



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**ΣΥΝΘΕΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ  
ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ  $[\text{Cu}(2,2'\text{-bis-COOEt dppz})_2](\text{BF}_4)$  ΚΑΙ  
 $[\text{Cu}(\text{dppz})(\text{dppe})](\text{BF}_4)$  ΜΕ DNA: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ  
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ.**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΣΤΑΥΡΑΚΗ ΑΡΣΙΝΟΗ-ΙΩΑΝΝΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ  
ΜΑΡΤΙΟΣ 2016**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ  
ΤΟΥ  $[\text{Cu}(2,2'\text{-dis-COOEtDppz})_2](\text{BF}_4)$  ΚΑΙ  $[\text{Cu}(\text{dppz})(\text{dppe})](\text{BF}_4)$  ΜΕ DNA:  
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΑΡΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ.**

**ΣΤΑΥΡΑΚΗ ΑΡΣΙΝΟΗ-ΙΩΑΝΝΑ**

**A.M.: 81308**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:**

Χ. Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Χ. ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια

Π. ΚΥΡΙΤΣΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής

Κ. ΜΕΘΕΝΙΤΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 03/03/2016



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων  $[\text{Cu}(\text{dpprz})(\text{dprpe})](\text{BF}_4)$  και  $[\text{Cu}(2,2'\text{-dis-dpprzCOOEt})_2](\text{BF}_4)$  με φασματοσκοπία NMR, FT-IR, UV-Vis, καθώς και με MS, CV και φθορισμομετρία. Τα σύμπλοκα αυτά μελετήθηκαν ως προς την αλληλεπίδρασή τους με φυσικό DNA, από θύμο αδένα βοειδούς (C.T.-DNA). Η αλληλεπίδραση μελετήθηκε με φασματοσκοπία UV-Vis, κυκλικό διχρωισμό, ιξωδομετρία, κυκλική βολταμετρία, φθορισμό καθώς και πειράματα σε πηκτική αгарόζης. Όλα τα πειράματα αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με C.T.-DNA πραγματοποιήθηκαν σε pH=7 (tris-HCl buffer). Επιπλέον, μελετήθηκε η δράση των συμπλόκων στις καρκινικές σειρές PC-3 και U-87MG.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ:** Σύνθεση διμινικών συμπλόκων και βιολογική τους δράση.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Διμινικά σύμπλοκα, Χαλκός (I), DNA, Φωτοδυναμική Θεραπεία (PDT).

## ABSTRACT

In the work presented in this thesis we carried out is the synthesis and characterization of the  $[\text{Cu}(\text{dppz})(\text{dppe})](\text{BF}_4)$  and  $[\text{Cu}(2,2'\text{-dis-dppzCOOEt})_2](\text{BF}_4)$  complexes using spectrophotometric methods like NMR, F.T-IR, UV-Vis, MS spectrometry, fluorescence and CV. These complexes were studied in their interaction with calf thymus DNA (C.T.-DNA). The interaction was studied by UV-Vis Spectrometry, Circular Dichroism, Electrophoresis, Viscometry, Cyclic Voltammetry and Fluorescence. All experiments were carried out at pH=7 (tris- HCl buffer). In addition, we studied the activity of these complexes against cancer cells PC-3 and U87-MG.

**SUBJECT AREA:** Synthesis of diimine complexes and biological activity.

**KEYWORDS:** Diimine complexes, Copper (I), DNA, Photodynamic Therapy (PDT).



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα εργασία διενεργήθηκε στα πλαίσια της μεταπτυχιακής ειδίκευσης στο τομέα της Ανόργανης Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Για την εκπόνηση αυτής της εργασίας, αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Χριστιάνα Μητσοπούλου για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική καθοδήγησή της καθώς και για τη πολύτιμη συμβολή της στη συγγραφή και διόρθωση της εργασίας αυτής.

Επίσης, Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Αθανάσιο Ζαρκαδούλα, Χριστίνα Κεφαλίδη και Ευγενία Κουτσούρη για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφεραν καθώς και για το ευχάριστο κλίμα στο χώρο του εργαστηρίου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Μιχαήλ Καπλάνη και την υποψήφια διδάκτορα Κυπραίου Κωσταντίνα για τις χρήσιμες συμβουλές και τη βοήθειά τους σε οποιαδήποτε απορία μου.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές που συμμετείχαν στην τριμελή επιτροπή καθώς και το εργαστήριο της Ανόργανης Χημείας που με φιλοξένησε.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου για την ηθική τους υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 DNA</b> .....	<b>17</b>
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ DNA.....	17
1.2 ΤΡΟΠΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	18
1.3 ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΕΣ (ΜΗ ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΕΣ) ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΟΡΙΩΝ- DNA.....	19
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ</b> .....	<b>22</b>
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ (PDT).....	22
2.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	22
2.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ.....	23
2.4 In VIVO ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ.....	24
2.5 ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ.....	24
2.6 ΦΩΤΙΣΜΟΣ.....	27
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΧΑΛΚΟΣ(I)</b> .....	<b>28</b>
3.1 ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ.....	28
3.2 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΧΑΛΚΟ.....	30
3.3 ΦΩΤΟΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ (I).....	30
3.3.1 ΑΝΙΟΝΤΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ.....	31
3.3.2 ΚΑΤΙΟΝΤΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ.....	38
3.4 ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ <i>dipyrido[3,2-a:2'3'-c]phenazine</i> (– <i>dppz</i> .).....	43
3.5 ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ <i>1,2-Bis(diphenylphosphine)ethane</i> .....	44
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ/ ΥΛΙΚΑ/ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ</b> .....	<b>47</b>
4.1 ΥΛΙΚΑ/ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	47
4.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	47
4.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ CT- DNA.....	47
4.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	48
4.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	49
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ [Cu(2,2'-dis- COOEt<i>dppz</i>)<sub>2</sub>](BF<sub>4</sub>)</b> .....	<b>50</b>
5.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ: διαιθυλεστέρας της 2,9-δικαρβοξυ- διπυριδοσφαιναζίνης( <i>dppz</i> (COOEt) <sub>2</sub> ).....	50
5.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ [Cu(2,2'-bis-COOEt <i>dppz</i> ) <sub>2</sub> ](BF <sub>4</sub> ).....	52
5.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ (1).....	53
5.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ.....	54
5.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ (1).....	58
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΤΟΥ [Cu(2,2'-bis-COOEt<i>dppz</i>)<sub>2</sub>](BF<sub>4</sub>) ΚΑΙ ΤΟΥ [Cu(<i>dppz</i>)(<i>dppe</i>)](BF<sub>4</sub>) ΜΕ ΤΟ DNA</b> .....	<b>63</b>
6.1 ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ UV-vis.....	63
6.2 ΙΞΩΔΟΜΕΤΡΙΑ.....	69
6.3 ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΟΥ DNA- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	70
6.4 ΚΥΚΛΙΚΟΣ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΣ.....	73

6.5 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ.....	77
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ.....</b>	<b>79</b>
7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	79
7.2 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (1) ΚΑΙ (2) ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ PC- 3.....	79
7.3 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (1) ΚΑΙ (2) ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ U- 87MG.....	81
7.4 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (1) ΚΑΙ (2) ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ 3- T3.....	83

