής επίδρασης του μεταλλικού κέντρου και της εκλεκτικότητας της βιοδραστικής ομάδας του υποκαταστάτη. Βασική επιδίωξη είναι η δημιουργία μη τοξικών αντικαρκινικών ενώσεων οι οποίες θα στοχεύουν εκλεκτικά ορισμένους τύπους όγκων και ταυτόχρονα θα διατηρούν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA.

Τα μεταλλικά σύμπλοκα που συνετέθησαν έχουν σχεδιαστεί με τη μέθοδο της σύνδεσης διλειτουργικού υποκαταστάτη (bifunctional approach). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η ομάδα του διλειτουργικού υποκαταστάτη (3) διαθέτει κατάλληλα άτομα δότες ικανά να σχηματίσουν χημικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα. Η ομάδα αυτή συνδέεται μέσω αλυσίδας (2) με μια βιοδραστική ομάδα (1). Με αυτό τον τρόπο η βιοδραστική ομάδα δεν συμμετέχει άμεσα στη σφαίρα συναρμογής του μετάλλου, παραμένει στερεοχημικά ελεύθερη και διατηρεί τις βιοχημικές της ιδιότητες. Η σχηματική αναπαράσταση της γενικής δομής του διλειτουργικού υποκαταστάτη δίνεται στο Σχήμα 7.



Σχήμα 7: Σχηματική παρουσίαση της γενικής δομής του διλειτουργικού υποκαταστάτη

1. Η βιοδραστική ομάδα
2. Συνδετικό τμήμα
3. Ομάδα πρόσδεσης του μεταλλικού κέντρου



Ως βιοδραστική ομάδα επιλέχθηκε το 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζόλιο, λόγω του εξαιρετικού συνδυασμού εκλεκτικότητας και δραστηριότητας που διαθέτουν. Με τροποποιήσεις του μήκους του συνδετικού τμήματος (**n**) (δηλαδή της απόστασης της βιοδραστικής ομάδας από το σημείο πρόσδεσης) συντέθηκαν οι δύο υποκαταστάτες **1** και **2** αλλά και τα αντίστοιχα σύμπλοκα των οποίων η βιολογική αξιολόγηση θα αναδείξει σημαντικότερες σχέσεις δομής-δραστηριότητας. Ως ομάδα πρόσδεσης επιλέχθηκε η πυριδίνη η οποία μπορεί να λειτουργήσει ως (N-N)-χηλικός παράγοντας. Τα σύμπλοκα που συνετέθησαν είναι σύμπλοκα του Pt(II), Pd(II) και Cu(II) με τους διλειτουργικούς υποκαταστάτες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Τα πρωτότυπα σύμπλοκα αναμένεται να χαρακτηρίζονται εξίσου από την εκλεκτική αντικαρκινική δράση που προσδίδει το βενζοθειαζόλιο, σε συνδυασμό με την κυτταροτοξική δράση του μεταλλικού πυρήνα, στοχεύοντας έτσι στην συνεργιστική αποτελεσματικότητα των δυο βιοδραστικών μονάδων [169, 170].

Εξ'όσων γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που συνδυάζεται η εκλεκτική αντικαρκινική δράση του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου με το ενεργό μεταλλικό κέντρο του Pt(II). Επιπροσθέτως, τα αντίστοιχα σύμπλοκα με Pd(II) και Cu(II) επιλέχθησαν λόγω των δυνατοτήτων πρόσδεσης τους με το DNA και των αποδεδειγμένων αντικαρκινικών τους ιδιοτήτων [110].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

#### 5.1 Όργανα και αντιδραστήρια

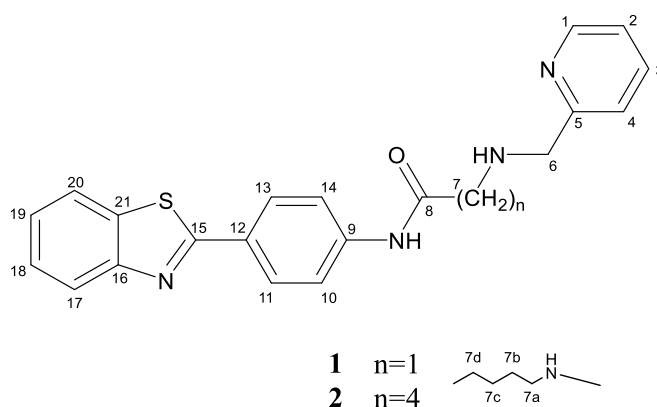
##### 5.1.1 Όργανα

- **Φασματοφωτόμετρο NMR** (600 MHz, BRUKER), Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών – Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό, ΕΚΕΦΕ, "Δημόκριτος".
- **Φασματοφωτόμετρο NMR** (300 MHz, Varian).
- **Φασματοφωτόμετρο UV-Vis CARY 3E** (Varian, με κυκλοφορητή ύδατος, θερμοστατούμενο υποδοχέα έξι κυψελίδων και σύνδεση με Η/Υ).
- **Φασματόμετρο Μάζας** (ESI-MS, TSQ 7000 Finnigan MAT) Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας – Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών).
- **Φασματοφωτόμετρο Συνεχούς και Παλμικού EPR** (X-band, Bruker ESP 380E, 9 GHz), Τομέας Επιστήμης Υλικών - ΕΚΕΦΕ, "Δημόκριτος".
- **Φασματοφωτόμετρο IR** (PERKIN-ELMER 883).
- **Ψηφιακός Αναλυτικός Ζυγός ADAM** ( $\pm 0,1$  mg).
- **pH-μετρο Xenon** (RUSSEL CMAWL/3.7/180, ηλεκτρόδιο λευκοχρυσού)
- **Κυψελίδες NMR** (NMR tubes, SDS, διαμέτρου 5 mm και μήκους 178 mm).
- **Κυψελίδες UV-Vis** (οπτικής διαδρομής 0,100-0,500 cm και 1,000 cm, κατασκευασμένες από χαλαζία).
- **Πιπέτες ακριβείας 100-1000  $\mu$ L και 10-100  $\mu$ L** (High Tech.Lab.)
- **Ιξωδόμετρο** (Schott geräte, type 531 01/0a, θερμοστάτης Schott geräte GT 1150, μετρητής Schott geräte AVS 300).

- **Φασματοπολωσίμετρο CD** (J715, Jasco), Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών – Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό – ΕΚΕΦΕ, Δημόκριτος.
- **Φασματοφωτόμετρο Φθορισμού** (HITACHI F-2500), Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών – Εργαστήριο Βιοφυσικής και Βιοτεχνολογίας Μεμβρανών - ΕΚΕΦΕ, Δημόκριτος.
- **Ψηφιακός Αναλυτικός Ζυγός** (ADAM).
- **pH-μετρο Xenon** (RUSSEL CMAWL/3.7/18, ηλεκτροδίου λευκοχρυσού).
- **Κυψελίδες UV-Vis** (Helma Analytics, οπτικής διαδρομής 0,1-0,5 cm και 1,0 cm, κατασκευασμένες από χαλαζία).
- **Πιπέτες ακριβείας 100-1000  $\mu$ L και 10-100  $\mu$ L** (High Tech.Lab).
- **Φίλτρα 1  $\mu$ m** (Milipore).
- **Φασματοφωτόμετρο ELISA** (Sirio S Seac RADIM-Group Diachel ELISA plate reader) - Εργαστήριο Ανοσοπεπτιδικής Χημείας ΙΡΡΠ, ΕΚΕΦΕ, Δημόκριτος
- **Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού** (Leica confocal laser scanning microscope, TCS SP5, DMI6000 εξοπλισμένο με λογισμικό LAS-AF, στους 23-24 °C, μεγέθυνσης x63 με αριθμητικό διάφραγμα NA 1.4) - Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) Μονάδας Απεικονιστικής Μικροσκοπίας
- **Αιματοκυττόμετρο** (Greiner)

### 5.1.2 Αντιδραστήρια

Για λόγους συντομίας τα παράγωγα του 2-4'-(αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου με M.B = 374,46 και 416,54 θα τα συμβολίζουμε με τους αριθμούς **1** και **2** αντίστοιχα (Σχήμα 8). Τα σύμπλοκα με Pd(II), Pt(II) και Cu(II) θα τα συμβολίζουμε ως **Pt-1**, **Pd-1**, **Cu-1** και **Pt-2**, **Pd-2**, **Cu-2** αντίστοιχα. Οι δύο υποκαταστάτες (**1** και **2**) συντέθηκαν από τη Δρ. Μ. Σαγνού στο εργαστήριο της Δρ. Μ. Πελεκάνου (Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών – Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό, ΕΚΕΦΕ, "Δημόκριτος").



Σχήμα 8: Σχηματική αναπαράσταση μοριακής δομής υποκαταστατών **1** και **2** (η αρίθμηση των ατόμων έγινε για την απόδοση των κορυφών στο NMR)

- **N-(4-(βενζοθειαζολ-2-υλο)φαινυλ-2-((1,2-διυδροπυριδino-2-υλο)μεθυλ)αμινο)ακεταμιδίου** (υποκαταστάτης **1** μοριακού βάρους 374,46)
- **N-(4-(βενζοθειαζολ-2-υλο)φαινυλ-5-((1,2-διυδροπυριδino-2-υλο)μεθυλ)αμινο)πενταναμίδιο** (υποκαταστάτης **2** μοριακού βάρους 416,54)
- **K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>, Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O** (Alfa Aesar)
- **H<sub>2</sub>O** (Milli-Q plus της Millipore)
- **DMSO** (Serva, Research grade)

- **CD<sub>3</sub>OD, DMSO-d<sub>6</sub>** (Sds 99,90%)
- **KBr** (Merck)
- **Σύμπλοκα Pd-1, Pt-1, Cu-1 και Pd-2, Pt-2, Cu-2**
- **Calf Thymus DNA** (φυσικό DNA θύμου αδένος βοοειδούς τύπου II, μετά νατρίου άλας και 42% σε GC, Sigma)
- **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** (Fluka)
- **NaCl** (Merck)
- **DMSO** (Serva, Research grade)
- **EtBr** (Sigma)
- **H<sub>2</sub>O** (απιοντισμένο, από τη συσκευή απιοντισμού ύδατος Milli-Q plus Millipore)
- **Θρεπτικό υλικό D-MEM** (Biochrom AG)
- **Θρυψίνη-EDTA 0,05 %** (Biochrom AG)
- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS** (Biochrom AG)
- **Ορός εμβρύου μόσχου FBS** (PAA Laboratories)
- **L-Γλουταμίνη** (PAA Laboratories)
- **Πενικιλίνη - Στρεπτομυκίνη** (Biochrom AG)
- **MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)** (Applichem)
- **CH<sub>3</sub>OH και DMSO** (Aldrich Chemical Co.)
- **π-φαινυλενοδιαμίνη- antifade solution** (PAA Laboratories)

## 5.2 Μεθοδολογία

### 5.2.1 Δομικός χαρακτηρισμός με φασματοσκοπικές μελέτες

Ο χαρακτηρισμός της δομής των υπό αξιολόγηση ενώσεων έγινε κυρίως με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Τα ανωτέρω δεδομένα επιβεβαιώθηκαν με φάσματα υπερύθρου (IR), με μετρήσεις μάζας (MS), απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και εκπομπής. Για την λήψη των φασμάτων NMR, παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης ~ 2 mg/mL σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφίδιο (DMSO-d<sub>6</sub>) στους 25 °C. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μίας διάστασης (<sup>1</sup>H στα 500,13 MHz και <sup>13</sup>C στα 125,77 MHz), δύο διαστάσεων ομοπυρηνικής συσχέτισης (COSY) και ετεροπυρηνικής συσχέτισης (HSQC και HMBC). Η λήψη των φασμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος XWinNMR ενώ για την επεξεργασία αυτών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MestReC Lite. Η κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων ρυθμίστηκε με ένωση αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) και δίνεται σε ppm.

Τα φάσματα IR πραγματοποιήθηκαν με την χρήση δισκίων KBr στην περιοχή 200–4000 cm<sup>-1</sup>, ενώ για την καταγραφή των φασμάτων μάζας (ESI-MS) τα δείγματα διαλύθηκαν σε DMSO και μελετήθηκαν στην περιοχή 250-1400 m/z. Για την λήψη των φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής, οι ενώσεις διαλύθηκαν επίσης σε DMSO και χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Τα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν στην περιοχή 200-500 nm και εντοπίστηκε το μήκος κύματος στο οποίο η κάθε ένωση παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση, ούτως ώστε εκεί να γίνει η διέγερση στα φάσματα εκπομπής.

Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων του Cu(II) με τους υποκαταστάτες πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους IR, EPR, MS, UV-Vis. Για την λήψη των φασμάτων X-band EPR, τα στερεά δείγματα διαλύθηκαν σε DMSO και ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία συνεχούς κύματος, σε θερμοκρασία υγρού ηλίου (15K), με συχνότητα 9,43 GHz. Οι μελέτες για τον υπολογισμό της στοιχειομετρίας των συμπλόκων του Cu(II) έγινε με τη μέθοδο συνεχών μεταβολών (μέθοδος Job), λαμβάνοντας φάσματα UV-Vis. Η επεξεργασία

των πειραματικών δεδομένων έγινε με την χρήση του προγράμματος OriginPro 9.0.

## 5.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων CT-DNA

- **Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων**

**Παρασκευή αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ .** Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 1,7867 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  και αραιώνονται με απιοντισμένο νερό milli-Q σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα Α). Έπειτα ζυγίζονται 0,9073 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  και αραιώνονται ομοίως με νερό milli-Q σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα Β). Εν συνεχεία αναμιγνύονται 58,7 mL του διαλύματος Α και 41,3 mL του διαλύματος Β σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζεται το αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ , το οποίο έχει pH~7 και μετρίεται κάθε φορά πριν τη χρήση του.

**Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος για την διάλυση του DNA.** Μεταφέρονται 10 mL του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται με απιοντισμένο νερό milli-Q σε αναλογία 1:10.

**Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10 με  $\text{Na}^+$ , 0,1 M σε NaCl.** Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 0,5844 gr NaCl και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και η φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το παρασκευασθέν ρυθμιστικό διάλυμα DNA 1:10 (διάλυμα Γ).

**Παρασκευή διαλύματος DNA.** Ζυγίζονται περίπου 5 mg φυσικό DNA θύμου αδένα βοοειδούς και προστίθενται σε αυτά 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10 με  $\text{Na}^+$  (διάλυμα Γ). Η αναλογία  $[\text{Na}^+]/[\text{DNA}]=100/1$ , είναι επιβεβλημένη έτσι ώστε η όποια μεταβολή της Β-δομής του DNA να μην οφείλεται στα ιόντα  $\text{Na}^+$ . Το διάλυμα τοποθετείται σε φιαλίδιο και αφήνεται για μία νύκτα σε ήπια ανάδευση στο σκοτάδι. Το παραπάνω πυκνό διάλυμα του DNA αραιώνεται σε αναλογία 1:20 παίρνοντας κάθε φορά τις κατάλληλες ποσότητες πυκνού διαλύματος και ρυθμιστικού, ανάλογα με την ποσότητα που θέλουμε να παρασκευάσουμε.

### 5.3 Μεθοδολογία πειραμάτων αλληλεπίδρασης με CT-DNA

Στην παρούσα διατριβή η μελέτη της αλληλεπίδρασης των υπό αξιολόγηση ενώσεων με DNA (CT-DNA) αξιολογήθηκε με την χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών ηλεκτρονικής απορρόφησης ορατού-υπεριώδους, φθορισμομετρίας, κυκλικού διχρωϊσμού, καμπυλών θερμικής μετουσίωσης και με την υδροδυναμική μέθοδο της ιξωδομετρίας. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,05 M, pH = 7,2) τα οποία περιέχουν  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Υποκεφάλαιο 7.1.3) και ήταν ελεύθερα πρωτεΐνης όπως επιβεβαιώθηκε από την αναλογία 1,9 : 1 των UV κορυφών στα 260 nm και 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA ανά νουκλεοτίδιο υπολογίστηκε φασματοφωτομετρικά με τη χρήση του συντελεστού μοριακής απορροφητικότητας  $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  στα 260 nm [171].

Το πυκνό διάλυμα DNA διατηρήθηκε στους 4 °C και δεν χρησιμοποιήθηκε πέραν του διαστήματος των 4 ημερών. Τα αντίστοιχα πυκνά διαλύματα των υποκαταστατών και των αντίστοιχων συμπλόκων (συγκέντρωσης  $10^{-3}$  M σε DMSO) διατηρήθηκαν στους 0 – 4 °C απουσία φωτός. Όλες οι υπό μελέτη ενώσεις είναι σταθερές στο DMSO, όπως διαπιστώθηκε από μελέτες σταθερότητας που παραγματοποιήθηκαν με την χρήση  $^1\text{H}$  NMR. Πριν από κάθε πείραμα τα μίγματα των υπό μελέτη ενώσεων με το DNA επωάστηκαν για 24 h στους 25 °C μέχρι να αποκατασταθεί η ισορροπία. Κάθε πειραματικό αποτέλεσμα της εν λόγω μελέτης προέρχεται από τον μέσο όρο 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

#### 5.3.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

Οι μελέτες τιτλοδότησης των υπό αξιολόγηση ενώσεων με DNA πραγματοποιήθηκαν με την λήψη φασμάτων ηλεκτρονικής απορρόφησης στην περιοχή 200 - 600 nm στους 25 °C, με την χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Τα προς μέτρηση διαλύματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (DMSO = 1%), διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση των υπό μελέτη ενώσεων ( $10^{-5}$  M) και μεταβάλλοντας την



συγκέντρωση του DNA ( $0 - 10^{-3}$ ) έτσι ώστε να προκύψουν οι αναλογίες  $R = [\text{ένωση}]/[\text{DNA}] = 0, 0,01, 0,02, 0,2, 0,5, 1, 2, 10$ . Τα φάσματα UV που ελήφθησαν, επεξεργάστηκαν με την χρήση των προγραμμάτων Cary WinUV software και OriginPro 9.0. Η σταθερά σύνδεσης  $K_b$  η οποία είναι χαρακτηριστική της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA υπολογίζεται με την βοήθεια της Εξίσωσης (1) [172, 173] :

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

όπου  $[\text{DNA}]$  είναι η συγκέντρωση του DNA ανά ζεύγη βάσεων,  $\varepsilon_a$  είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της παρατηρούμενης κορυφής στη συγκεκριμένη κάθε φορά συγκέντρωση DNA (που αναφέρεται στο λόγο  $A_{\text{obs}}/[\text{ένωση}]$ ),  $\varepsilon_f$  είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της μη δεσμευμένης ένωσης στο διάλυμα και  $\varepsilon_b$  ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της πλήρως δεσμευμένης ένωσης στο DNA. Η γραφική παράσταση  $[\text{DNA}]/[\varepsilon_a - \varepsilon_f]$  συναρτήσει του  $[\text{DNA}]$  έχει ως κλίση τον όρο  $1/[\varepsilon_a - \varepsilon_f]$  και ως τεταγμένη τον όρο  $1/K_b[\varepsilon_b - \varepsilon_f]$ . Η σταθερά σύνδεσης  $K_b$  προκύπτει από το λόγο της κλίσης προς την τεταγμένη. Η μέθοδος γραμμικής ανάλυσης ελαχίστων τετραγώνων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προγράμματος OriginPro 9.0.

### 5.3.2 Φασματοσκοπία φθορισμού

Οι μελέτες τιτλοδότησης των υπό αξιολόγηση ενώσεων με DNA πραγματοποιήθηκαν με την λήψη φασμάτων φθορισμού στην περιοχή 350-600 nm στους 25 °C. Η διέγερση έγινε στα 320 nm, ως ταχύτητα σάρωσης ορίστηκε η 300 nm/min και ως πλάτος σχισμής (εκπομπής και απορρόφησης) τα 2,5 nm. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (DMSO = 1%), διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση των υπό μελέτη ενώσεων ( $10^{-5}$  M) και μεταβάλλοντας την συγκέντρωση του DNA ( $0 - 10^{-3}$  M) έτσι ώστε να προκύψουν οι αναλογίες  $R = [\text{ένωση}]/[\text{DNA}] = 0, 0,01, 0,02, 0,2, 0,5, 1, 2, 10$ . Άλλη μια τεχνική που εφαρμόστηκε για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης είναι η φθορισμομετρία μέσω πειραμάτων ανταγωνισμού με το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Η τεχνική της φθορισμομετρίας μέσω πειραμάτων ανταγωνισμού με το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) χρησιμοποιείται

ευρέως στις μελέτες αλληλεπίδρασης με το DNA. Το EtBr είναι ένα επίπεδο μόριο που αν και δεν φθορίζει έντονα, η ένταση φθορισμού του αυξάνεται δραματικά όταν αλληλεπιδρά με το DNA, λόγω της παρεμβολής αυτού μεταξύ των ζευγών βάσεων της διπλής έλικας [174]. Η προσθήκη ενός δεύτερου μορίου, το οποίο ενδεχομένως να προσδένεται ισχυρότερα στο DNA έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της καταγραφόμενης έντασης φθορισμού η οποία πιθανόν να οφείλεται στον εκτοπισμό μορίων EtBr [175].

Εν συνεχεία, παρασκευάστηκαν διαλύματα (DNA-EtBr-ένωση), διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση του DNA ( $5 \cdot 10^{-5}$ ) και αυτή του EtBr ( $6,25 \cdot 10^{-6}$ ) και μεταβάλλοντας την συγκέντρωση της ένωσης ( $0 - 2 \cdot 10^{-5}$  M) έτσι ώστε να τηρηθούν οι αναλογίες  $R = [\text{ένωση}]/[\text{DNA-EtBr}] = 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,625, 0,875$ . Τα προς μέτρηση διαλύματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (DMSO = 2%) και παρέμειναν για επώαση 24 h. Η λήψη των φασμάτων έγινε στην περιοχή 530 – 900 nm στους 25 °C. Ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής επιλέχθησαν τα 526 nm και 590 nm αντίστοιχα, ως ταχύτητα σάρωσης τα 300 nm/min και ως πλάτος σχισμής (εκπομπής και απορρόφησης) τα 2,5 nm.

Η ικανότητα των υπό μελέτη ενώσεων να μειώνουν την ένταση εκπομπής του συστήματος DNA-EtBr, αξιολογήθηκε με την βοήθεια της Εξίσωσης Stern-Volmer (2), όπου και υπολογίστηκε η σταθερά  $K_{sv}$  [176, 177]:

$$F_0/F = 1 + K_{sv} \cdot [Q] \quad (2)$$

όπου  $F_0$  και  $F$  είναι η μετρούμενη ένταση φθορισμού απουσία και παρουσία των ενώσεων αντίστοιχα και  $[Q]$  είναι η ολική συγκέντρωση των ενώσεων-αποσβεστών. Επιπροσθέτως είναι δυνατόν να υπολογιστεί και η φαινόμενη σταθερά πρόσδεσης ( $K_{app}$ ) από την Εξίσωση 3 :

$$K_{EB} \cdot [EB] = K_{app} \cdot [Q] \quad (3)$$

όπου  $[Q]$  είναι η συγκέντρωση του αποσβέστη που προκαλεί μείωση κατά 50% στην ένταση φθορισμού του συστήματος DNA-EtBr ( $K_{EB} = 1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  και  $[EB] = 6,25 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ). Τα φάσματα που προέκυψαν υπέστησαν επεξεργασία με την χρήση του προγράμματος OriginPro 9.0.

### 5.3.3 Φασματοπολωσιμετρία CD

Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού καταγράφηκαν στην περιοχή 180 - 400 nm στους 25 °C με την χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm και επιλέγοντας ταχύτητα σάρωσης 100 nm/min και χρόνο απόκρισης 1 s. Τα προς μέτρηση διαλύματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (DMSO = 2%), διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση του DNA ( $5 \times 10^{-5}$  M) και μεταβάλλοντας την συγκέντρωση των ενώσεων ( $0 - 2,5 \times 10^{-5}$  M) έτσι ώστε να προκύψουν οι αναλογίες  $R = [\text{ένωση}]/[\text{DNA}] = 0, 0,01, 0,02, 0,033, 0,05, 0,1, 0,2, 0,33, 0,5$ . Τα φάσματα που προέκυψαν προήλθαν από 4 διαδοχικές σαρώσεις και επεξεργάστηκαν με την χρήση των προγραμμάτων Jasco software package και OriginPro 9.0.

### 5.3.4 Μελέτες θερμικής μετουσίωσης

Για την λήψη των καμπυλών θερμικής μετουσίωσης, παρακολουθήθηκε η απορρόφηση του DNA στα 258 nm για περιοχή θερμοκρασιών 25 °C έως 95 °C, με αύξηση της θερμοκρασίας κατά 0,5 °C/min και με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Τα διαλύματα αφέθηκαν να φτάσουν σε ισορροπία για 1 min σε κάθε θερμοκρασία, ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν επίσης και ως ποσοστά της υπερχρωμικότητας (%h). Τα προς μέτρηση διαλύματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (DMSO=2%), διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση του DNA ( $5 \times 10^{-5}$  M) και μεταβάλλοντας την συγκέντρωση των ενώσεων ( $0 - 2,5 \times 10^{-5}$  M) έτσι ώστε να προκύψουν οι αναλογίες:  $R = [\text{ένωση}]/[\text{DNA}] = 0, 0,01, 0,02, 0,033, 0,05, 0,1, 0,2, 0,33, 0,5$ . Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων για κάθε λόγο έγιναν τρεις διαφορετικές μετρήσεις και ως σημεία τήξεως ελήφθησαν οι μέσοι όροι.

### 5.3.5 Μελέτες ιξωδομετρίας

Για την μελέτη της επίδρασης των ενώσεων στο ιξώδες του DNA χρησιμοποιήθηκε ιξωδόμετρο θερμοστατούμενο στους  $25,0 \pm 0,1$  °C εντός υδρόλουτρου. Ο χρόνος ροής κάθε διαλύματος μετρήθηκε με ψηφιακό

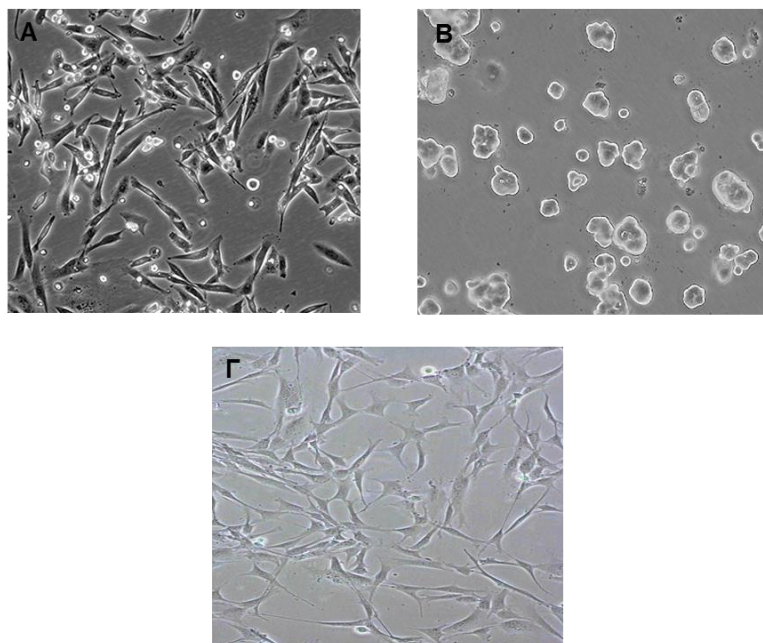
χρονόμετρο, ενώ πριν από κάθε μέτρηση τα διαλύματα περάστηκαν από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 1 μm έτσι ώστε να μην επηρεάζεται η μέτρηση από εξωτερικούς παράγοντες (π.χ σκόνη). Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (ποσοστό DMSO = 2%), διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση του DNA ( $5 \times 10^{-5}$  M) και μεταβάλλοντας την συγκέντρωση των ενώσεων ( $0 - 2,5 \times 10^{-5}$  M) έτσι ώστε να τηρηθούν οι αναλογίες  $R = [\text{ένωση}]/[\text{DNA}] = 0, 0,01, 0,02, 0,033, 0,05, 0,1, 0,2, 0,33, 0,5$ . Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων για κάθε λόγο έγιναν τρεις διαφορετικές μετρήσεις, οι οποίες δεν διαφέρουν περισσότερο από 0,2 s και ως τελικός χρόνος ελήφθη ο μέσος όρος. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος OriginPro 9.0.

## **5.4 Αρχές μεθόδων βιολογικής αξιολόγησης**

### **5.4.1 Κυτταρικές σειρές MCF-7, MDA-MB-231 και DSF**

Η κυτταρική σειρά MCF-7 συγκαταλέγεται στην κατηγορία του ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος μαστού και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1970 από μια Καυκάσια γυναίκα. Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα μαστού χαμηλής μεταστατικής ικανότητας και έχει αποδειχθεί ιδιαίτερως χρήσιμη για τις *in vitro* μελέτες του καρκίνου λόγω της ικανότητας να διατηρεί αρκετά επιθηλιακά χαρακτηριστικά του μαστού, όπως τη δυνατότητα των κυττάρων να επεξεργάζονται τα οιστρογόνα, με τη μορφή της οιστραδιόλης, μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Αυτό καθιστά την κυτταρική σειρά MCF-7 θετική σε υποδοχείς οιστρογόνων (ER+). Τα κύτταρα MCF-7 είναι ευαίσθητα σε κυτοκερατίνη και δεν αλληλεπιδρούν με την δεσμίνη, την ενδοθελίνη, την GAP και την βιμεντίνη. Όταν καλλιεργούνται *in vitro* σχηματίζουν θόλους και έτσι τα επιθηλιακά κύτταρα αναπτύσσονται σε μονοστοιβάδες (Εικόνα 28B). Η δημοτικότητα αυτής της κυτταρικής σειράς οφείλεται στην ιδιαίτερη ορμονική ευαισθησία που παρουσιάζουν μέσω της έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων (ER), αναδεικνύοντας την εξαιρετικό μοντέλο μελέτης ορμονικής απόκρισης.

Η κυτταρική σειρά MDA-MB-231 ανήκει στην κατηγορία του ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος μαστού και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1973 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο του Τέξας, MD Anderson Cancer Center. Θεωρείται ως μια άκρως επιθετική μορφή αδενοκαρκινώματος με μορφολογία επιθηλιακού κυττάρου όπου τα κύτταρα εμφανίζονται φαινοτυπικά ως ατρακτοειδή (Εικόνα 28Α). Χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο σύγκρισης in vitro πειραματικών δεδομένων διότι είναι τριπλά αρνητική σε υποδοχείς οιστρογόνων (ER-), προγεστερόνης (PR-) και επιδερμικών αυξητικών παραγόντων (HER-2-). Η φυσιολογική κυτταρική σειρά DSF χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να μελετηθούν τυχόν διαφοροποιήσεις που μπορεί να παρατηρηθούν μεταξύ καρκινικών και υγιών κυτταρικών σειρών [178]. Πρόκειται για φυσιολογικούς-υγείς ινοβλάστες που προέρχονται από το ανθρώπινο δέρμα. Τα κύτταρα αυτής της σειράς όπως και των περισσότερων ινοβλαστών γερνάνε μετά από 50 με 60 κυτταρικούς κύκλους [179].



**Εικόνα 28: Μορφολογία κυττάρων καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 (Α), MCF-7 (Β) και φυσιολογικής κυτταρικής σειράς ινοβλαστών δέρματος DSF (Γ)**

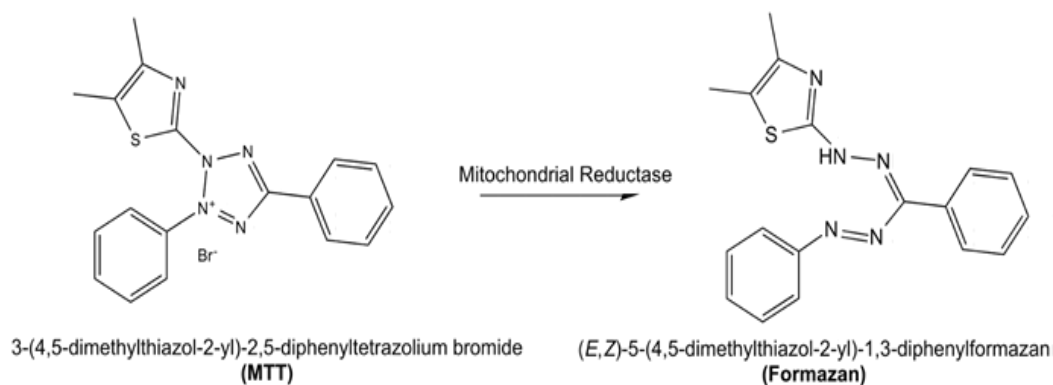
#### **5.4.2 Μελέτη κυτταρικής πρόσληψης**

Η μελέτη κυτταρικής πρόσληψης μας δίνει την δυνατότητα να διαπιστώσουμε κατά πόσο οι υπό αξιολόγηση ενώσεις καταφέρουν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και να εισέλθουν εντός του κυττάρου. Επιπλέον μπορούμε να συγκρίνουμε το βαθμό που εισέρχονται ενδοκυτταρικά και να διαπιστώσουμε πιθανό εντοπισμό σε συγκεκριμένες περιοχές-οργανίδια του κυττάρου. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η μελέτη κυτταρικής πρόσληψης έγινε με την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού. Τα πλεονεκτήματα της συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού είναι ότι μας δίνεται η δυνατότητα καταγραφής εικόνων υψηλής ανάλυσης χωρίς τη παρέμβαση του διαθλώμενου φωτός. Με αυτή τη μέθοδο δημιουργούνται οπτικές τομές των κυττάρων οι οποίες τοποθετούνται η μία πάνω στη άλλη, οι λεγόμενες Z-στοιβάδες και συνδυάζονται έτσι ώστε να δημιουργηθεί μια τρισδιάστατη εικόνα από την οποία μπορούν να προσδιοριστούν οι περιοχές του κυττάρου που εντοπίζονται οι ενώσεις [180].

#### **5.4.3 Μελέτη in vitro κυτταροτοξικότητας (μέθοδος MTT)**

Η μέθοδος MTT είναι μια χρωματομετρική δοκιμασία που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας υποψήφιων φαρμάκων σε κυτταρικές σειρές, αφού σχετίζεται με την κυτταρική αναπνοή. Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει την ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό άλας του τετραζολίου (thiazolyl blue tetrazolium bromide-MTT) σε αδιάλυτο ίζημα φορμαζάνης. Συγκεκριμένα, τα άλατα του τετραζολίου λαμβάνουν ηλεκτρόνια από οξειδωμένα υποστρώματα ή από τα ένζυμα NADPH και NADH (Σχήμα 9). Οι μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης που σχηματίζονται ύστερα από τέσσερις ώρες επώασης στα κύτταρα, διαλύονται σε έναν οργανικό διαλύτη και μετράται η απορρόφηση σε φασματοφωτομέτρο στα 540 nm έχοντας ως μήκος κύματος αναφοράς 620 nm. Οι τιμές IC<sub>50</sub> (η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ένωσης που απαιτείται για τη μείωση κατά 50% της επιβίωσης των κυττάρων του μάρτυρα-control) υπολογίζονται από τις καμπύλες συγκέντρωσης και χρησιμοποιούνται ως μέτρο της κυτταρικής ευαισθησίας σε μια δεδομένη θεραπεία [181]. Τα πλεονεκτήματα της

δοκιμασίας MTT συγκριτικά με άλλες παρόμοιες δοκιμασίες είναι ότι απαιτείται λιγότερος χρόνος, είναι σχετικά φθηνή μέθοδος και λόγω της χρήσης του φασματοφωτομέτρου επιτρέπεται η ταυτόχρονη μέτρηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.



**Σχήμα 9: Αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

#### 6.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός υποκαταστατών 1 και 2

Η συνθετική πορεία των υποκαταστατών 1 και 2 περιγράφεται λεπτομερώς στην βιβλιογραφία [182].

**1:** IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1675, 1600, 1585, 1563, 1526, 1520, 1504, 1475, 1429, 1402.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , ppm): 8,53 (H-1), 7,26 (H-2), 7,70 (H-3), 7,46 (H-4), 3,87 (H-6), 3,40 (H-7a), 7,84 (H-10/H-14), 8,05 (H-11/H-13), 8,11 (H-17), 7,43 (H-18), 7,53 (H-19), 8,02 (H-20), 10,29 (CONH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , ppm): 148,91 (C-1), 122,13 (C-2), 136,67 (C-3), 122,07 (C-4), 159,78 (C-5), 54,24 (C-6), 52,40 (C-7a), 170,77 (C-8), 141,59 (C-9), 119,46 (C-10/C-14), 128,07 (C-11/C-13), 127,67 (C-12), 167,04 (C-15), 134,32 (C-16), 122,32 (C-17), 125,32 (C-18), 126,64 (C-19), 122,62 (C-20), 153,67 (C-21). ESI-MS (m/z): υπολογισθέν  $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{OS} + \text{H}]^+$  375,1623, ευρεθέν: 375,1269.

**2:** IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1676, 1600, 1585, 1563, 1528, 1500, 1476, 1429, 1403.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , ppm): 8,63 (H-1), 7,42 (H-2), 7,88 (H-3), 7,49 (H-4), 4,29 (H-6), 2,99 (H-7a), 1,66 (H-7b), 1,69 (H-7c), 2,41 (H-7d), 7,80 (H-10/H-14), 8,04 (H-11/H-13), 8,11 (H-17), 7,44 (H-18), 7,53 (H-19), 8,01 (H-20), 10,27 (CONH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , ppm): 149,09 (C-1), 123,62 (C-2), 137,39 (C-3), 122,55 (C-4), 152,43 (C-5), 50,52 (C-6), 46,90 (C-7a), 25,21 (C-7b), 22,00 (C-7c), 35,75 (C-7d), 171,39 (C-8), 142,02 (C-9), 119,32 (C-10/C-14), 128,01 (C-11/C-13), 127,50 (C-12), 167,02 (C-15), 134,26 (C-16), 122,24 (C-17), 125,30 (C-18), 126,62 (C-19), 122,55 (C-20), 153,62 (C-21). ESI-MS (m/z): υπολογισθέν  $[\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{OS} + \text{H}]^+$  417,2428, ευρεθέν: 417,1742.