#### **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

#### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 Χαρακτηριστικά Φωτοευαίσθητοποιητών.....σελ.26
Πίνακας 3.1 Γενικά στοιχεία για το χαλκό Cu.....σελ.30
Πίνακας 3.2 Σύμπλοκα του Cu (I) με τις σταθερές τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.....σελ.32
Πίνακας 3.3 Φασματοσκοπικές ιδιότητες των αλογόνο- και ψευδαλογόνο- συμπλόκων του χαλκού.....σελ.33
Πίνακας 3.4 Φασματοσκοπικές ιδιότητες των υποκαταστατών για σύμπλοκα της μορφής $CuX_3^{2-}$ για ιοντική ισχύ 5 M.....σελ.33
Πίνακας 3.5 Κβαντική απόδοση των αλογόνο- και ψευδαλογόνο- συμπλόκων του Cu(I) σε διάφορες συγκεντρώσεις.....σελ.35
Πίνακας 3.6 Σταθερές ισορροπίας για τις διεγερμένες καταστάσεις καθώς και για τις θεμελιώδεις.....σελ.37
Πίνακας 3.7 Φασματοσκοπικά μεγέθη του $Cu(NH_3)^{3+}$ σε υδατικό διάλυμα και κβαντικές αποδόσεις για την φωτο-οξειδωση του σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης σε συγκέντρωση 1 M.....σελ.38
Πίνακας 5.1 Σύγκριση Πειραματικών και Βιβλιογραφικών Δεδομένων για τη2, 9 δικαρβοξυ-1,10 φαινανθρολίνη 5, 6 διόνη . ....σελ.54
Πίνακας 5.2 Σύγκριση Πειραματικών και Βιβλιογραφικών Δεδομένων για το 2,2(COOH) <sub>2</sub> -dppz.....σελ.56
Πίνακας 5.3 Πειραματικά Δεδομένα για το 2,2'(COOEt) <sub>2</sub> - dppz.....σελ.58
Πίνακας 5.4 Πειραματικά Δεδομένα για το Σύμπλοκο (1).....σελ.61
Πίνακας 7.1 Αποτελέσματα για την καρκινική σειρά PC-3.....σελ.80
Πίνακας 7.2 Αποτελέσματα για την καρκινική σειρά U-87MG.....σελ.82
Πίνακας 7.3 Αποτελέσματα για την καρκινική σειρά 3-T.....σελ.84

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 Οικογένειες Διαμορφώσεων του δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (DNA).....	17
Σχήμα 1.2 Αζωτούχες βάσεις του DNA.....	18
Σχήμα 1.3 Μόριο που παρεμβάλλεται στο DNA.....	19
Σχήμα 1.4 Δομή σπερμίνης.....	20
Σχήμα 1.5 Δομή νετροψίνης.....	20
Σχήμα 1.6 Δομή προφλαβίνης.....	21
Σχήμα 1.7 Κρυσταλλική δομή της νετροψίνης στη μικρή αύλακα του DNA.....	21
Σχήμα 2.1 Αρχή της PDT σχηματικά.....	23
Σχήμα 2.2 Φωτοευαισθητοποιητές πρώτης γενιάς.....	25
Σχήμα 2.3 Καρκίνος του δέρματος πριν (Α) και 6 μήνες μετά (Β) την εφαρμογή του m-THPC.....	26
Σχήμα 2.4 Το λέιζερ στην PDT.....	27
Σχήμα 3.1 Δομή ορισμένων χηλικών υποκαταστατών.....	29
Σχήμα 3.2 Ετεροληπτικά σύμπλοκα Cu(I) με αλογονοϊόντα και κυανιούχα.....	38
Σχήμα 3.3 Φάσμα απορρόφησης στο UV.....	39
Σχήμα 3.4 Φάσμα εκπομπής Cu(dmp) <sup>2+</sup> .....	40
Σχήμα 3.5 Ενεργειακό διάγραμμα σχηματισμού του 5-υποκατεστημένου συμπλόκου.....	41
Σχήμα 3.6 Δομή dprz.....	43
Σχήμα 3.7 Δομή φαινανζίνης.....	44
Σχήμα 3.8 Δομή dpre.....	44

Σχήμα 3.9 . Κρυσταλλική δομή ενός συμπλόκου με dprp.....	45
Σχήμα 4.1 Διάγραμμα Απορρόφησης Διαλύματος DNA.....	48
Σχήμα 5.1 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της 2, 9 δικαρβόξυ-1,10 φαινανθρολίνης 5, 6 διόνης.....	54
Σχήμα 5.2 Φάσμα IR του 2,2(COOH) <sub>2</sub> -dppz.....	55
Σχήμα 5.3 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ για το 2,2(COOH) <sub>2</sub> -dppz.....	56
Σχήμα 5.4 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ για το 2,2'(COOEt) <sub>2</sub> -dppz σε $\text{CDCl}_3$ .....	57
Σχήμα 5.5 Φάσμα IR για το σύμπλοκο <b>(1)</b> .....	59
Σχήμα 5.6 Φάσμα Απορρόφησης συμπλόκου <b>(1)</b> σε MeOH.....	59
Σχήμα 5.7 Φάσμα μάζας του συμπλόκου <b>(1)</b> .....	60
Σχήμα 5.8 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου <b>(1)</b> .....	61
Σχήμα 5.9 Φάσμα φθορισμού του συμπλόκου <b>(1)</b> σε MeOH.....	62
Σχήμα 6.1 Φάσμα τιτλοδότησης του συμπλόκου <b>(1)</b> - [complex] <sub>τελ</sub> = $2 \times 10^{-5}$ M, [DNA]= $0-30 \times 10^{-5}$ M.....	64
Σχήμα 6.2 Καμπύλη μεταβολής του λόγου [DNA]/(εα-εφ) σε συνάρτηση της συγκέντρωσης [DNA] για την κορυφή στα 384 nm ( $K_b=7.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) του συμπλόκου <b>(1)</b> .....	64
Σχήμα 6.3 Φάσμα μάζας συμπλόκου <b>(2)</b> .....	65
Σχήμα 6.4 Φάσμα φθορισμού συμπλόκου <b>(2)</b> .....	66
Σχήμα 6.5 Φάσμα τιτλοδότησης του Συμπλόκου <b>(2)</b> με [complex]= $2 \times 10^{-5}$ M και [DNA]= $0-30 \times 10^{-5}$ M.....	67
Σχήμα 6.6 Καμπύλη μεταβολής του λόγου [DNA]/(εα-εφ) σε συνάρτηση της συγκέντρωσης [DNA] για την κορυφή στα 377 nm.....	67
Σχήμα 6.7 Η μεταβολή του $L/L_0=(n/n_0)^{1/3}$ σε συνάρτηση του λόγου R μετά από 24h επώαση για το σύμπλοκο <b>(1)</b> .....	69
Σχήμα 6.8 Η μεταβολή του $L/L_0=(n/n_0)^{1/3}$ σε συνάρτηση του λόγου R μετά από 24h επώαση του συμπλόκου <b>(2)</b> .....	70
Σχήμα 6.9 Ηλεκτροφόρηση συμπλόκου <b>(1)</b> .....	71