## 6.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκων Pt(II) και Pd(II)

Τα σύμπλοκα [PtCl<sub>2</sub>(1)] (**Pt-1**), [PdCl<sub>2</sub>(1)] (**Pd-1**), [PtCl<sub>2</sub>(2)] (**Pt-2**) και [PdCl<sub>2</sub>(2)] (**Pd-2**) προήλθαν από την ανάμειξη των υποκαταστατών **1** και **2** με ισομοριακές ποσότητες K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> ή K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>. Τα προϊόντα παραλήφθηκαν σε ικανοποιητική απόδοση υπό την μορφή σκόνης και χαρακτηρίστηκαν πλήρως με φασματοσκοπικές μεθόδους. Τα σύμπλοκα είναι σταθερά στον αέρα για μακρά χρονική περίοδο και πλήρως διαλυτά σε DMSO, DMF, εν μέρει διαλυτά σε ακετόνη, χλωροφόρμιο και ελάχιστα διαλυτά σε νερό, μεθανόλη, αιθανόλη και ακετονιτρίλιο.

### 6.2.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου Pd-1

Παρασκευάστηκαν διαλύματα υποκαταστάτη **1** (50 mg, 0,13 mmol) σε 5 mL μεθανόλη και K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> (43,6 mg, 0,13 mmol) σε 5 mL διαλύματος νερό:μεθανόλη (1:0,2). Τα ανωτέρω αναμείχθηκαν και έμειναν υπό ανάδευση, απουσία φωτός σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ημέρες. Το ερυθρό-καφέ ίζημα που προέκυψε, διηθήθηκε υπό κενό, εκπλύθηκε με κρύο απεσταγμένο νερό, αιθανόλη, κρύα ακετόνη και ξηράνθηκε υπό κενό για μια νύχτα. Απόδοση: 59%. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1677, 1610, 1593, 1571, 1537, 1520, 1479, 1429, 1402. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 8,79 (H-1), 7,53 (H-2), 8,07 (H-3), 7,66 (H-4), 4,45/4,38 (H-6), 3,81/4,05 (H-7a), 7,79 (H-10/H-14), 8,07 (H-11/H-13), 8,12 (H-17), 7,44 (H-18), 7,53 (H-19), 8,02 (H-20), 6,86 (NH), 10,60 (CONH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 148,61 (C-1), 123,86 (C-2), 139,98 (C-3), 121,93 (C-4), 163,46 (C-5), 60,00 (C-6), 54,57 (C-7a), 166,38 (C-8), 141,30 (C-9), 119,55 (C-10/C-14), 128,15 (C-11/C-13), 127,98 (C-12), 166,94 (C-15), 134,33 (C-16), 122,32 (C-17), 125,38 (C-18), 126,67 (C-19), 122,65 (C-20), 153,65 (C-21). ESI-MS (m/z): υπολογισθέν [C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>OSCl<sub>2</sub>Pd - Cl]<sup>+</sup> 515,0272, ευρεθέν: 514,9933.

### 6.2.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου Pd-2

Παρασκευάστηκαν διαλύματα υποκαταστάτη **2** (50 mg, 0,12 mmol) σε 5 mL μεθανόλη και  $K_2PdCl_4$  (39,2 mg, 0,12 mmol) σε 5 mL διαλύματος νερό:μεθανόλη (1:0,2). Τα ανωτέρω αναμείχθηκαν και έμειναν υπό ανάδευση, απουσία φωτός σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ημέρες. Το καφετί ίζημα που προέκυψε, διηθήθηκε υπό κενό, εκπλύθηκε με κρύο απεσταγμένο νερό, αιθανόλη, κρύα ακετόνη και ξηράνθηκε υπό κενό για μια νύχτα. Απόδοση: 62%. IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1674, 1610, 1595, 1571, 1539, 1520, 1479, 1429, 1404.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , ppm): 8,73 (H-1), 7,50 (H-2), 8,04 (H-3), 7,63 (H-4), 4,49/4,0 (H-6), 2,76 (H-7a), 1,62/1,88 (H-7b), 1,62 (H-7c), 2,36 (H-7d), 7,76 (H-10/H-14), 8,02 (H-11/H-13), 8,10 (H-17), 7,43 (H-18), 7,53 (H-19), 8,01 (H-20), 6,49 (NH), 10,21 (CONH).  $^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , ppm): 148,91 (C-1), 123,95 (C-2), 140,05 (C-3), 122,26 (C-4), 163,60 (C-5), 58,95 (C-6), 53,17 (C-7a), 26,96 (C-7b), 22,39 (C-7c), 36,04 (C-7d), 171,47 (C-8), 142,07 (C-9), 119,37 (C-10/C-14), 128,02 (C-11/C-13), 127,48 (C-12), 167,09 (C-15), 134,31 (C-16), 122,26 (C-17), 125,31 (C-18), 126,64 (C-19), 122,59 (C-20), 153,67 (C-21). ESI-MS (m/z): υπολογισθέν  $[C_{24}H_{24}N_4OSCl_2Pd - Cl]^+$  557,1073, ευρεθέν: 557,0392.

### 6.2.3 Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου Pt-1

Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε είναι παρόμοια με αυτή του συμπλόκου **Pd-1**. Το πορτοκαλί ίζημα που προέκυψε, διηθήθηκε υπό κενό, εκπλύθηκε με κρύο απεσταγμένο νερό, μεθανόλη, κρύα ακετόνη και ξηράνθηκε υπό κενό για μια νύχτα. Απόδοση = 61%. IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1690, 1680, 1571, 1535, 1532, 1518, 1473, 1430, 1405.  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , ppm): 9,08 (H-1), 7,52 (H-2), 8,14 (H-3), 7,69 (H-4), 4,50/4,33 (H-6), 3,81/4,23 (H-7a), 7,80 (H-10/H-14), 8,07 (H-11/H-13), 8,12 (H-17), 7,44 (H-18), 7,53 (H-19), 8,02 (H-20), 7,34 (NH), 10,72 (CONH).  $^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , ppm): 147,03 (C-1), 124,30 (C-2), 139,05 (C-3), 122,09 (C-4), 164,12 (C-5), 61,25 (C-6), 56,01 (C-7a), 166,41 (C-8), 141,29 (C-9), 119,59 (C-10/C-14), 128,15 (C-11/C-13), 128,01 (C-12), 166,95 (C-15), 134,34 (C-16), 122,34 (C-17), 125,40 (C-18), 126,70 (C-19), 122,66 (C-20), 153,64 (C-21). ESI-MS (m/z): υπολογισθέν  $[C_{21}H_{18}N_4OSCl_2Pt + H]^+$  640,0653, ευρεθέν: 640,0458.

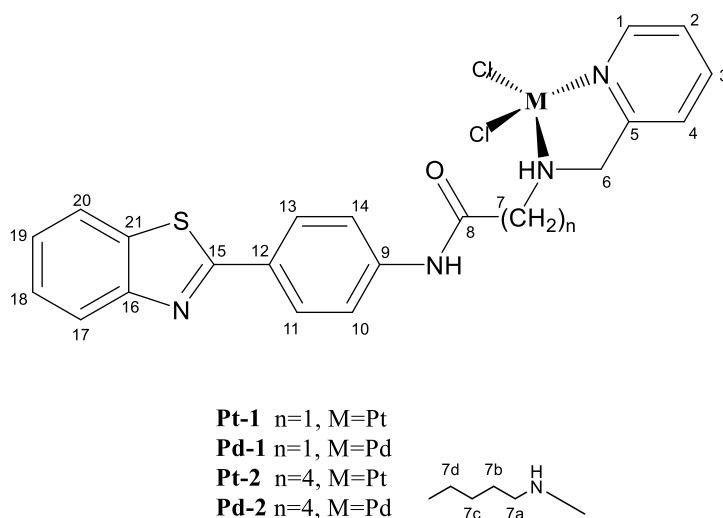
#### 6.2.4 Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου Pt-2

Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε είναι παρόμοια με αυτή του συμπλόκου **Pd-2**. Το κεραμιδί ίζημα που προέκυψε, διηθήθηκε υπό κενό, εκπλύθηκε με κρύο απεσταγμένο νερό, μεθανόλη, κρύα ακετόνη και ξηράνθηκε υπό κενό για μια νύχτα. Απόδοση = 65%. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1690, 1683, 1571, 1539, 1532, 1520, 1473, 1432, 1407.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , ppm): 9,01 (H-1), 7,49 (H-2), 8,09 (H-3), 7,64 (H-4), 4,34/4,10 (H-6), 2,78 (H-7a), 1,85/1,60 (H-7b), 1,60 (H-7c), 2,35 (H-7d), 7,76 (H-10/H-14), 8,01 (H-11/H-13), 8,09 (H-17), 7,43 (H-18), 7,52 (H-19), 8,00 (H-20), 7,08 (NH), 10,27 (CONH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , ppm): 147,43 (C-1), 124,49 (C-2), 139,13 (C-3), 122,33 (C-4), 163,77 (C-5), 60,28 (C-6), 54,38 (C-7a) 26,49 (C-7b), 22,27 (C-7c), 36,11 (C-7d), 171,59 (C-8), 142,16 (C-9), 119,41 (C-10/C-14), 128,06 (C-11/C-13), 127,50 (C-12), 167,16 (C-15), 134,34 (C-16), 122,33 (C-17), 125,38 (C-18), 126,71 (C-19), 122,63 (C-20), 153,70 (C-21). ESI-MS (m/z): υπολογισθέν  $[\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{OSCl}_2\text{Pt} + \text{H}]^+$  682,1453, ευρεθέν: 682,0472.

### 6.3 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού συμπλόκων Pd(II) και Pt(II)

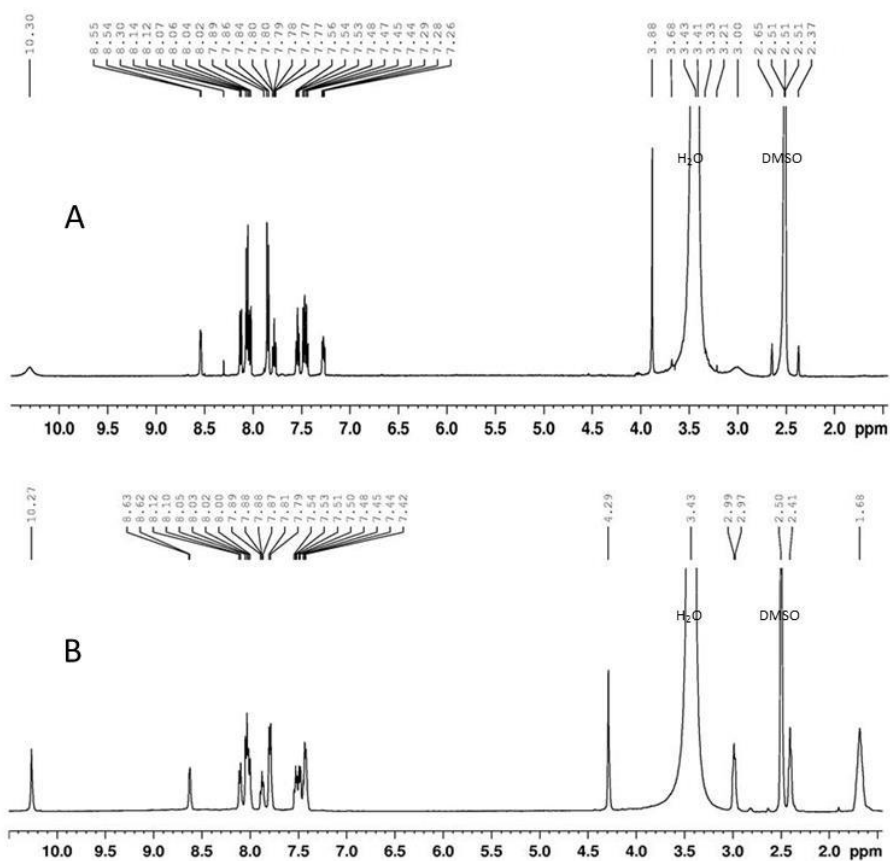
#### 6.3.1 Φάσματα NMR

Ο χαρακτηρισμός της δομής των υποκαταστατών **1** και **2** και των αντίστοιχων συμπλόκων με Pd(II) και Pt(II) που συνετέθησαν στην παρούσα εργασία έγινε κυρίως με φασματοσκοπία NMR. Η απόδοση των κορυφών  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  στα φάσματα NMR μίας διάστασης βασίστηκε στη μελέτη φασμάτων δύο διαστάσεων (2D NMR) και φασμάτων ομοπυρηνικής/ετεροπυρηνικής ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) συσχέτισης. Οι χημικές μετατοπίσεις δίδονται στον Πίνακα 4 του Παραρτήματος I. Η αρίθμηση των ατόμων δίνεται στο Σχήμα 10.



**Σχήμα 10: Γενική δομή συμπλόκων Pd(II) και Pt(II)**

Η συμπλοκοποίηση των υποκαταστατών έχει ως αποτέλεσμα τα πρωτόνια H-1, H-2, H-3 και H-4 της πυριδίνης να καθίστανται λιγότερο προστατευμένα, μετατοπιζόμενα προς χαμηλά πεδία (downfield). Το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο στην περίπτωση των συμπλόκων του Pt(II) (Σχήμα 11, 12). Επιπροσθέτως, τα πρωτόνια του C6 που εμφανίζονται ως μία κορυφή στα φάσματα των υποκαταστατών, διαφοροποιούνται μεταξύ τους στα σύμπλοκα και εμφανίζονται ως δύο ξεχωριστές κορυφές. Η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία (downfield) είναι πιο έντονη στην περίπτωση των συμπλόκων του υποκατάστατη **1**. Οι προαναφερόμενες χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων στα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR καταδεικνύουν ότι η συμπλοκοποίηση των υποκαταστατών **1** και **2** με τα ιόντα Pd(II) και Pt(II) γίνεται μέσω των ατόμων αζώτου της δευτεροταγούς αμίνης και της πυριδίνης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός πενταμελούς χηλικού δακτυλίου.

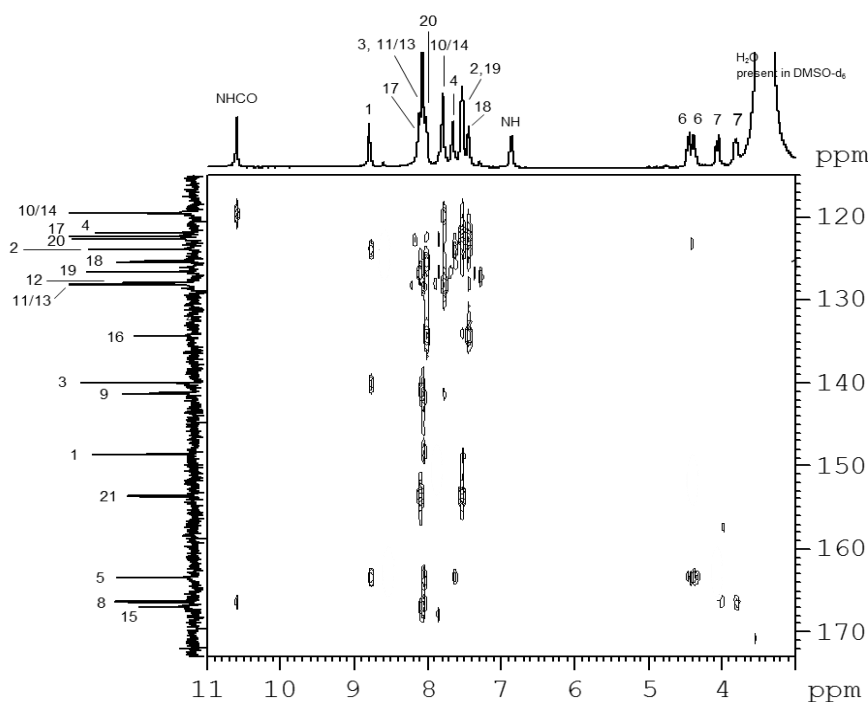


Σχήμα 11:  $^1\text{H}$  NMR φάσμα των υποκαταστατών **1** (A) και **2** (B) σε  $\text{DMSO-d}_6$  στους  $25\text{ }^\circ\text{C}$  στη περιοχή 10,50 - 1,45 ppm

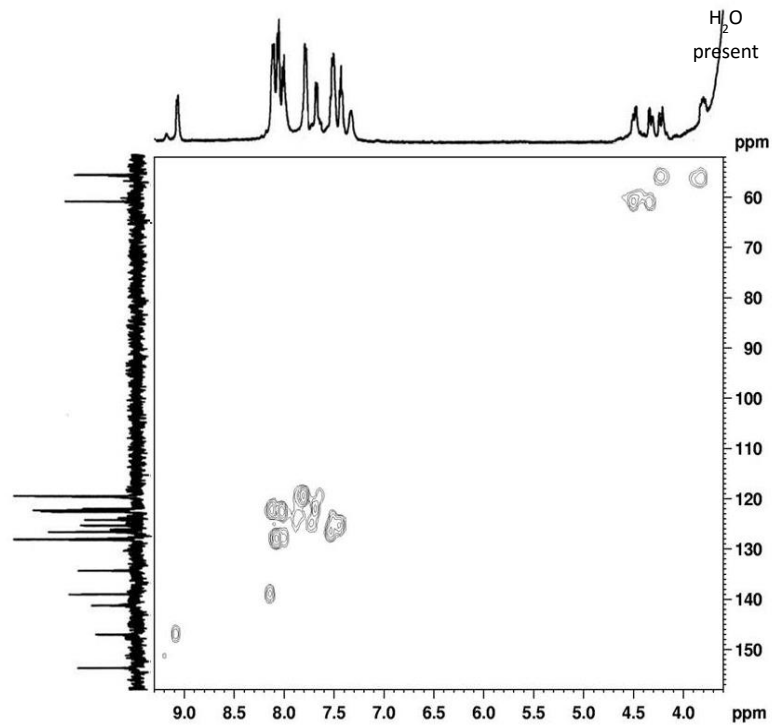
Οι μετατοπίσεις των κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της ομάδας του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου δεν μεταβάλλονται σημαντικά μετά την συμπλοκοποίηση με τα μεταλλικά ιόντα. Εξάιρεση αποτελεί το πρωτόνιο της ομάδας του καρβοξαμιδίου ( $\text{NHCO}$ ) που εμφανίζει ηλεκτρονική αποθωράκιση στην περίπτωση των συμπλόκων του υποκαταστάτη **1** (μετατόπιση κατά 0,3 ppm στην περίπτωση του **Pd-1** και κατά 0,4 ppm στην περίπτωση του **Pt-1**) κάτι που δεν παρατηρείται στα σύμπλοκα του υποκαταστάτη **2** (Σχήμα 14). Η ανωτέρω παρατήρηση φανερώνει το σημαντικό ρόλο του μήκους της συνδετικής αλυσίδας ( $n$ ) που καθορίζει την απόσταση της βιοδραστικής φαρμακοφόρου ομάδας από τον μεταλλικό πυρήνα. Τα πρωτόνια της δευτεροταγούς αμίνης ( $\text{NH}$ ) των υποκαταστατών **1** και **2** δεν είναι εμφανή στα

φάσματα NMR, αντιθέτως όμως στα σύμπλοκα καθίστανται ορατά. Το γεγονός ότι δεν λαμβάνει χώρα η αποπρωτονίωση της δευτεροταγούς αμίνης καθιστά τα σύμπλοκα ηλεκτρικώς ουδέτερα.

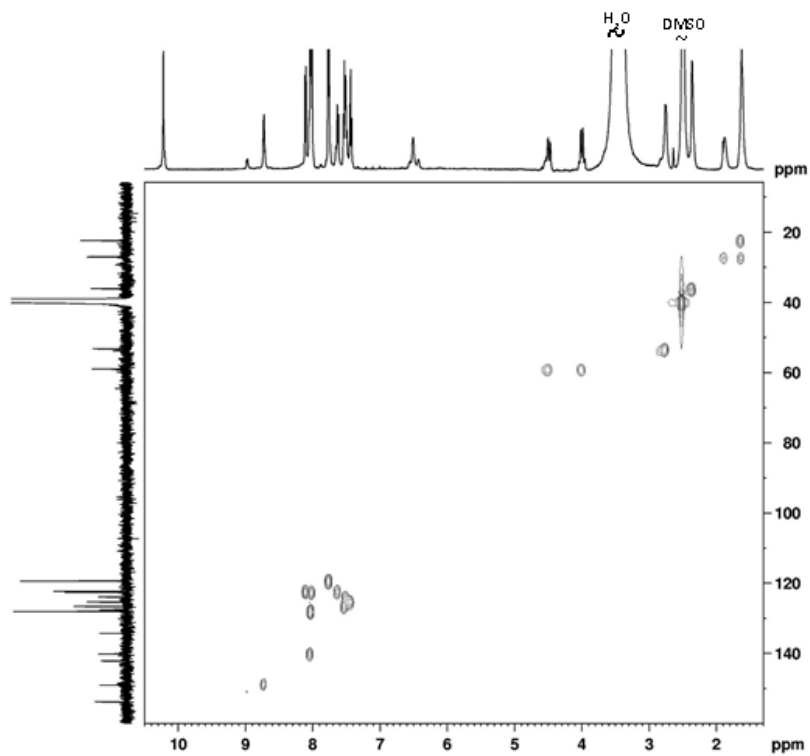
Η απόδοση των κορυφών στα φάσματα  $^{13}\text{C}$ -NMR παρουσιάζεται στο Πίνακα Β του Παραρτήματος Ι. Παρατηρούμε ότι οι κορυφές που αποδίδονται στους άνθρακες C-5 και C-6 μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία (downfield). Η συγκεκριμένη χημική μετατόπιση ( $\Delta\delta$ ) είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση των συμπλόκων του υποκαταστάτη **2** και ιδιαίτερα για το σύμπλοκο **Pt-2** έφτασε την τιμή των 11,3 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών που αποδίδονται στην ομάδα του 2-(4'-φαινυλο)βενζοθειαζολίου δεν επηρεάζονται σημαντικά από την συμπλοκοποίηση. Μοναδική εξαίρεση αποτελούν οι άνθρακες C-8 και C-9 των συμπλόκων του υποκαταστάτη **1** που μετατοπίζονται σε υψηλότερα πεδία (upfield). Αντιθέτως, στην περίπτωση των συμπλόκων του υποκαταστάτη **2** οι άνθρακες C-8 και C-9 παραμένουν σχετικά ανεπηρέαστοι από την συμπλοκοποίηση, γεγονός που καταδεικνύει την επίδραση που έχει η απόσταση της ομάδας του καρβοξαμιδίου (NHCO) από τον χηλικό δακτύλιο, στις ιδιότητες του αμιδικού δεσμού.



Σχήμα 12: HMBC φάσμα συμπλόκου Pd-1 ( $^1\text{H}$  περιοχή 11 - 3 ppm,  $^{13}\text{C}$  περιοχή 173 - 115 ppm) σε  $\text{DMSO-d}_6$  στους 25 °C



Σχήμα 13: HSQC φάσμα συμπλόκου Pt-1 ( $^1\text{H}$  περιοχή 9,3 – 3,6 ppm,  $^{13}\text{C}$  περιοχή 158 - 52 ppm) σε  $\text{DMSO-d}_6$  στους 25 °C



Σχήμα 14: HSQC φάσμα συμπλόκου Pd-2 ( $^1\text{H}$  περιοχή 10,5 – 1,3 ppm,  $^{13}\text{C}$  περιοχή 160 - 6 ppm) σε  $\text{DMSO-d}_6$  στους 25 °C

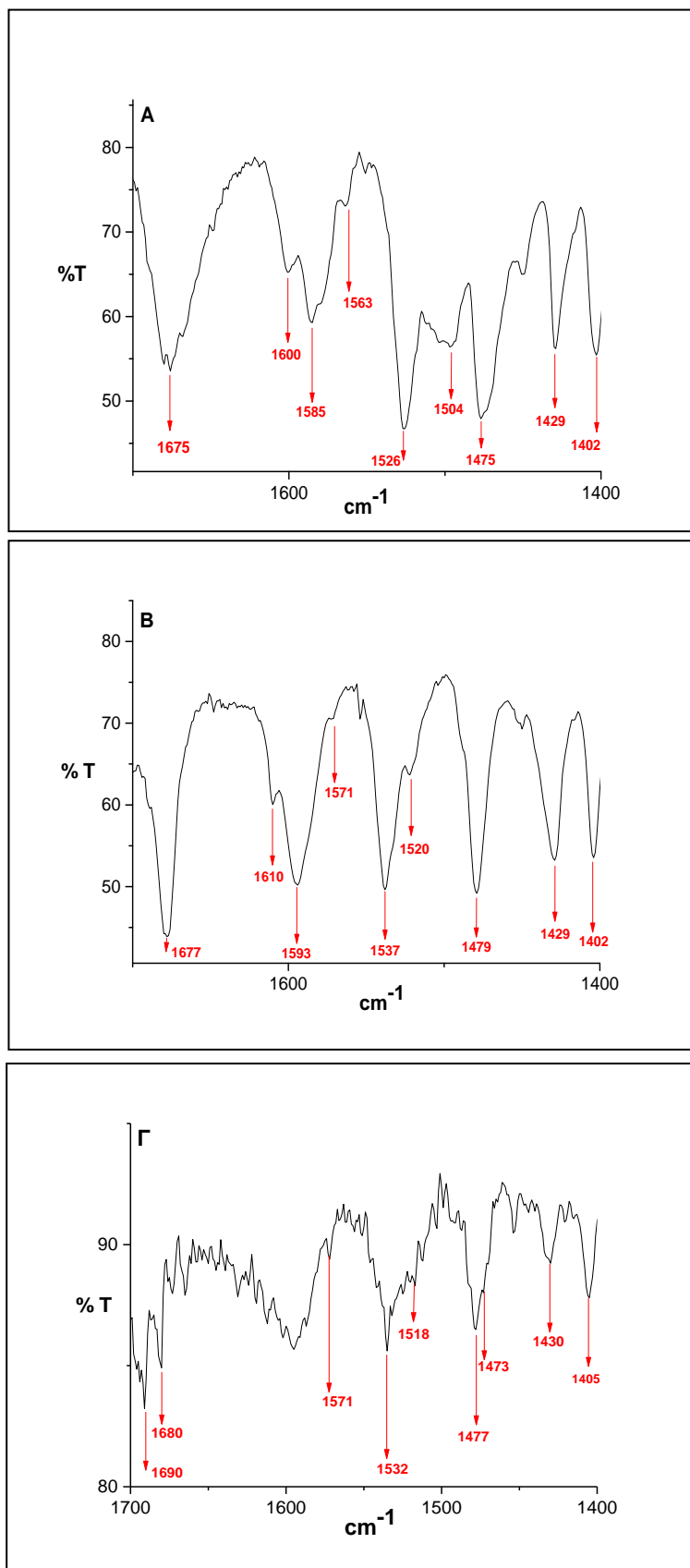
### 6.3.2 Φάσματα IR και ESI-MS

Ενδεικτικά φάσματα IR του υποκαταστάτη **1** και των αντίστοιχων συμπλόκων με Pd(II) και Pt(II) παρουσιάζονται στο Σχήμα 15 και στο Παράρτημα II δίνεται ο πίνακας με τις χαρακτηριστικές IR ταινίες των υποκαταστατών και των συμπλόκων όπως επίσης και τα φάσματα IR του υποκαταστάτη **2** και των αντίστοιχων συμπλόκων με Pd(II) και Pt(II).

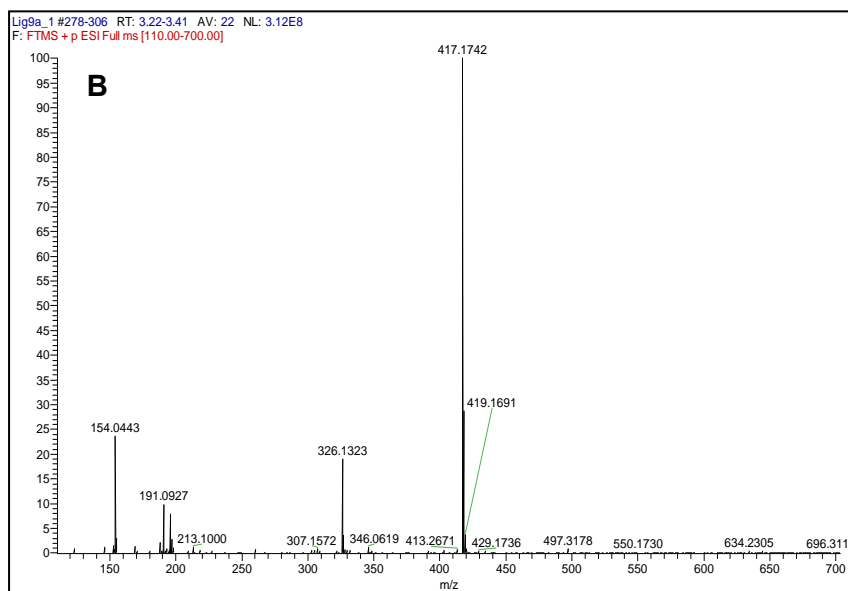
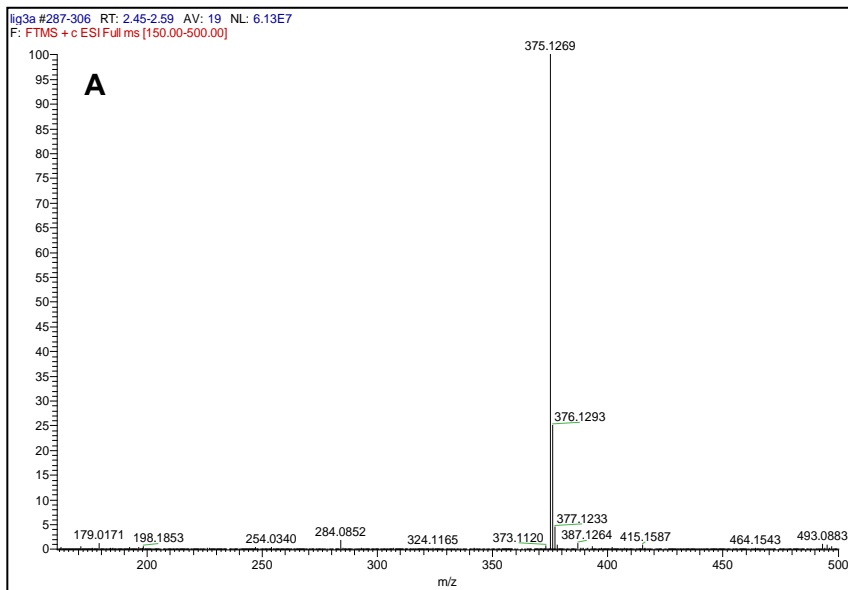
Οι υποκαταστάτες **1** και **2** εμφανίζουν έντονες, οξείες κορυφές στα  $1475\text{ cm}^{-1}$ ,  $1429\text{ cm}^{-1}$  και  $1402\text{ cm}^{-1}$  οι οποίες αντιστοιχούν στις ταινίες έκτασης των δεσμών C-H και C-C της ομάδας του βενζοθειαζολίου [183]. Η ταινία έκτασης του C=O των καρβοξαμιδίων (Amide I) αποδίδεται στην ευρεία κορυφή που εμφανίζεται στα  $1675\text{ cm}^{-1}$ . Η οξεία κορυφή στα  $1526\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στη ταινία κάμψης του δεσμού N-H των καρβοξαμιδίων (Amide II), ενώ οι ταινίες έκτασης των δεσμών N-H της αμίνης αντιστοιχούν στις ασθενείς κορυφές στα  $1563\text{ cm}^{-1}$  και  $1504\text{ cm}^{-1}$ . Οι κορυφές που εμφανίζονται στα  $1600\text{ cm}^{-1}$  και  $1585\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχούν στις ταινίες έκτασης C=C της ομάδας της πυριδίνης [184]. Η συμπλοκοποίηση δεν επέφερε κάποια σημαντική διαφοροποίηση στις ταινίες έκτασης της ομάδας του βενζοθειαζολίου και του C=O των καρβοξαμιδίων (Amide I). Αντιθέτως, οι ταινίες κάμψεως του δεσμού N-H της αμίνης και οι ταινίες έκτασης C=C της ομάδας της πυριδίνης μετατοπίζονται σημαντικά, γεγονός που αποτελεί σαφή ένδειξη συμμετοχής των ατόμων αζώτου στην συμπλοκοποίηση ως παραγόντων χηλίωσης. Καινούργιες ταινίες εμφανίζονται στην περιοχή  $470 - 510\text{ cm}^{-1}$  οι οποίες αποδίδονται σε ταινίες έκτασης  $\nu(\text{M-N})$  [185].

Τα δεδομένα είναι σε συμφωνία με συμπλοκοποίηση των υποκαταστατών **1** και **2** μέσω των ατόμων αζώτου της αμίνης και της πυριδίνης. Στο Σχήμα 16 παρουσιάζονται τα φάσματα MS των υποκαταστατών **1** και **2**. Η ανάλυση μάζας επαλήθευσε την προτεινόμενη δομή των υποκαταστατών και των αντίστοιχων συμπλόκων με Pd(II) και Pt(II) όπως επίσης και την παρουσία του πρωτονίου στο άζωτο της αμίνης.





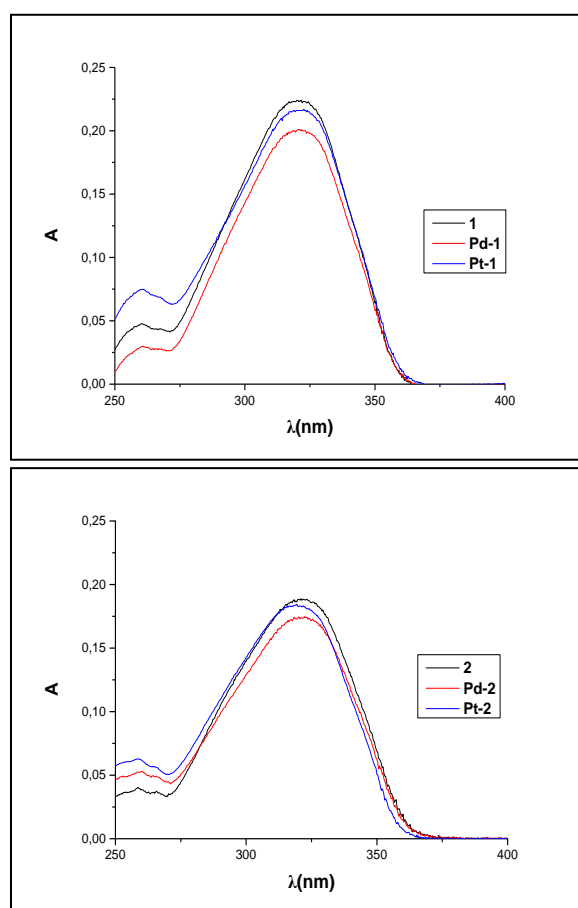
Σχήμα 15: IR φάσματα ενώσεων 1 (A) Pd-1 (B) και Pt-1 (Γ)



Σχήμα 16: Φάσματα μάζας ενώσεων 1 (A) και 2 (B)

### 6.3.3 Φάσματα απορρόφησης UV-Vis

Τα φάσματα απορρόφησης των υποκαταστατών **1** και **2** εμφανίζουν δύο κορυφές διαφορετικής έντασης (Σχήμα 17). Η ασθενής κορυφή στα 260 nm αποδίδεται στη μετάπτωση  $\pi \rightarrow \pi^*$  της ομάδας της πυριδίνης. Η έντονη κορυφή στα 320 nm αποδίδεται στη  $\pi \rightarrow \pi^*$  μετάπτωση της ομάδας του βενζοθειαζολίου [183]. Ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας των **1** και **2** σε DMSO ( $d = 1 \text{ cm}$ ) υπολογίστηκε σε  $22300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  και  $19000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  αντίστοιχα. Η συμπλοκοποίηση των υπό μελέτη υποκαταστατών με Pd(II) ή Pt(II) δεν επέφερε σημαντική αλλαγή στις κορυφές στα φάσματα UV εκτός από μια ασθενή υποχρωμικότητα.



Σχήμα 17: Φάσματα απορρόφησης ενώσεων **1**, Pd-1, Pt-1, **2**, Pd-2 και Pt-2 ( $10^{-5} \text{ M}$ ) σε DMSO

#### 6.4 Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκων Cu(II)

Τα σύμπλοκα **Cu-1** και **Cu-2** προήλθαν από την ανάμειξη των **1** και **2** με  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  σε στοιχειομετρική αναλογία 2:1 (υποκαταστάτης:μέταλλο). Τα προϊόντα παραλήφθηκαν σε ικανοποιητική απόδοση υπό την μορφή σκόνης σκούρου πράσινου χρώματος και στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν πλήρως με φασματοσκοπικές μεθόδους. Τα σύμπλοκα είναι σταθερά στον αέρα για μακρά χρονική περίοδο και πλήρως διαλυτά σε DMSO, εν μέρει διαλυτά σε ακετόνη, χλωροφόρμιο και ελάχιστα διαλυτά σε νερό, μεθανόλη, αιθανόλη και ακετονιτρίλιο.

##### 6.4.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου Cu-1

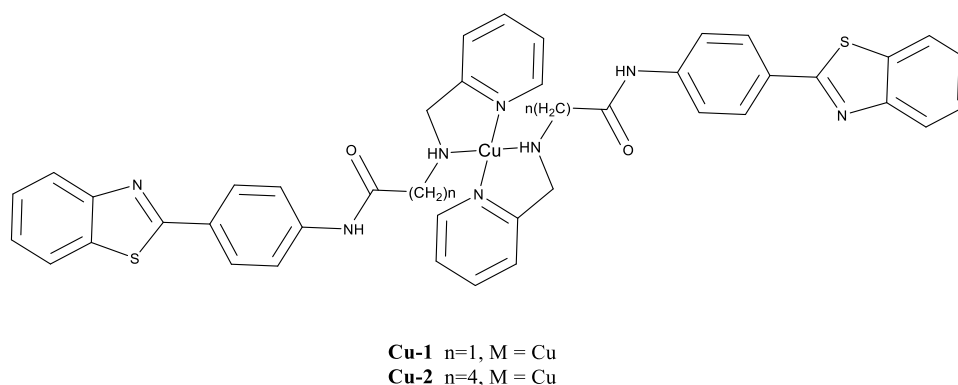
Παρασκευάστηκαν διαλύματα υποκαταστάτη **1** (75 mg, 0,2 mmol) σε 5 mL μεθανόλη και  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (37 mg, 0,10 mmol) σε 5 mL διαλύματος νερό:μεθανόλη (1:2). Τα ανωτέρω αναμείχθηκαν και έμειναν υπό ανάδευση, απουσία φωτός σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ημέρα. Το πράσινο ίζημα που προέκυψε, διηθήθηκε υπό κενό, εκπλύθηκε με κρύα αιθανόλη και με ακετόνη και ξηράνθηκε υπό κενό. Απόδοση: 45%. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1662, 1608, 1595, 1572, 1545, 1520, 1475, 1429, 1402. ESI-MS ( $m/z$ ): υπολογισθέν  $[\text{C}_{42}\text{H}_{34}\text{CuN}_8\text{O}_2\text{S}_2 + \text{H}]^+$  810,1623, ευρεθέν: 810,1637.

##### 6.4.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου Cu-2

Παρασκευάστηκαν διαλύματα υποκαταστάτη **2** (83 mg, 0,2 mmol) σε 5 mL μεθανόλη και  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (42 mg, 0,10 mmol) σε 5 mL διαλύματος νερό:μεθανόλη (1:2). Τα ανωτέρω αναμείχθηκαν και έμειναν υπό ανάδευση, απουσία φωτός σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ημέρα. Το σκούρο πράσινο ίζημα που προέκυψε, διηθήθηκε υπό κενό, εκπλύθηκε με κρύα αιθανόλη και με ακετόνη και ξηράνθηκε υπό κενό. Απόδοση: 40%. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1630, 1610, 1597, 1562, 1524, 1506, 1475, 1436, 1417.

## 6.5 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού συμπλόκων Cu(II)

Ο χαρακτηρισμός της δομής των συμπλόκων **Cu-1** και **Cu-2** έγινε με φασματοσκοπία IR, MS, EPR και με UV-Vis. Στο Σχήμα 18 παρουσιάζεται η προτεινόμενη δομή των συμπλόκων του χαλκού(II) η οποία βασίστηκε στα ληφθέντα φασματοσκοπικά δεδομένα, τα οποία αναλύονται λεπτομερώς στη συνέχεια.

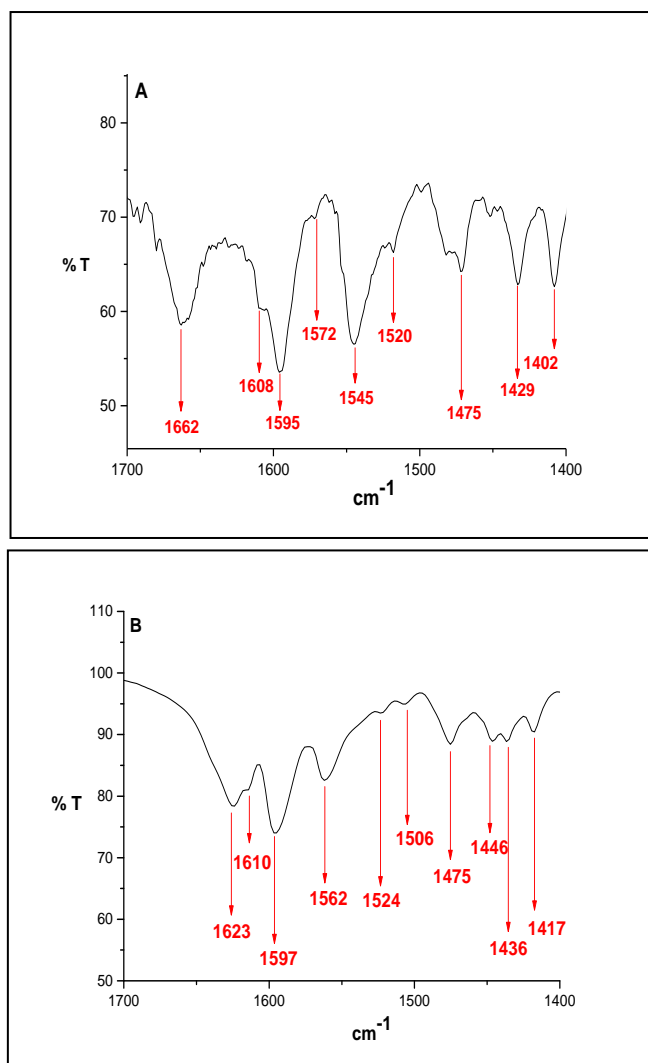


Σχήμα 18: Προτεινόμενος τύπος συμπλόκων Cu(II)

### 6.5.1 Φάσματα IR και ESI-MS

Οι αποδόσεις των ταινιών του φάσματος IR των συμπλόκων **Cu-1** και **Cu-2** συνοψίζονται στον Πίνακα 2 (παρατίθενται και οι αντίστοιχες ταινίες των υποκαταστατών **1** και **2** για λόγους σύγκρισης) και στο Παράρτημα II δίνεται ο πίνακας με τις χαρακτηριστικές IR ταινίες των υποκαταστατών και των συμπλόκων. Τα φάσματα επιβεβαιώνουν ότι ο Cu (II) συμπλέκεται με τους υποκαταστάτες **1** και **2** μέσω των ατόμων αζώτου της πυριδίνης και της αμίνης. Αυτό γίνεται αντιληπτό διότι οι ταινίες που επηρεάζονται περισσότερο αφορούν το δεσμό C=C και N-H της πυριδίνης και τον δεσμό N-H της αμίνης. Αντιθέτως οι ταινίες έκτασης που αποδίδονται στην ομάδα του βενζοθειαζολίου δεν μεταβάλλονται σημαντικά. Καινούργιες ταινίες εμφανίζονται στην περιοχή  $470\text{-}510\text{ cm}^{-1}$  οι οποίες αποδίδονται στη δόνηση τάσης του δεσμού Cu-N (Σχήμα 19). Τα υπερχλωρικά ανιόντα δεν

συμπλέκονται στο σύμπλοκο διότι οι δονήσεις τάσης του δεσμού Cl-O δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη μετατόπιση σε σχέση με τα ελεύθερα υπερχλωρικά ανιόντα [186, 187]. Τέλος η φασματομετρία μάζας επαλήθευσε το προτεινόμενη δομή των συμπλόκων, ενώ επιπροσθέτως επιβεβαιώθηκε η στοιχειομετρική αναλογία 2:1 (υποκαταστάτης:Cu(II)).



Σχήμα 19: IR φάσματα ενώσεων Cu-1(A) και Cu-2 (B)

## 6.5.2 Φασματοσκοπία EPR

Τα φάσματα EPR των συμπλόκων **Cu-1** και **Cu-2** παρουσιάζονται στο Σχήμα 20. Για την ανάλυση του φάσματος EPR θα χρειαστούμε τις ακόλουθες σχέσεις: Εξίσωση Hathaway [188]:

$$E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot B,$$

$$G = (g_{//} - 2) / (g_{\perp} - 2), f = g_{//} / A_{//}$$

Εξίσωση Kivelson-Neiman [189]:

$$\alpha^2 = (A_{//} / 0,036) + (g_{//} - 2,0023) + 3/7(g_{\perp} - 2,0023) + 0,04$$

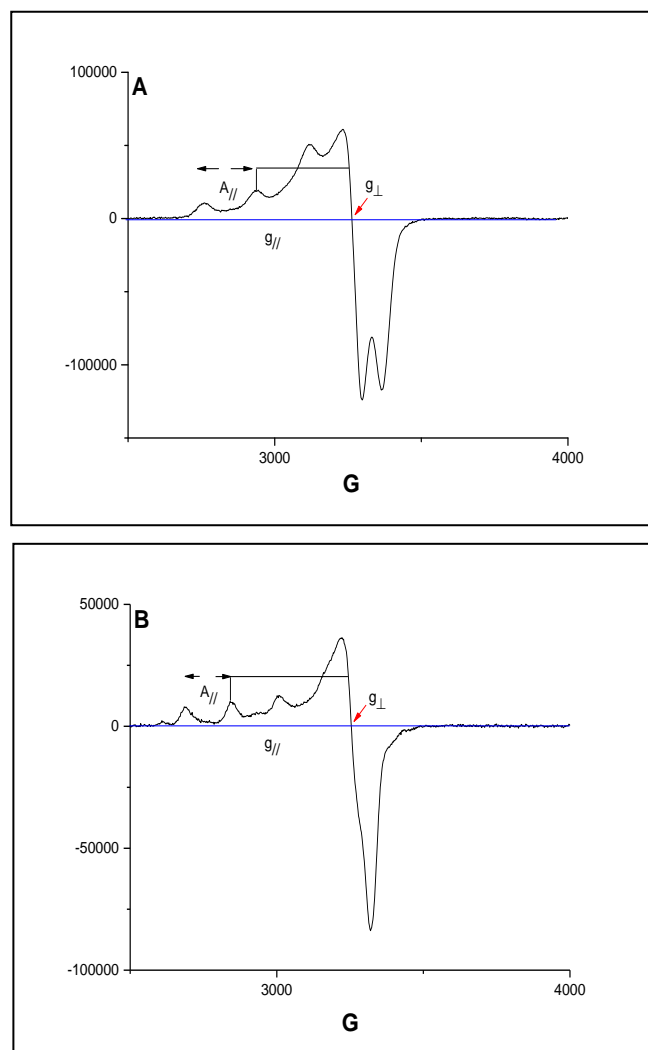
$$K_{//}^2 = (g_{//} - 2,0023) \cdot E_{d-d} / 8 \cdot \lambda_0, \quad K_{\perp}^2 = (g_{\perp} - 2,0023) \cdot E_{d-d} / 2 \cdot \lambda_0,$$

όπου  $h$  η σταθερά Planck ( $6,62606957 \cdot 10^{-34}$  J·s),  $\nu$  η συχνότητα του πεδίου ( $9,431051 \cdot 10^9$  και  $9,432296 \cdot 10^9$  s<sup>-1</sup> για τα **Cu-1** και **Cu-2** αντίστοιχα),  $\mu_B$  η μαγνητόνη Bohr ( $9,27400968 \cdot 10^{-24}$  J·T<sup>-1</sup>),  $B$  η ένταση του μαγνητικού πεδίου σε Tesla,  $K_{//}$  και  $K_{\perp}$  παράμετροι τροχιακής μείωσης (orbital reduction factors),  $E_{d-d}$  η ενέργεια της d-d μετάπτωσης στα σύμπλοκα,  $\lambda_0$  η σταθερά σύζευξης spin-orbit ενός ηλεκτρονίου για το ελεύθερο ιόν ( $828$  cm<sup>-1</sup>),  $\alpha^2$  παράμετρος που σχετίζονται με την ομοιοπολικότητα των εντός του επιπέδου σ-δεσμών.

Από την ανάλυση του φάσματος EPR και με τη χρήση των παραπάνω εξισώσεων προέκυψαν τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2: Παράμετροι φάσματος EPR συμπλόκων Cu(II)**

	$g_{//}$	$g_{\perp}$	$A_{//} \cdot 10^{-4}$ (cm <sup>-1</sup> )	G	f(cm)	$K_{//}$	$K_{\perp}$	$\alpha^2$
<b>Cu-1</b>	2,202	2,067	185,000	3,015	119,027	0,684	0,778	0,781
<b>Cu-2</b>	2,299	2,068	174,800	4,397	131,522	0,833	0,789	0,850



**Σχήμα 20: Φάσμα X-band EPR συμπλόκων Cu-1 (A) και Cu-2 (B) στην περιοχή 2500-4000 G**

Όπως γίνεται αντιληπτό και από τον Πίνακα 2 για τα σύμπλοκα **Cu-1** και **Cu-2** το  $g_{//}$  και το  $g_{\perp}$  έχουν τιμές κοντά στο 2 με το  $g_{//} > g_{\perp}$ , οπότε η γεωμετρία αυτών προτείνεται να είναι επίπεδη παραμορφωμένη. Επιπλέον, λόγω ότι το  $g_{//} > g_{\perp} > 2,0023$  συμπεραίνουμε ότι το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο του Cu(II) και στα δύο σύμπλοκα είναι εντοπισμένο στο τροχιακό  $d_{x^2-y^2}$ . Επιπλέον, επειδή το  $g_{//} < 2,3$  συμπεραίνουμε ότι ο δεσμός μετάλλου-υποκαταστάτη έχει περισσότερο ομοιοπολικό χαρακτήρα. Η τιμή του  $A_{//}$  είναι σχετικά μεγάλη και αυτό είναι ενδεικτικό της σύμπλεξης του μετάλλου μέσω των ατόμων αζώτου

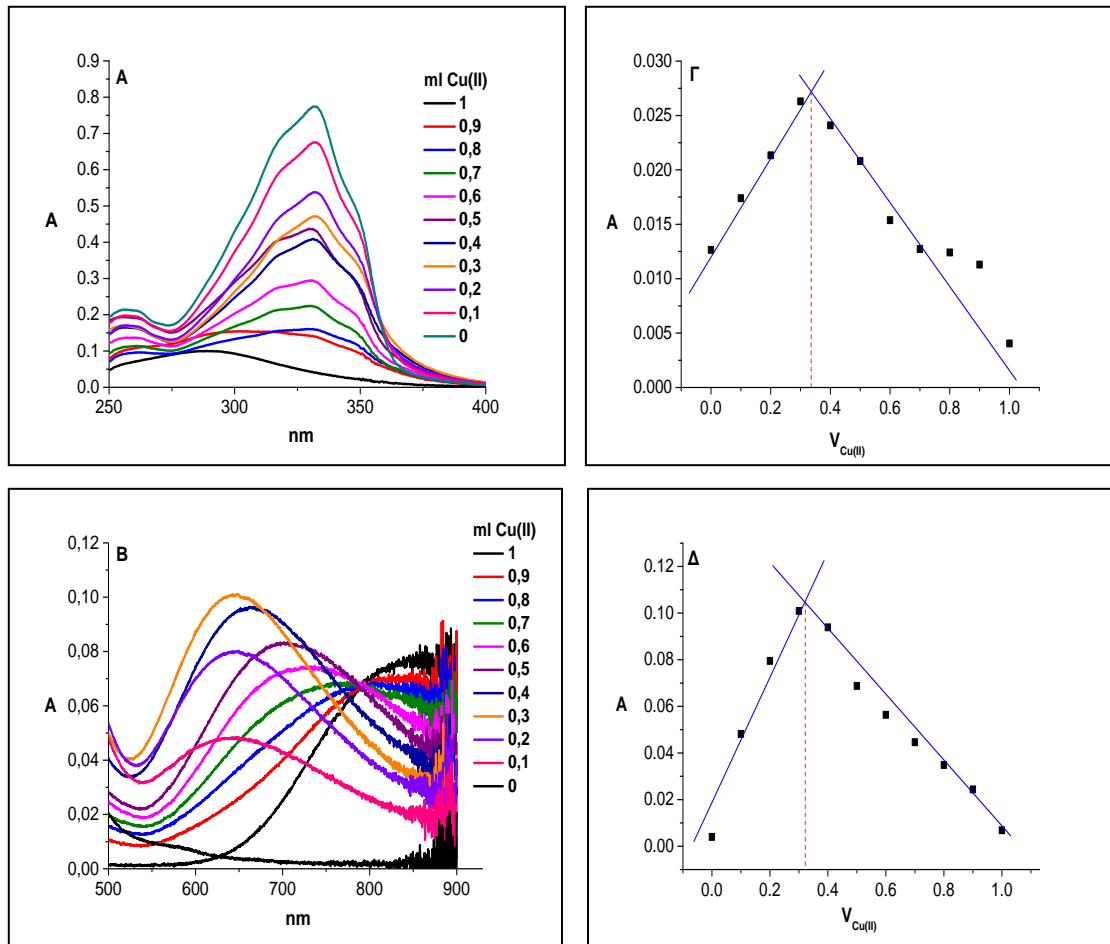


και όχι για παράδειγμα μέσω των οξυγόνων όπου θα παρατηρούνταν χαμηλότερες τιμές του  $A_{//}$ . Επιπροσθέτως, επειδή ο παράγοντας  $G < 4$  στην περίπτωση του **Cu-1**, συμπεραίνουμε ότι υπάρχει κάποια διαμοριακή αλληλεπίδραση και αυτό πιθανώς να οφείλεται σε «πακετάρισμα» των μορίων λόγω της παραμορφωμένης γεωμετρίας που υιοθετούν. Οι τιμές του παράγοντα  $f$  καταδεικνύουν πάλι ότι η γεωμετρία των συμπλόκων είναι παραμορφωμένη αφού κυμαίνονται στην περιοχή 90-140 [188, 190]. Οι τιμές των  $K_{//}$  και  $K_{\perp}$  που ελήφθησαν για το σύμπλοκο **Cu-1** ( $K_{//} < K_{\perp}$ ) καταδεικνύουν ότι οι π-δεσμοί είναι εντός επιπέδου. Τέλος, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η τιμή του  $\alpha^2$  σχετίζεται με την ομοιοπολικότητα των σ-δεσμών, επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι σ-δεσμοί εντός του επιπέδου στα σύμπλοκα έχουν περισσότερο ομοιοπολικό χαρακτήρα διότι το  $\alpha^2 < 1$  [191, 192].

### 6.5.3 Μέθοδος συνεχών μεταβολών

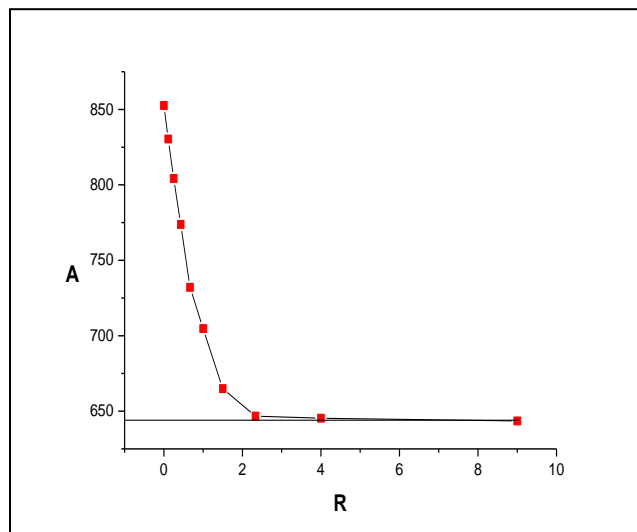
Για τον υπολογισμό της στοιχειομετρίας των συμπλόκων του Cu(II) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των συνεχών μεταβολών (μέθοδος Job). Η στοιχειομετρία του συμπλόκου προσδιορίζεται από το διάγραμμα της απορρόφησης (στο μήκος κύματος που απορροφά το σχηματιζόμενο σύμπλοκο και δεν απορροφούν ούτε το μέταλλο ούτε ο υποκαταστάτης) συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποκαταστάτη που περιέχεται σε κάθε διάλυμα [193]. Παρασκευάστηκαν διαλύματα υποκαταστατών (**1** και **2**) και  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  αρχικής συγκέντρωσης  $2 \cdot 10^{-3}$  M και  $2 \cdot 10^{-4}$  M σε DMSO. Από την ανάμιξη διαφορετικών ποσοτήτων αυτών προέκυψαν διαλύματα τελικού όγκου 1 mL και ελήφθησαν τα φάσματα UV-Vis στην περιοχή 250-500 nm και 500-900 nm με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 0,1 cm και 1 cm αντίστοιχα (Σχήμα 21).

Η μέθοδος Job κατέδειξε ότι το μέγιστο της γραφικής παράστασης εντοπίζεται σε αναλογία Cu(II) : υποκαταστάτης **1** = 0,33 : 0,66. Παρόμοια εικόνα είχαμε από αντίστοιχες μελέτες του υποκαταστάτη **2** (Παράρτημα III). Επομένως ο σχηματισμός των συμπλόκων του χαλκού γίνεται με στοιχειομετρική αναλογία 1:2 (μέταλλο:υποκαταστάτης) και όπως εξηγήθηκε και παραπάνω η σύμπλεξη γίνεται μέσω των 2 ατόμων αζώτου της αμίνης και της πυριδίνης [194].



**Σχήμα 21: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων ανάμιξης υποκαταστάτη 1 ( $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) και  $\text{Cu(II)}$  ( $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) στην περιοχή των 250-500 nm (A) και 500-900 nm (B). Μεταβολή της απορρόφησης στα 320 και 650 nm συναρτήσει του λόγου  $R = [\text{Cu(II)}] / [1]$  (Γ και Δ)**

Στο Σχήμα 22 παρουσιάζεται η μεταβολή του μεγίστου των ταινιών απορρόφησης του Σχήματος 21B σε συνάρτηση με το λόγο  $R = [\text{Cu(II)}]/[1]$ . Παρατηρούμε ότι το μέγιστο μήκος κύματος των απορροφήσεων στην περιοχή των d-d μεταπτώσεων του  $\text{Cu(II)}$  μειώνεται συνεχώς μέχρι το λόγο περίπου  $R=2$  και παραμένει σταθερό στα 644 nm για λόγους  $R>2$ . Για λόγους  $R>2$ , λοιπόν, θεωρούμε ότι υπάρχει μόνο ένα σύμπλοκο καθώς και ότι όλη η ποσότητα των ιόντων  $\text{Cu(II)}$  έχει συμπλεχθεί.

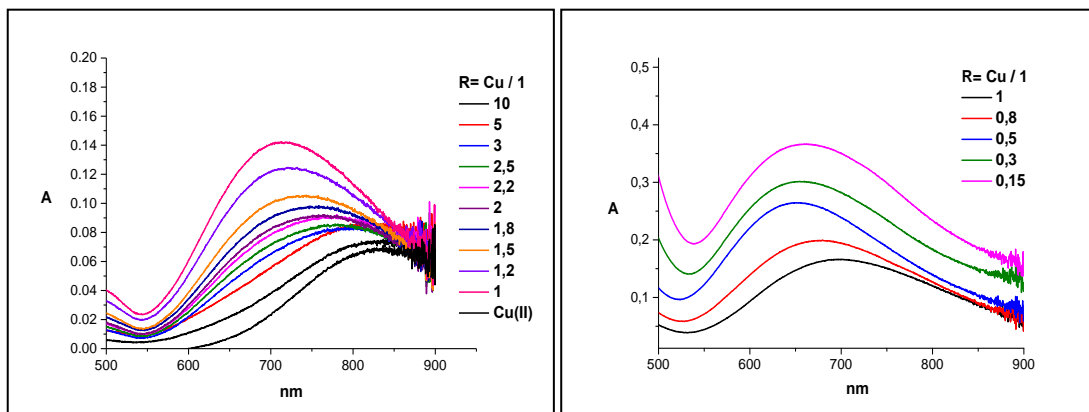


**Σχήμα 22: Μεταβολή του μεγίστου των ταινιών απορρόφησης Σχήματος 25B συναρτήσει του λόγου  $R = [Cu(II)] / [1]$**

#### 6.5.4 Προσδιορισμός σταθεράς σχηματισμού συμπλόκων χαλκού

Μελετήθηκαν τα φάσματα στην περιοχή 400-900 nm σειράς διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης σε Cu(II) ( $2 \cdot 10^{-3}$  M) και μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης υποκαταστάτη **1** ( $R = [Cu] / [1]$  από 0,15 έως 10). Τα φάσματα ελήφθησαν στους 25 °C, σε DMSO και με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm. Στο Σχήμα 23 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα φάσματα που ελήφθησαν.

Παρατηρούμε ότι η διαδοχική προσθήκη υποκαταστάτη **1** προκαλεί μείωση του  $\lambda_{max}$  των απορροφήσεων που αντιστοιχούν στις d-d μεταπτώσεις του Cu(II), ως αποτέλεσμα της σύνδεσης του στο μέταλλο. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε κανένα ισοβεστικό σημείο γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, στο διάλυμα, ο σχηματισμός του 2:1 συμπλόκου δεν συμβαίνει με ισορροπία μεταξύ δύο μοριακών ειδών, αλλά στον σχηματισμό του συμμετέχουν σε ισορροπία περισσότερα μοριακά είδη.



**Σχήμα 23: Φάσματα ηλεκτρονικής απορρόφησης στην περιοχή των 400 - 900 nm των μιγμάτων υποκαταστάτη 1 και Cu(II)**

Στο λόγο  $R = 0,15$  ( $[Cu] / [1] = 1/7$ ) θεωρούμε ότι όλη η ποσότητα του Cu(II) έχει συμπλεχθεί και η απορρόφηση είναι  $A = 0,366$ . Από τον νόμο Lambert-Beer ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του συμπλόκου είναι  $\epsilon_{\text{συμπλ}} = 183 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ).

Η απορρόφηση του διαλύματος στα 650 nm είναι 0,00833 επομένως ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του μη δεσμευμένου Cu(II) είναι  $\epsilon_{\text{CuF}} = 4,165 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Στα 650 nm οι υποκαταστάτες δεν απορροφούν.

Επομένως για κάθε άλλο διάλυμα η απορρόφηση στα 650 nm ( $A_x$ ) θα δίδεται από τον τύπο:

$$A_x = \epsilon_{\text{συμπλ}} \cdot [\text{συμπλόκου}] \cdot d + \epsilon_{\text{CuF}} \cdot [\text{Cu(II)}]_F \cdot d$$

για  $d = 1 \text{ cm}$  (οπτική διαδρομή) η σχέση αυτή γίνεται:

$$A_x = \epsilon_{\text{συμπλ}} \cdot [\text{συμπλόκου}] + \epsilon_{\text{CuF}} \cdot [\text{Cu(II)}]_F$$

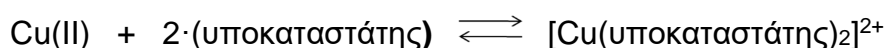
όμως  $[\text{συμπλόκου}] = [\text{Cu(II)}]_B$  και  $[\text{Cu(II)}]_B = [\text{Cu(II)}]_o - [\text{Cu(II)}]_F$ ,

Επομένως από την παραπάνω σχέση θα έχουμε:

$$[\text{συμπλόκου}] = \frac{(A_x - \epsilon_{\text{CuF}} \cdot [\text{Cu(II)}]_o)}{(\epsilon_{\text{συμπλ}} - \epsilon_{\text{CuF}})}$$

όπου  $[Cu(II)]_B$  η συγκέντρωση του δεσμευμένου Cu(II) και  $[Cu(II)]_o$  η ολική συγκέντρωση του Cu(II). Τα  $\epsilon_{CuF}$  και  $\epsilon_{\text{συμπλ}}$  έχουν υπολογιστεί, η  $[Cu(II)]_o$  είναι γνωστή και η  $A_x$  μετράται για κάθε διάλυμα. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίζεται η συγκέντρωση του συμπλόκου.

Η προτεινόμενη αντίδραση σχηματισμού του συμπλόκου είναι:



Η σταθερά σχηματισμού ( $K_f$ ) του συμπλόκου σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση θα ισούται με:

$$K_f = \frac{[\text{συμπλόκου}]}{[Cu(II)]_F \cdot [\text{υποκαταστάτης}]_F^2}$$

όπου  $[\text{συμπλόκου}]$  η συγκέντρωση του συμπλόκου,  $[Cu(II)]_F$  η συγκέντρωση του μη δεσμευμένου Cu(II) και  $[\text{υποκαταστάτης}]_F$  η συγκέντρωση του μη δεσμευμένου υποκαταστάτη.

Επίσης ισχύει ότι:  $[Cu(II)]_F = [Cu(II)]_o - [\text{συμπλόκου}]$  και

$$[\text{υποκαταστάτης}]_F = [\text{υποκαταστάτης}]_o - 2 \cdot [\text{συμπλόκου}]$$

Επομένως με αντικατάσταση των όρων στην ανωτέρω σχέση προκύπτει ο πίνακας με τις σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων **Cu-1** και **Cu-2**.

**Πίνακας 3: Σταθερές σχηματισμού  $K_f$  ( $L \cdot mol^{-1}$ ) και τα  $\ln K_f$  σε DMSO στους 25 °C συμπλόκων Cu(II)**

	$K_f$	$\ln K_f$
<b>Cu-1</b>	$(1,95 \pm 0,13) \cdot 10^6$	14,48
<b>Cu-2</b>	$(0,62 \pm 0,02) \cdot 10^6$	8,27

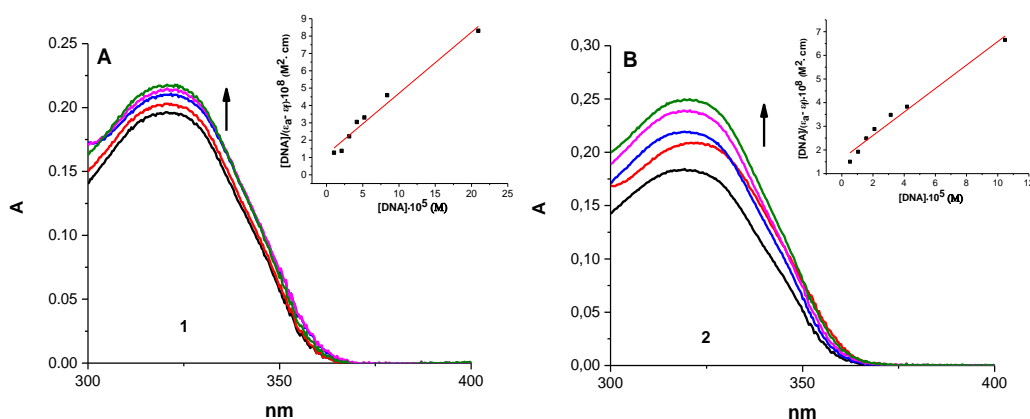
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ CT-DNA

#### 7.1 Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης με CT-DNA

##### 7.1.1 Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση UV-Vis

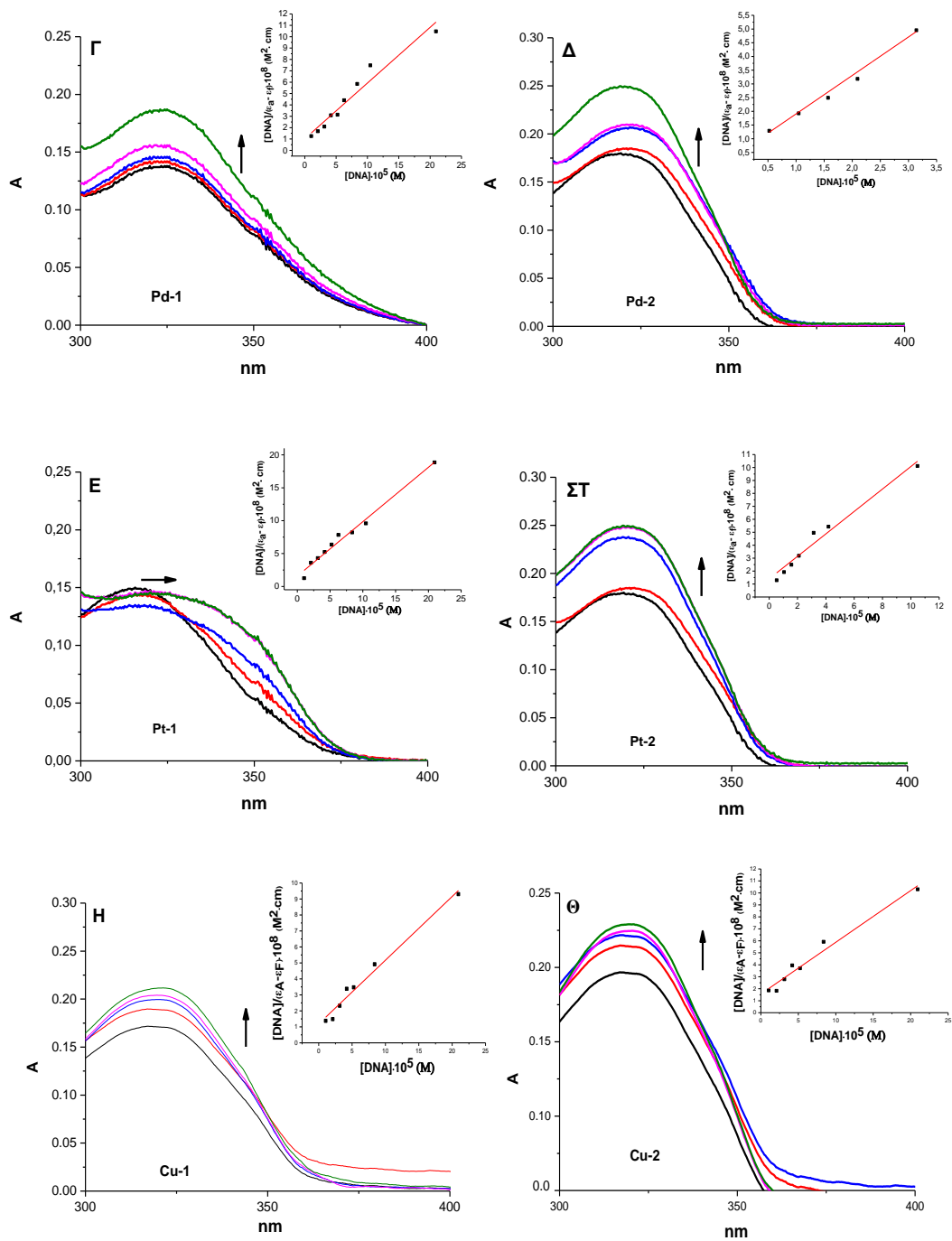
Μελετήθηκαν με φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση UV-Vis, οι αλλαγές που επάγουν οι υπό αξιολόγηση ενώσεις απουσία και παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων CT-DNA. Η ανωτέρω μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως και μας παρέχει αρκετές πληροφορίες για τον τρόπο και τον βαθμό αλληλεπίδρασης μορίων με το DNA. Η αλληλεπίδραση των υποκαταστατών **1** και **2** αλλά και των αντίστοιχων συμπλόκων με Pd(II), Pt(II) και Cu(II) με το DNA, μελετήθηκε με την λήψη φασμάτων ηλεκτρονικής απορρόφησης στην περιοχή 300-400 nm, όπου και εντοπίζονται οι π→π\* μεταπτώσεις της ομάδας του φαινυλοβενζοθειαζολίου (Σχήμα 24α, 24β).



**Σχήμα 24α:** Φάσματα UV-Vis υποκαταστατών **1** (A) και **2** (B) ( $10^{-5}$  M) απουσία και παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA ( $0 - 5 \times 10^{-4}$  M). Ενδεικτικοί λόγοι  $R = [\text{υποκαταστάτης}]/[\text{DNA}]$ : —  $R = 0$ , —  $R = 0,01$ , —  $R = 0,5$ , —  $R = 2$ , —  $R = 10$ . Ένθετο γράφημα:  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times 10^8$  συναρτήσει  $[\text{DNA}] \times 10^5$ .

Η προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων DNA στα παράγωγα **1**, **2**, **Pd-1**, **Pd-2**, **Pt-2**, **Cu-1** και **Cu-2** έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή αύξηση της έντασης απορρόφησης της χαρακτηριστικής κορυφής στα 320 nm (υπερχρωμισμός), ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DNA παρατηρήθηκε μετατόπιση του μήκους κύματος κατά 2 nm (βαθυχρωμική μετατόπιση). Ο παρατηρούμενος υπερχρωμισμός, που κυμαίνεται μεταξύ 10,6% και 36,3% (για  $R = \frac{[\text{ένωση}]}{[\text{DNA}]} = 10$ ) είναι ενδεικτικός της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA και βρίσκεται σε συμφωνία με την πρόσδεση των ενώσεων κατά μήκος της αύλακας του DNA μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών [195, 196]. Η ανωτέρω συμπεριφορά αποκλείει την αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής, η οποία χαρακτηρίζεται από υποχρωμισμό και ερυθρά μετατόπιση της χαρακτηριστικής κορυφής στα φάσματα ηλεκτρονικής απορρόφησης [197].

Η προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων DNA στο διάλυμα του συμπλόκου **Pt-1** δεν επιφέρει σημαντικές διαφοροποιήσεις στην ένταση απορρόφησης της κορυφής στα 320 nm, παρατηρείται όμως στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DNA βαθμιαία μετατόπιση του μήκους κύματος σε μεγαλύτερες τιμές (κατά 10 nm). Τα φάσματα UV του **Pt-1** καταδεικνύουν καταδεικνύοντας έναν πιο περίπλοκο τρόπο αλληλεπίδρασης με το DNA. Ο σημαντικός ρόλος του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας, αναδεικνύεται στην περίπτωση των συμπλόκων **Pt-1** και **Pt-2**, όπου διαπιστώθηκε αλλαγή στα λαμβανόμενα φάσματα απορρόφησης. Τα παρόμοιας δομής σύμπλοκα **Pt-1** και **Pd-1** παρουσίασαν διαφοροποιημένη συμπεριφορά κατά την διάρκεια της τιτλοδότησης με το DNA, γεγονός που αντανακλά το ρόλο του μεταλλικού κέντρου στην αλληλεπίδραση με το DNA [111].



**Σχήμα 24β: Φάσματα UV-Vis συμπλόκων Pd-1 (Γ), Pd-2 (Δ), Pt-1 (E), Pt-2 (ΣΤ), Cu-1 (Η) και Cu-2 (Θ) ( $10^{-5}$  M) απουσία και παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA ( $0 - 5 \times 10^{-4}$ ) M. Ενδεικτικοί λόγοι  $R = [\text{υποκαταστάτης}]/[\text{DNA}]$ : —  $R = 0$ , —  $R = 0,01$ , —  $R = 0,5$ , —  $R = 2$ , —  $R = 10$ . Ένθετο γράφημα:  $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_i) \times 10^8$  συναρτήσει  $[DNA] \times 10^5$ .**



Σε συνέχεια της μελέτης με φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση UV-Vis, τα φασματοσκοπικά πειραματικά δεδομένα της χαρακτηριστικής κορυφής στα 320 nm προσαρμόστηκαν στην Εξίσωση 1 (Υποκεφάλαιο 5.3.1), με σκοπό τον υπολογισμό της σταθεράς σύνδεσης ( $K_b$ ) η οποία είναι χαρακτηριστική της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA (Σχήμα 24α και 24β, Ένθετο Γράφημα). Στο Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι τιμές  $K_b$  των υποκαταστατών και των αντίστοιχων συμπλόκων, όπου και διαπιστώθηκε ότι βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους ( $10^4 M^{-1}$ ). Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι για το σύμπλοκο **Pt-1** υπολογίστηκε η σταθερά σύνδεσης και στα μήκη κύματος 325 και 335 nm (περιοχές που παρατηρήθηκαν εντονότερες αλλαγές στην απορρόφηση), όπου δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές διότι οι τιμές  $K_b$  που υπολογίστηκαν ήταν της τάξεως  $\pm 0,2 \times 10^4$  εν συγκρίσει με αυτήν που υπολογίστηκε στα 320 nm.