Σχήμα 6.10 Ηλεκτροφόρηση συμπλόκου <b>(2)</b> .....	72
Σχήμα 6.11 Ηλεκτροφόρηση παρουσία αναστολέων για τα σύμπλοκα <b>(1)</b> , <b>(2)</b> .....	73
Σχήμα 6.12 Διάγραμμα κυκλικού διχρωσμού για το σύμπλοκο <b>(1)</b> .....	75
Σχήμα 6.13 Διάγραμμα κυκλικού διχρωσμού για το σύμπλοκο <b>(2)</b> .....	75
Σχήμα 6.14 Διάγραμμα κυκλικής βολταμετρίας για το σύμπλοκο <b>(2)</b> .....	76
Σχήμα 6.15 Φάσμα εκπομπής αιθιδίου-DNA παρουσία συμπλόκου <b>(1)</b> .....	77
Σχήμα 6.16 (α) Φάσμα εκπομπής αιθιδίου-DNA παρουσία συμπλόκου <b>(2)</b> .....	79
Σχήμα 6.16 (β) Διάγραμμα Stern-Volmer ( $\lambda_{\text{emission}} = 630 \text{ nm}$ ) διαλύματος DNA-βρωμίδιο του αιθιδίου κατά την προσθήκη συμπλόκου <b>(2)</b> .....	79
Σχήμα 7.1 Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο <b>(1)</b> στην σειρά PC-3.....	80
Σχήμα 7.2 Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο <b>(2)</b> στην σειρά PC-3.....	80
Σχήμα 7.3 Σιγμοειδής καμπύλη για το τυφλό (cis-platin) στην σειρά PC-3.....	81
Σχήμα 7.4 Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο <b>(1)</b> στην σειρά U-87MG.....	81
Σχήμα 7.5 Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο <b>(2)</b> στην σειρά U-87MG.....	82
Σχήμα 7.6 Σιγμοειδής καμπύλη τυφλού.....	82
Σχήμα 7.7 Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο <b>(1)</b> στην σειρά 3-T3.....	83
Σχήμα 7.8 Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο <b>(2)</b> στην σειρά 3-T3.....	83
Σχήμα 7.9 Σιγμοειδής καμπύλη για το τυφλό στην σειρά 3-T3.....	84

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη και η έρευνα των συμπλόκων ενώσεων με διάφορα μεταλλικά κέντρα άργησε αρκετά να αναπτυχθεί όσον αφορά τη φαρμακευτική τους δράση. Η επιστημονική κοινότητα ήταν δύσπιστη, θεωρώντας ότι μία σύμπλοκη ένωση θα ήταν μάλλον τοξική για τον οργανισμό. Ωστόσο, πολλά πειράματα έδειξαν ότι όταν ένα μέταλλο συμπλέκεται με έναν κατάλληλο οργανικό υποκαταστάτη έχει την ιδιότητα να λειτουργεί ως αντικαρκινικό και όχι μόνο. Το ίδιο το μέταλλο δίνει στον υποκαταστάτη συγκεκριμένες ιδιότητες που χωρίς την παρουσία του δεν θα υπήρχαν. Τέτοιες ιδιότητες είναι η καλύτερη διαλυτότητα, η επιθυμητή δομή κ.α. Στις μέρες μας έχουν συντεθεί και μελετηθεί πάρα πολλές τέτοιες ενώσεις δίδοντας αρκετά σημαντικά αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό ενθαρρύνει τους επιστήμονες να συνεχίσουν για να επιτύχουν τη βελτίωση των ιδιοτήτων αυτών των ενώσεων.

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

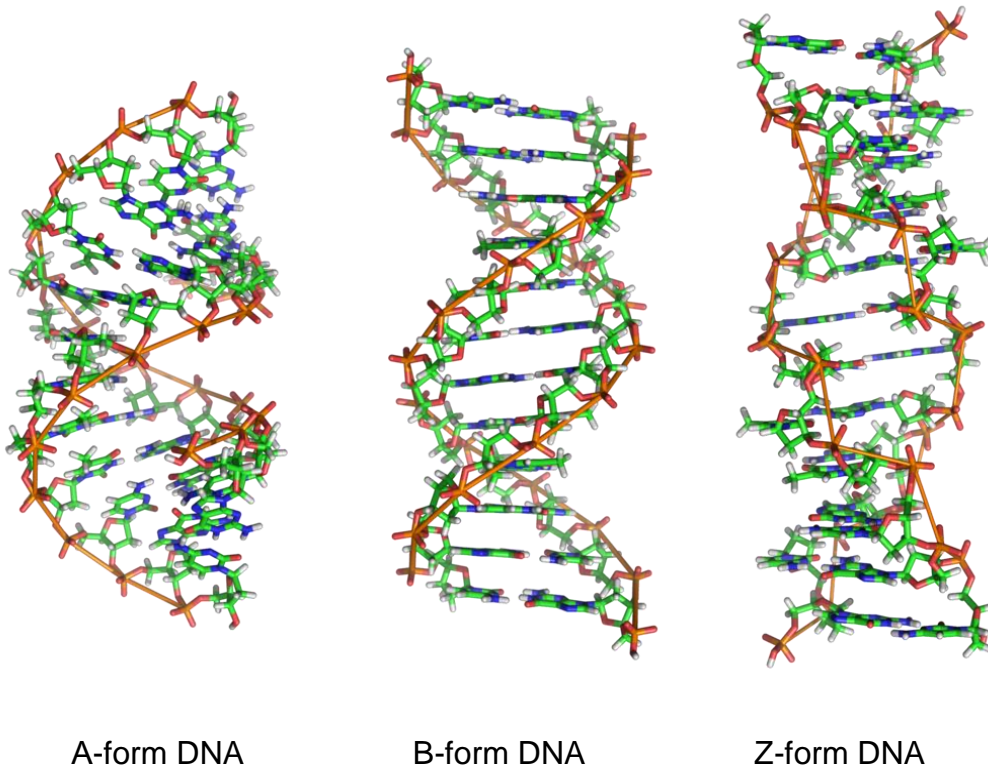


# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## DNA

### 1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ DNA

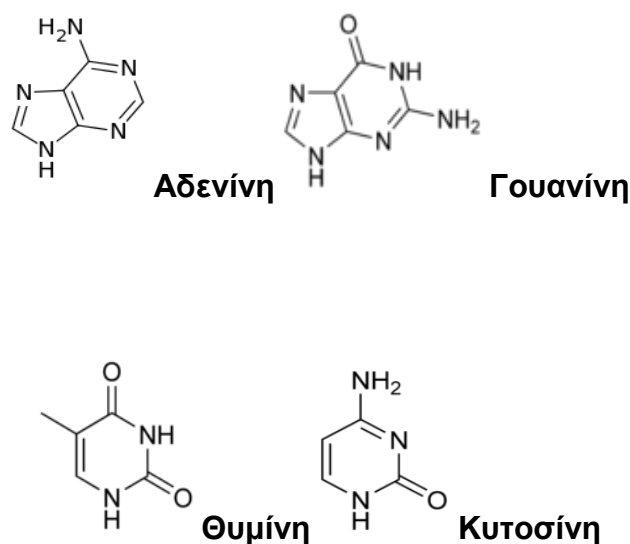
Ως γνωστόν, το DNA είναι ένα δίκλωνο μόριο το οποίο αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες οι οποίες είναι αντιπαράλληλες και συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου καθώς και μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Σε κανονικές συνθήκες και σε υδατικό διάλυμα, οι βάσεις βρίσκονται η μία πάνω στην άλλη κατά μήκος της αλυσίδας. Στη B-μορφή (**Σχήμα 1.1**) οι δύο συμπληρωματικές αλυσίδες πλησιάζουν ώστε να σχηματίσουν δεσμούς. Εσωτερικά των δύο αυτών αλυσίδων εμπεριέχονται οι συμπληρωματικές βάσεις.



**Σχήμα 1.1:** Οικογένειες Διαμορφώσεων του δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (DNA).

Οι πουρινικές βάσεις A (αδενίνη) και G (γουανίνη) μπορούν να σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με τις πυριμιδινικές βάσεις T (θυμίνη) και C (κυτοσίνη) αντίστοιχα δημιουργώντας τα ακόλουθα ζεύγη A-T και G-C (**Σχήμα 1.2**).