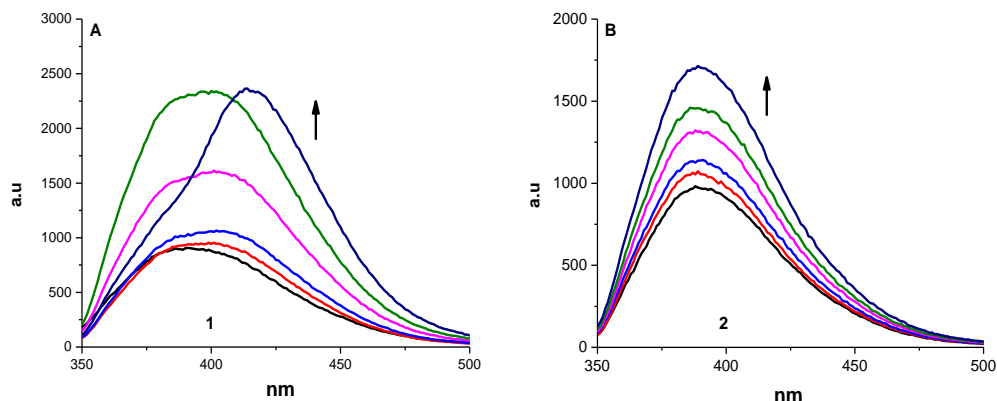
Οι σταθερές σύνδεσης των υποκαταστατών **1** και **2** αλλά και των συμπλόκων **Cu-1** και **Cu-2** είναι παρόμοιες, ενώ οι τιμές  $K_b$  των συμπλόκων **Pt-2** και **Pd-2** εμφανίζονται σχετικά υψηλότερες από αυτές των **Pt-1**, **Pd-1** και των συμπλόκων του χαλκού, δίχως όμως να παρατηρηθεί σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των μετάλλων [198]. Το γεγονός ότι οι υποκαταστάτες εμφανίζουν τιμές  $K_b$  που βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους με αυτές των συμπλόκων καταδεικνύει ότι η ομάδα του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου μαζί με τη πυριδίνη, αλληλεπιδρούν με την έλικα του DNA και επηρεάζουν κατά μεγάλο βαθμό τις τιμές των  $K_b$  [199, 200].

**Πίνακας 4: Σταθερές σύνδεσης ( $K_b$ ) υποκαταστατών και αντίστοιχων συμπλόκων με DNA**

ένωση	$K_b$ ( $10^4 M^{-1}$ )
<b>1</b>	2,98 ± 1,11
<b>2</b>	3,06 ± 1,20
<b>Pd-1</b>	4,80 ± 1,12
<b>Pd-2</b>	6,55 ± 2,26
<b>Pt-1</b>	5,23 ± 1,12
<b>Pt-2</b>	6,15 ± 2,19
<b>Cu-1</b>	3,35 ± 1,19
<b>Cu-2</b>	3,76 ± 1,22

### 7.1.2 Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση φθορισμού

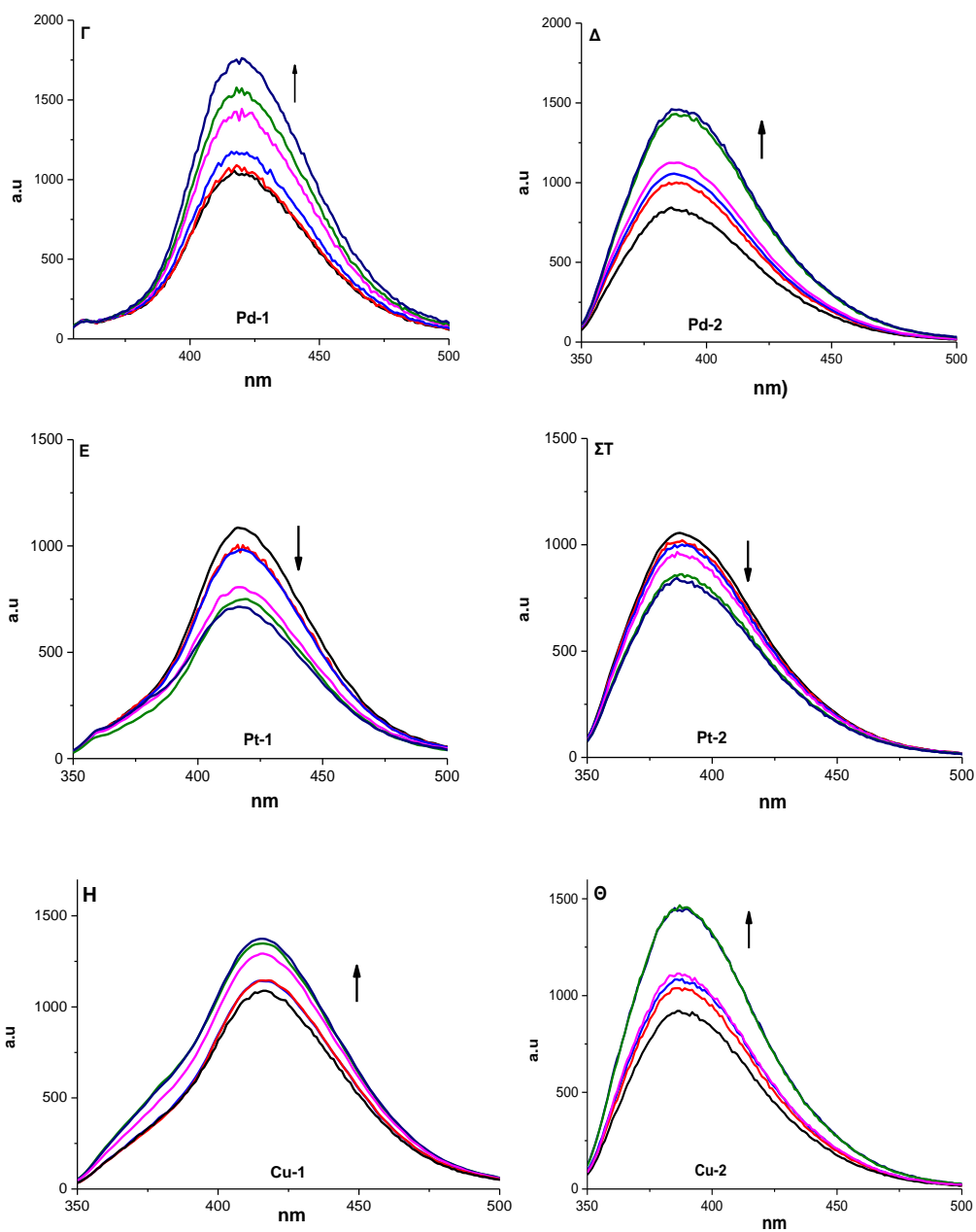
Λόγω της παρουσίας της φθορίζουσας φαρμακοφόρου ομάδας του 2-(4' αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου, όλες οι υπό μελέτη ενώσεις φθορίζουν και η εκπομπή αυτών στα 320 nm σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα στους 25 °C έχει ως αποτέλεσμα την λήψη φασμάτων εκπομπής που παρουσιάζουν μέγιστο στα 390 nm για τους υποκαταστάτες **1** και **2**, στα 418 nm για τα σύμπλοκα **Pd-1**, **Pt-1**, **Cu-1** και στα 388 nm για τα σύμπλοκα **Pd-2**, **Pt-2** και **Cu-2** (Σχήμα 25α, 25β). Η διαδοχική προσθήκη διαλύματος CT-DNA σε σταθερής συγκέντρωσης διαλύματα ενώσεων, επιφέρει την βαθμιαία αύξηση της έντασης φθορισμού των χαρακτηριστικών κορυφών των **1**, **2**, **Pd-1**, **Pd-2**, **Cu-1** και **Cu-2**, γεγονός που σαφώς καταδεικνύει την αλληλεπίδρασή τους με το DNA.



**Σχήμα 25α: Φάσματα εκπομπής φθορισμού υποκαταστατών 1 (A) και 2 (B) ( $10^{-5}$  M) απουσία και παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA ( $0 - 5 \times 10^{-4}$  M).**

**Ενδεικτικοί λόγοι  $R = [\text{υποκαταστάτης}]/[\text{DNA}]$ : —  $R = 0$ , —  $R = 0,01$ , —  $R = 0,5$ , —  $R = 2$ , —  $R = 10$ .**

Η αύξηση της εντάσεως φθορισμού κατά την διάρκεια της αλληλεπίδρασης με το DNA, κατά κανόνα αποδίδεται στην περιορισμένη δυνατότητα προσέγγισης του δεσμευμένου μορίου από τα γειτονικά μόρια νερού [201]. Η κατά δύο τάξεις μεγέθους αύξηση της εντάσεως, βρίσκεται σε συμφωνία με αντίστοιχες μελέτες ενώσεων που δρουν μέσω της μικρής αύλακας του DNA και επιπλέον είναι κατά πολύ μικρότερη από αυτή που παρατηρείται παρουσία μορίων-παρεμβολέων [179, 202, 203].



**Σχήμα 25β:** Φάσματα εκπομπής φθορισμού συμπλόκων Pd-1 (Γ), Pd-2 (Δ), Pt-1 (Ε), Pt-2 (ΣΤ), Cu-1 (Η) και Cu-2 (Θ) ( $10^{-5}$  M) απουσία και παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA ( $0 - 5 \times 10^{-4}$  M).

Ενδεικτικοί λόγοι  $R = [\text{υποκαταστάτης}]/[\text{DNA}]$ : — R = 0, — R = 0,01, — R = 0,5, — R = 2, — R = 10.

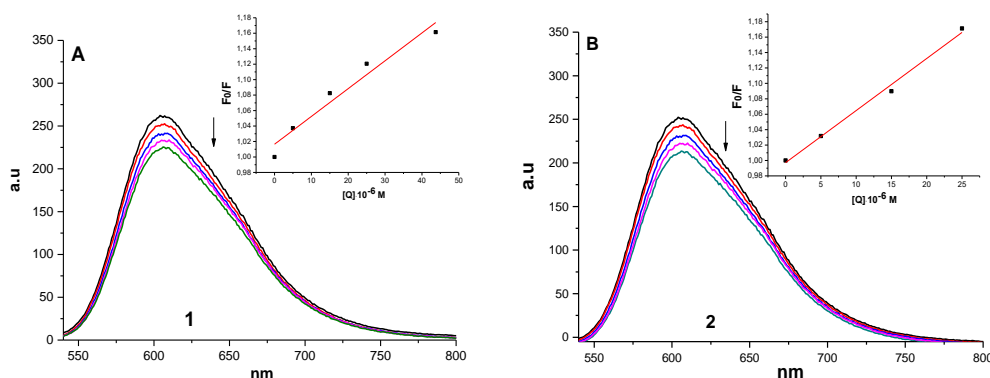
Για τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου καταγράφηκε μείωση της έντασης φθορισμού με την προσθήκη διαλύματος DNA, δίχως εμφανή μεταβολή στο σχήμα και στην θέση των κορυφών [204]. Για το **Pt-1**, η μείωση αυτή ενδεχομένως να συνδέεται με τη μείωση της εντάσεως στα φάσματα απορρόφησης UV του συμπλόκου στο αντίστοιχο μήκος κύματος εκπομπής (Σχήμα 24β.Ε). Ωστόσο, φαίνεται ότι η παρουσία του Pt(II) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με το DNA. Σε ανάλογες μελέτες παρατηρήθηκε μείωση της εντάσεως φθορισμού, παρουσία μονο-λειτουργικών [205, 206] και διλειτουργικών [207] συμπλόκων του Pt(II) που φέρουν φθορίζοντα υποκαταστάτη, με την προσθήκη διαλύματος DNA, ανεξαρτήτως του τρόπου αλληλεπίδρασης.

Η παρουσία του υποκαταστάτη **2** αλλά και όλων των αντίστοιχων συμπλόκων δεν επιφέρει μεταβολή του  $\lambda_{max}$  στα φάσματα εκπομπής, με την προσθήκη διαλύματος DNA, υποδηλώνοντας ότι η αλληλεπίδραση δεν επηρεάζει το τοπικό περιβάλλον του χρωμοφόρου [208]. Αντιθέτως, παρουσία του υποκαταστάτη **1**, η κορυφή βαθμιαία πεπλατίζεται, υποδεικνύοντας έτσι τη παρουσία δεύτερου φθορίζοντος είδους. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DNA (όπου όλη η ποσότητα του **1** θεωρείται δεσμευμένη) καθίσταται το κυρίαρχο είδος παρουσιάζοντας ερυθρά μετατόπιση κατά 23,5 nm σε σύγκριση με το αντίστοιχο του **1**. Το γεγονός ότι μόνο στην περίπτωση του **1** παρατηρείται μετατόπιση στο μήκος κύματος αντανάκλα το σημαντικό ρόλο της αλκυλικής αλυσίδας στη διαμόρφωση του τοπικού περιβάλλοντος του χρωμοφόρου.

Το  $\lambda_{max}$  του δεσμευμένου **1** (416 nm) προσεγγίζει το  $\lambda_{max}$  των συμπλόκων **Pd-1**, **Pt-1** και **Cu-1**, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο υποκαταστάτης είναι ικανός να δεσμευθεί στο DNA και να επάγει αλλαγές στο περιβάλλον του χρωμοφόρου, ανεξαρτήτως της παρουσίας μετάλλου. Ο υποκαταστάτης **2** εμφανίζει κορυφή στα φάσματα φθορισμού σε τιμή  $\lambda_{max}$  που παρατηρείται και για τα σύμπλοκα **Pd-2**, **Pt-2** και **Cu-2**. Η καταγραφόμενη διαφορά στα μήκη κύματος εκπομπής (418 nm και 390 nm) των υποκαταστατών και των αντίστοιχων συμπλόκων, υποδεικνύει ένα πιο καθορισμένο περιβάλλον για τα παράγωγα του **1**.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης ανταγωνισμού πρόσδεσης στο DNA, με την χρήση της ένωσης EtBr η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Το μη δεσμευμένο EtBr σε ρυθμιστικό υδατικό διάλυμα εμφανίζει ασθενή φάσματα εκπομπής ( $\lambda_{em} = 630 \text{ nm}$ ), όμως παρουσία DNA παρατηρείται δραστική αύξηση της εντάσεως (περίπου 20 φορές) με ταυτόχρονη υποχρωμική μετατόπιση στα 606 nm ( $\lambda_{ex} = 526 \text{ nm}$ ) [209]. Η ανωτέρω ισχυρή ένταση εκπομπής του συστήματος DNA-EtBr μπορεί να μειωθεί εάν προστεθεί στο διάλυμα μια ένωση-παρεμβολέας, λόγω εκτοπισμού μορίων EtBr από συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης του DNA ή/και αποδοχής ηλεκτρονίου (διηγεμένης καταστάσεως) του EtBr μέσω φωτο-ηλεκτρονιακών μηχανισμών μεταφοράς [210]. Στο συγκεκριμένο μήκος κύματος διέγερσης ( $\lambda_{ex} = 526 \text{ nm}$ ) τόσο το μη δεσμευμένο EtBr όσο και οι υπό μελέτη ενώσεις εμφανίζουν ασθενή σήματα εκπομπής.

Στο Σχήμα 25γ παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής του συστήματος DNA-EtBr απουσία και παρουσία των υποκαταστατών **1** και **2**. Παρατηρούμε ότι οι υποκαταστάτες επιφέρουν μικρή μείωση (15% για τους μεγαλύτερους λόγους R) στην ένταση της κορυφής εκπομπής στα 606 nm, υποδεικνύοντας ότι εν μέρει ανταγωνίζονται το EtBr. Η μικρής κλίμακας απόσβεση φθορισμού του συστήματος DNA-EtBr, ενδεχομένως να υποδηλώνει ότι οι υποκαταστάτες εκτοπίζουν μερικώς το EtBr από το σύστημα DNA-EtBr, γεγονός που αποκλείει την πιθανότητα αλληλεπίδρασης μέσω τυπικής παρεμβολής [211]. Επί παραδείγματι, η ένωση Lucigenin η οποία θεωρείται ότι παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, επάγει τουλάχιστον 50% μείωση της έντασης εκπομπής του συστήματος DNA-EtBr [212].

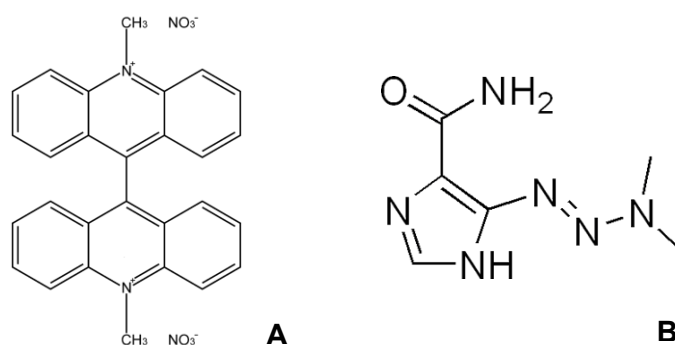


**Σχήμα 25γ: Φάσματα εκπομπής φθορισμού συστήματος DNA-EtBr ( $[DNA] = 5 \cdot 10^{-5} M$  και  $[EtBr] = 6,25 \cdot 10^{-6} M$ ) με αυξανόμενη προσθήκη υποκαταστατών 1 (A) και 2 (B). Ενδεικτικοί λόγοι  $R = [υποκαταστάτης]/[DNA-EtBr]$ : —  $R = 0$ , —  $R = 0,1$ , —  $R = 0,3$ , —  $R = 0,5$ , —  $R = 0,875$ . Ένθετο γράφημα:  $F_0/F$  συναρτήσει  $[Q] \times 10^{-6}$ .**

Η προσθήκη όλων των υπό μελέτη συμπλόκων επιφέρει παρόμοια μείωση (21% για τους μεγαλύτερους λόγους R) στην ένταση της χαρακτηριστικής κορυφής εκπομπής στα 606 nm (Σχήμα 25δ). Η παρατηρούμενη απόσβεση φθορισμού του συστήματος DNA-EtBr δεν μπορεί να αποδοθεί σε κλασσική παρεμβολή των συμπλόκων διότι σε αυτήν την περίπτωση θα καταγράφαμε δραστική μείωση της έντασης [213]. Η δακαρβαζίνη (Εικόνα 29) όπως επίσης και άλλες πολυαμίνες, αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω της μικρής αύλακας, επάγοντας μικρή μείωση της εντάσεως [214, 215]. Επομένως τα φασματοσκοπικά μας δεδομένα αποκλείουν την αλληλεπίδραση των ενώσεων μέσω κλασσικής παρεμβολής και είναι σε συμφωνία με πρόσδεση στις αύλακες [216].

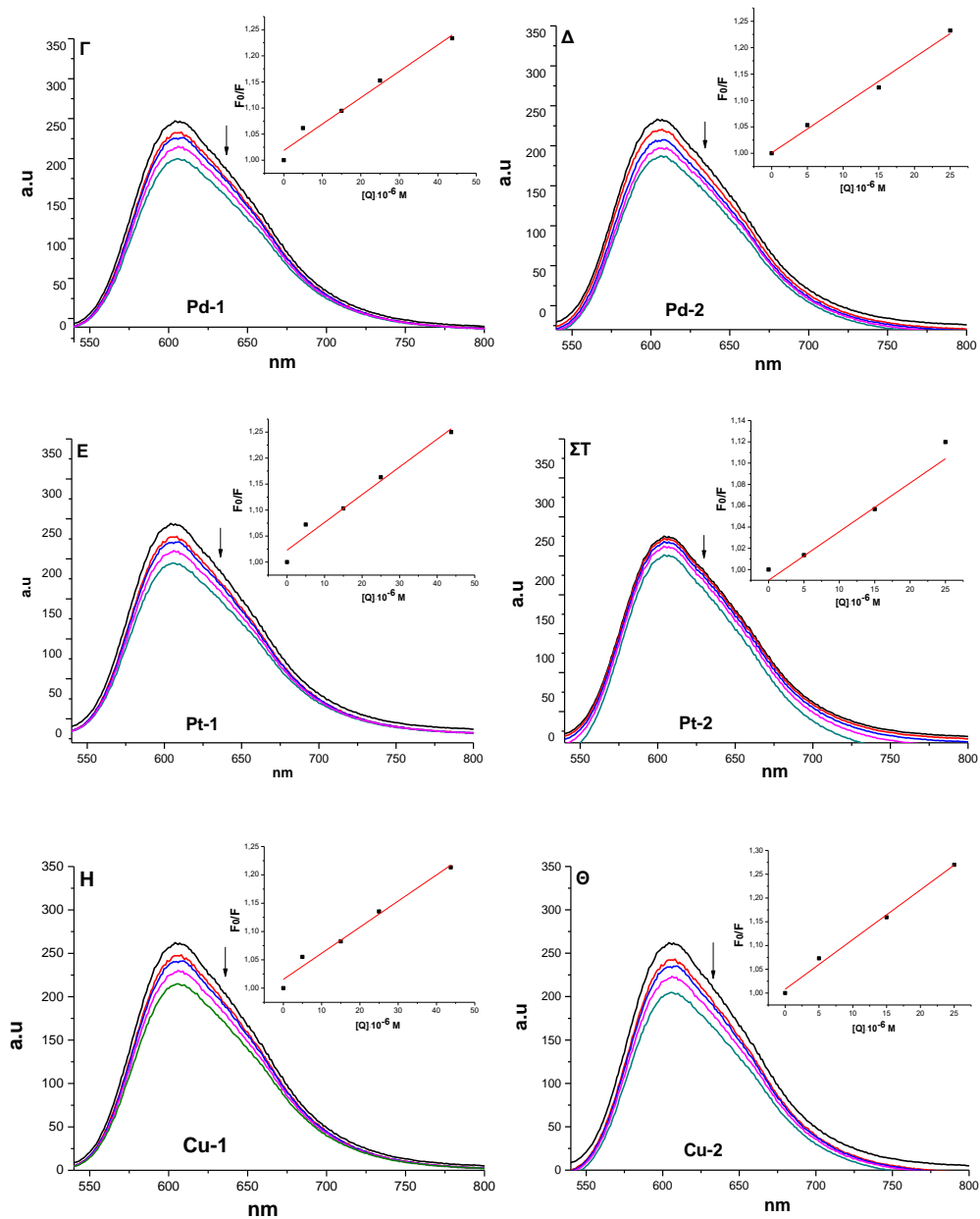
Τα φασματοσκοπικά πειραματικά δεδομένα της χαρακτηριστικής κορυφής στα 606 nm προσαρμόστηκαν στις Εξισώσεις 2 και 3 (Υποκεφάλαιο 5.3.2), με σκοπό τον υπολογισμό των σταθερών  $K_{sv}$  και  $K_{app}$  (Σχήμα 25γ και 25δ, Ένθετο Γράφημα). Τα γραφήματα Stern-Volmer καταδεικνύουν ότι ο εκτοπισμός του δεσμευμένου EtBr από τις ενώσεις βρίσκεται σε συμφωνία με την γραμμικότητα της Εξίσωσης 2 (Πίνακας 5). Οι τιμές των σταθερών  $K_{sv}$  και

$K_{app}$  επιβεβαιώνουν την ισχυρή σύνδεση των υπό μελέτη ενώσεων με το DNA η οποία ακολουθεί την εξής σειρά: σύμπλοκα Pt(II) > σύμπλοκα Pd(II) > σύμπλοκα Cu(II) > υποκαταστάτες. Είναι προφανές ότι τα σύμπλοκα του Pt(II) εκτοπίζουν περισσότερα μόρια EtBr που είναι προσδεμένα στο DNA από τα υπόλοιπα σύμπλοκα αλλά και από τους υποκαταστάτες [217]. Η ανωτέρω συμπεριφορά συμβαδίζει απόλυτα με τις υπολογισμένες τιμές  $K_b$  (Υποκεφάλαιο 7.1.1), καταδεικνύοντας τη σημασία του μεταλλικού κέντρου.



**Εικόνα 29: Χημική δομή ενώσεων Lucigenin (A) και Δακαρβαζίνης (B)**





**Σχήμα 25δ:** Φάσματα εκπομπής φθορισμού συστήματος DNA-EtBr ( $[DNA] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  και  $[EtBr] = 6,25 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ) με αυξανόμενη προσθήκη συμπλόκων Pd-1 (Γ), Pd-2 (Δ), Pt-1 (E), Pt-2 (ΣΤ), Cu-1 (Η) και Cu-2 (Θ).

Ενδεικτικοί λόγοι  $R = [\text{σύνπλοκο}]/[DNA-EtBr]$ : —  $R = 0$ , —  $R = 0,1$ , —  $R = 0,3$ ,  
 —  $R = 0,5$ , —  $R = 0,875$ . Ένθετο γράφημα:  $F_0/F$  συναρτήσει  $[Q] \times 10^{-6}$ .

**Πίνακας 5: Σταθερές K<sub>sv</sub> και K<sub>app</sub> υποκαταστατών και αντίστοιχων συμπλόκων**

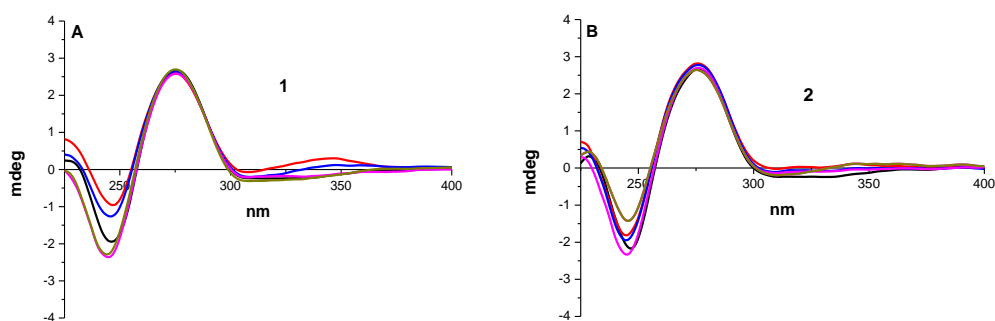
ένωση	K <sub>sv</sub> (10 <sup>3</sup> M <sup>-1</sup> )	K <sub>app</sub> (10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
<b>1</b>	3,60 ± 0,11	2,25 ± 0,11	0,9871
<b>2</b>	3,22 ± 0,20	2,01 ± 0,20	0,9902
<b>Pd-1</b>	5,05 ± 0,12	3,16 ± 0,12	0,9881
<b>Pd-2</b>	4,28 ± 0,36	2,68 ± 0,36	0,9890
<b>Pt-1</b>	5,34 ± 0,22	3,34 ± 0,22	0,9898
<b>Pt-2</b>	4,82 ± 0,19	2,82 ± 0,19	0,9904
<b>Cu-1</b>	4,61 ± 0,16	2,88 ± 0,16	0,9800
<b>Cu-2</b>	4,09 ± 0,09	2,56 ± 0,09	0,9901

### 7.1.3 Φασματοπολωσιμετρία CD

Η φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωϊσμού (CD) είναι ιδανική μέθοδος για μελέτες αλληλεπιδράσεων βιομορίων. Αξιολογήθηκε η επίδραση των υποκαταστατών **1** και **2** και των συμπλόκων **Pd-1**, **Pt-1**, **Pd-2**, **Pt-2**, **Cu-1** και **Cu-2** στη δομή της διπλής έλικας του DNA, αυξάνοντας σταδιακά τον λόγο [ένωση]/[DNA].

Στο CD φάσμα του CT-DNA εμφανίζονται δύο κορυφές, μία θετική με μέγιστο στα 275 nm, η οποία σχετίζεται με την επάλληλη διάταξη των αζωτούχων βάσεων του DNA και μία αρνητική με ελάχιστο στα 245 nm, που συνδέεται με την δεξιόστροφη στρέψη της έλικας του πολυνουκλεοτιδίου. Οι υπό αξιολόγηση υποκαταστάτες και τα αντίστοιχα σύμπλοκα είναι οπτικώς ανενεργά μόρια με αποτέλεσμα οι ηλεκτρονικές μεταπτώσεις των χαρακτηριστικών ομάδων να μην εμφανίζουν φάσμα CD [218].

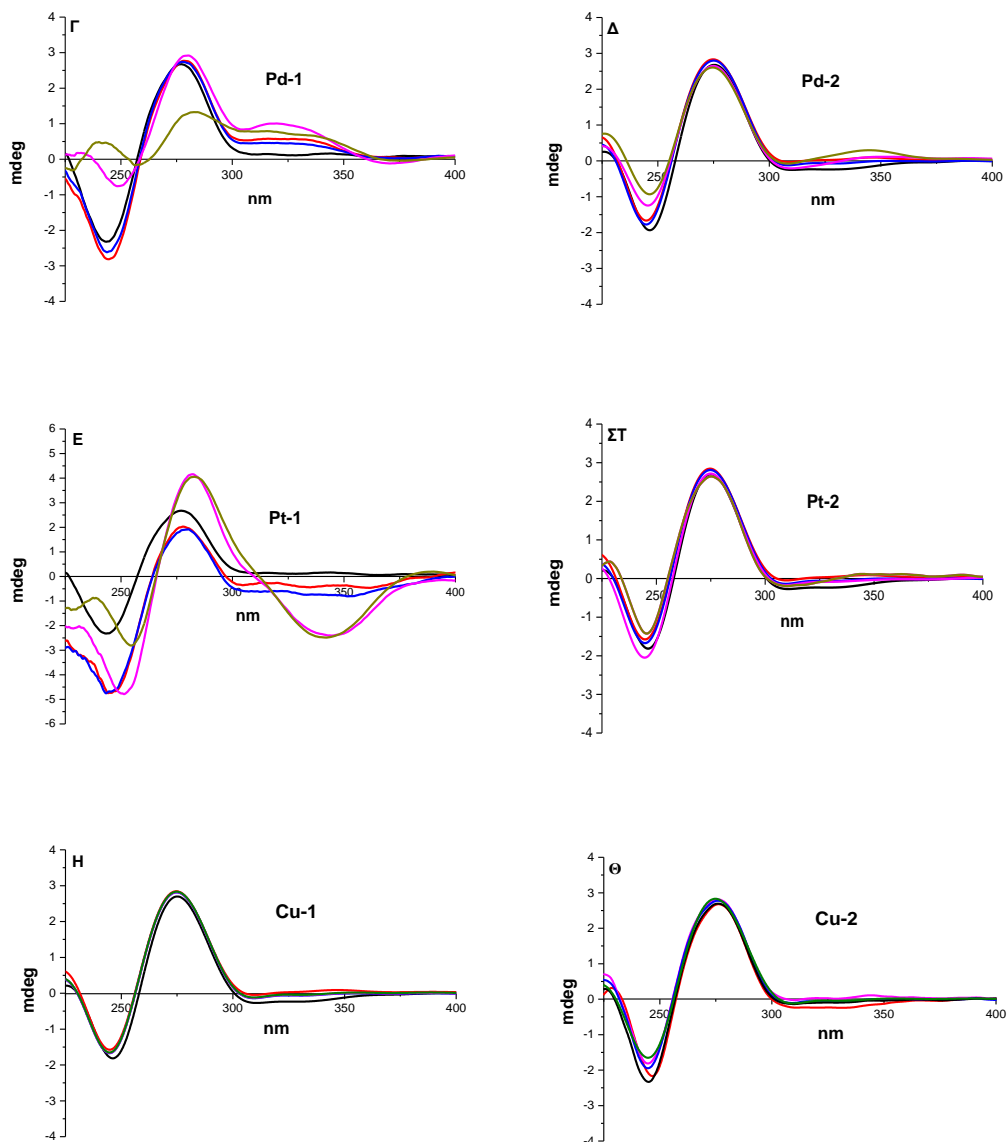
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 26α, η προσθήκη των υποκαταστατών επιφέρει αλλαγές στην αρνητική κορυφή στα 245 nm, ενδεικτικό της διατάραξης της διαμόρφωσης του DNA, ενώ η θετική κορυφή παραμένει αμετάβλητη. Η παρουσία τόσο της θετικής όσο και της αρνητικής κορυφής σε όλους τους λόγους καταδεικνύει ότι το DNA διατηρεί την Β-μορφή, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τη περίπτωση αλληλεπίδρασης μέσω των αυλακών, η οποία επιφέρει χαμηλή έως και ανύπαρκτη διατάραξη στην στοίβαξη των βάσεων και στην ελλειπτικότητα του DNA. Τα πειραματικά δεδομένα συμφωνούν με την βιβλιογραφία όπου παράγωγα του 2-φαινυλοβενζοθειαζολίου [219] και σύμπλοκα του 2-φαινυλοβενζοθειαζολίου και του 2-φαινυλοβενζοξαζολίου με Ru(II) [220, 221] δεσμεύονται επιλεκτικά στη μικρή αύλακα του CT-DNA.



**Σχήμα 26α: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού DNA ( $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) με αυξανόμενη προσθήκη υποκαταστατών 1 (A) και 2 (B).**

Ενδεικτικοί λόγοι  $R = [\text{υποκαταστάτης}]/[\text{DNA}]$ : —  $R = 0$ , —  $R = 0,01$ , —  $R = 0,05$ ,  
—  $R = 0,2$ , —  $R = 0,5$ .

Η προσθήκη του **Pd-1** προκαλεί εντυπωσιακές αλλαγές στο CD φάσμα με την εμφάνιση μιας θετικής ICD (εξ'επαγωγής κυκλικού διχρωϊσμού - Induced Circular Dichroism) κορυφής στα 323 nm, που οφείλεται στις π→π\* μεταπτώσεις του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου στο σύστημα **Pd-1**/DNA (Σχήμα 26β.Γ). Η κορυφή ICD αποτελεί σαφή ένδειξη της αλληλεπίδρασης του **Pd-1** με το DNA, αφού το σύμπλοκο είναι οπτικά ανενεργό. Η παρουσία της ICD κορυφής συμφωνεί με την πρόσδεση του συμπλόκου στην αύλακα του DNA [200, 222, 223]. Η παρουσία ισοελλειπτικού σημείου στα 257 nm πιθανόν υποδεικνύει μια ομοιόμορφη αλληλεπίδραση του συμπλόκου **Pd-1** με το DNA [224]. Καθώς ο λόγος R αυξάνει, η ένταση της αρνητικής κορυφής στα 245 nm μειώνεται, μεταβαίνοντας σε μηδενικές τιμές στο μεγαλύτερο λόγο (R = 0,5). Οι ανωτέρω αλλαγές αντανakλούν μετάβαση του CT-DNA από B- προς A-μορφή η οποία αποδίδεται, με βάση την βιβλιογραφία, σε μη ομοιοπολικές [225, 226] ή/και ομοιοπολικές [227, 228] αλληλεπιδράσεις με το DNA που αλλάζουν την διαμόρφωση της διπλής έλικας. Στην περίπτωση του συμπλόκου **Pd-1**, η μετάβαση από την B- στην A-μορφή συνδέεται με τη παρουσία του μετάλλου, αφού κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε παρουσία του υποκαταστάτη **1**. Σύμπλοκα του Pd(II) με έναν ή δύο υποκαταστάτες έχει δειχθεί ότι συνδέονται με το DNA με σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών [228-232], μεταβάλλοντας την δομή του πολυνουκλεοτιδίου. Επομένως ο συνδυασμός ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων του Pd(II) και μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου επιφέρει την καταγραφόμενη μετάβαση της τυπικής διαμόρφωσης του CT-DNA παρουσία του **Pd-1**. Η βαθμιαία μετατόπιση κατά 3 nm (βαθυχρωμική μετατόπιση) που εμφανίζουν οι 2 κορυφές του CT-DNA είναι δυνατόν να αποδωθούν αποτέλεσμα στην αλληλεπίδραση μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων του συμπλόκου και των βάσεων του DNA [225]. Παρόμοια μετάβαση από B- σε A- μορφή διαπιστώθηκε και στην περίπτωση προσθήκης του συμπλόκου **Pd-2** στο DNA, μολονότι απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση **Pd-2** για να επιφέρει το ίδιο αποτέλεσμα με αυτό του **Pd-1** (Σχήμα 26β.Δ).



**Σχήμα 26β: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού DNA ( $5 \times 10^{-5}$  M) με αυξανόμενη προσθήκη συμπλόκων Pd-1 (Γ), Pd-2 (Δ), Pt-1 (Ε), Pt-2 (ΣΤ), Cu-1 (Η) και Cu-2 (Θ).**

**Ενδεικτικοί λόγοι  $R = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$ : —  $R = 0$ , —  $R = 0,01$ , —  $R = 0,05$ ,  
—  $R = 0,2$ , —  $R = 0,5$ .**

Τα φάσματα CD που καταγράφησαν με την διαδοχική προσθήκη συμπλόκου **Pt-1** διαφοροποιούνται από εκείνα των συμπλόκων του παλλαδίου (Σχήμα 26β.Ε). Αρχικά παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην ένταση της αρνητικής κορυφής του DNA, η οποία μετατοπίζεται σταδιακά σε μεγαλύτερα μήκη κύματος μειούμενη σε ένταση, παραμένοντας μολαταύτα ισχυρότερη από εκείνη του DNA μόνου του. Η ένταση της θετικής κορυφής ακολουθεί αντίθετη τάση, αρχικά εμφανίζει μειωμένη ένταση απορρόφησης και κατόπιν αυξάνεται στις μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης του **Pt-1**. Στο μεγαλύτερο λόγο  $[\text{Pt-1}]/[\text{DNA}] = 0,5$ , η αρνητική και η θετική κορυφή του CT-DNA εμφανίζουν βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 12 nm και 5 nm αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, σε όλους τους υπό μελέτη λόγους οι δύο χαρακτηριστικές κορυφές του CT-DNA είναι παρούσες, καταδεικνύοντας ότι το DNA διατηρεί τα βασικά χαρακτηριστικά της B-μορφής. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στους μεγαλύτερους  $[\text{Pt-1}]/[\text{DNA}]$  λόγους παρατηρείται η εμφάνιση αρνητικής ICD κορυφής στα 345 nm, δεδομένο που βρίσκεται σε αντιστοιχία με τη φασματοσκοπία UV-Vis (Σχήμα 24β.Ε) όπου επίσης διαπιστώθηκε βαθμιαία μετατόπιση της χαρακτηριστικής κορυφής σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η κορυφή αυξάνει σε ένταση, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του **Pt-1** και εντέλει φτάνει σε κορεσμό για τον λόγο  $R = 0,2$ . Το ανωτέρω αρνητικό ICD συνήθως συνδέεται με αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής [223]. Εντούτοις, οι τυπικοί παρεμβολείς κατά κανόνα εμφανίζουν ασθενή σήματα ICD και με βάση θεωρητικούς υπολογισμούς [233, 234], η καταγραφή ισχυρών ICD σημάτων έρχεται σε αντίθεση με το φαινόμενο της παρεμβολής. Το σημαντικό μεγάλο μέγεθος της ευρεθείσας μοριακής ελλειπτικότητας ( $\Delta\epsilon > 10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  στους μεγαλύτερους λόγους R) των ICD κορυφών του συμπλόκου **Pt-1** αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης μέσω της αύλακας του DNA [223].

Με βάση τη βιβλιογραφία, αρνητικές ICD κορυφές έχουν παρατηρηθεί σε περιπτώσεις αλληλεπίδρασης μέσω της μικρής αύλακας του DNA εφόσον ο εξ'επαγωγής κυκλικός διχρωϊσμός εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την διαμόρφωση και την σχετική θέση της δεσμευμένης χρωμοφόρου ομάδας σε σχέση με τον άξονα της έλικας του DNA [222, 235], με χαρακτηριστικά παραδείγματα εκείνα των παραγώγων της δισταμικίνης [236-238].

Επομένως, όπως και στην περίπτωση του **Pd-1**, αναμένεται συνδυαστικός τρόπος αλληλεπίδρασης του συμπλόκου **Pt-1** με το DNA. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι η σισπλατίνη και ανάλογα σύμπλοκα του Pt(II) τα οποία είναι προσδεδεμένα με βιολογικά ενεργούς υποκαταστάτες σχηματίζουν GG και GA ενδοκλωνικούς και διακλωνικούς σταυροδεσμούς μέσω ομοιοπολικών δεσμών με το N7 των πουρινών της μεγάλης αύλακας, ενώ τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης τους με το DNA είναι ενδεικτικά της παρουσίας μη ομοιοπολικών δεσμών αλλά και δεσμών συναρμογής [239, 240].

Η λεπτομερής ανάλυση της αλληλεπίδρασης του συστήματος σισπλατίνης-δισταμικίνης φανέρωσε ότι η παρουσία της δισταμικίνης, η οποία έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά μέσω της μικρής αύλακας του DNA, οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού των διακλωνικών σταυροδεσμών εν συγκρίσει με τη σισπλατίνη μόνη της, ενώ τα προϊόντα αυτής της αλληλεπίδρασης σχηματίζονται επιλεκτικά μεταξύ των συμπληρωματικών G και C καταλοίπων. Ο σχηματισμός των καινούριων GC διακλωνικών σταυροδεσμών, οι οποίοι επιφέρουν δραματική διατάραξη της διαμόρφωσης του DNA, συσχετίστηκε με την δυνατότητα της δισταμικίνης να προσδένεται εκλεκτικά στην μικρή αύλακα. Το φαινόμενο του εξ'επαγωγής κυκλικού διχρωϊσμού που παρουσιάζει το σύστημα σισπλατίνη-δισταμικίνη αποδίδεται στην παρουσία των προϊόντων που σχηματίζουν διακλωνικούς δεσμούς, ενώ εκείνα που συμμετέχουν σε ενδοκλωνικούς σταυροδεσμούς δεν εμφανίζουν ICD [240].

Τα CD δεδομένα για το **Pt-1** συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με την δυνατότητα πρόσδεσης του φαινυλοβενζοθειαζολίου στην μικρή αύλακα αλλά και την αλληλεπίδραση του Pt(II) με πιθανή δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών με τις βάσεις του DNA. Επιπλέον, μπορεί να προταθεί ότι πέραν της αναμενόμενης παρουσίας του **Pt-1** στη μεγάλη αύλακα του DNA, το συγκεκριμένο σύμπλοκο πιθανότατα να προσδένεται και στη μικρή αύλακα μέσω της συνδυαστικής δράσης δεσμών συναρμογής του λευκοχρύσου με το DNA και μη ομοιοπολικής σύνδεσης του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που καταγράφησαν για τους υποκαταστάτες **1**, **2** και για τα σύμπλοκα **Pd-1** και **Pd-2** συμφωνούν με την προαναφερθείσα βιβλιογραφία όσον αφορά την παρουσία των μορίων στην μικρή αύλακα του DNA αλλά και την αλληλεπίδραση του με το μεταλλικό κέντρο. Η παρουσία της κορυφής ICD στα CD φάσματα ενδεχομένως να οφείλεται στον ακριβή προσανατολισμό της χρωμοφόρου ομάδας εντός της μικρής αύλακας. Ο κορεσμός του σήματος (για  $R = 0,2$ ) υποδηλώνει ότι η πρόσδεση πραγματοποιείται σε συγκεκριμένα σημεία και βρίσκεται σε συμφωνία με το σχηματισμό σταυροδεσμών σε συγκεκριμένες βάσεις του DNA, με τρόπο ανάλογο με εκείνο που παρατηρήθηκε για το σύμπλοκο Pt-δισταμυκίνη. Το αρνητικό ICD πιθανώς να αποδίδεται στην τοποθέτηση του υποκαταστάτη πλησίον της έλικας αφού με βάση θεωρητικούς υπολογισμούς [234], το σήμα ICD καθίστανται αρνητικό για μόρια που προσδένονται στην μικρή αύλακα με τον επιμήκη άξονά τους σε απόσταση λιγότερο από 7 Å από τον άξονα της έλικας του DNA. Λαμβάνοντας υπόψιν το μικρότερο μήκος της υδρογονανθρακικής αλυσίδας (Σχήμα 10,  $n=1$ ) που συνδέει τη χρωμοφόρο ομάδα με το μεταλλικό χηλικό κομμάτι στο σύμπλοκο **Pt-1**, ενδεχομένως η χρωμοφόρος ομάδα να έρχεται πιο κοντά στον άξονα της έλικας. Με βάση το ανωτέρω σκεπτικό, η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε στη συμπεριφορά μεταξύ των συμπλόκων **Pt-1** και **Pd-1**, πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης με το DNA ή/και στο διαφορετικό τρόπο σχηματισμού σταυροδεσμών. Η παρουσία των συμπλόκων **Cu-1** και **Cu-2** επιφέρει αλλαγές στην αρνητική κορυφή στα 245 nm, ενδεικτικό της διατάραξης της διαμόρφωσης του DNA, ενώ η θετική κορυφή παραμένει σχετικά αμετάβλητη (Σχήμα 26β.Η, Θ).

Συγκεκριμένα και για τα δύο σύμπλοκα του χαλκού διαπιστώθηκε μείωση της έντασης της αρνητικής κορυφής, ενώ επιπλέον για το **Cu-1** παρατηρήθηκε υποχρωμική μετατόπιση κατά 2 nm. Η παρουσία της θετικής και της αρνητικής κορυφής καταδεικνύει ότι το DNA διατηρεί την Β-μορφή, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με την αλληλεπίδραση μέσω της αύλακας του DNA. Αντίστοιχες μελέτες συμπλόκων του Cu(II) με φαινανθρολίνη, έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση με το DNA πραγματοποιείται μέσω μερικής παρεμβολής [195] ή εξωτερικής αλληλεπίδρασης με την έλικα [241].



Η προσθήκη του συμπλόκου **Pt-2** στο CT-DNA δεν επιφέρει τις δραματικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του μικρότερου σε μέγεθος **Pt-1**, στην ίδια συγκέντρωση. Η απουσία σήματος ICD για τα σύμπλοκα **Pt-2**, **Pd-2**, **Cu-1** και **Cu-2** δεν μπορεί αποδοθεί στην ασθενή πρόσδεση αυτών αφού καταγράφησαν σταθερές σύνδεσης της τάξεως του  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , οι οποίες είναι συγκρίσιμες με τις τιμές  $K_b$  των συμπλόκων **Pt-1** και **Pd-1**, ωστόσο ίσως να υποδεικνύει ένα λιγότερο ομοιογενή προσανατολισμό των μορίων σε σχέση με τον άξονα της έλικας του CT-DNA. Το ίδιο ισχύει και για τους υποκαταστάτες **1** και **2**.

#### 7.1.4 Μελέτες θερμικής μετουσίωσης

Η αλληλεπίδραση μικρών μορίων με το DNA συχνά μεταβάλλει το σημείο τήξεως αυτού ( $T_m$ ), αντανakλώντας σε κάποιο βαθμό την ισχύ και τον τρόπο αλληλεπίδρασης. Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων υποκαταστατών και συμπλόκων στο σημείο τήξεως του CT-DNA παρουσιάζεται στον Πίνακα 6 μαζί με το % ποσοστό της υπερχρωμικότητας (%h) η οποία αποδίδεται στην μεταξύ τους απομάκρυνση των βάσεων του DNA κατά την διάρκεια της θερμικής μετουσίωσης. Όπως αναμενόταν, με βάση την βιβλιογραφία, για το διάλυμα του CT-DNA μόνου του, το σημείο τήξεως υπολογίστηκε σε  $69,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$  και η αντίστοιχη % υπερχρωμικότητα σε  $29,5 \pm 0,8 \text{ }^\circ\text{C}$  [242].

Η αυξανόμενη προσθήκη υποκαταστατών **1** και **2** δεν επιφέρει σοβαρές διαταραχές στη δομή του CT-DNA όπως φαίνεται και από τις πειραματικές τιμές  $T_m$ . Οι ανωτέρω τιμές αποκλείουν πρόσδεση μέσω τυπικής παρεμβολής, η οποία συνοδεύεται από σημαντική αύξηση στις τιμές  $T_m$  που κυμαίνεται από  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  μέχρι  $+14 \text{ }^\circ\text{C}$  [196, 243, 244] και συμφωνούν με αλληλεπίδραση μέσω της αύλακας του DNA και. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις υποκαταστατών η διαπιστωμένη μείωση της % h (η οποία είναι πιο έντονη για τον υποκαταστάτη **1** και προσεγγίζει την τιμή 19,4 για τον λόγο  $R = 0,5$ ), είναι ενδεικτική της διατάραξης που προκαλείται στο στοίβαγμα των βάσεων.

Η προσθήκη των συμπλόκων **Pt-1** και **Pt-2** έχει ως αποτέλεσμα την μείωση τόσο της %h όσο και του σημείου τήξεως του DNA, προσεγγίζοντας τιμές  $\Delta T_m$  της τάξεως των  $-8,8\text{ }^\circ\text{C}$  και  $-7,8\text{ }^\circ\text{C}$ , αντίστοιχα, στο μεγαλύτερο λόγο  $R = 0,5$ . Η ανωτέρω δομική αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας, η οποία εμφανίζεται με τρόπο άμεσα εξαρτώμενο από την συγκέντρωση, αποδίδεται στην σύνδεση του μεταλλικού κέντρου του λευκοχρύσου των συμπλόκων **Pt-1** και **Pt-2** με το DNA. Ενδοκλωνικές και διακλωνικές αλληλεπιδράσεις του Pt(II) με τις βάσεις του DNA είναι γνωστό ότι επιφέρουν διαμορφωσιακές αλλαγές, οι οποίες αποσταθεροποιούν την έλικα και επάγουν την τοπική δημιουργία μετουσιωμένων περιοχών με ταυτόχρονη απώλεια της στοίβαξης των βάσεων [245, 246]. Παρόμοια πειραματικά δεδομένα θερμικής μετουσίωσης έχουν καταγραφεί για την σισπλατίνη και ανάλογα σύμπλοκα του λευκοχρύσου [247, 248]. Η χαμηλότερη τιμή %h που καταγράφηκε για το **Pt-1** (στο λόγο  $R = 0,5$ ) συγκρινόμενη με την αντίστοιχη του συμπλόκου **Pt-2** ίσως να φανερώνει την ισχυρότερη παρουσία ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με το DNA.

Αντιθέτως, τα σύμπλοκα του Pd(II) αλληλεπιδρούν με τρόπο διαφορετικό από αυτόν των αντίστοιχων συμπλόκων του λευκοχρύσου, προκαλώντας αύξηση των τιμών του σημείου τήξεως του CT-DNA (Πίνακας 6). Τα πειραματικά δεδομένα βρίσκονται σε συμφωνία με μελέτες αλληλεπιδράσεων συμπλόκων Pt-φαμοτιδίνης και Pd-φαμοτιδίνης με το CT-DNA, οι οποίες έδειξαν διαφοροποιημένη συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, εικόνες AFM ανέδειξαν ότι τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου επιφέρουν αλλαγές στη δομή του DNA, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό συμπαγών μορίων DNA νηματοειδούς δομής, ενώ τα παράγωγα του παλλαδίου μεταβάλλουν την τυπική δομή του πολυνουκλεοτιδίου σχηματίζοντας ισχυρά συμπαγείς και πεπλατυσμένες δομές μορίων DNA [249]. Επιπροσθέτως, ο χαρακτηρισμός με φυσικές και χημικές τεχνικές έδειξε ότι η συχνότητα και η δομή των διακλωνικών διασυνδέσεων διαφέρει μεταξύ των δύο συμπλόκων, με τα αντίστοιχα του παλλαδίου να επάγουν αλλαγές στην επάλληλη διάταξη των βάσεων οι οποίες με την σειρά τους καθιστούν το DNA πιο συμπαγές [250]. Σε σχετική μελέτη συμπλόκων Pt(II) και Pd(II) που παρουσιάζουν αντι-τρυπανοσωμική δραστηριότητα, οι εικόνες AFM έδειξαν ότι τα παράγωγα του Pd(II) επάγουν εντονότερες αλλαγές στη μορφή του CT-DNA, όπως υπερσπείρωση, κάμψη

και πάχυνση, από τα αντίστοιχα του Pt [232]. Η δημιουργία ισχυρά συμπαγών δομών DNA, όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία, παρουσία συμπλόκων παλλαδίου βρίσκεται σε αντιστοιχία με τα ληφθέντα πειραματικά δεδομένα θερμικής μετουσίωσης του DNA παρουσία ενώσεων **Pd-1** και **Pd-2** και συμφωνεί με τα CD δεδομένα της προσθήκης του συμπλόκου **Pd-1**, όπου διαπιστώθηκε μετάβαση από την B-μορφή στην πιο συμπαγή A-μορφή του DNA [251].

Η προσθήκη των συμπλόκων **Cu-1** και **Cu-2** έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση τόσο της %h όσο και του σημείου τήξεως του CT-DNA, προσεγγίζοντας τιμές  $\Delta T_m$  της τάξεως των  $-3.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $-2.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  αντίστοιχα, στο μεγαλύτερο λόγο  $R = 0,5$ . Η παρατηρούμενη δομική αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας δηλώνει την ισχυρή αλληλεπίδραση των συμπλόκων του χαλκού με το DNA και συγχρόνως αποκλείει την πιθανότητα παρεμβολής αυτών μεταξύ των βάσεων του πολυνουκλεοτιδίου [252, 253].

**Πίνακας 6:  $\Delta T_m$  και %h του CT-DNA παρουσία υποκαταστατών και αντίστοιχων συμπλόκων**

ένωση	R = 0		R = 0,01		R = 0,033		R = 0,1		R = 0,2		R = 0,5	
	$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	%h	$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	%h	$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	%h	$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	%h	$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	%h	$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	%h
<b>1</b>	0	30,0	0,7	27,4	0,1	25,1	0,1	24,4	-0,2	24,5	-0,6	19,4
<b>Pt-1</b>	0	29,5	0,4	28,5	-0,1	29,6	-0,4	26,8	-1,8	24,2	-8,8	14,5
<b>Pd-1</b>	0	29,4	0,6	28,2	0,4	25,4	2,1	20,0	2,6	14,3	1,6	7,1
<b>Cu-1</b>	0	29,8	-0,4	25,2	-0,5	23,1	-1,8	21,8	-2,2	20,7	-3,1	14,3
<b>2</b>	0	28,2	1,5	28,0	1,7	27,8	1,7	28,1	1,5	27,4	1,3	25,9
<b>Pt-2</b>	0	29,4	2,2	28,1	-0,3	29,9	-3,9	25,3	-4,6	24,3	-7,8	23,7
<b>Pd-2</b>	0	30,8	0,4	27,8	2,2	27,8	2,7	18,1	4,7	9,5	3,9	8,8
<b>Cu-2</b>	0	29,8	-1,4	25,8	-1,5	22,8	-1,1	21,1	-2,7	20,1	-2,9	13,6

### 7.1.5 Ιξωδομετρία

Η ιξωδομετρία θεωρείται από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους αξιολόγησης του τρόπου αλληλεπίδρασης ενώσεων με το DNA. Οι ενώσεις που δρουν ως κλασσικοί παρεμβολείς αυξάνουν δραστικά το μήκος του DNA με αποτέλεσμα να έχουμε αυξημένες τιμές ιξώδους, αντιθέτως οι ενώσεις που αλληλεπιδρούν μέσω της αύλακας συνήθως προκαλούν μικρές ή και καθόλου αλλαγές στις τιμές ιξώδους [254]. Τα διαγράμματα συσχέτισης του ιξώδους  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  με τον λόγο R παρουσιάζονται στο Σχήμα 27. Συγκεκριμένα, η προσθήκη του υποκαταστάτη **1** και των συμπλόκων **Pt-1**, **Pd-1** και **Cu-1** επιφέρει άμεση πτώση του ιξώδους, η οποία σταθεροποιείται στον λόγο  $R = 0,033$  (για τις ενώσεις **1**, **Pt-1** και **Cu-1**), ενώ στην περίπτωση του **Pd-1** η μείωση συνεχίζεται (Σχήμα 27A). Η διαφοροποίηση στην συμπεριφορά μεταξύ των μετάλλων είναι πιο χαρακτηριστική παρουσία των συμπλόκων **Pt-2**, **Pd-2** και **Cu-2** (Σχήμα 27B).

Αρχικά τα σύμπλοκα **Pt-2** και **Pd-2** μειώνουν το ιξώδες κατά 0,82 (για  $R = 0,02$ ), ενώ το **Cu-2** κατά 0,62. Σε μεγαλύτερους λόγους δεν παρατηρείται περαιτέρω μείωση του ιξώδους του CT-DNA για τα **Pt-2** και **Cu-2**, ενώ για το **Pd-2** η πτώση του ιξώδους συνεχίζεται. Ομοίως, η προσθήκη του υποκαταστάτη **2** προκαλεί εντυπωσιακή και απότομη μείωση του ιξώδους μέχρι την τιμή 0,6 (για το λόγο  $R = 0,01$ ) και στην συνέχεια σταθεροποιείται. Η ιδιαίτερως εντυπωσιακή επίδραση των υπό αξιολόγηση ενώσεων στο ιξώδες του DNA, προφανώς δεν μπορεί να αποδοθεί σε αλληλεπίδραση μέσω κλασσικής παρεμβολής ή μέσω της μικρής αύλακας.

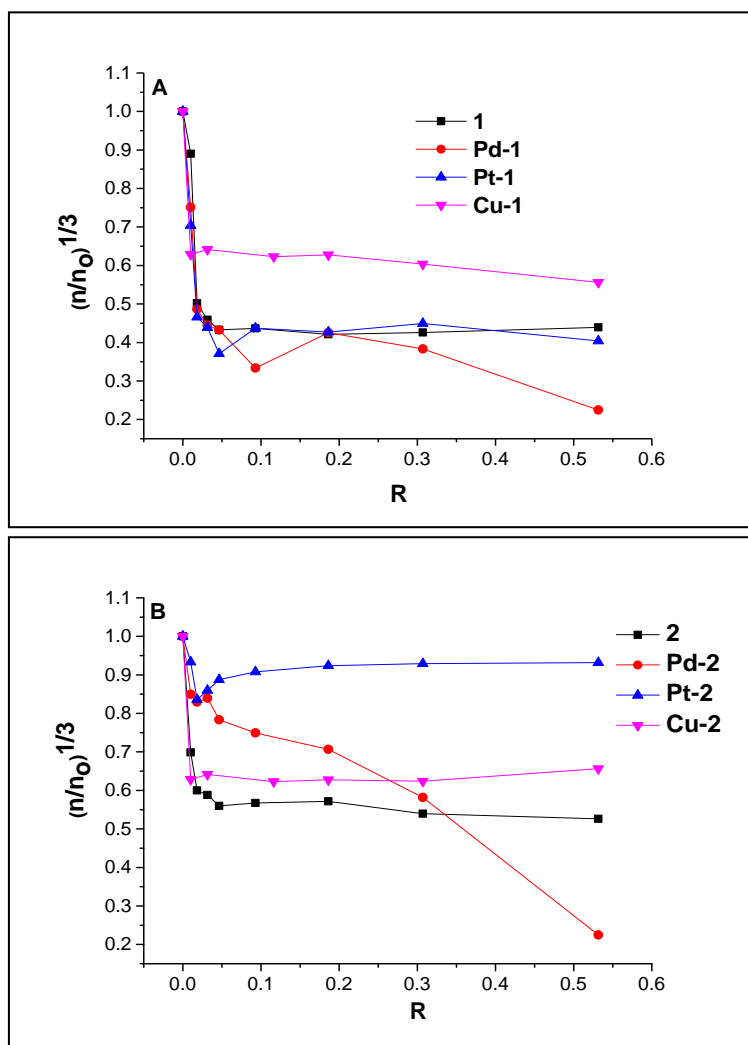
Στην περίπτωση των συμπλόκων, ενδεχομένως να οφείλεται στο σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των μετάλλων και του CT-DNA. Η αλληλεπίδραση της σισπλατίνης και αντίστοιχων συμπλόκων με το DNA, θεωρείται ότι μειώνει το μήκος και την τιμή του ιξώδους του DNA [249, 255], ως φυσικό επακόλουθο της διασύνδεσης, μέσω σταυροδεσμών, του λευκοχρύσου με τις βάσεις γουανίνης που λυγίζει και κάμππει την έλικα. Είναι γνωστό ότι τα σύμπλοκα του παλλαδίου σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με το DNA και επάγουν αλλαγές στη δομή του, οι οποίες περιλαμβάνουν φαινόμενα όπως υπερσπείρωση, κάμψη και πάχυνση, φαινόμενα που πιθανόν σχετίζονται με τη μείωση του ιξώδους του DNA [229, 250, 256, 257].

Επιπροσθέτως, μελέτες συμπλόκων του χαλκού με υποκαταστάτες τη πυριδινολομεθυλοδιαμίνη και τη μεθυλοπυριδίνη έδειξαν ότι μειώνουν το ιξώδες άρα και το μήκος της έλικας του DNA, δίχως να παρατηρηθεί ανάλογη εντυπωσιακή πτώση κατά 0,4 μονάδες [195, 258]. Όμως, η πιθανή παρουσία ομοιοπολικής σύνδεσης των μετάλλων με τις βάσεις του DNA δεν αιτιολογεί την εντυπωσιακά μεγάλη μείωση του ιξώδους των υποκαταστατών **1** και **2** [259], εύλογα επομένως, συμπεραίνουμε ότι η χημική δομή του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μείωση του ιξώδους. Η μείωση του ιξώδους από αρωματικούς υποκαταστάτες έχει αποδοθεί στην βιβλιογραφία στην αλληλεπίδραση μέσω μη κλασσικής παρεμβολής, όπου η επίπεδη αρωματική ομάδα παρεμβάλλεται μερικώς μεταξύ των ζευγών βάσεων. Συνήθως αυτού του τύπου η αλληλεπίδραση λυγίζει ή κάμπτει την έλικα του DNA και έτσι μειώνεται το μήκος, άρα και το ιξώδες [260, 261]. Βιβλιογραφικές μελέτες έδειξαν ότι η πυριδίνη παρεμβάλλεται μερικώς μεταξύ των βάσεων του DNA είτε ως τμήμα της δομής ενός υποκαταστάτη [195] είτε άμεσα συνδεδεμένο στο μεταλλικό κέντρο [262-264]. Είναι λοιπόν πιθανόν και στην δική μας περίπτωση η χημική ομάδα της πυριδίνης να παρεμβάλλεται μερικώς μεταξύ των βάσεων του DNA [220, 221, 265].

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι ενώσεις που αλληλεπιδρούν μέσω της μικρής αύλακας του DNA εμφανίζουν επιλεκτικότητα σε περιοχές "πλούσιες" σε AT αλληλουχίες [266] και επιπλέον μόρια-παρεμβολείς συνήθως εμφανίζουν προτίμηση σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, η σταθεροποίηση της τιμής του ιξώδους του DNA που παρατηρήθηκε στην περίπτωση των υποκαταστατών **1** και **2** (για τον λόγο R μεγαλύτερο από 0,03) μπορεί να αποδοθεί στο κορεσμό των σημείων πρόσδεσης του DNA, γεγονός που επιτρέπει τη δέσμευση της χρωμοφόρου ομάδας του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου αλλά και τη μερική παρεμβολή της πυριδίνης. Η σχετικά μικρότερη επίδραση του υποκαταστάτη **2** στο ιξώδες του DNA σε σχέση με αυτή του **1** ίσως να αποδίδεται στηN πιο μεγάλη σε μήκος ανθρακική αλυσίδα που συνδέει το φαρμακοφόρο με την ομάδα χηλίωσης. Τοιουτοτρόπως, ο υποκαταστάτης **2** καταλαμβάνει περισσότερο χώρο στην αύλακα με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η δέσμευση σε συγκεκριμένες θέσεις του DNA.

Με το σκεπτικό ότι η χηλική ομάδα της πυριδίνης παρεμβάλλεται μερικώς μεταξύ των βάσεων του DNA, οι αλλαγές στο ιξώδες που παρατηρήθηκαν παρουσία των συμπλόκων πιθανόν να είναι αποτέλεσμα μερικής παρεμβολής και ομοιοπολικού δεσμού. Αντίστοιχη συνδυαστική δράση έχει προταθεί για διχλωρο-σύμπλοκα του λευκοχρύσου με παράγωγα της πυριδίνης και πυριμιδίνης [263] όπως επίσης για σύμπλοκα του Cu(II) με φαινανθρολίνη [267]. Η ενδιαφέρουσα διαφοροποίηση μεταξύ των **Pt-1** και **Pt-2** μπορεί μόνο να αποδοθεί στο διαφορετικό μήκος της υδρογονοανθρακικής αλυσίδας.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως για τον υποκαταστάτη **1**, ενδεχομένως και στην περίπτωση του **Pt-2** το μεγάλο μέγεθος του συμπλόκου εμποδίζει τον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού και/ή παρεμβολής μεταξύ των βάσεων, με αποτέλεσμα τον μικρότερο συνολικά αριθμό δεσμευμένων μορίων στο DNA. Συγκεκριμένα, για τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου τα οποία πιθανότατα προσδένονται στη μικρή αύλακα του DNA μέσω αλληλεπίδρασης της ομάδας του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου, θερμοδυναμικοί παράγοντες που σχετίζονται με τους υψηλότερους βαθμούς ελευθερίας της μεγαλύτερης σε μήκος ανθρακικής αλυσίδας του **Pt-2**, πιθανότατα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της προσέγγισης του μετάλλου στα ζεύγη βάσεων. Επιπλέον, η μεγάλη μείωση στο ιξώδες του DNA που διαπιστώθηκε για τα σύμπλοκα του παλλαδίου βρίσκεται σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα του CD και της θερμικής μετουσίωσης, αντανakλώντας ενδεχομένως τη δημιουργία συμπαγών δομών.



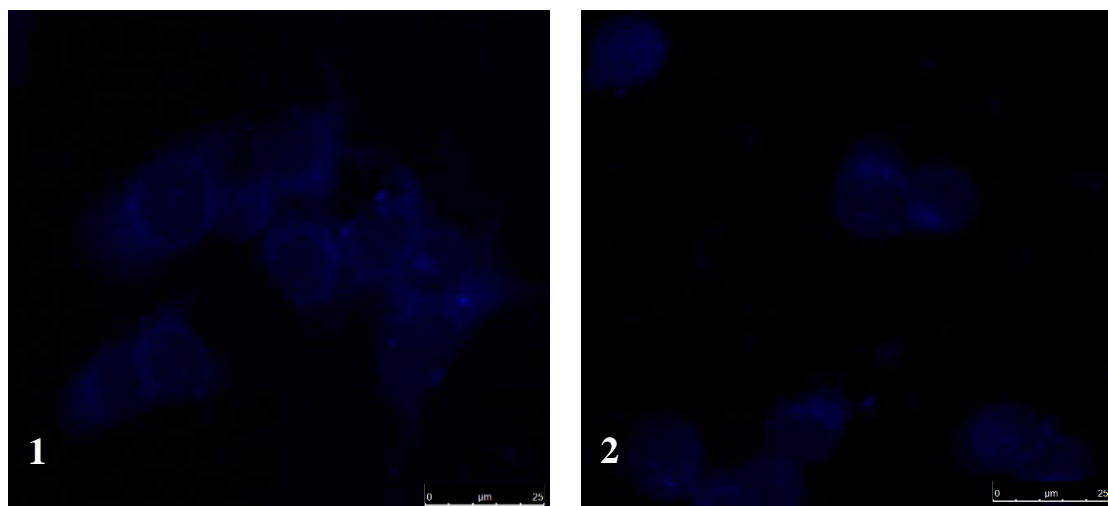
**Σχήμα 27: Διάγραμμα επίδρασης αυξανόμενων ποσοτήτων υποκαταστατών και αντίστοιχων συμπλόκων στο ιξώδες του CT-DNA ( $5 \times 10^{-5}$  M) στους  $25^\circ\text{C}$ , όπου  $R = [\text{ένωση}] / [\text{DNA}]$  (0 – 0,5)**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

### ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

#### 8.1 Αποτελέσματα μελέτης κυτταρικής πρόσληψης

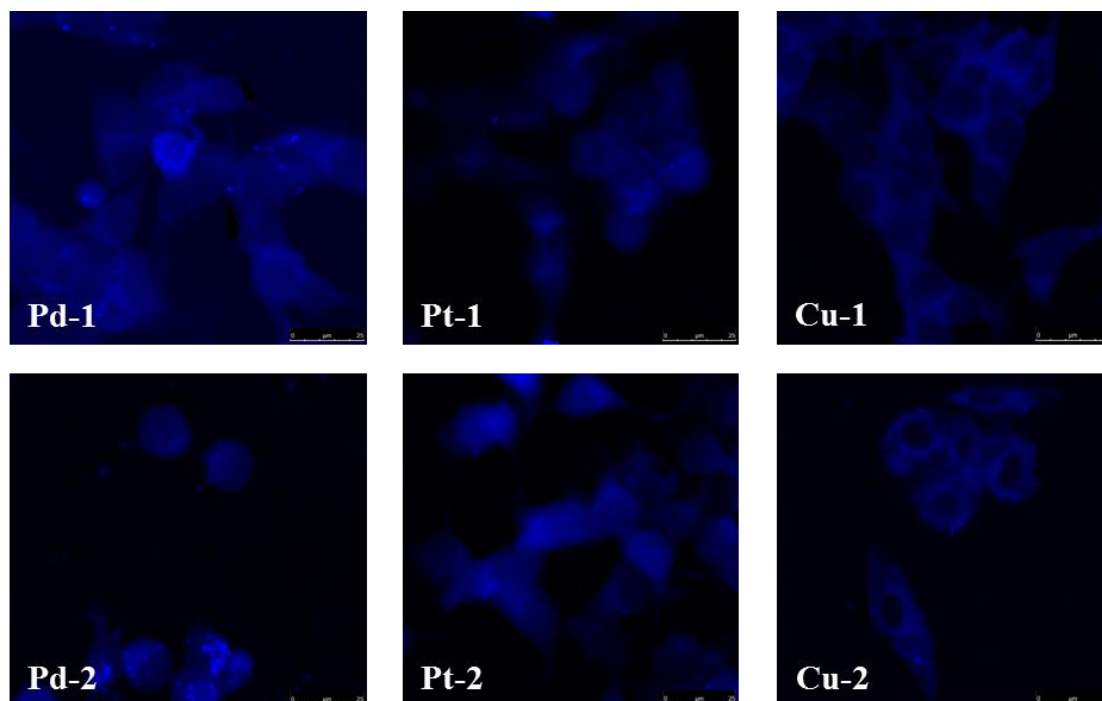
Στην Εικόνα 30 παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες της κυτταρικής πρόσληψης των υποκαταστατών και των αντίστοιχων συμπλόκων (συγκέντρωσης 50  $\mu\text{M}$ ) μετά από 24 ώρες επώασης στα MCF-7 κύτταρα. Είναι προφανές ότι οι υποκαταστάτες **1** και **2** εισέρχονται στα κύτταρα σε μικρότερο βαθμό, παρουσιάζοντας χαμηλότερες ενδοκυτταρικές εντάσεις φθορισμού από αντίστοιχα παράγωγα του βενζοθειαζολίου που απαντώνται στη βιβλιογραφία [268]. Η χαμηλή κυτταρική πρόσληψη των υποκαταστατών πιθανόν να οφείλεται στη παρουσία της πυριδινομεθυλαμινο-ομάδας που διαδραματίζει το ρόλο του χηλικού παράγοντα.



**Εικόνα 30:** Ενδεικτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων MCF-7 μετά από 24 ώρες επώασης με τις ενώσεις **1** και **2** με την χρήση φίλτρου DAPI. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 25  $\mu\text{m}$



Αντιθέτως, όλα τα σύμπλοκα εισέρχονται στα κύτταρα σε μεγαλύτερο βαθμό από τους υποκαταστάτες, καταδεικνύοντας την ιδιαίτερη σημασία της παρουσίας μεταλλικού κέντρου. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε έντονος φθορισμός εσωτερικά του κυττάρου, ο οποίος είναι ισχυρότερος στο κυτταρόπλασμα και ασθενέστερος στον πυρήνα (Εικόνα 31). Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες μελέτες κυτταρικής πρόσληψης στα φυσιολογικά κύτταρα DSF, οι οποίες δεν έδειξαν ενδοκυτταρική πρόσληψη των υπό αξιολόγηση ενώσεων, γεγονός που υποδεικνύει εκλεκτικότητα μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων.



**Εικόνα 31: Ενδεικτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων MCF-7 μετά από 24 ώρες επώασης με τις ενώσεις, Pd-1, Pt-1, Cu-1, Pd-2, Pt-2 και Cu-2 με την χρήση φίλτρου DAPI. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 25  $\mu\text{m}$**

Σε υδατικό περιβάλλον και σε συνθήκες pH και αλατότητας (7,4 και 118 mM) που προσεγγίζουν τις φυσιολογικές, τα σύμπλοκα του Pd(II) και του Pt(II) αναμένεται να είναι θετικά φορτισμένα λόγω της αντικατάστασης των ατόμων χλωρίου από μόρια νερού [269], εντούτοις, αντίστοιχα χλώρο-σύμπλοκα με ουδέτερο φορτίο έχει βρεθεί ότι βρίσκονται σε ισορροπία με υδρολυμένα και υδροξυ-σύμπλοκα [270]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός μεταφοράς της σισπλατίνης [271] αλλά και άλλων μεταλλοφαρμάκων [272] εντός των κυττάρων επιτυγχάνεται με ενεργή διάχυση μέσω των μεταφορέων που χρησιμοποιούν ενέργεια (μεταβολική ή ηλεκτροχημική) για να μεταφέρουν τις διαλυτές ουσίες ακόμα κι ενάντια στο ηλεκτροχημικό τους δυναμικό. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι μόρια με ουδέτερο φορτίο διαπερνούν ευκολότερα την κυτταρική μεμβράνη από τα μόρια με φορτίο μέσω μηχανισμών παθητικής διάχυσης [273]. Επομένως είναι πολύ πιθανό τα σύμπλοκα της παρούσας μελέτης να εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω και των δύο μηχανισμών ενεργής μεταφοράς και παθητικής διάχυσης.

## **8.2 Αποτελέσματα μελέτης in vitro κυτταροτοξικότητας**

Η διερεύνηση της in vitro κυτταροτοξικότητας των παραγώγων του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου πραγματοποιήθηκε στην "ευαίσθητη" στα φαινυλοβενζοθειαζόλια κυτταρική σειρά MCF-7 και στην λιγότερο ευαίσθητη MDA-MB-231 [5]. Για να μελετηθεί πιθανή εκλεκτικότητα μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων επιλέχθηκε η φυσιολογική κυτταρική σειρά ινοβλαστών DSF. Το κλινικά χρησιμοποιούμενο χημειοθεραπευτικό φάρμακο σισπλατίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Η συγκέντρωση κάθε παραγώγου που απαιτείται για να αναστείλει το 50% της κυτταρικής επιβίωσης, παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Οι υποκαταστάτες **1** και **2** δεν εμφάνισαν σημαντική τοξικότητα στις δοκιμαζόμενες καρκινικές σειρές μαστού αλλά ούτε και στη φυσιολογική κυτταρική σειρά ινοβλαστών. Η χαμηλή κυτταροτοξικότητα που καταγράφηκε συμφωνεί με την χαμηλή κυτταρική πρόσληψη των υποκαταστατών που διαπιστώθηκε στην Υποενότητα **8.1**.

Αντιθέτως, οι τιμές IC<sub>50</sub> στην περίπτωση των συμπλόκων του παλλαδίου και του λευκοχρύσου είναι από 5 έως και 15 φορές χαμηλότερες από εκείνες που παρατηρήθηκαν για τους υποκαταστάτες. Στη φυσιολογική κυτταρική σειρά DSF η καταγραφόμενη τοξικότητα είναι έως και 15 φορές χαμηλότερη από αυτή που προέκυψε στις καρκινικές σειρές μαστού. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην "ευαίσθητη" καρκινική σειρά μαστού MCF-7 τα σύμπλοκα του παλλαδίου είναι 2-3 φορές περισσότερο τοξικά από τα αντίστοιχα του λευκοχρύσου, ενώ αυτή η διαφοροποίηση είναι λιγότερο εμφανής στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231. Μολονότι τα σύμπλοκα του παλλαδίου και του λευκοχρύσου είναι λιγότερο κυτταροτοξικά (2 έως 7 φορές στα MCF-7 και 2 έως 4 φορές στα MDA-MB-231) από τη σισπλατίνη [274] και εμφανίζουν μικρότερη κυτταροτοξική δράση από το 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζόλιο [275], συνολικά επιφέρουν μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις στην τοξικότητα μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυτταρικών σειρών (4 έως και 15 φορές), σε σύγκριση με την σισπλατίνη (3 έως και 4 φορές).

Τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάζουν τα σύμπλοκα του χαλκού με τιμές IC<sub>50</sub> που κυμαίνονται μεταξύ 10 και 1 μΜ. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο δοκιμαζόμενων καρκινικών σειρών μαστού, όμως τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν στα φυσιολογικά κύτταρα καταδεικνύουν έως και 40 φορές μεγαλύτερη τοξικότητα στα καρκινικά. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της *in vitro* κυτταροτοξικότητας διαπιστώθηκε ότι η συμπλοκοποίηση των υποκαταστατών επάγει μεγαλύτερη τοξικότητα. Τα σύμπλοκα του χαλκού εμφανίζουν το καλύτερο κυτταροτοξικό προφίλ, παρουσιάζοντας χαμηλότερες τιμές IC<sub>50</sub> από τα αντίστοιχα του παλλαδίου και του λευκοχρύσου, ενώ η δραστηριότητα που καταγράφηκε είναι συγκρίσιμη και κατά περιπτώσεις καλύτερη από της σισπλατίνης [276, 277]. Επιπροσθέτως, διαπιστώθηκε για όλα τα σύμπλοκα εκλεκτικότητα μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων, δίχως να διαπιστωθεί σημαντική διαφοροποίηση με αλλαγή του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε ότι η επιλογή του μετάλλου μπορεί να βελτιστοποιήσει την κυτταροτοξικότητα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η δραστικότητα των μεταλλικών ιόντων, μόνων τους, ( $K_2PdCl_4$ ,  $K_2PtCl_4$  και  $Cu(ClO_4)_2$ ) στην κυτταρική σειρά MCF-7, ανέδειξε μεγαλύτερες κατά μία τάξη μεγέθους τιμές  $IC_{50}$ , υποδηλώνοντας έτσι ότι η βιολογική δράση των συμπλόκων προκύπτει από τη συνδυαστική δράση του μετάλλου και της ομάδας του φαινυλοβενζοθειαζολίου. Τελειώνοντας, πρέπει να σημειωθεί ότι η εκλεκτικότητα μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων διαπιστώθηκε και από τα πειράματα κυτταρικής πρόσληψης αλλά και από τις κυτταροτοξικές μελέτες.

**Πίνακας 7: Τιμές  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) των υπό μελέτη ενώσεων στις δοκιμαζόμενες κυτταρικές σειρές**

	<b>MCF-7</b>	<b>MDA-MB-231</b>	<b>DSF</b>
<b>1</b>	331,9 ± 5,9	398,2 ± 6,8	736,6 ± 0,8
<b>Pd-1</b>	20,1 ± 0,3	47,6 ± 0,4	296,2 ± 0,6
<b>Pt-1</b>	71,0 ± 1,6	39,6 ± 0,2	393,2 ± 10,8
<b>Cu-1</b>	10,9 ± 1,2	7,6 ± 0,6	50,7 ± 5,3
<b>2</b>	355,1 ± 0,3	373,6 ± 0,6	772,2 ± 2,9
<b>Pd-2</b>	30,5 ± 1,7	30,4 ± 1,1	320,6 ± 4,3
<b>Pt-2</b>	58,8 ± 0,1	26,7 ± 0,2	208,7 ± 0,2
<b>Cu-2</b>	7,9 ± 0,2	1,4 ± 0,3	58,6 ± 4,3
<b>σισπλατίνη</b>	9,5 ± 0,1	12,4 ± 0,6	40,0 ± 0,4

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή συνετέθησαν δύο υποκαταστάτες που φέρουν την αντικαρκινική ομάδα του 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζολίου συνδεδεμένη, μέσω ανθρακικής αλυσίδας, με την 2-αμινομεθυλοπυριδίνη. Ως βιοδραστική ομάδα επιλέχθηκε το 2-(4'-αμινοφαινυλο)βενζοθειαζόλιο, λόγω του αποδεδειγμένου συνδυασμού εκλεκτικότητας και δραστηριότητας που διαθέτει, ενώ ως ομάδα χηλίωσης επιλέχθηκε η πυριδινο μεθυλαμίνη η οποία μπορεί να λειτουργήσει ως (N-N)- υποκαταστάτης. Η επιλογή των μεταλλικών ιόντων του Pd(II), Pt(II) και Cu(II) για τη συμπλοκοποίηση των υποκαταστατών πραγματοποιήθηκε αφενός λόγω της δυνατότητας αλληλεπίδρασης του Pt(II) με το DNA (σισπλατίνη), αφετέρου, λόγω της αντικαρκινικής δράσης συμπλόκων του Pd(II) και Cu(II), αποφεύγοντας έτσι τις αρνητικές επιπτώσεις της τοξικότητας των συμπλόκων του λευκοχρύσου.

Τα μεταλλικά σύμπλοκα έχουν σχεδιαστεί με τη μέθοδο σύνδεσης διλειτουργικού υποκαταστάτη, όπου η φαρμακοφόρος ομάδα παραμένει στερεοχημικά ελεύθερη διατηρώντας τις δραστικές της ιδιότητες. Βασική επιδίωξη είναι η σύνθεση αντικαρκινικών ενώσεων οι οποίες θα παρουσιάζουν διπλή αντικαρκινική δράση ως αποτέλεσμα του συνδυασμού της τοξικής επίδρασης του μεταλλικού κέντρου και της εκλεκτικότητας της φαρμακοφόρου ομάδας. Τα ανωτέρω συμπλέχθηκαν επιτυχώς με Pd(II) (**Pd-1** και **Pd-2**), με Pt(II) (**Pt-1** και **Pt-2**) και με Cu(II) (**Cu-1** και **Cu-2**) και ακολούθησε χαρακτηρισμός με διάφορες μεθόδους (IR, NMR, MS, UV-Vis και EPR) όπου και πιστοποιήθηκε η σταθερότητα, η δομή και η καθαρότητα αυτών. Βασιζόμενοι στα πειραματικά αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι τα ιόντα του λευκοχρύσου (II), του παλλαδίου (II) και του χαλκού (II) συμπλέκονται με τους υποκαταστάτες μέσω των ατόμων αζώτου της δευτεροταγούς αμίνης και της πυριδίνης.

Σε συνέχεια της μελέτης, ακολούθησε η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το CT-DNA των κλασικών μεθόδων της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), κυκλικού διχρωϊσμού (CD), φθορισμού, ιζωδομετρίας και καμπυλών θερμικής μετουσίωσης. Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης ανέδειξαν την ικανότητα τόσο των υποκαταστατών όσο και των συμπλόκων να αλληλεπιδρούν ισχυρά με το DNA. Η ανωτέρω διαπίστωση βασίζεται στο γεγονός ότι εμφανίζουν παρόμοιες τιμές σταθερών σύνδεσης ( $K_b$ ), που είναι της τάξεως των  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , παρεμφερή ποσοστά εκτοπισμού του μορίου-παρεμβολέα EtBr αλλά και στη ιδιαίτερα εντυπωσιακή μείωση του ιζώδους του DNA.

Βασιζόμενοι στα πειραματικά αποτελέσματα αλλά και στην υπάρχουσα βιβλιογραφία ανάλογων παραγώγων του φαινυλοβενζοθειαζολίου, προτείνεται η παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων στη μικρή αύλακα του DNA. Για τα σύμπλοκα υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα στη μικρή αύλακα του DNA και πιθανόν συνοδεύονται από σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Η εντυπωσιακή μείωση του ιζώδους που καταγράφηκε για όλες τις ενώσεις ενδεχομένως συνδέεται με τη μερική παρεμβολή της ομάδας της πυριδίνης.

Στις συνθήκες που λαμβάνουν χώρα τα πειράματα μελέτης αλληλεπίδρασης με το CT-DNA (υδατικό φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα,  $\text{pH}=7,2$ ) η αρχική προσέγγιση των υπό μελέτη ενώσεων στην έλικα του DNA πιθανότατα πραγματοποιείται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες που εκτείνονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό του μεγαλομορίου, καθώς οι ενώσεις αναμένεται να είναι θετικά φορτισμένες. Συγκεκριμένα, οι υποκαταστάτες και τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου (II) και του παλλαδίου (II) καθίσταται θετικά φορτισμένα λόγω αντικατάστασης των ατόμων χλωρίου από μόρια νερού, σύμφωνα με το πρότυπο της σισπλατίνης.

Τα προκαταρκτικά πειράματα βιολογικής αξιολόγησης έδειξαν ότι τόσο οι υποκαταστάτες όσο και τα σύμπλοκα προσλαμβάνονται από τις καρκινικές σειρές μαστού (MCF-7 και MDA-MB-231) ενώ το ίδιο φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση των φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος (DSF). Επιπροσθέτως, οι μελέτες κυτταροτοξικότητας στις ανωτέρω κυτταρικές σειρές καταδεικνύουν ότι η ομάδα του φαινυλοβενζοθειαζολίου σε συνδυασμό με το μεταλλικό κέντρο επιφέρουν δραστικές αλλαγές στην καταγραφόμενη τοξικότητα. Η κυτταροτοξικότητα που καταγράφηκε είναι πιο έντονη στην περίπτωση των συμπλόκων, ενώ για τα σύμπλοκα του χαλκού ελήφθησαν τιμές  $IC_{50}$  που είναι συγκρίσιμες και κατά περιπτώσεις καλύτερες από τις αντίστοιχες της σισπλατίνης.

Εν κατακλείδι, η δυνατότητα των ενώσεων να προσλαμβάνονται εκλεκτικά από τα καρκινικά κύτταρα και να επάγουν αλλαγές στο DNA τα καθιστά έναν πολλά υποσχόμενο αντικαρκινικό παράγοντα ο οποίος θα μπορούσε να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω συνθετικά δίνοντας, ενδεχομένως, ακόμα καλύτερα αποτελέσματα.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

CD	Circular Dichroism
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
UV-Vis	UltraViolet-Visible
IR	Infrared
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
ESI-MS	Electrospray-Ionization Mass Spectrometry
DNA	Deoxyribonucleic Acid
A-T	Adenine-Thymine
G-C	Guanine-Cytocine
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
DMSO	Dimethylsulfoxide
EtBr	Ethydium Bromide
KBr	Kaliumbromide
CT-DNA	Calf Thymous - DeoxyRibonucleicAcid
PBS	Phosphate Buffered Saline
FBS	Fetal Bovine Serum
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### A.

Χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  NMR (ppm) των υποκαταστατών **1**, **2** και των αντίστοιχων συμπλόκων **Pd-1**, **Pt-1**, **Pd-2** και **Pt-2** σε  $\text{DMSO-d}_6$  στους  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Η αρίθμηση είναι σύμφωνη με αυτή του Σχήματος 15

	<b>1</b>	<b>Pd-1</b>	<b>Pt-1</b>	<b>2</b>	<b>Pd-2</b>	<b>Pt-2</b>
H-1	8,53	8,79	9,08	8,63	8,73	9,01
H-2	7,26	7,53	7,52	7,42	7,50	7,49
H-3	7,70	8,07	8,14	7,88	8,04	8,09
H-4	7,46	7,66	7,69	7,49	7,63	7,64
H-6	3,87	4,45, 4,38	4,50, 4,33	4,29	4,49, 4,00	4,34, 4,10
H-7a	3,40	4,05, 3,81	4,23, 3,81	2,99	2,76	2,78
H-7b				1,66	1,88, 1,62	1,85, 1,60
H-7c				1,69	1,62	1,60
H-7d				2,41	2,36	2,35
H-10/H-14	7,84	7,79	7,80	7,80	7,76	7,76
H-11/H-13	8,05	8,07	8,07	8,04	8,02	8,01
H-17	8,11	8,12	8,12	8,11	8,10	8,09
H-18	7,43	7,44	7,44	7,44	7,43	7,43
H-19	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,52
H-20	8,02	8,02	8,02	8,01	8,01	8,00
NHCO	10,29	10,60	10,72	10,27	10,21	10,27
NH	-	6,86	7,34	-	6,49	7,08

**B.**

Χημικές μετατοπίσεις  $^{13}\text{C}$  NMR (ppm) των υποκαταστατών **1**, **2** και των αντίστοιχων συμπλόκων **Pd-1**, **Pt-1**, **Pd-2** και **Pt-2** σε DMSO- $d_6$  στους 25 °C. Η αρίθμηση είναι σύμφωνη με αυτή του Σχήματος 15

	<b>1</b>	<b>Pd-1</b>	<b>Pt-1</b>	<b>2</b>	<b>Pd-2</b>	<b>Pt-2</b>
C-1	148,91	148,61	147,03	149,09	148,91	147,43
C-2	122,13	123,86	124,30	123,62	123,95	124,49
C-3	136,67	139,98	139,05	137,39	140,05	139,13
C-4	122,07	121,93	122,09	122,55	122,26	122,33
C-5	159,78	163,46	164,12	152,43	163,60	163,77
C-6	54,24	60,00	61,25	50,52	58,95	60,28
C-7a	52,40	54,57	56,01	46,90	53,17	54,38
				25,21	26,96	26,49
				22,00	22,39	22,27
				35,75	36,04	36,11
C-8	170,77	166,38	166,41	171,39	171,47	171,59
C-9	141,59	141,30	141,29	142,02	142,07	142,16
C-10/C-14	119,46	119,55	119,59	119,32	119,37	119,41
C-11/C-13	128,07	128,15	128,15	128,01	128,02	128,06
C-12	127,67	127,98	128,01	127,50	127,48	127,50
C-15	167,04	166,94	166,95	167,02	167,09	167,16
C-16	134,32	134,33	134,34	134,26	134,31	134,34
C-17	122,32	122,32	122,34	122,24	122,26	122,33
C-18	125,32	125,38	125,40	125,30	125,31	125,38
C-19	126,64	126,67	126,70	126,62	126,64	126,71
C-20	122,62	122,65	122,66	122,55	122,59	122,63
C-21	153,67	153,65	153,64	153,62	153,67	153,70

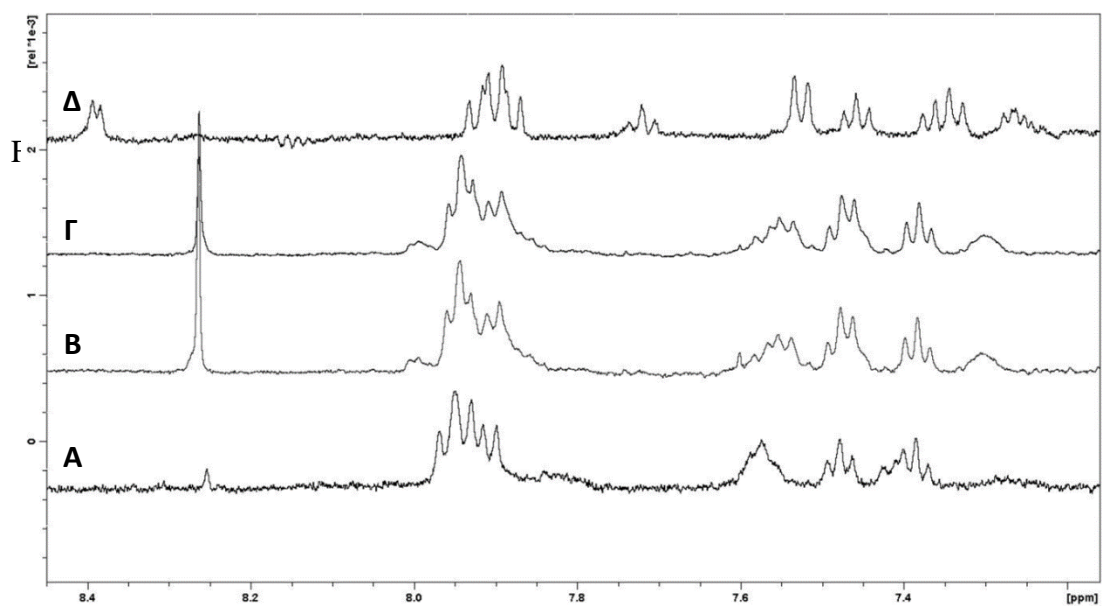
Γ.

### NMR μελέτη σταθερότητας του συμπλόκου Pd-2 σε DMEM

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η σταθερότητα των συμπλόκων στο κυτταρικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, παρακολουθήθηκε, μέσω NMR, η συμπεριφορά του συμπλόκου **Pd-2** σε DMEM. Συγκεκριμένα, 0,4 ml διαλύματος DMEM τοποθετήθηκαν σε συσκευή λυοφιλίωσης και το προκύπτον στερεό επανανακτήθηκε με D<sub>2</sub>O (DMEM-σε-D<sub>2</sub>O) έτσι ώστε να μπορεί να μελετηθεί με NMR φασματοσκοπία. Σε αυτό το διάλυμα προστέθηκαν 30 μL διαλύματος **Pd-2** σε DMSO-d<sub>6</sub>, συγκέντρωσης 9 mM. Εξαιτίας της περιορισμένης διαλυτότητας των συμπλόκων σε υδατικά διαλύματα κρίθηκε απαραίτητο να προστεθούν 0,17 mL διαλύματος DMSO-d<sub>6</sub> έτσι ώστε να διατηρηθεί το σύμπλοκο στο διάλυμα δίχως να καταβυθιστεί. Επομένως η τελική συγκέντρωση του συμπλόκου **Pd-2** σε DMEM (D<sub>2</sub>O:DMSO-d<sub>6</sub> 70:30) ήταν περίπου 0,5 mM. Το διάλυμα επώαστηκε στους 37 °C και τα φάσματα λαμβάνονταν τακτικά κάθε 48 ώρες ούτως ώστε να διαπιστωθούν τυχόν αλλαγές.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα ληφθέντα φάσματα NMR της αρωματικής περιοχής του συμπλόκου **Pd-2**, αμέσως μετά την διάλυση (Α), μετά από 24 h (Β) και μετά από 48 h (Γ) επώασης. Το φάσμα του υποκαταστάτη **2** κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες (DMEM-σε-D<sub>2</sub>O:DMSO-d<sub>6</sub> 70:30) παρατίθεται για λόγους σύγκρισης (Δ). Είναι εμφανές ότι οι αλλαγές που υπάρχουν στα φάσματα δεν οφείλονται σε διάσπαση του συμπλόκου. Οι αλλαγές του συμπλόκου **Pd-2** έπειτα από 24 h επώασης δεν μπορεί να συσχετιστεί με μια συγκεκριμένη δομή του συμπλόκου στο διάλυμα (μονο- ή δις-υδατωμένο, παρουσία υδρόξυ- ειδών κ.α). Τα ληφθέντα φάσματα NMR παρέχουν ενδείξεις της σταθερότητας του συμπλόκου **Pd-2** σε συνθήκες που προσεγγίζουν εκείνες των πειραμάτων κυτταρικής πρόσληψης, γεγονός που ισχύει και για το παρόμοιας δομής σύμπλοκο **Pd-1**.

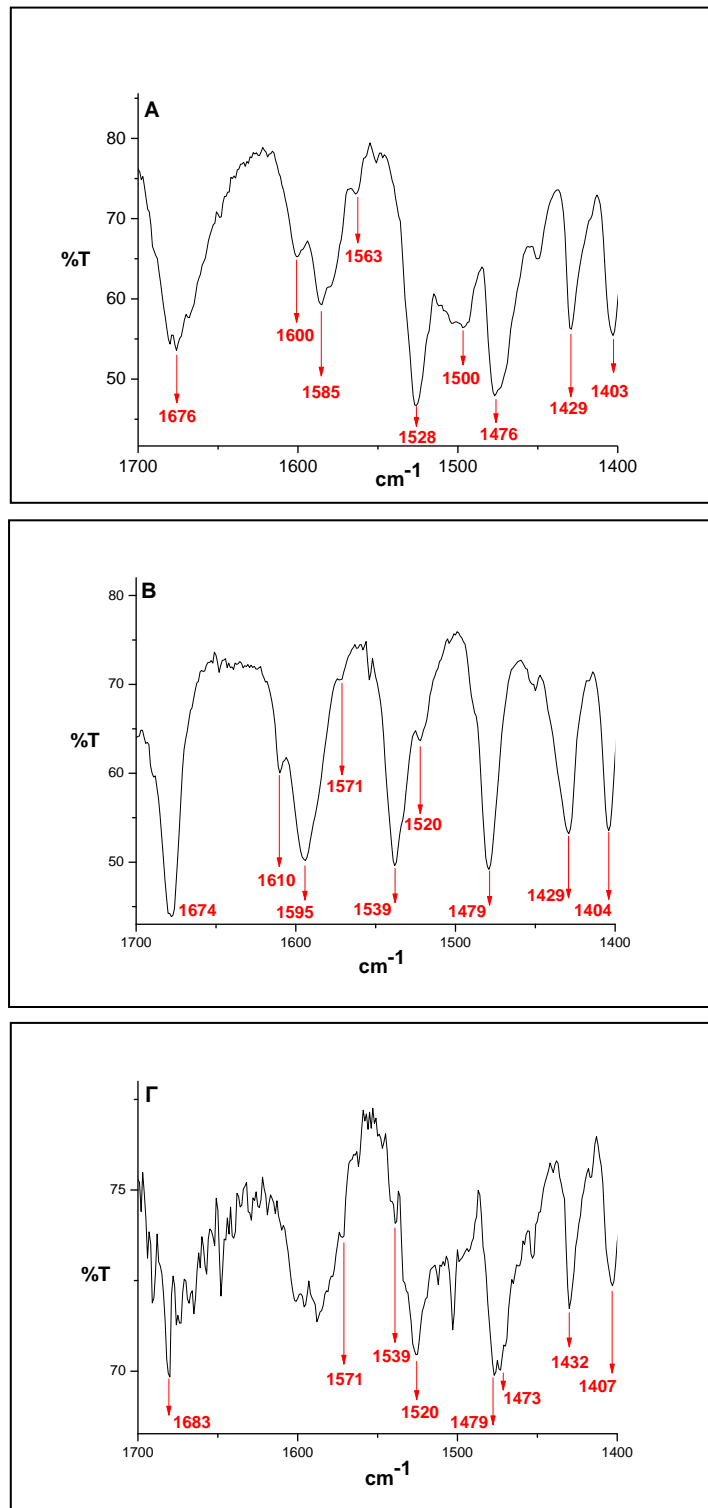
Επιπροσθέτως, θεωρείται ότι τα σύμπλοκα **Pt-1** και **Pt-2** είναι σταθερά στο κυτταρικό μέσο ανάπτυξης, βασιζόμενοι στο σκεπτικό ότι τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου είναι κινητικώς σταθερότερα από τα αντίστοιχα του παλλαδίου. Η μελέτη σταθερότητας με NMR βρίσκεται σε συμφωνία με τις μελέτες κυτταρικής πρόσληψης όπου διαπιστώθηκε εντονότερη κυτταρική πρόσληψη των συμπλόκων σε σύγκρισή με τους υποκαταστάτες, στα MCF-7 κύτταρα. Σε περίπτωση που είχαμε διάσπαση των συμπλόκων στους επιμέρους υποκαταστάτες, δεν θα μπορούσε να παρατηρηθεί η κυτταρική πρόσληψη από τα καρκινικά κύτταρα. Οι κορυφές NMR που καταγράφησαν στην περίπτωση του DMEM μόνου του, ήταν ιδιαίτερος ασθενείς στην συγκεκριμένη αρωματική περιοχή, προσεγγίζοντας το επίπεδο αναφοράς (baseline) του φάσματος.



<sup>1</sup>H NMR φάσμα (8,45 -7,16 ppm) διαλύματος **Pd-2** σε DMEM (D<sub>2</sub>O:DMSO-d<sub>6</sub> 70:30) αμέσως μετά την διάλυση (A), έπειτα από 24 h επώασης στους 37 °C (B), έπειτα από 48 h επώασης στους 37 °C (Γ), υποκαταστάτη **2** σε DMEM (D<sub>2</sub>O:DMSO-d<sub>6</sub> 70:30) (Δ)

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

**A.**



IR φάσματα των ενώσεων **2** (A), **Pd-2** (B) και **Pt-2** (Γ)

## B.

### Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR υποκαταστατών και συμπλόκων

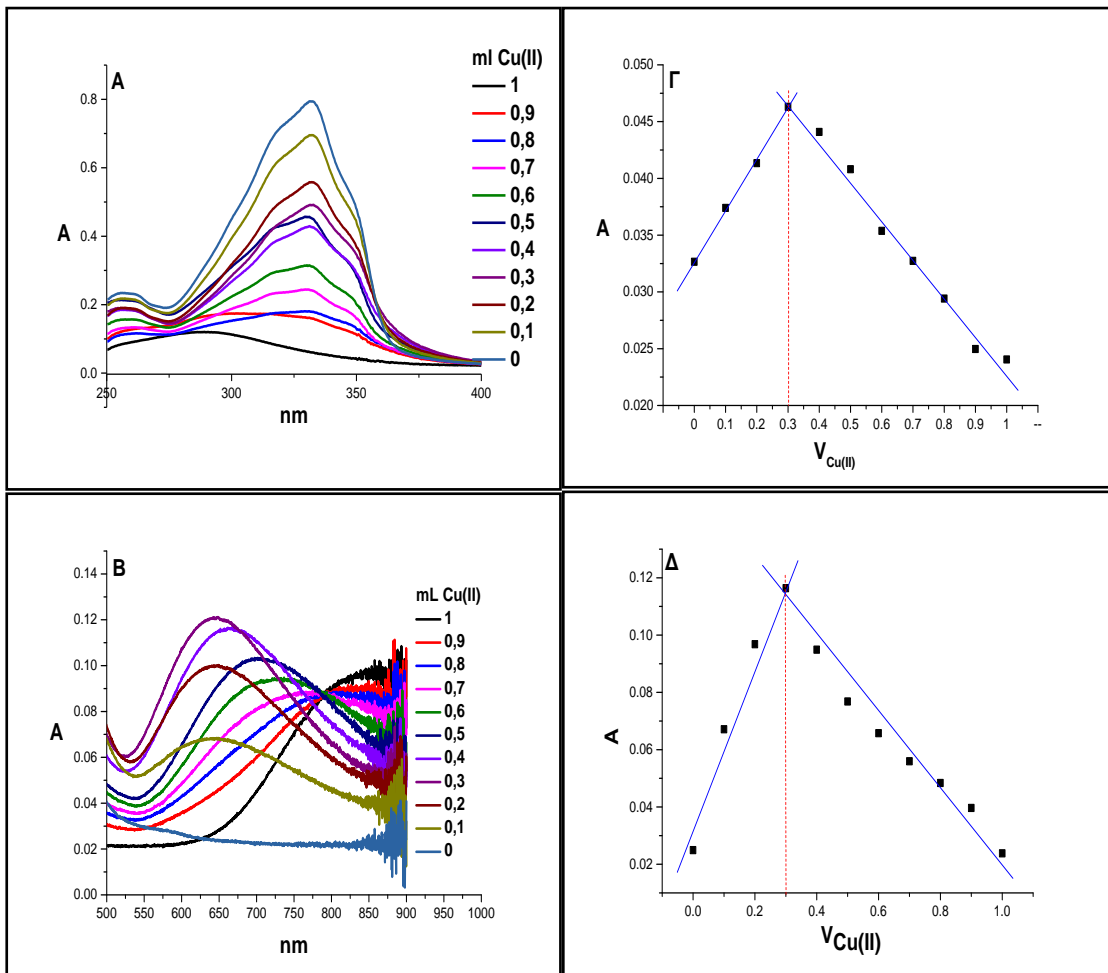
1	Pd-1	Pt-1	2	Pd-2	Pt-2	Απόδοση
1475 cm <sup>-1</sup> 1429 cm <sup>-1</sup> 1402 cm <sup>-1</sup>	1479 cm <sup>-1</sup> 1429 cm <sup>-1</sup> 1402 cm <sup>-1</sup>	1473 cm <sup>-1</sup> 1430 cm <sup>-1</sup> 1405 cm <sup>-1</sup>	1476 cm <sup>-1</sup>  1429 cm <sup>-1</sup>  1403 cm <sup>-1</sup>	1479 cm <sup>-1</sup>  1429 cm <sup>-1</sup>  1404 cm <sup>-1</sup>	1473 cm <sup>-1</sup>  1432 cm <sup>-1</sup>  1407 cm <sup>-1</sup>	C-H ταινία έκτασης βενζοθειαζολίου C-C ταινία έκτασης βενζοθειαζολίου C-C ταινία έκτασης βενζοθειαζολίου
1600 cm <sup>-1</sup> 1585 cm <sup>-1</sup> 3443 cm <sup>-1</sup>	1610 cm <sup>-1</sup> 1593 cm <sup>-1</sup> 3435 cm <sup>-1</sup>	1532 cm <sup>-1</sup> 1477 cm <sup>-1</sup> 3458 cm <sup>-1</sup>	1600 cm <sup>-1</sup>  1585 cm <sup>-1</sup>  3432 cm <sup>-1</sup>	1610 cm <sup>-1</sup>  1595 cm <sup>-1</sup>  3429 cm <sup>-1</sup>	1532 cm <sup>-1</sup>  1479 cm <sup>-1</sup>  3447 cm <sup>-1</sup>	C=C ταινία έκτασης πυριδίνης C=C ταινία έκτασης πυριδίνης N-H ταινία έκτασης πυριδίνης
1675 cm <sup>-1</sup>	1677 cm <sup>-1</sup>	1690 cm <sup>-1</sup> 1680 cm <sup>-1</sup>	1676 cm <sup>-1</sup>	1674 cm <sup>-1</sup>	1690 cm <sup>-1</sup>  1683 cm <sup>-1</sup>	Ταινία έκτασης C=O (Amide I band)
1563 cm <sup>-1</sup> 1504 cm <sup>-1</sup>	1571 cm <sup>-1</sup> 1520 cm <sup>-1</sup>	1571 cm <sup>-1</sup> 1518 cm <sup>-1</sup>	1563 cm <sup>-1</sup>  1500 cm <sup>-1</sup>	1571 cm <sup>-1</sup>  1520 cm <sup>-1</sup>	1571 cm <sup>-1</sup>  1520 cm <sup>-1</sup>	Ταινία έκτασης N-H
1526 cm <sup>-1</sup>	1537 cm <sup>-1</sup>	1535 cm <sup>-1</sup>	1528 cm <sup>-1</sup>	1539 cm <sup>-1</sup>	1539 cm <sup>-1</sup>	Ταινία κάμψης N-H (Amide II band)
- -	489 cm <sup>-1</sup> 509 cm <sup>-1</sup>	478 cm <sup>-1</sup> 505 cm <sup>-1</sup>	- -	490 cm <sup>-1</sup>  510 cm <sup>-1</sup>	481 cm <sup>-1</sup>  515 cm <sup>-1</sup>	Ταινία έκτασης M-N

Γ.

## Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR συμπλόκων Cu(II)

1	Cu-1	2	Cu-2	Απόδοση
1475 cm <sup>-1</sup> 1429 cm <sup>-1</sup> 1402 cm <sup>-1</sup>	1475 cm <sup>-1</sup> 1429 cm <sup>-1</sup> 1402 cm <sup>-1</sup>	1476 cm <sup>-1</sup> 1429 cm <sup>-1</sup> 1403 cm <sup>-1</sup>	1475 cm <sup>-1</sup> 1436 cm <sup>-1</sup> 1417 cm <sup>-1</sup>	C-H ταινία έκτασης βενζοθειαζολίου C-C ταινία έκτασης βενζοθειαζολίου C-C ταινία έκτασης βενζοθειαζολίου
1600 cm <sup>-1</sup> 1585 cm <sup>-1</sup> 3443 cm <sup>-1</sup>	1608 cm <sup>-1</sup> 1595 cm <sup>-1</sup> 3435 cm <sup>-1</sup>	1600 cm <sup>-1</sup> 1585 cm <sup>-1</sup> 3432 cm <sup>-1</sup>	1610 cm <sup>-1</sup> 1446 cm <sup>-1</sup> 3447 cm <sup>-1</sup>	C=C ταινία έκτασης πυριδίνης C=C ταινία έκτασης πυριδίνης N-H ταινία έκτασης πυριδίνης
1675 cm <sup>-1</sup>	1662 cm <sup>-1</sup>	1676 cm <sup>-1</sup>	1630 cm <sup>-1</sup>	Ταινία έκτασης C=O (Amide I band)
1563 cm <sup>-1</sup> 1504 cm <sup>-1</sup>	1572 cm <sup>-1</sup> 1520 cm <sup>-1</sup>	1563 cm <sup>-1</sup> 1500 cm <sup>-1</sup>	1597 cm <sup>-1</sup> 1506 cm <sup>-1</sup>	Ταινία έκτασης N-H
1526 cm <sup>-1</sup>	1545 cm <sup>-1</sup>	1528 cm <sup>-1</sup>	1562 cm <sup>-1</sup>	Ταινία κάμψης N-H (Amide II band)
- -	622 cm <sup>-1</sup> 1111 cm <sup>-1</sup>	- -	620 cm <sup>-1</sup> 1100 cm <sup>-1</sup>	Ταινία έκτασης δεσμού Cl-O
-	470 cm <sup>-1</sup>	-	508 cm <sup>-1</sup>	Ταινία έκτασης M-N

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ



Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων ανάμιξης υποκαταστάτη **2** και Cu(II), αρχικής συγκέντρωσης  $2 \cdot 10^{-4}$  M και  $2 \cdot 10^{-3}$  M στην περιοχή των 250-500 nm (A) και 500-900 nm (B), Μεταβολή της απορρόφησης στα 320 και 620 nm συναρτήσει του λόγου  $R = [Cu(II)] / [1]$  (Γ και Δ)

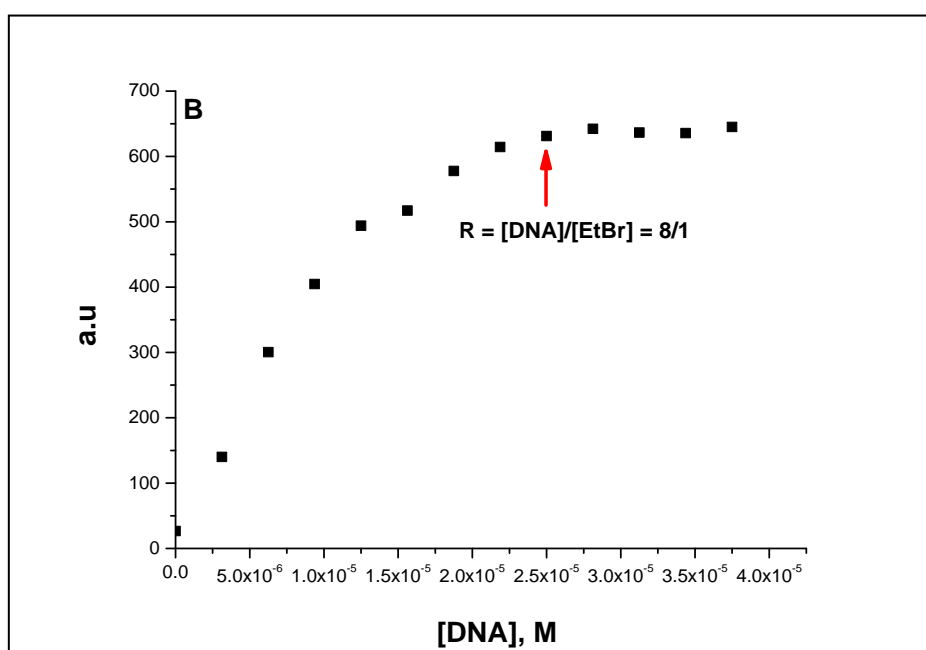
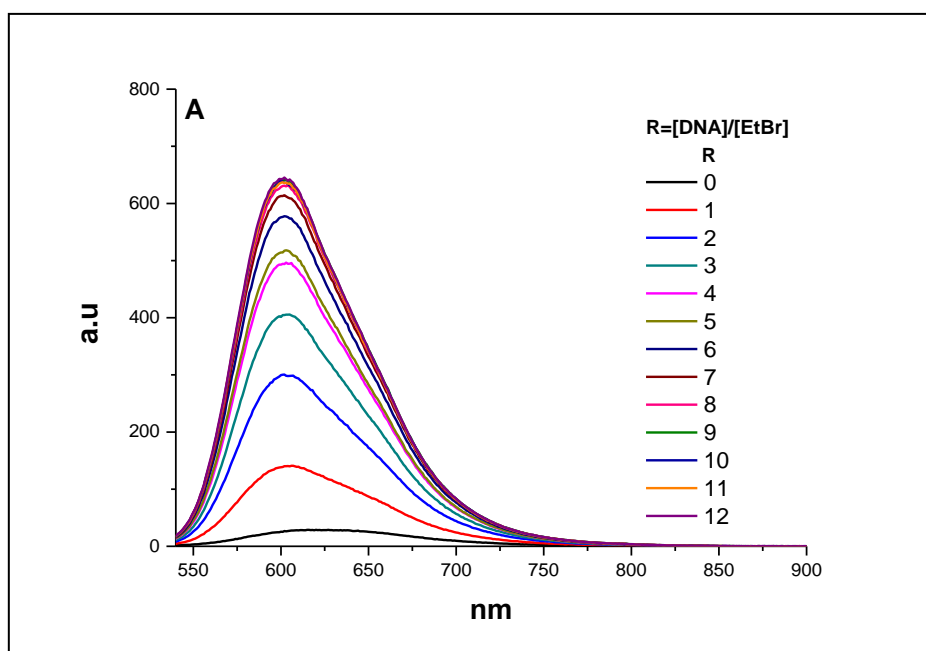


## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

### Φθορισμομετρία μέσω πειραμάτων ανταγωνισμού με το EtBr.

Προκειμένου, να μελετηθεί η αναλογία συγκεντρώσεων  $[DNA]/[EtBr]$  όπου όλη η ποσότητα του EtBr έχει δεσμευθεί πλήρως στο μόριο του DNA, παρασκευάστηκαν διαλύματα DNA-EtBr, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (DMSO = 2%), διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση του EtBr ( $3,125 \cdot 10^{-6}$  M) και μεταβάλλοντας την συγκέντρωση του DNA ( $0 - 3,75 \cdot 10^{-5}$  M) έτσι ώστε να τηρηθούν οι αναλογίες  $R = [DNA]/[EtBr] = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12$ . Σε αυτήν την περίπτωση δεν πραγματοποιήθηκε επώαση των διαλυμάτων DNA-EtBr. Τα προς μέτρηση διαλύματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (DMSO = 2%) και παρέμειναν για επώαση 24 h. Η λήψη των φασμάτων έγινε στην περιοχή 530 – 900 nm στους 25 °C. Ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής επιλέχθησαν τα 526 nm και 590 nm αντίστοιχα (για να μετρηθεί η ένταση φθορισμού του EtBr), ως ταχύτητα σάρωσης τα 300 nm/min και ως πλάτος σχισμής (εκπομπής και απορρόφησης) τα 2,5 nm.