Το μόριο του DNA είναι ελικοειδώς περιστραμμένο σχηματίζοντας μία δεξιόστροφη διπλή έλικα διαμέτρου 20 Å με τις συμπληρωματικές βάσεις σε απόσταση 3,4 Å μεταξύ τους. Τον εξωτερικό μανδύα της έλικας σχηματίζουν η πεντόζη και ο φωσφο-διεστερικός δεσμός<sup>1,2</sup>.



**Σχήμα 1.2:** Αζωτούχες βάσεις του DNA

## 1.2 ΤΡΟΠΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Πολλά μικρά μόρια δύναται να προσδεθούν στο μόριο του DNA είτε αντιστρεπτά είτε μη αντιστρεπτά. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μορίων που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία πρόσδεσης είναι η αφλατοξίνη Β<sub>1</sub> και το βένζο(α)-πυρένιο που είναι καρκινογενείς ουσίες καθώς και το cis-platin, γνωστό αντικαρκινικό. Αντίθετα, στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα μόρια εκείνα που εμφανίζουν μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με το DNA<sup>3,4</sup>.

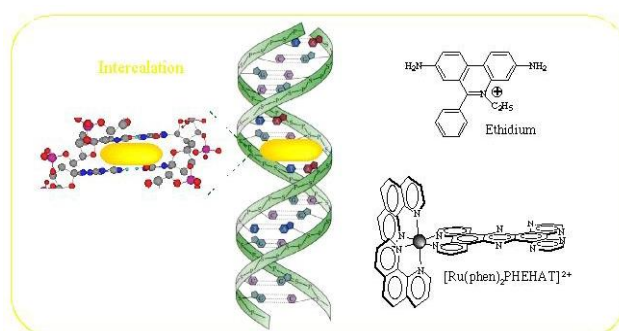
Στην τελευταία κατηγορία που προαναφέρθηκε συναντώνται πολλές σύμπλοκες ενώσεις οι οποίες αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων που θα αναφερθούν παρακάτω εκτενώς. Τα μεταλλικά κέντρα των στοιχείων μετάπτωσης αποτελούν σημαντικό κομμάτι των βιοανόργανων ερευνών καθώς ενώσεις τέτοιες εμφανίζουν ιδανικές γεωμετρίες

αλλά και ιδιαίτερες ηλεκτροχημικές και φωτοχημικές ιδιότητες. Το γεγονός αυτό σταθεροποιεί τη λειτουργικότητα του παράγοντα πρόσδεσης. Συγκεκριμένα τα  $d^8$  τετραεδρικά και τα  $d^6$  οκταεδρικά σύμπλοκα που είναι αδρανή εμφανίζουν τέτοιου είδους ιδιότητες <sup>3</sup>.

### 1.3 ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΕΣ (ΜΗ ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΕΣ) ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΟΡΙΩΝ- DNA

Υπάρχουν έξι αντιστρεπτοί τρόποι πρόσδεσης DNA-μορίων και είναι οι παρακάτω :

- (1) Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (έλξης) που λαμβάνουν χώρα μέσω του φωσφορικού άλατος του σακχάρου του βιομορίου.
- (2) Αλληλεπιδράσεις μέσω της μεγάλης αύλακας (major groove binding).
- (3) Αλληλεπιδράσεις μέσω της μικρής αύλακας (minor groove binding).
- (4) Παρεμβολή (intecalation) στα ζεύγη βάσεων μέσω της μεγάλης αύλακας (**Σχήμα 1.3**).
- (5) Παρεμβολή στα ζεύγη βάσεων μέσω μικρής αύλακας.
- (6) Παρεμβολή όχι παράλληλη στα ζεύγη βάσεων (threading) <sup>5-7</sup>.

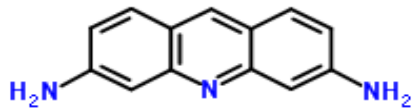


**Σχήμα: 1.3:** Μόριο που παρεμβάλλεται στο DNA

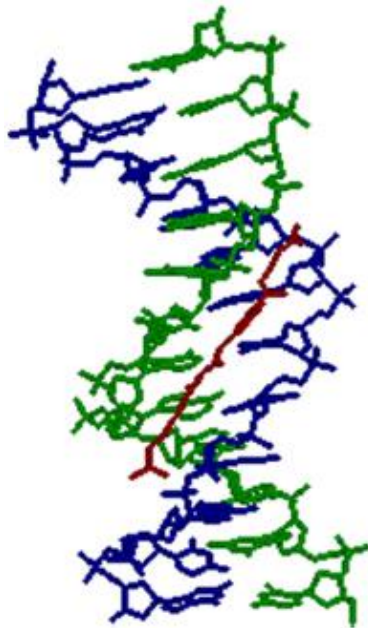
Όσον αφορά τις κατηγορίες (2) και (3), τέτοιου είδους «δεσμούς» συναντά κανείς συχνά στις πολυαμίνες. Αυτές κάτω από φυσιολογικές συνθήκες πρωτονιώνονται και αλληλεπιδρούν μέσω groove binding με το DNA. Σημαντικό ρόλο εδώ



της δίνεται στο **Σχήμα 1.6** και όπως παρατηρείται οι ενώσεις που συνήθως προκαλούν intercalation εμφανίζουν συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά όπως πολλούς αρωματικούς δακτυλίους (συνήθως ενωμένους ή fused) καθώς επίσης κάπου θα υπάρχει και κάποιο θετικό φορτίο <sup>10</sup>.



**Σχήμα 1.6:** Δομή της προφλαβίνης



**Σχήμα 1.7:** Κρυσταλλική δομή της νετροψίνης στη μικρή αύλακα του DNA

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

#### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ (PDT)

Η φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου (photodynamic therapy, PDT) ενδιαφέρει όλο και περισσότερο ως εναλλακτική θεραπεία. Η διαδικασία περιλαμβάνει δύο σχετικά απλές διαδικασίες, τη χορήγηση ενός φωτοευαίσθητου φαρμάκου και το φωτισμό του όγκου ώστε να επιτευχθεί ενεργοποίηση του φαρμάκου. Η αποτελεσματικότητα είναι μεγάλη στους μικρούς και επιφανειακούς όγκους και εκτός από τον παροδικό ερεθισμό του δέρματος ο ασθενής δεν εμφανίζει μακροχρόνιες παρενέργειες, εάν ακολουθηθεί το πρωτόκολλο. Με το πέρας της θεραπείας ο ασθενής μένει με λίγα ή καθόλου σημάδια και η διαδικασία δύναται να επαναληφθεί χωρίς να τίθεται θέμα τοξικότητας.

Αν σκεφτεί κανείς τα δύο προαναφερθέντα πολύ σημαντικά προτερήματα δηλαδή την αποτελεσματικότητα και την απουσία τοξικότητας, όπως επίσης και το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε περίπου εκατό χρόνια πριν, θα περίμενε ότι θα ήταν μία εδραιωμένη μέθοδος. Παρόλα αυτά η φωτοδυναμική θεραπεία πραγματοποιείται σε λίγα κέντρα, αν και τελευταία κερδίζει έδαφος ως εναλλακτική θεραπεία. Γενικά, έχει αποδειχθεί πως όταν η διεργασία αυτή εφαρμόζεται σωστά είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση του καρκίνου <sup>11</sup>.

#### 2.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

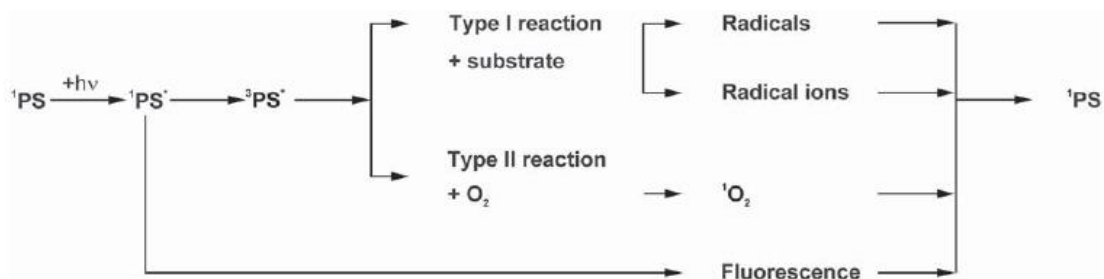
Η πρώτη κλινική αναφορά για τη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου περιγράφεται από τους Tarpeiner και Jesionek το 1903 <sup>12</sup> οι οποίοι εφάρμοσαν εοσίνη (ένα χρωμοφόρο) σε καρκινικά κύτταρα πριν από το φωτισμό. Αργότερα, οι ίδιοι όρισαν την PDT ως μία δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ φωτός, φωτοευαίσθητοποιητή και οξυγόνου που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του ιστού <sup>13</sup>. Το 1975 ο Dougherty και οι συνεργάτες <sup>14</sup> του ανέφεραν ένα παράγωγο της αιμοπορφυρίνης (HpD), το οποίο ακτινοβόλησαν με κόκκινο φως και κατάφεραν να εξαλείψουν καρκινώματα σε ποντίκια. Με την ίδια ουσία, ακολούθησαν κλινικές διαδικασίες σε ασθενείς προκειμένου να θεραπευτούν από δερματικά και κυστικά καρκινώματα <sup>15,16</sup>.

Λόγω των ανωτέρω θετικών ερευνών, ακολούθησαν και άλλες που περιελάμβαναν τόσο τη στοχοποίηση θεραπειών διαφορετικών ειδών καρκίνου όσο και τη χρήση διαφορετικών φωτοευαίσθητοποιητών. Οι φωτοευαίσθητοποιητές που

χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα είναι: (A) Photofrin (porfimersodium), (B) ALA (5-amino-levunilicacid), (B') methyl- esterofALA, (C) m-THPC (temoporfin, meso-tetra-hydroxy-phenyl-clorine).

### 2.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή και το φωτισμό του όγκου με κατάλληλη ακτινοβολία ώστε να ενεργοποιηθεί η ένωση-φάρμακο. Η ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή κατά την εκπομπή του φωτός μετατρέπει το φάρμακο με τον εξής τρόπο: η ένωση από τη θεμελιώδη κατάσταση ( $^1PS$ ) μεταβαίνει σε μία διεγερμένη κατάσταση, απλή (singlet) ( $^1PS^*$ ), όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.1**.



**Σχήμα 2.1:** Αρχή της PDT σχηματικά.

Από τη διεγερμένη αυτή κατάσταση, η ένωση μπορεί να αποδιεγερθεί κατευθείαν και να επιστρέψει στη θεμελιώδη κατάσταση εμφανίζοντας φθορισμό. Αυτό αποτελεί τη βασική ιδιότητα αφού οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως για φωτοανίχνευση. Ωστόσο, για να προκύψει θεραπευτική ιδιότητα απαιτείται το ηλεκτρόνιο του φωτοευαισθητοποιητή να υποστεί αντιστροφή του spin, μεταβαίνοντας στην τριπλή κατάσταση ( $^3PS^*$ ). Παρουσία οξυγόνου, το διεγερμένο μόριο δύναται να αντιδράσει απευθείας με το υπόστρωμα, με μεταφορά  $e^-$  ώστε να σχηματιστούν δραστικές ενώσεις ή ιόντα, τα οποία αλληλεπιδρούν με το ίδιο προς παραγωγή ενώσεων με οξυγόνο (αντίδραση τύπου I). Εναλλακτικά, η ενέργεια της διεγερμένης κατάστασης μπορεί να μεταφερθεί απευθείας στο οξυγόνο προς σχηματισμό του singlet oxygen (αντίδραση τύπου II). Η παραγόμενη αυτή ουσία είναι επικίνδυνη και καταστρεπτική για τους ιστούς <sup>17</sup>.

## 2.4 IN VIVO ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Η αποτελεσματικότητα της PDT στη θεραπεία του καρκίνου εξαρτάται από: (α) το είδος του φωτοευαισθητοποιητή (β) τη συγκέντρωση της ένωσης-φάρμακο (γ) το φωτισμό (δ) το κυτταρικό περιβάλλον (ε) τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Το singlet oxygen που παράγεται από τη φωτοχημική αντίδραση μπορεί απευθείας να προσβάλλει τον όγκο προκαλώντας την απόπτωση και νέκρωσή του. Επίσης καταστρέφει το αγγειακό σύστημα του όγκου καθώς και τα περιφερειακά υγιή αγγεία. Ουσιαστικά, οδηγεί σε έμμεση καταστροφή του όγκου μέσω εποξίας και έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Σε αντίθεση, η PDT αποτελεί την άνοσο-απάντηση αφού επιτίθεται στα καρκινικά κύτταρα που έχουν απομείνει. Η έκβαση της διαδικασίας εξαρτάται από όλους τους προαναφερθέντες παράγοντες <sup>18</sup>.

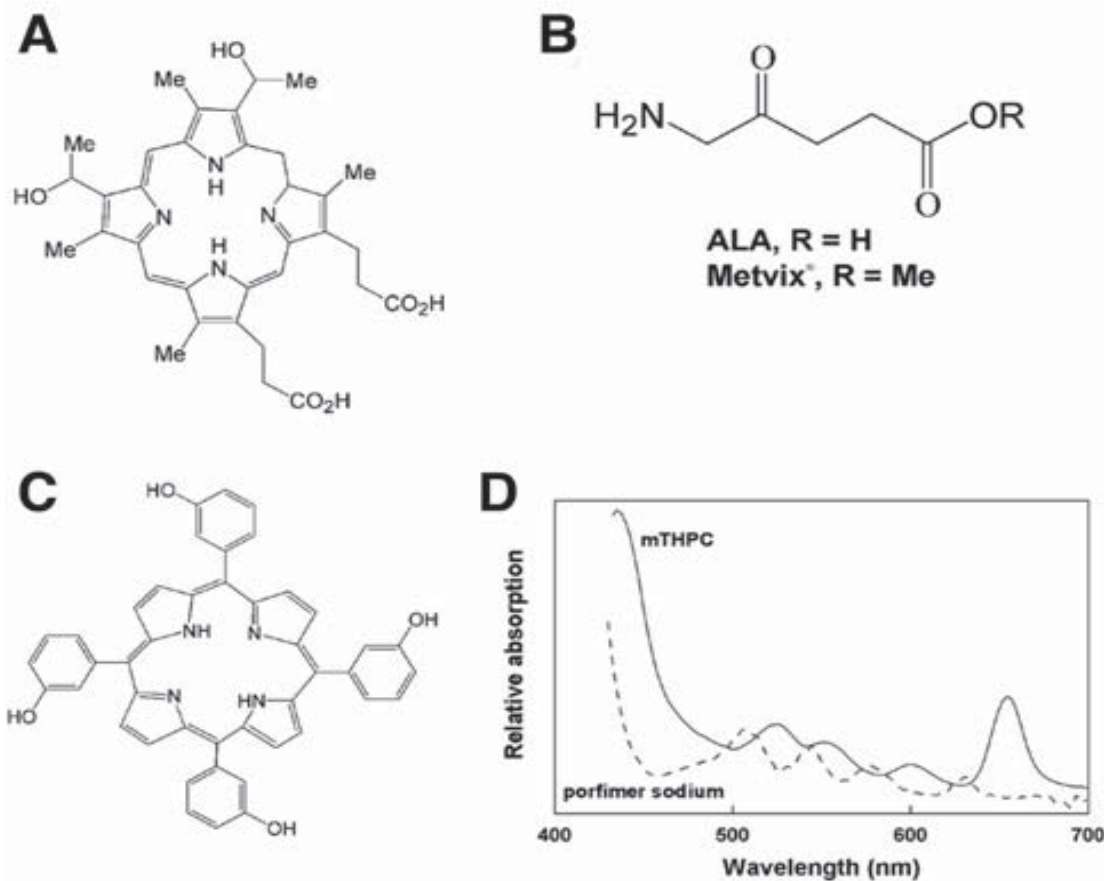
Το singlet oxygen είναι ιδιαίτερα δραστικό και μπορεί να διαχέεται λίγο (0,01-0,02 μm) στο σύντομο χρόνο ζωής που έχει. Αυτό το γεγονός απαιτεί την τοποθέτηση του φωτοευαισθητοποιητή πολύ κοντά στο στόχο του όταν έρθει η στιγμή του φωτισμού. Έχοντας συγκεκριμένο στόχο που πρέπει να “χτυπηθεί”, οι ερευνητές υπέθεσαν ότι η βέλτιστη καμπύλη θα προέκυπτε με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου δεν εξασφαλίζει την επιτυχία της φωτοδυναμικής θεραπείας <sup>19-21</sup>.