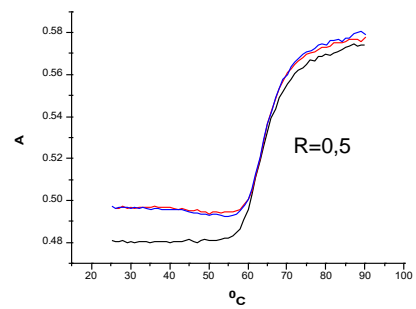
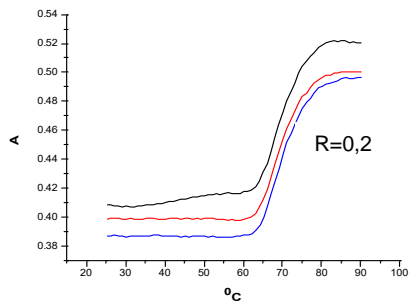
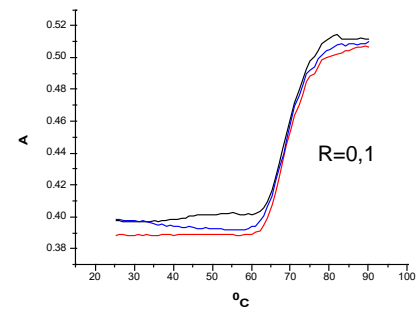
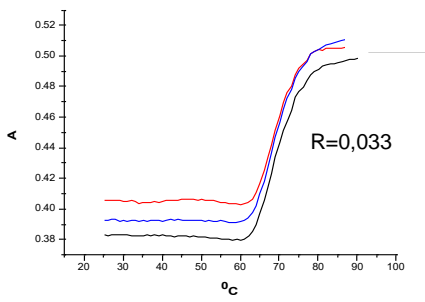
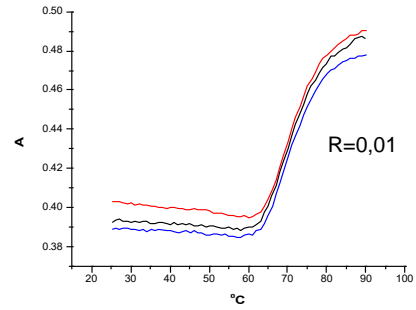
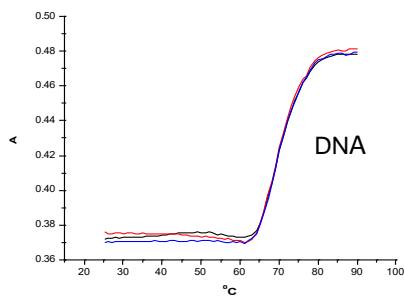
Στα Σχήματα A και B που παρατίθενται ακολούθως, παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού της ανωτέρω μελέτης. Διαπιστώθηκε ότι στην αναλογία 8/1 ( $[DNA]/[EtBr]$ ), όλη η ποσότητα του EtBr έχει δεσμευθεί πλήρως στο μόριο του DNA και επομένως δεν υπάρχει ελεύθερο στα υπό μελέτη διαλύματα. Η ανωτέρω παρατήρηση προέκυψε από το γεγονός ότι από τον λόγο  $R=8$  και μετά δεν διαπιστώθηκε σημαντική αλλαγή ούτε στην ένταση αλλά ούτε και στην θέση κορυφών.



A. Φάσματα εκπομπής φθορισμού EtBr ( $3,125 \cdot 10^{-6}$  M) απουσία και παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων DNA ( $0 - 3,75 \cdot 10^{-5}$  M), όπου  $R = \frac{[DNA]}{[EtBr]}$

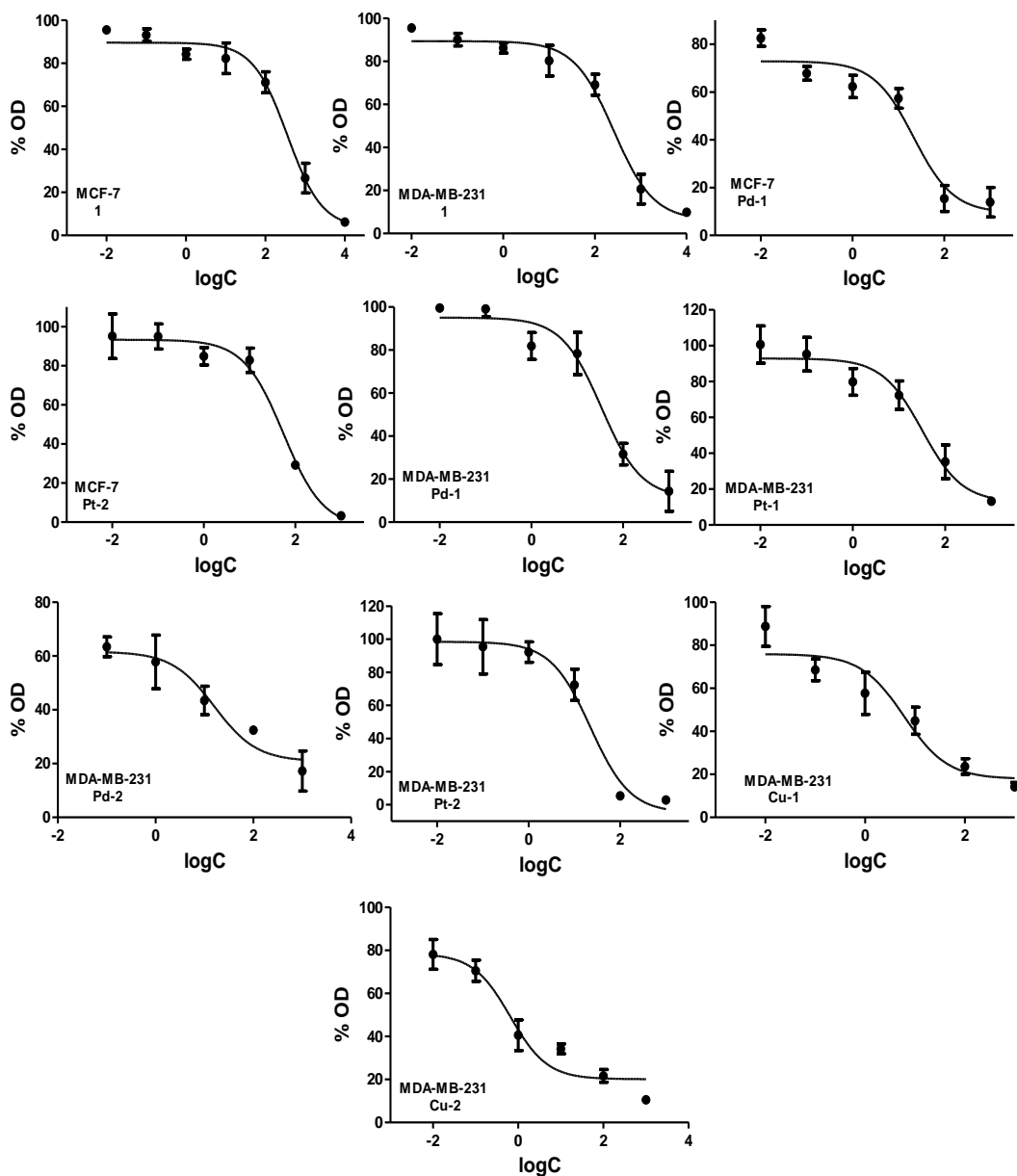
B. Διάγραμμα συσχέτισης τιμών έντασεων φθορισμού (Σχήματος A) στα 606 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης του DNA

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V



Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης του DNA παρουσία **Pd-1**, όπου  $R=[\text{Pd-1}]/[\text{DNA}]$

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI



Ενδεικτικές σιγμοειδείς καμπύλες συγκέντρωσης των υπό αξιολόγηση ενώσεων στις καρκινικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231 σε διάφορες συγκεντρώσεις  $10^{-8}$  έως  $10^{-3}$  M, μετά από 72 ώρες επώασης στους  $37^{\circ}\text{C}$

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. D.F. Shi, T.D. Bradshaw, S. Wrigley, C.J. McCall, P. Lelieveld, I. Fichtner, and M.F. Stevens, *Antitumor benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles and evaluation of their activities against breast cancer cell lines in vitro and in vivo.* J Med Chem, 1996. 39(17): p. 3375-84.
2. C.A. Zarate, Jr., J.L. Payne, J. Quiroz, J. Sporn, K.K. Denicoff, D. Luckenbaugh, D.S. Charney, and H.K. Manji, *An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression.* Am J Psychiatry, 2004. 161(1): p. 171-4.
3. J.M. Simard, O. Tsybalyuk, K. Keledjian, A. Ivanov, S. Ivanova, and V. Gerzanich, *Comparative effects of glibenclamide and riluzole in a rat model of severe cervical spinal cord injury.* Exp Neurol, 2012. 233(1): p. 566-74.
4. S. Tzanopoulou, I.C. Pirmettis, G. Patsis, C. Raptopoulou, A. Terzis, M. Papadopoulos, and M. Pelecanou, *Oxorhenium(V) and oxotechnetium(V) [NN][S]3 complexes of 2-phenylbenzothiazole derivatives.* Inorg Chem, 2006. 45(2): p. 902-9.
5. T.D. Bradshaw, M.F. Stevens, and A.D. Westwell, *The discovery of the potent and selective antitumour agent 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazole (DF 203) and related compounds.* Curr Med Chem, 2001. 8(2): p. 203-10.
6. E. Kashiyama, I. Hutchinson, M.S. Chua, S.F. Stinson, L.R. Phillips, G. Kaur, E.A. Sausville, T.D. Bradshaw, A.D. Westwell, and M.F. Stevens, *Antitumor benzothiazoles. 8. Synthesis, metabolic formation, and biological properties of the C- and N-oxidation products of antitumor 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles.* J Med Chem, 1999. 42(20): p. 4172-84.
7. I. Hutchinson, S.A. Jennings, B.R. Vishnuvajjala, A.D. Westwell, and M.F. Stevens, *Antitumor benzothiazoles. 16. Synthesis and pharmaceutical properties of antitumor 2-(4-aminophenyl)benzothiazole amino acid prodrugs.* J Med Chem, 2002. 45(3): p. 744-7.
8. T.D. Bradshaw, M.C. Bibby, J.A. Double, I. Fichtner, P.A. Cooper, M.C. Alley, S. Donohue, S.F. Stinson, J.E. Tomaszewski, E.A. Sausville, and M.F. Stevens, *Preclinical evaluation of amino acid prodrugs of novel antitumor 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazoles.* Mol Cancer Ther, 2002. 1(4): p. 239-46.

9. C.O. Leong, M. Gaskell, E.A. Martin, R.T. Heydon, P.B. Farmer, M.C. Bibby, P.A. Cooper, J.A. Double, T.D. Bradshaw, and M.F. Stevens, *Antitumour 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles generate DNA adducts in sensitive tumour cells in vitro and in vivo*. *Br J Cancer*, 2003. 88(3): p. 470-7.
10. H.B. Gray, *Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21st century*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(7): p. 3563-8.
11. C. Orvig, *Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction*. *Chem Rev*, 1999. 99: p. 2201-2203.
12. M.J. Abrams and B.A. Murrer, *Metal compounds in therapy and diagnosis*. *Sci*, 1993. 261(5122): p. 725-30.
13. M. Gielen, *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*. 2005.
14. I. Romero-Canelón, *Next-Generation Metal Anticancer Complexes: Multitargeting via Redox Modulation*. *Inorg Chem*, 2013. 52(21): p. 12276–12291.
15. N. Muhammad and Z. Guo, *Metal-based anticancer chemotherapeutic agents*. *Curr Opin Chem Biol*, 2014. 19: p. 144-53.
16. S. Rafique, A. Nasim, H. Akbar, and A. Athar, *Transition metal complexes as potential therapeutic agents*. *Biotechnol Mol Biol Rev*, 2010. 5: p. 38-45.
17. S.P. Waseem A. Wani, S. Shreaz, and S. Gómez-Ruiz, *Nanostructured materials functionalized with metal complexes: In search of alternatives for administering anticancer metallodrugs*. *Coord Chem Rev*, 2016. 312: p. 67-98.
18. T.W. Hambley, *Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities*. *Dalton Trans*, 2007. 43: p. 4929-4937.
19. S.Ahmad, S. Ali, and A. R. Al-Arfaj *Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents*. *Polyhedron*, 2006. 25: p. 1633–1645.
20. N. Tejman-Yarden, D. Leitsch, J. Santini, A. Debnath, J. Gut, J.H. McKerrow, S.L. Reed, and L.Eckmann, *A reprofiled drug, auranofin, is effective against metronidazole-resistant Giardia lamblia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. 57: p. 2029-2035.

21. E. Dellera, G. Sandri, S. Rossi, F. Ferrari, C. Del Fante, C. Perotti, P. Grisoli, and C. Caramella, *Development of chitosan oleate ionic micelles loaded with silver sulfadiazine to be associated with platelet lysate for application in wound healing*. Eur J Pharm Biopharm, 2014. 88: p. 643-650.
22. S.L. Croft, *Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs*. Trends Parasitol, 2003. 19: p. 502-508.
23. P. Caravan, T.J. McMurry, and R.B. Lauffer, *Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications*. Chem Rev, 1999. 99: p. 2293-2352.
24. E.J. Rummeny, J.C. Kurdziel, G. Nilsen, B. Op de Beeck, and B. Lundby, *MnDPDP for MR imaging of the liver. Results of an independent image evaluation of the European phase III studies*. Acta Radiologica 1997. 38: p. 638-642.
25. D. Brachman, L. Ashby, T. Thomas, E. Dunbar, S. Narayan, H. Robins, J. Bovi, J. Rockhill, M. Won, and W. Curran, *Phase 1/2 trials of Temozolomide, Motexafin Gadolinium, and 60-Gy fractionated radiation for newly diagnosed supratentorial glioblastoma multiforme: final results of RTOG 0513*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2015. 91: p. 961-967.
26. C. Avendano, and J. C. Menendez, *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, in *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 2015. p. 133–195.
27. B.J. Marshall and J.R. Warren, *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. Lancet, 1984. 1(8390): p. 1311-5.
28. P. Sadler, H. Sun, *Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth*. Coord Chem Rev, 1999. 185-186: p. 689–709.
29. C.G. Chen R, So MH, Wu JL, Lu Z, Che CM, Sun H, *Bismuth subcarbonate nanoparticles fabricated by water-in-oil microemulsion-assisted hydrothermal process exhibit anti-Helicobacter pylori properties*. Mat Res Bull 2010. 45: p. 654-658.
30. H. Sun, *Recent advances in bioinorganic chemistry of bismuth*. Curr Opin Chem Biol, 2012. 16: p. 74–83.
31. W. Li, L. Jin, N. Zhu, X. Hou, F. Deng, and H. Sun, *Structure of colloidal bismuth subcitrate (CBS) in dilute HCl: unique assembly of bismuth citrate dinuclear units ([Bi(cit)(2)Bi](2-))*. J Am Chem Soc, 2003. 125(41): p. 12408-9.

32. X. Sun, *Identification and characterization of metallodrug binding proteins by (metallo)proteomics*. *Metallomics*, 2009. 1: p. 25-31.
33. H. Timmerman, *Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 2013. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.05394-4.
34. P. Sadler, C. Muncie, and M. A. Shipman, *Metals in Medicine*, in *Biological Inorganic Chemistry, Structure and reactivity*. 2007: University Science Books.
35. Z. Li, *Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography*. *Adv Drug Deliver Rev*, 2010. 62: p. 1031–1051.
36. D. Josephs, J. Spicer, and M.O'Doherty, *Molecular imaging in clinical trials*. *Targ Oncol*, 2009. 4: p. 151–168.
37. S. Liu, *The role of coordination chemistry in the development of target specific radiopharmaceuticals*. *Chem Soc Rev*, 2004. 33: p. 445.
38. Y. Liu, G. Liu, and D. J. Hnatowich, *A Brief Review of Chelators for Radiolabeling Oligomers*. *Materials* 2010. 3: p. 3204-3217.
39. G. Bandolia, F. Tisato, A. Dolmella, and S. Agostinia, *Structural overview of technetium compounds*. *Coord Chem Rev*, 2006. 250: p. 561-573.
40. L.E. Cole, T. Vargo-Gogola, and R.K. Roeder, *Targeted delivery to bone and mineral deposits using bisphosphonate ligands*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. 99: p. 12-27.
41. C. Fernandes, S. Monteiro, A. Belchior, F. Marques, L. Gano, J.D.G. Correia, and I. Santos, *Novel <sup>188</sup>Re multi-functional bone-seeking compounds: Synthesis, biological and radiotoxic effects in metastatic breast cancer cells*. *Nucl Med Biol*, 2016. 43: p. 150-157.
42. A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 2011. 61(2): p. 69-90.
43. B. Desoize, *Metals and metal compounds in cancer treatment*. *Anticancer Res*, 2004. 24(3a): p. 1529-44.
44. S. H. van Rijt and P. Sadler, *Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs*. *Drug discov today*, 2009. 14: p. 1089-1097.



45. C. Xin Zhang, *New metal complexes as potential therapeutics*. *Curr Opin Chem Biol*, 2003. 7: p. 481–489.
46. I. Kostova, *Ruthenium Complexes as Anticancer Agents*. *Curr Med Chem*, 2006. 13: p. 1085-1107.
47. J.M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J.H. Beijnen, and J.H. Schellens, *A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent*. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(11): p. 3717-27.
48. R. Hernandez, J. Mendez, J. Lamboy, M. Torres, F.R. Roman, and E. Melendez, *Titanium(IV) complexes: cytotoxicity and cellular uptake of titanium(IV) complexes on caco-2 cell line*. *Toxicol In Vitro*, 2010. 24(1): p. 178-83.
49. M.M. Hart and R.H. Adamson, *Antitumor activity and toxicity of salts of inorganic group 3a metals: aluminum, gallium, indium, and thallium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. 68(7): p. 1623-6.
50. G. Cevc, and U. Vierl, *Nanotechnology and the transdermal route A state of the art review and critical appraisal*. *J Controlled Release*, 2010. 41: p. 277–299.
51. C.C. Anajwala, G.K. Jani, and S.M.V. Swamy, *Current trends of nanotechnology for cancer therapy*. *Int J Pharm Sci Nanotechnol*, 2010. 3: p. 1043–1056.
52. W. E. Bawarski, D. J. Bharali, and S. A. Mousa, *Emerging nanopharmaceuticals*. *Nanomedicine*, 2008. 4: p. 273-282.
53. L.J. Shen and F.L. Wu, *Nanomedicines in renal transplant rejection--focus on sirolimus*. *Int J Nanomedicine*, 2007. 2(1): p. 25-32.
54. N.N. Greenwood, *Chemistry of the Elements*, in *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 1998. p. 1144.
55. B. Rosenberg, L. Van Camp, and T. KRIGAS, *Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode*. *Nature*, 1965. 205: p. 698 - 699.
56. L. Messoria, *Cisplatin binding to proteins: A structural perspective*. *Coord Chem Rev*, 2016. 315: p. 67–89.

57. D. Wang and S.J. Lippard, *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. 4(4): p. 307-20.
58. A.M. Florea and D. Busselberg, *Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects*. *Cancers (Basel)*, 2011. 3(1): p. 1351-71.
59. D.W. Shen, L.M. Pouliot, M.D. Hall, and M.M. Gottesman, *Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes*. *Pharmacol Rev*, 2012. 64(3): p. 706-21.
60. A. Ruggiero, G. Trombatore, S. Triarico, R. Arena, P. Ferrara, M. Scalzone, F. Pierri, and R. Riccardi, *Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management*. *Anticancer Drugs*, 2013. 24(10): p. 1007-19.
61. J. Graham, M. Mushin, and P. Kirkpatrick, *Oxaliplatin*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3(1): p. 11-2.
62. M. Galanski, M.A. Jakupec, and B.K. Keppler, *Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches*. *Curr Med Chem*, 2005. 12(18): p. 2075-94.
63. T. Boulikas, E. Bellis, and P. Christofis, *Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms*. *Cancer Ther*, 2007. 5: p. 537-583.
64. Y. P. Ho, S. C. Au-Yeung, and K. K. To, *Platinum-Based Anticancer Agents: Innovative Design Strategies and Biological Perspectives*. *Med Res Rev*, 2003. 23: p. 633-655.
65. N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, and R. Oun, *The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials*. *Dalton Trans*, 2010. 39(35): p. 8113-27.
66. M.G. Apps, E.H. Choi, and N.J. Wheate, *The state-of-play and future of platinum drugs*. *Endocr Relat Cancer*, 2015. 22(4): p. R219-33.
67. S.C. White, P. Lorigan, G.P. Margison, J.M. Margison, F. Martin, N. Thatcher, H. Anderson, and M. Ranson, *Phase II study of SPI-77 (sterically stabilised liposomal cisplatin) in advanced non-small-cell lung cancer*. *Br J Cancer*, 2006. 95(7): p. 822-8.
68. H. Choy, C. Park, and M. Yao, *Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue*. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(6): p. 1633-8.

69. J. Holford, F. Raynaud, B.A. Murrer, K. Grimaldi, J.A. Hartley, M. Abrams, and L.R. Kelland, *Chemical, biochemical and pharmacological activity of the novel sterically hindered platinum co-ordination complex, cis-[amminedichloro(2-methylpyridine)] platinum(II) (AMD473)*. *Anticancer Drug Des*, 1998. 13(1): p. 1-18.
70. A.R. Battle, R. Choi, D.E. Hibbs, and T.W. Hambley, *Platinum(IV) analogues of AMD473 (cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(2-picoline)])*: preparative, structural, and electrochemical studies. *Inorg Chem*, 2006. 45(16): p. 6317-22.
71. G.P. Stathopoulos and T. Boulikas, *Lipoplatin formulation review article*. *J Drug Deliv*, 2012. 2012: p. 581363.
72. G.P. Stathopoulos, D. Antoniou, J. Dimitroulis, P. Michalopoulou, A. Bastas, K. Marosis, J. Stathopoulos, A. Provata, P. Yiamboudakis, D. Veldekis, N. Lolis, N. Georgatou, M. Toubis, C. Pappas, and G. Tsoukalas, *Liposomal cisplatin combined with paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in non-small-cell lung cancer: a randomized phase III multicenter trial*. *Ann Oncol*, 2010. 21(11): p. 2227-32.
73. T. Boulikas, *Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009. 18(8): p. 1197-218.
74. M. Fanellia, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, and P. Paolic, *New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents*. *Coord Chem Rev*, 2016. 310: p. 41-79.
75. S.G. J. Zhao, and F. Liu, *Potent Anticancer Activity and Possible Low Toxicity of Platinum(II) Complexes with Functionalized 1,1-Cyclobutanedicarboxylate as a Leaving Ligand*. *Chem Eur J*, 2014. 20: p. 15216-15225.
76. W.M. Motswainyana, M.O. Onani, A.M. Madiehe, M. Saibu, N. Thovhogi, and R.A. Lalancette, *Imino-phosphine palladium(II) and platinum(II) complexes: synthesis, molecular structures and evaluation as antitumor agents*. *J Inorg Biochem*, 2013. 129: p. 112-8.
77. C. Gao, Y. Zhang, J. Chen, T. Wang, Y. Qian, B. Yang, P. Dong, and Y. Zhang, *Targeted Drug Delivery System for Platinum-based Anticancer Drugs*. *Mini Rev Med Chem*, 2015.
78. X. Wang and Z. Guo, *Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs*. *Chem Soc Rev*, 2013. 42(1): p. 202-24.

79. M.P. Serenella Medicia , V. M. Nurchib, J. I. Lachowiczb, G. Crisponib, and M. A. Zoroddu, *Noble metals in medicine: Latest advances*. *Coord Chem Rev*, 2015. 284: p. 329–350.
80. J. Zhao, S. Gou, and F. Liu, *Potent anticancer activity and possible low toxicity of platinum(II) complexes with functionalized 1,1-cyclobutanedicarboxylate as a leaving ligand*. *Chem*, 2014. 20(46): p. 15216-25.
81. W. Liu, Q. Ye, J. Jiang, L. Lou, Y. Xu, C. Xie, and M. Xie, *cis-[Pt(II) (1R,2R-DACH)(3-acetoxy-1,1-cyclobutanedicarboxylato)]*, a water-soluble, oxalate-free and stable analogue of oxaliplatin: synthesis, characterization, and biological evaluations. *ChemMedChem*, 2013. 8(9): p. 1465-7.
82. P. Liu, Y. Lu, X. Gao, R. Liu, D. Zhang-Negrerie, Y. Shi, Y. Wang, S. Wang, and Q. Gao, *Highly water-soluble platinum(II) complexes as GLUT substrates for targeted therapy: improved anticancer efficacy and transporter-mediated cytotoxic properties*. *Chem Commun (Camb)*, 2013. 49(24): p. 2421-3.
83. W. Liu, J. Jiang, Y. Xu, S. Hou, L. Sun, Q. Ye, and L. Lou, *Design, synthesis and anticancer activity of diam(m)ine platinum(II) complexes bearing a small-molecular cell apoptosis inducer dichloroacetate*. *J Inorg Biochem*, 2015. 146: p. 14-8.
84. J. Zhao, S. Gou, F. Liu, Y. Sun, and C. Gao, *Anticancer potency of platinum(II) complexes containing both chloride anion and chelated carboxylate as leaving groups*. *Inorg Chem*, 2013. 52(14): p. 8163-70.
85. L. Messori, A. Casini, C. Gabbiani, E. Michelucci, L. Cubo, C. Rios-Luci, J.M. Padron, C. Navarro-Ranninger, and A.G. Quiroga, *Cytotoxic Profile and Peculiar Reactivity with Biomolecules of a Novel "Rule-Breaker" Iodidoplatinum(II) Complex*. *ACS Med Chem Lett*, 2010. 1(8): p. 381-5.
86. M. Gay, A.M. Montana, C. Batalla, J.M. Mesas, and M.T. Alegre, *Design, synthesis and SAR studies of novel 1,2-bis(aminomethyl)cyclohexane platinum(II) complexes with cytotoxic activity. Studies of interaction with DNA of iodinated seven-membered 1,4-diaminoplatinocycles*. *J Inorg Biochem*, 2015. 142: p. 15-27.
87. A. Savic, L. Filipovic, S. Arandelovic, B. Dojcinovic, S. Radulovic, T.J. Sabo, and S. Grguric-Sipka, *Synthesis, characterization and cytotoxic activity of novel platinum(II) iodido complexes*. *Eur J Med Chem*, 2014. 82: p. 372-84.

88. L. Fang, S. Gou, J. Zhao, Y. Sun, and L. Cheng, *Platinum(II) complexes with N-monoalkyl 1R,2R-diaminocyclohexane derivatives as carrier ligands and 3-hydroxycyclobutane-1,1-dicarboxylate as a leaving group: potent cytotoxicity and DNA binding ability*. Eur J Med Chem, 2013. 69: p. 842-7.
89. H. Zhang, S. Gou, J. Zhao, F. Chen, G. Xu, and X. Liu, *Cytotoxicity profile of novel sterically hindered platinum(II) complexes with (1R,2R)-N(1),N(2)-dibutyl-1,2-diaminocyclohexane*. Eur J Med Chem, 2015. 96: p. 187-95.
90. T. Muchova, J. Pracharova, P. Starha, R. Olivova, O. Vrana, B. Benesova, J. Kasparkova, Z. Travnicek, and V. Brabec, *Insight into the toxic effects of cis-dichloridoplatinum(II) complexes containing 7-azaindole halogeno derivatives in tumor cells*. J Biol Inorg Chem, 2013. 18(5): p. 579-89.
91. K.H. I. Łakomska, A. Wojtczak, J. Sitkowski, E. Maj, J. Wietrzyk, *Cytotoxic malonate platinum(II) complexes with 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives: Structural characterization and mechanism of the suppression of tumor cell growth* J Inorg Biochem, 2014. 141: p. 188–197.
92. M.C. Liu, T.S. Lin, and A.C. Sartorelli, *Synthesis and antitumor activity of amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone*. J Med Chem, 1992. 35(20): p. 3672-7.
93. M.C. Liu, T.S. Lin, and A.C. Sartorelli, *Chemical and biological properties of cytotoxic alpha-(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones*. Prog Med Chem, 1995. 32: p. 1-35.
94. D.S. Kalinowski, P. Quach, and D.R. Richardson, *Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment*. Future Med Chem, 2009. 1(6): p. 1143-51.
95. A.I. Matesanz, J. Perles, and P. Souza, *New palladium and platinum complexes with bioactive 3,5-diacetyl-1,2,4-triazol bis(4-cyclohexyl thiosemicarbazone) ligand: chemistry, antiproliferative activity and preliminary toxicity studies*. Dalton Trans, 2012. 41(40): p. 12538-47.
96. A.A. Ibrahim, H. Khaledi, P. Hassandarvish, H. Mohd Ali, and H. Karimian, *Indole-7-carbaldehyde thiosemicarbazone as a flexidentate ligand toward ZnII, CdII, PdII and PtII ions: cytotoxic and apoptosis-inducing properties of the PtII complex*. Dalton Trans, 2014. 43(10): p. 3850-60.

97. X. Liu, L.L. Zhang, X.H. Xu, L. Hui, J.B. Zhang, and S.W. Chen, *Synthesis and anticancer activity of dichloroplatinum(II) complexes of podophyllotoxin*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013. 23(13): p. 3780-4.
98. R. Cincinelli, L. Musso, S. Dallavalle, R. Artali, S. Tinelli, D. Colangelo, F. Zunino, M. De Cesare, G.L. Beretta, and N. Zaffaroni, *Design, modeling, synthesis and biological activity evaluation of camptothecin-linked platinum anticancer agents*. *Eur J Med Chem*, 2013. 63: p. 387-400.
99. S. Ding, X. Qiao, G.L. Kucera, and U. Bierbach, *Design of a platinum-acridine-endoxifen conjugate targeted at hormone-dependent breast cancer*. *Chem Commun (Camb)*, 2013. 49(24): p. 2415-7.
100. K. Cheung-Ong, K.T. Song, Z. Ma, D. Shabtai, A.Y. Lee, D. Gallo, L.E. Heisler, G.W. Brown, U. Bierbach, G. Giaever, and C. Nislow, *Comparative chemogenomics to examine the mechanism of action of dna-targeted platinum-acridine anticancer agents*. *ACS Chem Biol*, 2012. 7(11): p. 1892-901.
101. M. Wenzel, E. Bigaeva, P. Richard, P. Le Gendre, M. Picquet, A. Casini, and E. Bodio, *New heteronuclear gold(I)-platinum(II) complexes with cytotoxic properties: are two metals better than one?* *J Inorg Biochem*, 2014. 141: p. 10-6.
102. N. Cutillas, A. Martínez, G. S. Yellol, V. Rodríguez, A. Zamora, M. Pedreno, A. Donaire, C. Janiak, and J. Ruiz, *New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents*. *Coord Chem Rev*, 2016. 310: p. 441-79.
103. R. McGuire Jr., and D. R. McMillin, *Platinum(II) polypyridines: A tale of two axes*. *Coord Chem Rev*, 2010. 254: p. 2574–2583.
104. A.G. Quiroga, *Understanding trans platinum complexes as potential antitumor drugs beyond targeting DNA*. *J Inorg Biochem*, 2012. 114: p. 106-12.
105. L. Cubo, M. Groessl, P.J. Dyson, A.G. Quiroga, C. Navarro-Ranninger, and A. Casini, *Proteins as possible targets for cytotoxic trans-platinum(II) complexes with aliphatic amine ligands: Further exceptions to the DNA paradigm*. *ChemMedChem*, 2010. 5(8): p. 1335-43.
106. M. Coluccia and G. Natile, *Trans-platinum complexes in cancer therapy*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2007. 7(1): p. 111-23.

- 107A. M. Galanski, V.B. Arion, M.A. Jakupec, and B.K. Keppler, *Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes*. *Curr Pharm Des*, 2003. 9(25): p. 2078-89.
- 107B. E. Wexselblatt, and D.Gibson, *What do we know about the reduction of Pt(IV) pro-drugs?* *J Inorg Biochem*, 2012. 117: p. 220-9.
108. F. A. Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillo, M. Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*. 1988, Willey-Interscience, New York. p. 1001.
109. N.N. Greenwood, *Chemistry of the Elements*. 1998, Elsevier Ltd. p. 1144.
110. E. Gao, C. Liu, M. Zhu, H. Lin, Q. Wu, and L. Liu, *Current development of Pd(II) complexes as potential antitumor agents*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009. 9(3): p. 356-68.
111. M.P.M. Marques, *Platinum and palladium polyamine complexes as anticancer agents: the structural factor*, in *ISRN Spectroscopy*. 2013. p. 29.
112. C. Icel, V.T. Yilmaz, Y. Kaya, H. Samli, W.T. Harrison, and O. Buyukgungor, *New palladium(II) and platinum(II) 5,5-diethylbarbiturate complexes with 2-phenylpyridine, 2,2'-bipyridine and 2,2'-dipyridylamine: synthesis, structures, DNA binding, molecular docking, cellular uptake, antioxidant activity and cytotoxicity*. *Dalton Trans*, 2015. 44(15): p. 6880-95.
113. T.M. Silva, S. Andersson, S.K. Sukumaran, M.P. Marques, L. Persson, and S. Oredsson, *Norspermidine and novel Pd(II) and Pt(II) polynuclear complexes of norspermidine as potential antineoplastic agents against breast cancer*. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e55651.
114. H. Mansouri-Torshizi, M. Saeidifar, A. Divsalar, and A.A. Saboury, *Interaction studies between a 1,10-phenanthroline adduct of palladium(II) dithiocarbamate anti-tumor complex and calf thymus DNA. A synthesis spectral and in-vitro study*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2010. 77(1): p. 312-8.
115. Δ. Κατάκης, Χ.Μητσοπούλου, Γ. Πνευματικάκης, *Ανόργανη Χημεία Β', Τα Στοιχεία*. 2002: Εκδόσεις Παπαζήση.
116. R. Prabhakaran, P. Poornima, F. Dallemer, R. Huang, V. Vijaya Padma, and K. Natarajan, *Synthesis, DNA/protein binding and in vitro cytotoxic studies of new palladium metallothiosemicarbazones*. *Bioorg Med Chem*, 2013. 21: p. 6742-52.

117. E. Ramachandran, N. Rath, and K.Natarajan, *Role of substitution at terminal nitrogen of 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde thiosemicarbazones on the coordination behavior and structure and biological properties of their palladium(II) complexes*. Inorg Chem., 2013. 52: p. 1504-1514.
118. A. I. Matesanz, I. Leita, and P. Souza *Palladium(II) and platinum(II) bis(thiosemicarbazone) complexes of the 2,6-diacetylpyridine series with high cytotoxic activity in cisplatin resistant A2780cisR tumor cells and reduced toxicity*. J Inorg Biochem, 2013. 125: p. 26-31.
119. R. de Souza, O. Treu-Filho, A. Netto, A. Mauro, E. Castellano, I. Carlos, F. Pavan, and C. Leite , *Antimycobacterial and antitumor activities of palladium(II) complexes containing isonicotinamide (isn): X-ray structure of trans-[Pd(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(isn)<sub>2</sub>]*. Eur J Med Chem, 2010: p. 4863-4868.
120. F. Ari , E. Armutak, N. Aztopal, V. Yilmaz, and E. Ulukaya, *Apoptosis-inducing effect of a palladium(II) saccharinate complex of terpyridine on human breast cancer cells in vitro and in vivo*. Bioorg Med Chem, 2014. 17: p. 4948-4954.
121. M.F. Mirco Fanelli, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, and P. Paoli, *New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents*. Coord Chem Rev, 2016. 310: p. 41–79.
122. M.P. Serenella Medici, V. Marina Nurchi, J. I. Lachowicz, G. Crisponi, and M. A. Zoroddu, *Noble metals in medicine: Latest advances*. Coord Chem Rev, 2015. 284: p. 329-350.
123. I. Solomon, *Multicopper Oxidases and Oxygenases*. Chem Rev, 1996. 96: p. 2563.
124. G.W. F. Albert Cotton, Carlos A. Murillo, Manfred Bochmann *Advanced Inorganic Chemistry*. 6th ed. 1988: Willey-Interscience.
125. C. Duncan and A.R. White, *Copper complexes as therapeutic agents*. Metallomics, 2012. 4(2): p. 127-38.
126. K. Ghosh, P. Kumar, N. Tyagi, U.P. Singh, N. Goel, A. Chakraborty, P. Roy, and M.C. Baratto, *DNA interaction, superoxide scavenging and cytotoxicity studies on new copper(II) complexes derived from a tridentate ligand*. Polyhedron, 2011. 30(16): p. 2667-2677.