## 2.5 ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ

Ο ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής είναι μία καθαρή ουσία με προτίμηση την πρόσδεσή της στον όγκο προς άμεση εκκαθάρισή του και με την απορρόφηση να εμφανίζεται σε μήκος κύματος  $\lambda > 630 \text{ nm}$  <sup>11</sup>. Οι φωτοευαισθητοποιητές που θα παρουσιαστούν εμφανίζονται στο **Σχήμα 2.2**.

(A) Porfimer Sodium (μετά νατρίου άλας porfimer): Γενικά, έχει εμφανίσει προτίμηση όσον αφορά την πρόσδεσή του σε όγκους συνδυαζόμενο με κόκκινη ακτινοβολία. Η πρώτη σύγχρονη κλινική μελέτη έλαβε χώρα με αυτόν το φωτοευαισθητοποιητή κυρίως για περιπτώσεις δερματικών καρκινωμάτων <sup>22</sup>. Υπήρξε ο πρώτος εγκεκριμένος φωτοευαισθητοποιητής και ερευνάται αλλά και χρησιμοποιείται ακόμα. Ουσιαστικά, ο porfimer sodium αποτελείται από ένα μίγμα αιμοπορφυρινών με διάφορα μέγιστα απορρόφησης. Η μεγαλύτερη αυτών παρατηρείται στα 630 nm που είναι και το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση του φαρμάκου. Αυτό συμβαίνει γιατί σε μικρότερα μήκη κύματος λόγω της μεγαλύτερης ενέργειας είναι πιθανό να καταστραφούν περισσότερο οι υγιείς ιστοί. Λόγω της χαμηλής έντασης σε αυτό το μήκος κύματος απαιτούνται αρκετές παλμικές ακτινοβολήσεις ( $100-200 \text{ J/cm}^2$ ) <sup>11</sup>.





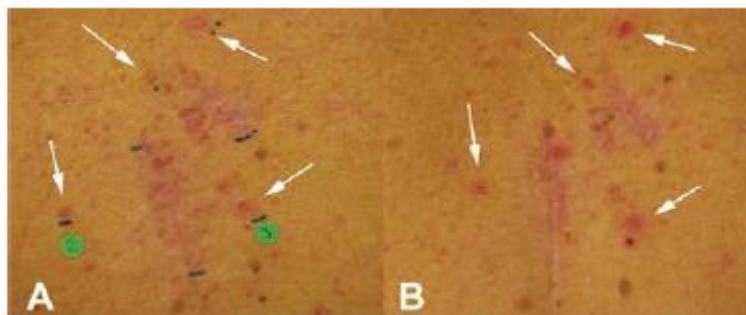
**Σχήμα 2.2:** Φωτοευαισθητοποιητές πρώτης γενιάς.

(B) ALA: Είναι φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς και σε αυτόν δόθηκε έγκριση το 1999, σχετικά με τη θεραπεία του καρκίνου. Αυτή η ένωση δεν εμφανίζει από μόνη της ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή αλλά αποτελεί βασικό πρόδρομο της αίμης. Έτσι, καταλήγει να μετατρέπεται σε πρωτοπορφυρίνη (IX) που έχει ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή μέσω χηλίωσης με τον σίδηρο. Το φάσμα απορρόφησης του ALA είναι παρόμοιο με αυτό του porfimer sodium, δηλαδή η ενεργοποίησή του γίνεται στα 630 nm. Τα πλεονεκτήματά του είναι σημαντικά, το βασικό είναι ότι ο δερματικός ιστός επανέρχεται μετά από δύο μέρες ενώ στον (A) γίνεται αυτό μετά από 4-12 εβδομάδες. Ακόμη, αν πρόκειται για θεραπεία δερματικών καρκινωμάτων μπορεί η ουσία να εφαρμοστεί τοπικά, ενώ αν πρόκειται για ίαση καρκίνου της στοματικής κοιλότητας χορηγείται από το στόμα. Έτσι, εμφανίζει εκλεκτικότητα. Το μειονέκτημά του είναι ότι παρουσιάζει μεγάλη υδροφιλικότητα και για αυτό δεν μπορεί να εισέλθει εύκολα μέσα στα κύτταρα. Αυτός είναι ο λόγος που παρασκευάστηκαν κάποιοι αλκυλ-εστέρες του ALA οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να εισέρχονται πιο εύκολα στα κύτταρα. Για το μεθυλεστέρα του ALA (B') δόθηκε έγκριση το 2001 <sup>11</sup>.

**Πίνακας 2.1:** Χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητών.

Photosensitizer	Porfimer sodium	ALA	mTHPC
Maximum absorption (nm)	630	635	652
Absorption coefficient ( $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{l}^{-1}$ )	1,170	5,000	22,400
Drug dose (mg/kg)	2	20% <sup>a</sup>	0.1–0.15
Drug–light interval (h)	48–72	3–6	96
Fluence ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	100–200	100	10–20
Fluence rate ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ )	100	100–150	100

(C) m- THPC: Είναι ο πιο πρόσφατα εγκεκριμένος φωτοευαισθητοποιητής για τον καρκίνο σε κεφάλι και σβέρκο. Έλαβε έγκριση το 2001, και είναι ο πιο ισχυρός από τους τρεις προηγούμενους που αναφέρθηκαν (**Σχήμα 2.3**). Απαιτεί φωτισμό μόνο 10-20  $\text{J}/\text{cm}^2$  και η ευαισθησία που προκαλεί στο δέρμα διαρκεί 2-4 εβδομάδες<sup>23–27</sup>. Έχει μέγιστη απορρόφηση στα 652 nm, δηλαδή σε μεγαλύτερο μήκος κύματος σε σχέση με τους άλλους φωτοευαισθητοποιητές (**Πίνακας 2.1**) πράγμα που σημαίνει πως μειώνεται ελαφρώς η διείσδυση στους ιστούς.