127. A. Draksharapu, A.J. Boersma, M. Leising, A. Meetsma, W.R. Browne, and G. Roelfes, *Binding of copper(II) polypyridyl complexes to DNA and consequences for DNA-based asymmetric catalysis*. Dalton Trans, 2015. 44(8): p. 3647-55.
128. J. Lakshmipraba, S. Arunachalam, A. Riyasdeen, R. Dhivya, and M.A. Akbarsha, *Polyethyleneimine anchored copper(II) complexes: synthesis, characterization, in vitro DNA binding studies and cytotoxicity studies*. J Photochem Photobiol B, 2015. 142: p. 59-67.
129. C. Kowol, W. Miklos, L. Gille, R. Trondl, L. Cappellacci, W. Berger, and B. Keppler, *Mechanisms underlying reductant-induced reactive oxygen species formation by anticancer copper(II) compounds*. J Bio Inorg Chem, 2012. 17: p. 409-423.
130. Z. Li, S. Dong, and X. Li, *DNA breakage induced by piceatannol and copper(II): Mechanism and anticancer properties*. Oncol Lett, 2012. 3: p. 1087-1094.
131. M. Jagadeesh, S.K. Kalangi, L. Sivarama Krishna, and A.V. Reddy, *Halo-substituted thiosemicarbazones and their copper(II), nickel(II) complexes: detailed spectroscopic characterization and study of antitumour activity against HepG2 human hepatoblastoma cells*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2014. 118: p. 552-6.
132. M.N. Milunovic, E. Enyedy, N.V. Nagy, T. Kiss, R. Trondl, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, R. Krachler, G. Novitchi, and V.B. Arion, *L- and D-proline thiosemicarbazone conjugates: coordination behavior in solution and the effect of copper(II) coordination on their antiproliferative activity*. Inorg Chem, 2012. 51(17): p. 9309-21.
133. B.M. Paterson and P.S. Donnelly, *Copper complexes of bis(thiosemicarbazones): from chemotherapeutics to diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals*. Chem Soc Rev, 2011. 40(5): p. 3005-18.
134. F.A. Beckford, J. Thessing, A. Stott, A.A. Holder, O.G. Poluektov, L. Li, and N.P. Seeram, *Anticancer activity and biophysical reactivity of copper complexes of 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-N-alkylhydrazinocarbothioamides*. Inorg Chem Commun, 2012. 15: p. 225-229.
135. B. Duff, V.R. Thangella, B.S. Creaven, M. Walsh, and D.A. Egan, *Anti-cancer activity and mutagenic potential of novel copper(II) quinolinone Schiff base complexes in hepatocarcinoma cells*. Eur J Pharmacol, 2012. 689(1-3): p. 45-55.

136. A. Chakraborty, P. Kumar, K. Ghosh, and P. Roy, *Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action*. Eur J Pharmacol, 2010. 647(1-3): p. 1-12.
137. S. Adsule, V. Barve, D. Chen, F. Ahmed, Q.P. Dou, S. Padhye, and F.H. Sarkar, *Novel Schiff base copper complexes of quinoline-2 carboxaldehyde as proteasome inhibitors in human prostate cancer cells*. J Med Chem, 2006. 49(24): p. 7242-6.
138. L.L. Koh, O.L. Kon, K.W. Loh, Y.C. Long, J.D. Ranford, A.L. Tan, and Y.Y. Tjan, *Complexes of salicylaldehyde acylhydrazones: cytotoxicity, QSAR and crystal structure of the sterically hindered t-butyl dimer*. J Inorg Biochem, 1998. 72(3-4): p. 155-62.
139. E.W. Ainscough, A.M. Brodie, W.A. Denny, G.J. Finlay, S.A. Gothe, and J.D. Ranford, *Cytotoxicity of salicylaldehyde benzoylhydrazone analogs and their transition metal complexes: quantitative structure-activity relationships*. J Inorg Biochem, 1999. 77(3-4): p. 125-33.
140. C. Fan, J. Zhao, B. Zhao, S. Zhang, and J. Miao, *Novel complex of copper and a salicylaldehyde pyrazole hydrazone derivative induces apoptosis through up-regulating integrin beta 4 in vascular endothelial cells*. Chem Res Toxicol, 2009. 22(9): p. 1517-25.
141. F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D.P. Kessissoglou, and G. Psomas, *Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: synthesis, structure, DNA- and albumin-binding*. J Inorg Biochem, 2011. 105(3): p. 476-89.
142. S. Fountoulaki, F. Perdih, I. Turel, D.P. Kessissoglou, and G. Psomas, *Non-steroidal anti-inflammatory drug diflunisal interacting with Cu(II). Structure and biological features*. J Inorg Biochem, 2011. 105(12): p. 1645-55.
143. A. Theodorou, M.A. Demertzis, D. Kovala-Demertzi, E.E. Lioliou, A.A. Pantazaki, and D.A. Kyriakidis, *Copper(II) complexes of diclofenac: Spectroscopic studies and DNA strand breakage*. Biometals, 1999. 12(2): p. 167-172.
144. X. Zhao, P.P. Lee, Y.K. Yan, and C.K. Chu, *Synthesis, crystal structures and cytotoxicities of some transition metal complexes with N-[2-((pyridin-2-ylmethylidene)amino)ethyl]acetamide*. J Inorg Biochem, 2007. 101(2): p. 321-8.

145. A.T. Chaviara, P.J. Cox, K.H. Repana, R.M. Papi, K.T. Papazisis, D. Zambouli, A.H. Kortsaris, D.A. Kyriakidis, and C.A. Bolos, *Copper(II) Schiff base coordination compounds of dien with heterocyclic aldehydes and 2-amino-5-methyl-thiazole: synthesis, characterization, antiproliferative and antibacterial studies. Crystal structure of  $Cu(dien)OOC_2$* . J Inorg Biochem, 2004. 98(8): p. 1271-83.
146. X.Y. Qin, L.C. Yang, F.L. Le, Q.Q. Yu, D.D. Sun, Y.N. Liu, and J. Liu, *Structures and anti-cancer properties of two binuclear copper complexes*. Dalton Trans, 2013. 42(41): p. 14681-4.
147. A. Prisecaru, M. Devereux, N. Barron, M. McCann, J. Colleran, A. Casey, V. McKee, and A. Kellett, *Potent oxidative DNA cleavage by the di-copper cytotoxin:  $[Cu_2(\mu\text{-terephthalate})(1,10\text{-phen})_4]^{2+}$* . Chem Commun (Camb), 2012. 48(55): p. 6906-8.
148. K. Suntharalingam, D.J. Hunt, A.A. Duarte, A.J. White, D.J. Mann, and R. Vilar, *A tri-copper(II) complex displaying DNA-cleaving properties and antiproliferative activity against cancer cells*. Chem, 2012. 18(47): p. 15133-41.
149. X.W. Li, X.J. Li, Y.T. Li, Z.Y. Wu, and C.W. Yan, *Syntheses and structures of new trimetallic complexes bridged by  $N\text{-}(5\text{-chloro-2-hydroxyphenyl})\text{-}N'\text{-}[3\text{-}(dimethylamino)propyl]oxamide$ : cytotoxic activities, and reactivities towards DNA and protein*. J Photochem Photobiol B, 2013. 118: p. 22-32.
150. M.S. Balakrishna, D. Suresh, A. Rai, J.T. Mague, and D. Panda, *Dinuclear copper(II) complexes containing cyclodiphosphazane derivatives and pyridyl ligands: synthesis, structural studies, and antiproliferative activity toward human cervical and breast cancer cells*. Inorg Chem, 2010. 49(19): p. 8790-801.
151. F. Richard Keenea, J. Grant Collins, *Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids*. Coord Chem Rev, 2009. 253: p. 2021–2035.
152. P. Jaividhya, R. Dhivya, M.A. Akbarsha, and M. Palaniandavar, *Efficient DNA cleavage mediated by mononuclear mixed ligand copper(II) phenolate complexes: the role of co-ligand planarity on DNA binding and cleavage and anticancer activity*. J Inorg Biochem, 2012. 114: p. 94-105.
153. A. Kumar, J.P. Chinta, A.K. Ajay, M.K. Bhat, and C.P. Rao, *Synthesis, characterization, plasmid cleavage and cytotoxicity of cancer cells by a copper(II) complex of anthracenyl-terpyridine*. Dalton Trans, 2011. 40(41): p. 10865-72.

154. Z. Zhang, S.M. Schmitt, Y. Fan, L. Dong, J. Zuo, Q.P. Dou, *1,10-Phenanthroline promotes copper complexes into tumor cells and induces apoptosis by inhibiting the proteasome activity*. *J Bio Inorg Chem*, 2012. 17: p. 1257–1267.
155. L. Ruiz-Azuara and M.E. Bravo-Gomez, *Copper compounds in cancer chemotherapy*. *Curr Med Chem*, 2010. 17(31): p. 3606-15.
156. R. Kachadourian, H.M. Brechbuhl, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, and B.J. Day, *Casiopeina Ilgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells*. *Toxicol*, 2010. 268(3): p. 176-83.
157. J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sanchez, E. Reyes-Perez, F. Velazquez-Garcia, M.E. Bravo-Gomez, and L. Ruiz-Azuara, *Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas*. *Toxicol In Vitro*, 2011. 25(7): p. 1376-84.
158. T. Bortolotto, P.P. Silva, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, and H. Terenzi, *Photoinduced DNA cleavage promoted by two copper(II) complexes of tetracyclines and 1,10-phenanthroline*. *Inorg Chem*, 2011. 50(21): p. 10519-21.
159. P.P. Silva, W. Guerra, J.N. Silveira, A.M. Ferreira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, H. Terenzi, A. Neves, and E.C. Pereira-Maia, *Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage*. *Inorg Chem*, 2011. 50(14): p. 6414-24.
160. T. Wang and Z. Guo, *Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design*. *Curr Med Chem*, 2006. 13(5): p. 525-37.
161. D.C. Bloomfield, I.Jr.Tinoco, *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions*. 2000: University Science Books.
162. S.M.Hecht, *Bioorganic Chemistry-Nucleic Acids*. 1996: Oxford University Press Inc.
163. L.S. Lerman, *Structural considerations in the interaction of DNA and acridines*. *J Mol Biol*, 1961. 3: p. 18-30.
164. H. Ihmels, K. Faulhaber, D. Vedaldi, F. Dall'Acqua, and G. Viola, *Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA. Part 2: the annelated quinolinium ion as a structural motif in DNA intercalators*. *Photochem Photobiol*, 2005. 81(5): p. 1107-15.

165. O. Vazquez, J.B. Blanco-Canosa, M.E. Vazquez, J. Martinez-Costas, L. Castedo, and J.L. Mascarenas, *Efficient DNA binding and nuclear uptake by distamycin derivatives conjugated to octa-arginine sequences*. *Chembiochem*, 2008. 9(17): p. 2822-9.
166. M.M. Paz, T.A. Das, and M. Tomasz, *Mitomycin C linked to DNA minor groove binding agents: synthesis, reductive activation, DNA binding and cross-linking properties and in vitro antitumor activity*. *Bioorg Med Chem*, 1999. 7(12): p. 2713-26.
167. N.K. Alvi, N.S. Ahmad, S. Ahmad, and S.M. Hadi, *Effect of riboflavin and light on the secondary structure of DNA*. *Chem Biol Interact*, 1984. 48(3): p. 367-76.
168. M. Takeshita, A.P. Grollman, E. Ohtsubo, and H. Ohtsubo, *Interaction of bleomycin with DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. 75(12): p. 5983-7.
169. M. Chakraborty, K.J. Jin, S.A. Glover, and M. Novak, *Characterization of the 4-(benzothiazol-2-yl)phenylnitrenium ion from a putative metabolite of a model antitumor drug*. *J Org Chem*, 2010. 75(15): p. 5296-304.
170. M. Novak and M. Chakraborty, *Reactions of a putative metabolite of the model antitumor drug 2-(4-aminophenyl) benzothiazole with purines and pyrimidines*. *J Phys Org Chem*, 2011. 24(10): p. 960-968.
171. J. Marmur, *Procedure for Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-Organisms*. *J Mol Biol*, 1961. 3(2): p. 208-&.
172. J.D. McGhee and P.H.V. Hippel, *Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions - Cooperative and Non-Cooperative Binding of Large Ligands to a One-Dimensional Homogeneous Lattice*. *J Mol Bio*, 1974. 86(2): p. 469-489.
173. G. Scatchard, *The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1949. 51(4): p. 660-672.
174. P.O. Vardevanyan, A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan, M.A. Torosyan, and A.T. Karapetian, *Joint Interaction of Ethidium Bromide and Methylene Blue with DNA. The Effect of Ionic Strength on Binding Thermodynamic Parameters*. *J Biomol Struct Dyn*, 2015: p. 1-14.
175. D.L. Boger, B.E. Fink, S.R. Brunette, W.C. Tse, and M.P. Hedrick, *A simple, high-resolution method for establishing DNA binding affinity and sequence selectivity*. *J Am Chem Soc*, 2001. 123(25): p. 5878-91.

176. J.R. Lakowicz and G. Weber, *Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules*. *Biochem*, 1973. 12(21): p. 4161-70.
177. R. Frank and H. Rau, *Static and Dynamic Quenching of the Emission of Excited Ruthenium(II) Tris(Bipyridyl) Cation by Nickel(II) Tetracyanodithiolene Anion*. *J Phys Chem*, 1983. 87(25): p. 5181-5184.
178. R.M. Neve, K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F.L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J.P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P.T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N.J. Wang, W.L. Kuo, J.L. Stilwell, D. Pinkel, D.G. Albertson, F.M. Waldman, F. McCormick, R.B. Dickson, M.D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar, and J.W. Gray, *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. *Cancer Cell*, 2006. 10(6): p. 515-27.
179. M.H. Borawska, S.K. Czechowska, R. Markiewicz, A. Hayirli, E. Olszewska, and K. Sahin, *Cell viability of normal human skin fibroblast and fibroblasts derived from granulation tissue: effects of nutraceuticals*. *J Med Food*, 2009. 12(2): p. 429-34.
180. P.N. Dean, *Confocal microscopy: principles and practices*. *Curr Protoc Cytom*, 2001. Chapter 2: p. Unit 2 8.
181. F. Denizot and R. Lang, *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. *J Immunol Methods*, 1986. 89(2): p. 271-7.
182. S. Tzanopoulou, M. Sagnou, M. Paravatou-Petsotas, E. Gourni, G. Loudos, S. Xanthopoulos, D. Lafkas, H. Kiaris, A. Varvarigou, I.C. Pirmettis, M. Papadopoulos, and M. Pelecanou, *Evaluation of Re and (99m)Tc complexes of 2-(4'-aminophenyl)benzothiazole as potential breast cancer radiopharmaceuticals*. *J Med Chem*, 2010. 53(12): p. 4633-41.
183. V. Sathyanarayanmoorthi, R. Karunathan, and V. Kannappan, *Molecular Modeling and Spectroscopic Studies of Benzothiazole*. *J Chem*, 2013. doi:10.1155/2013/258519
184. M. Katcka and T. Urbanski, *Infrared Absorption Spectra of Quaternary Salts of Pyridine*. *Bulletin De L Academie Polonaise Des Sciences-Serie Des Sciences Chimiques*, 1964. 12(9): p. 615.

185. S. Budagumpi and V.K. Revankar, *Interaction of E. coli DNA with diazine-bridged late first row transition metal complexes derived from hexadentate compartmental ligands: an approach to DNA cleavage/binding studies*. *Trans Met Chem*, 2010. 35(6): p. 649-658.
186. M. Boca, M. Valko, G. Kickelbick, M. Durik, and W. Linert, *Cu-II complexes with the new Schiff base ligands as a mono- and bis-condensation products of 2-pyridinecarboxaldehyde-N-oxide with diethylenetriamine*. *Inorg Chim Acta*, 2003. 349: p. 111-122.
187. T. Ghosh, S. Das, and S. Pal, *Bis(2-(1H-imidazol-2-yl)-pyridine)copper(II): Effects of counteranions on the molecular and supramolecular structures*. *Polyhedron*, 2010. 29(16): p. 3074-3080.
188. V.P. Singh, S. Singh, D.P. Singh, P. Singh, K. Tiwari, M. Mishra, and R.J. Butcher, *Synthesis, spectral and single crystal X-ray diffraction studies on Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with o-amino acetophenone benzoyl hydrazone*. *Polyhedron*, 2013. 56: p. 71-81.
189. D. Kivelson, *ESR Studies on the Bonding in Copper Complexes*. *J Chem Phys*, 1961. 35: p. 149-155.
190. V.P. Singh, S. Singh, D.P. Singh, K. Tiwari, and M. Mishra, *Synthesis, spectroscopic (electronic, IR, NMR and ESR) and theoretical studies of transition metal complexes with some unsymmetrical Schiff bases*. *J Mol Struct*, 2014. 1058: p. 71-78.
191. G.A. van Albada, M. Ghazzali, K. Al-Farhan, E. Bouwman, and J. Reedijk, *Three new pyridine-2,6-dicarboxylate copper(II) compounds with coordinated pyridine-based ligands: Synthesis, characterisation and crystal structures*. *Polyhedron*, 2011. 30(16): p. 2690-2696.
192. Z. Hnatejko, D. Kwiatek, G. Dutkiewicz, M. Kubicki, R. Jastrzab, and S. Lis, *Pyridine N-oxide complexes of Cu(II) ions with pseudohalides: Synthesis, structural and spectroscopic characterization*. *Polyhedron*, 2014. 81: p. 728-734.
193. S. Gil and N.C. Oliveira, *On the Use of the Method of Continuous Variations*. *J Chem Ed*, 1990. 67(6): p. 473-478.
194. C. Hill, *Novel Approach to Job's Method*. *J Chem Ed*, 1986. 63.

195. J. Liu, T.X. Zhang, T.B. Lu, L.H. Qu, H. Zhou, Q.L. Zhang, and L.N. Ji, *DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes*. *J Inorg Biochem*, 2002. 91(1): p. 269-276.
196. R. Palchaudhuri and P.J. Hergenrother, *DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action*. *Curr Op Biotech*, 2007. 18(6): p. 497-503.
197. A.M. Pyle, J.P. Rehmann, R. Meshoyrer, C.V. Kumar, N.J. Turro, and J.K. Barton, *Mixed-Ligand Complexes of Ruthenium(II) - Factors Governing Binding to DNA*. *JACS*, 1989. 111(8): p. 3051-58.
198. M. Baldini, M. Belicchi-Ferrari, F. Bisceglie, G. Pelosi, S. Pinelli, and P. Tarasconi, *Cu(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: the case of 5-formyluracil. Synthesis, characterization, x-ray structures, DNA interaction studies, and biological activity*. *Inorg Chem*, 2003. 42(6): p. 2049-55.
199. P. Pandya, M.M. Islam, G.S. Kumar, B. Jayaram, and S. Kumar, *DNA minor groove binding of small molecules: Experimental and computational evidence*. *J Chem Sci*, 2010. 122(2): p. 247-257.
200. T. Biver, *Use of UV-Vis Spectrometry to Gain Information on the Mode of Binding of Small Molecules to DNAs and RNAs*. *App Spec Rev*, 2012. 47(4): p. 272-325.
201. A. Adhikary, V. Buschmann, C. Muller, and M. Sauer, *Ensemble and single-molecule fluorescence spectroscopic study of the binding modes of the bis-benzimidazole derivative Hoechst 33258 with DNA*. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(8): p. 2178-2186.
202. B.C. Baguley, *Nonintercalative DNA-binding antitumour compounds*. *Mol Cell Biochem*, 1982. 43(3): p. 167-81.
203. H.S. Rye, S. Yue, D.E. Wemmer, M.A. Quesada, R.P. Haugland, R.A. Mathies, and A.N. Glazer, *Stable Fluorescent Complexes of Double-Stranded DNA with Bis-Intercalating Asymmetric Cyanine Dyes - Properties and Applications*. *Nucleic Acids Research*, 1992. 20(11): p. 2803-2812.



204. F. Arjmand, F. Sayeed, and M. Muddassir, *Synthesis of new chiral heterocyclic Schiff base modulated Cu(II)/Zn(II) complexes: Their comparative binding studies with CT-DNA, mononucleotides and cleavage activity*. J Photochem Photobiol, 2011. 103(2): p. 166-179.
205. N. Shahabadi, S. Kashanian, and A. Fatahi, *Identification of Binding Mode of a Platinum (II) Complex, PtCl<sub>2</sub>(DIP), and Calf Thymus DNA*. Bioinorg Chem App, 2011, doi: 10.1155/2011/687571.
206. S.D. Wu, X.Y. Wang, C.C. Zhu, Y.J. Song, J. Wang, Y.Z. Li, and Z.J. Guo, *Monofunctional platinum complexes containing a 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole fluorophore: Distribution in tumour cells*. Dalton Trans, 2011. 40(40): p. 10376-10382.
207. E.J. New, R. Duan, J.Z. Zhang, and T.W. Hambley, *Investigations using fluorescent ligands to monitor platinum(IV) reduction and platinum(II) reactions in cancer cells*. Dalton Trans, 2009(16): p. 3092-3101.
208. X.Y. Zhang, Y. Wang, Q.R. Zhang, and Z.S. Yang, *The interaction of taurine-salicylaldehyde Schiff base copper(II) complex with DNA and the determination of DNA using the complex as a fluorescence probe*. Spectrochim Acta, 2010. 77(1): p. 1-5.
209. C.C. Tsai, S.C. Jain, and H.M. Sobell, *X-ray crystallographic visualization of drug-nucleic acid intercalative binding: structure of an ethidium-dinucleoside monophosphate crystalline complex, Ethidium: 5-iodouridylyl (3'-5') adenosine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. 72(2): p. 628-32.
210. K.J. Breslauer, D.P. Remeta, W.Y. Chou, R. Ferrante, J. Curry, D. Zaunczkowski, J.G. Snyder, and L.A. Marky, *Enthalpy-entropy compensations in drug-DNA binding studies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(24): p. 8922-6.
211. P. Zivec, F. Perdih, I. Turel, G. Giester, and G. Psomas, *Different types of copper complexes with the quinolone antimicrobial drugs ofloxacin and norfloxacin: structure, DNA- and albumin-binding*. J Inorg Biochem, 2012. 117: p. 35-47.
212. H.L. Wu, W.Y. Li, X.W. He, K. Miao, and H. Liang, *Spectral studies of the binding of lucigenin, a bisacridinium derivative, with double-helix DNA*. Anal Bioanal Chem, 2002. 373(3): p. 163-8.

213. M.B. Lyles and I.L. Cameron, *Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA*. Biophys Chem, 2002. 96(1): p. 53-76.
214. I. Ahmad and M. Ahmad, *Dacarbazine as a minor groove binder of DNA: Spectroscopic, biophysical and molecular docking studies*. Int J Biol Macromol, 2015. 79: p. 193-200.
215. A. Kabir and G. Suresh Kumar, *Binding of the biogenic polyamines to deoxyribonucleic acids of varying base composition: base specificity and the associated energetics of the interaction*. PLoS One, 2013. 8(7): p.70510.
216. A. Meenongwa, R.F. Brissos, C. Soikum, P. Chaveerach, P. Gamez, Y. Trongpanich, and U. Chaveerach, *DNA-interacting and biological properties of copper(II) complexes from amidino-O-methylurea*. New Journal of Chemistry, 2015. 39(1): p. 664-675.
217. E. Gao, M. Zhu, H. Yin, L. Liu, Q. Wu, and Y. Sun, *Synthesis, characterization, interaction with DNA and cytotoxicity in vitro of dinuclear Pd(II) and Pt(II) complexes dibridged by 2,2'-azanediyldibenzoic acid*. J Inorg Biochem, 2008. 102(10): p. 1958-64.
218. V.I. Ivanov, Le. Minchenk, Ak. Schyolki, and Ai. Poletaye, *Different Conformations of Double-Stranded Nucleic-Acid in Solution as Revealed by Circular-Dichroism*. Biopolymers, 1973. 12(1): p. 89-110.
219. L. Racane, R. Stojkovic, V. Tralic-Kulenovic, H. Ceric, M. Dakovic, K. Ester, A.M. Krpan, and M.R. Stojkovic, *Interactions with polynucleotides and antitumor activity of amidino and imidazolinyI substituted 2-phenylbenzothiazole mesylates*. Eur J Med Chem, 2014. 86: p. 406-419.
220. C.B. Spillane, N.C. Fletcher, S.M. Rountree, H. van den Berg, S. Chanduloy, J.L. Morgan, and F.R. Keene, *Benzothiazole bipyridine complexes of ruthenium(II) with cytotoxic activity*. J Bio Inorg Chem, 2007. 12(6): p. 797-807.
221. C.B. Spillane, M.N. Dabo, N.C. Fletcher, J.L. Morgan, F.R. Keene, I. Haq, and N.J. Buurma, *The dichotomy in the DNA-binding behaviour of ruthenium(II) complexes bearing benzoxazole and benzothiazole groups*. J Inorg Biochem, 2008. 102(4): p. 673-683.

222. M. Kubista, B. Akerman, and B. Norden, *Induced Circular-Dichroism in Nonintercalative DNA-Drug Complexes - Sector Rules for Structural Applications*. J Phys Chem, 1988. 92(8): p. 2352-2356.
223. N.C. Garbett, P.A. Ragazzon, and J.B. Chaires, *Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions*. Nat Protoc, 2007. 2(12): p. 3166-3172.
224. J.W. Pettegrew, D.W. Miles, and H. Eyring, *Circular-Dichroism of Adenosine Dinucleotides*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. 74(5): p. 1785-1788.
225. F.H. Li, G.H. Zhao, H.X. Wu, H. Lin, X.X. Wu, S.R. Zhu, and H.K. Lin, *Synthesis, characterization and biological activity of lanthanum(III) complexes containing 2-methylene-1,10-phenanthroline units bridged by aliphatic diamines*. J Inorg Biochem, 2006. 100(1): p. 36-43.
226. P.S. Dorraji and F. Jalali, *Investigation of the Interaction of Sertraline with Calf Thymus DNA by Spectroscopic Methods*. J Braz Chem Soc, 2013. 24(6): p. 939-U725.
227. N. Poklar, D.S. Pilch, S.J. Lippard, E.A. Redding, S.U. Dunham, and K.J. Breslauer, *Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability, and energetics of a 20-mer DNA duplex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. 93(15): p. 7606-7611.
228. N. Nikolis, C. Methenitis, and G. Pneumatikakis, *Studies on the interaction of altromycin B and its platinum(II) and palladium(II) metal complexes with calf thymus DNA and nucleotides*. J Inorg Biochem, 2003. 95(2-3): p. 177-193.
229. S. Steinkopf, A. Garoufis, W. Nerdal, and E. Sletten, *Sequence-Selective Metal-Ion Binding to DNA Oligomers*. Acta Chemica Scandinavica, 1995. 49(7): p. 495-502.
230. E. Katsarou, A. Kolstad, N. Hadjiliadis, and E. Sletten, *H-1 NMR study on the interaction between trans-Cl<sub>2</sub>Pd(dipeptide)<sub>2</sub> (dipeptide is glyglyOH and gly-L-nvalOH) and the dodecanucleotide [d(CGCGAATTCGCG)]<sub>2</sub>*. J Inorg Biochem, 1998. 70(3-4): p. 265-269.
231. X. Riera, V. Moreno, C.J. Ciudad, V. Noe, M. Font-Bardia, and X. Solans, *Complexes of Pd(II) and Pt(II) with 9-aminoacridine: Reactions with DNA and study of their antiproliferative activity*. Bioinorg Chem Appl, 2007. doi: 10.1155/2007/98732

232. M. Vieites, P. Smircich, M. Pagano, L. Otero, F.L. Fischer, H. Terenzi, M.J. Prieto, V. Moreno, B. Garat, and D. Gambino, *DNA as molecular target of analogous palladium and platinum anti-Trypanosoma cruzi compounds: A comparative study*. J Inorg Biochem, 2011. 105(12): p. 1704-1711.
233. R. Lyng, A. Rodger, and B. Norden, *The Cd of Ligand-DNA Systems .1. Poly(Dg-Dc) B-DNA*. Biopolymers, 1991. 31(14): p. 1709-1720.
234. R. Lyng, A. Rodger, and B. Norden, *The Cd of Ligand-DNA Systems .2. Poly(Da-Dt) B-DNA*. Biopolymer, 1992. 32(9): p. 1201-1214.
235. B. Nguyen, D. Hamelberg, C. Bailly, P. Colson, J. Stanek, R. Brun, S. Neidle, and W.D. Wilson, *Characterization of a novel DNA minor-groove complex*. Biophys J, 2004. 86(2): p. 1028-1041.
236. M. Lee, A.L. Rhodes, M.D. Wyatt, M. Dincalci, S. Forrow, and J.A. Hartley, *In vitro Cytotoxicity of Gc Sequence Directed Alkylating-Agents Related to Distamycin*. J Med Chem, 1993. 36(7): p. 863-870.
237. M. Lee, A.L. Rhodes, M.D. Wyatt, S. Forrow, and J.A. Hartley, *Design, Synthesis, and Biological Evaluation of DNA-Sequence and Minor-Groove Selective Alkylating-Agents*. Anti-Cancer Drug Des, 1993. 8(3): p. 173-192.
238. M. Lee, A.L. Rhodes, M.D. Wyatt, S. Forrow, and J.A. Hartley, *Gc-Base Sequence Recognition by Oligo(Imidazolecarboxamide) and C-Terminus-Modified Analogs of Distamycin Deduced from Circular-Dichroism, Proton Nuclear-Magnetic-Resonance, and Methidiumpropylethylenediaminetetraacetate-Iron(II) Footprinting Studies*. Biochem, 1993. 32(16): p. 4237-4245.
239. H. Loskotova and V. Brabec, *DNA interactions of cisplatin tethered to the DNA minor groove binder distamycin*. Eur J Biochem, 1999. 266(2): p. 392-402.
240. H. Kosthunova and V. Brabec, *Conformational analysis of site-specific DNA cross-links of cisplatin-distamycin conjugates*. Biochem, 2000. 39(41): p. 12639-49.
241. F. Liu, K.A. Meadows, and D.R. Mcmillin, *DNA-Binding Studies of Cu(Bcp)(2)<sup>+</sup> and Cu(Dmp)(2)<sup>+</sup> - DNA Elongation without Intercalation of Cu(Bcp)(2)<sup>+</sup>*. JACS, 1993. 115(15): p. 6699-6704.

242. W.B. Melchior and Vonhippe.Ph, *Alteration of Relative Stability of Da-Dt and Dg-Dc Base Pairs in DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973. 70(2): p. 298-302.
243. S. Das and G.S. Kumar, *Molecular aspects on the interaction of phenosafranine to deoxyribonucleic acid: Model for intercalative drug-DNA binding*. J Mol Struct, 2008. 872(1): p. 56-63.
244. B. Jana, S. Senapati, D. Ghosh, D. Bose, and N. Chattopadhyay, *Spectroscopic Exploration of Mode of Binding of ctDNA with 3-Hydroxyflavone: A Contrast to the Mode of Binding with Flavonoids Having Additional Hydroxyl Groups*. J Phys Chem, 2012. 116(1): p. 639-645.
245. V. Brabec, V. Kleinwachter, J.L. Butour, and N.P. Johnson, *Biophysical studies of the modification of DNA by antitumour platinum coordination complexes*. Biophys Chem, 1990. 35(2-3): p. 129-41.
246. R.C. Todd and S.J. Lippard, *Structure of duplex DNA containing the cisplatin 1,2- $\{Pt(NH_3)(2)\}(2+)$ -d(GpG) cross-link at 1.77 angstrom resolution*. J Inorg Biochem, 2010. 104(9): p. 902-908.
247. K. Inagaki and Y. Kidani, *Ultraviolet Difference Spectral Study of the Interaction of DNA with Platinum Complexes*. Inorg Chim Acta, 1980. 46(1): p. 35-39.
248. R. Zaludova, V. Kleinwachter, and V. Brabec, *The effect of ionic strength on melting of DNA modified by platinum(II) complexes*. Biophys Chem, 1996. 60(3): p. 135-142.
249. G.B. Onoa, G. Cervantes, V. Moreno, and M.J. Prieto, *Study of the interaction of DNA with cisplatin and other Pd(II) and Pt(II) complexes by atomic force microscopy*. Nucleic Acids Res, 1998. 26(6): p. 1473-1480.
250. G.B. Onoa and V. Moreno, *Palladium and platinum famotidine complexes*. J Inorg Biochem, 1998. 72(3-4): p. 141-153.
251. S. Harteis and S. Schneider, *Making the Bend: DNA Tertiary Structure and Protein-DNA Interactions*. Int J Mol Sci, 2014. 15(7): p. 12335-12363.

252. B. Selvakumar, V. Rajendiran, P. Uma Maheswari, H. Stoeckli-Evans, and M. Palaniandavar, *Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: the novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage*. *J Inorg Biochem*, 2006. 100(3): p. 316-30.
253. M. Sunita, M. Padmaja, B. Anupama, and C.G. Kumari, *Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage studies of mixed-ligand Cu(II) complexes of 2,6-bis(benzimidazol-2-yl)pyridine*. *J Fluoresc*, 2012. 22(3): p. 1003-12.
254. D. Suh and J.B. Chaires, *Criteria for the mode of binding of DNA binding agents*. *Bioorg Med Chem*, 1995. 3(6): p. 723-8.
255. J.L. Butour and J.P. Macquet, *Viscosity, nicking, thermal and alkaline denaturation studies on three classes of DNA-platinum complex*. *Biochim Biophys Acta*, 1981. 653(3): p. 305-15.
256. S. Steinkopf, A. Garoufis, W. Nerdal, and E. Sletten, *Sequence-selective metal ion binding to DNA oligomers*. *Acta Chem Scand*, 1995. 49(7): p. 495-502.
257. M. Marques, *Platinum and palladium polyamine complexes as anticancer agents: the structural factor*. *ISRN Spectroscopy*, 2013. 2013: p. 29.
258. R. Angamuthu, V. Rajendiran, P.U. Maheswari, R. Balamurugan, C.A. Kilner, M.A. Halcrow, and M. Palaniandavar, *Copper(II) complexes of tridentate pyridylmethylethylenediamines: Role of ligand steric hindrance on DNA binding and cleavage*. *J Inorg Biochem*, 2005. 99(8): p. 1717-32.
259. L.L. Munchausen and R.O. Rahn, *Physical studies on the binding of cis-dichlorodiamine platinum (II) to DNA and homopolynucleotides*. *Biochim Biophys Acta*, 1975. 414(3): p. 242-55.
260. L. Kapicak and E.J. Gabbay, *Effect of aromatic cations on the tertiary structure of deoxyribonucleic acid*. *J Am Chem Soc*, 1975. 97(2): p. 403-8.
261. S. Satyanarayana, J.C. Dabrowiak, and J.B. Chaires, *Neither Delta Tris(Phenanthroline)Ruthenium(II) nor Lambda-Tris(Phenanthroline)Ruthenium(II) Binds to DNA by Classical Intercalation*. *Biochem*, 1992. 31(39): p. 9319-24.

262. S. Mahadevan and M. Palaniandavar, *Spectroscopic and voltammetric studies of copper(II) complexes of bis(pyrid-2-yl)-di/trithia ligands bound to calf thymus DNA*. *Inorg Chim Acta*, 1997. 254(2): p. 291-302.
263. S. Roy, J.A. Westmaas, K.D. Hagen, G.P. van Wezel, and J. Reedijk, *Platinum(II) compounds with chelating ligands based on pyridine and pyrimidine: DNA and protein binding studies*. *J Inorg Biochem*, 2009. 103(9): p. 1288-1297.
264. F.J. Chen, M. Xu, P.X. Xi, H.Y. Liu, and Z.Z. Zeng, *Synthesis, DNA binding and cleavage activities of copper (II) thiocyanate complex with 4-(N,N-dimethylamino)pyridine and N,N-dimethylformamide*. *Spectrochim Acta A*, 2011. 81(1): p. 21-27.
265. L. Racane, R. Stojkovic, V. Tralic-Kulenovic, H. Ceric, M. Dakovic, K. Ester, A.M. Krpan, and M.R. Stojkovic, *Interactions with polynucleotides and antitumor activity of amidino and imidazolanyl substituted 2-phenylbenzothiazole mesylates*. *Eur J Med Chem*, 2014. 86: p. 406-19.
266. P.G. Baraldi, A. Bovero, F. Fruttarolo, D. Preti, M.A. Tabrizi, M.G. Pavani, and R. Romagnoli, *DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents*. *Med Res Rev*, 2004. 24(4): p. 475-528.
267. G.W. Lin, Y. Wang, Q.M. Jin, T.T. Yang, J.M. Song, Y. Lu, Q.J. Huang, K. Song, J. Zhou, and T. Lu, *Synthesis, structures and the biological activity study on the metal complexes of 2-(4-aminophenyl)benzothiazole derivative*. *Inorg Chim Acta*, 2012. 382: p. 35-42.
268. S. Tzanopoulou, I.C. Pirmettis, G. Patsis, M. Paravatou-Petsotas, E. Livaniou, M. Papadopoulos, and M. Pelecanou, *Synthesis, characterization, and biological evaluation of  $M(I)(CO)_3(NNO)$  complexes ( $M = Re, 99mTc$ ) conjugated to 2-(4-aminophenyl)benzothiazole as potential breast cancer radiopharmaceuticals*. *J Med Chem*, 2006. 49(18): p. 5408-10.
269. J. Reedijk and P.H. Lohman, *Cisplatin: synthesis, antitumour activity and mechanism of action*. *Pharm Weekbl Sci*, 1985. 7(5): p. 173-80.
270. F. Kelland, *Platinum Based Drugs in Cancer Therapy*. 2000, New Jersey: Humana Press.

271. M.D. Hall, M. Okabe, D.W. Shen, X.J. Liang, and M.M. Gottesman, *The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008. 48: p. 495-535.
272. S. Spreckelmeyer, C. Orvig, and A. Casini, *Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: an overview beyond cisplatin*. *Molecules*, 2014. 19(10): p. 15584-610.
273. K.A. Price, P.J. Crouch, I. Volitakis, B.M. Paterson, S. Lim, P.S. Donnelly, and A.R. White, *Mechanisms controlling the cellular accumulation of copper bis(thiosemicarbazonato) complexes*. *Inorg Chem*, 2011. 50(19): p. 9594-605.
274. C. Descoteaux, J. Provencher-Mandeville, I. Mathieu, V. Perron, S.K. Mandal, E. Asselin, and G. Berube, *Synthesis of 17 beta-estradiol platinum(II) complexes: Biological evaluation on breast cancer cell*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003. 13(22): p. 3927-3931.
275. T.D. Bradshaw and A.D. Westwell, *The development of the antitumour benzothiazole prodrug, Phortress, as a clinical candidate*. *Curr Med Chem*, 2004. 11(8): p. 1009-21.
276. X.X. Zhao, P.P.F. Lee, Y.K. Yan, and C.K. Chu, *Synthesis, crystal structures and cytotoxicities of some transition metal complexes with N-[2-((pyridin-2-ylmethylidene)amino)ethyl]acetamide*. *J Inorg Biochem*, 2007. 101(2): p. 321-328.
277. M. Salimi, K. Abdi, H.M. Kandelous, H. Hadadzadeh, K. Azadmanesh, A. Amanzadeh, and H. Sanati, *Antiproliferative effects of copper(II)-polypyridyl complexes in breast cancer cells through inducing apoptosis*. *BioMetals*, 2015. 28(2): p. 267-278.