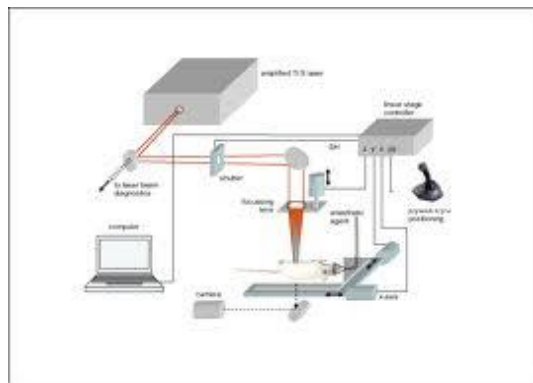
**Σχήμα 2.3:** Καρκίνος του δέρματος πριν (A) και 6 μήνες μετά (B) την εφαρμογή του m-THPC.

Οι φωτοευαισθητοποιητές καινούριας γενιάς αναζητούνται με γνώμονα κυρίως ένα χαρακτηριστικό, **να ενεργοποιούνται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος**. Αυτό θα ήταν θετικό γιατί έτσι οι καινούριες ενώσεις θα εμφανίζουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα αφού θα εμφανίζουν μικρότερη γενικευμένη φωτοευαισθησία. Κάποιοι τέτοιοι φωτοευαισθητοποιητές έχουν ήδη υπεισέλθει στην κλινική διαδικασία, ωστόσο λίγα αποτελέσματα είναι δημοσιευμένα (π.χ. SnET, Npe, BPD, Lu-Tex με μήκη κύματος 660, 664, 690, 732 nm αντίστοιχα.) <sup>11</sup>.

## 2.6 ΦΩΤΙΣΜΟΣ

Οι συμβατικές, ευρέου φάσματος πηγές φωτός, όπως για παράδειγμα οι λάμπες μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να ενεργοποιηθούν οι ενώσεις αυτές. Αυτές οι λάμπες είναι φτηνές και εύχρηστες. Το μειονέκτημα είναι πως δε μπορεί να μετρηθεί η απόδοσή τους. Επίσης, απαιτούνται φίλτρα προκειμένου να εμποδιστεί η UV ακτινοβολία που μπορεί να προκαλέσει αύξηση της θερμοκρασίας του φωτοευαισθητοποιητή.

Σημαντική ανακάλυψη για την PDT αποτέλεσε το λέιζερ που έχει την ιδιότητα να εκπέμπει φως σε ακριβή μήκη κύματος <sup>28</sup>. Τα πρώτα λέιζερ ήταν ακριβά, μεγάλα και δεν μετακινούνταν. Επίσης, απαιτούσαν ένα υψηλό επίπεδο τεχνικής υποστήριξης. Τώρα, η τεχνολογία τους έχει βελτιστοποιηθεί αφού είναι πιο ευκίνητα και φτηνότερα. Τα λέιζερ μπορούν να ακτινοβολούν σε μήκη κύματος από 350-1.100 nm (**Σχήμα 2.4**).



**Σχήμα 2.4:** Το λέιζερ στην PDT.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΧΑΛΚΟΣ (I)

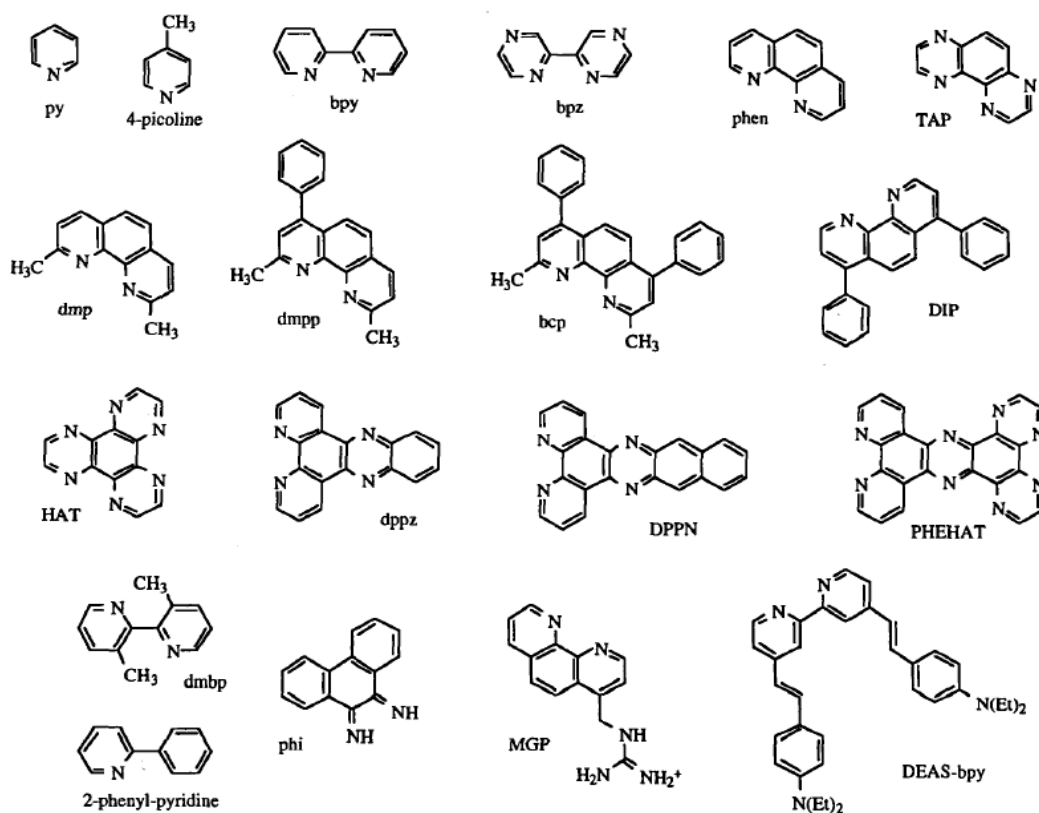
#### 3.1 ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

Για πολλά χρόνια στο επίκεντρο των ερευνών βρίσκονται τόσο οι αλληλεπιδράσεις, όσο και οι φώτο- αντιδράσεις διαφόρων μεταλλικών συμπλόκων, με διαφορετικές ιδιότητες <sup>29</sup>. Έντονα θετικά φορτισμένα σύμπλοκα, που παραμένουν σταθερά σε υδατικό περιβάλλον, αλληλεπιδρούν με το πολυανιόν του DNA και δίνουν σταθερές σύνδεσης που κυμαίνονται από  $1 \times 10^3$  έως  $6 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> <sup>30</sup>.

Τα άκαμπτα κορεσμένα σύμπλοκα διαθέτουν μια τρισδιάστατη δομή, που τα καθιστά πολύ ελκυστικά για τα νουκλεϊκά οξέα. Αυτά τα συγκροτήματα είναι σε θέση ν' αναγνωρίζουν ένα συμπληρωματικό σχήμα στις διάφορες θέσεις δέσμευσης του DNA, γεγονός που οδηγεί σε μια αυτό-συναρμολόγηση. Καθώς τα νουκλεϊκά οξέα είναι χειρικά, η χειρομορφία στο σχεδιασμό ενός συμπλόκου μπορεί να χρησιμοποιηθεί επωφελώς για να καταστεί η αλληλεπίδραση εναντιοεκλεκτική. Για παράδειγμα, το Δ-[Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> εναντιομερές προτιμάται με το B-DNA σε σχέση με το Λ-εναντιομερές <sup>31</sup>.

Με διαφοροποίηση του μεταλλικού κέντρου είναι δυνατόν να αλλάξει η γεωμετρία του συμπλόκου (επίπεδη τετραγωνική, τετραεδρική, οκταεδρική) και ακόμα και να τροποποιηθούν οι φωτοφυσικές ιδιότητες. Τροποποίηση στις φωτοχημικές ιδιότητες, καθώς επίσης και στην αλληλεπίδραση με τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να προκληθούν και με αλλαγές στους χηλικούς υποκαταστάτες <sup>32-34</sup> (**Σχήμα 3.1**).

Ορισμένα μεταλλικά σύμπλοκα που εμφανίζουν έντονες ταινίες απορρόφησης στο ορατό, είναι σε θέση να εμφανίζουν φωταύγεια σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μεταπτώσεις αυτές επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον που επικρατεί γύρω από το σύμπλοκο. Η σύνδεση με τη διπλή έλικα του DNA (χωρίς φωτο-αντίδραση), οδηγεί γενικά σε μια υποχρωμικότητα και αύξηση της φωταύγειας. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της αλληλεπίδρασης με πολυνουκλεοτίδια. Σημαντικό είναι ακόμα να αναφερθεί ότι τα σύμπλοκα των μετάλλων μετάπτωσης είναι καλύτερα οξειδωτικά και αναγωγικά όταν βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση από ότι όταν είναι στη θεμελιώδη.



**Σχήμα 3.1:** Δομή ορισμένων χηλικώνυποκαταστατών

Το σύνολο αυτών των ιδιοτήτων των μεταλλικών συμπλόκων τα καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμα τόσο στα πλαίσια της βιοχημείας του DNA, όσο και της βιοϊατρικής. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές φωταύγειας για το DNA αντί ραδιενεργών δεικτών [34]. Επίσης, όταν προκαλούν φωτοδιασπάσεις του σκελετού του DNA, μπορούν να εφαρμοστούν για πειράματα χαρτογράφησης και να θεωρηθούν ως τεχνητές ενδονουκλεάσες. Τέλος, μερικές από τις ενώσεις αυτές μπορεί να χρησιμοποιηθούν στη χημειοθεραπεία. Στη πραγματικότητα έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό σύμπλοκα του Pt (II)<sup>35,36</sup>, υπάρχει όμως ανάγκη για εύρεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων που είναι λιγότερο τοξικά από τις ενώσεις του Pt (II).

### 3.2 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΧΑΛΚΟ

Ο χαλκός είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 29 και ατομικό βάρος 63,546 g/mol. Συμβολίζεται ως «Cu» και ανήκει στον τομέα d του περιοδικού πίνακα, στην ενδέκατη ομάδα και στην τέταρτη περίοδο. Αυτά τα στοιχεία συνοψίζονται στον **Πίνακα 3.1**. Ο χαλκός έχει κυρίως δύο οξειδωτικές καταστάσεις, (+1) και (+2). Επίσης εμφανίζει δύο ισότοπα, τα εξής:  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ .

**Πίνακας 3.1:** Γενικά στοιχεία για το χαλκό

Στοιχείο	Χαλκός
Σύμβολο	Cu
Ατομικός Αριθμός	29
Ατομικό Βάρος	63,546 g/mol
Τομέας, Ομάδα, Περίοδος	d, 11, 4

Όσον αφορά το βιολογικό κομμάτι, ο χαλκός κατέχει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη βιοχημεία καθώς απαντάται στους οργανισμούς υπό μορφή μέταλλο-ενζύμων αλλά και ως συστατικό ενώσεων που έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με διάφορα βιομόρια. Πάρα πολλά ένζυμα, αρκετά από τα οποία περιλαμβάνουν στο ενεργό τους τμήμα διμεταλλικά σύμπλοκα του χαλκού διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στα βιολογικά συστήματα. Για τον προαναφερθέντα λόγο οι σύμπλοκες ενώσεις του μετάλλου αυτού έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον και έχουν μελετηθεί σε σημαντικό βαθμό αφού δύναται να λειτουργήσουν ως βιολογικά μοντέλα για διάφορους λόγους. Κάποιοι από αυτούς είναι 1. αντικαρκινικά φάρμακα 2. αντιμικροβιακοί παράγοντες 3. αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Κυρίως έχουν μελετηθεί σύμπλοκα του Cu(II), ενώ τα σύμπλοκα του Cu(I) περιλαμβάνουν κυρίως δομές που φέρουν αρωματικούς χηλικούς υποκαταστάτες και είναι σε θέση να σταθεροποιούν τη χαμηλή οξειδωτική κατάσταση του μεταλλικού ιόντος μέσα σε υδατικό διάλυμα<sup>37</sup>.

### 3.3 ΦΩΤΟΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ(I)

Τα σύμπλοκα του Cu (I) με υποκαταστάτες απλές ανόργανες ενώσεις όπως ανιόντα αλογόνων (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>) αλλά και αμμωνία (NH<sub>3</sub>) δεν εμφανίζουν δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας. Αυτό το γεγονός οδηγεί το μέταλλο αυτό στο να εμφανίζει φωτοχημεία με χαρακτήρα CTTS (charge transfer from complex to solvent). Η διέγερση συμπλόκων αυτού του τύπου σε υδατικά διαλύματα οδηγεί σε

απελευθέρωση ενός ενυδατωμένου ηλεκτρονίου ( $e^-$ ). Το ηλεκτρόνιο αυτό λαμβάνει μέρος σε διάφορες ανταγωνιστικές αντιδράσεις όπου το ίδιο είτε επιστρέφει πίσω στο μέταλλο είτε προσλαμβάνεται από κάποια άλλη ουσία που έχει την ικανότητα να το δεχτεί (ένωση scavenger). Ο μηχανισμός αυτός είναι αρκετά περίπλοκος και περιλαμβάνει το σχηματισμό και τη διάσπαση ενυδατωμένων ενδιάμεσων.

Παρόμοια φωτο-οξειδωτική συμπεριφορά εμφανίζουν και τα ανάλογα σύμπλοκα με υποκαταστάτες ψευδαλογόνα, όπως για παράδειγμα τα ιόντα κυανίου ( $CN^-$ ). Σε αυτήν την περίπτωση, αναφέρονται τόσο τα ομοληπτικά όσο και τα ετεροληπτικά σύμπλοκα του  $Cu(I)$  <sup>37</sup>.

Το πιο σημαντικό για όλα τα προαναφερθέντα είναι ότι οι ενώσεις αυτές έχουν την ιδιότητα, μέσω της φωτοχημείας τους, να εμφανίζουν ενδιάμεσα τα οποία κατά την αποδιέγερσή τους δίνουν ένα ηλεκτρόνιο κάθε φορά. Τέλος, θα εξεταστούν και σύμπλοκα του χαλκού με πολύ- πυριδίνες που εμφανίζουν ταινίες απορρόφησης MLCT (metal to ligand charge transfer). Στα τελευταία λαμβάνει χώρα σχηματισμός του exciplex (η ερμηνεία δίδεται παρακάτω) το οποίο είναι πολύ δραστικό <sup>37</sup>.

### 3.3.1 ΑΝΙΟΝΤΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ

Τα αρνητικά φορτισμένα σύμπλοκα του χαλκού (I) που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα ως προς τη φωτοχημεία τους περιλαμβάνουν ως υποκαταστάτες αλογόνα και ψευδαλογόνα. Σε απαερωμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει ανιόντα αλογόνου ο χαλκός βρίσκεται στις εξής μορφές:  $CuX_2^-$ ,  $CuX_3^{2-}$ ,  $CuX_4^{3-}$ . Οι μορφές αυτές βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους και οι σταθερές σχηματισμού των ενώσεων αυτών είναι σχετικά μικρές. Στον **Πίνακα 3.2** παρατίθενται αυτές οι σταθερές. Απαιτείται μεγάλη συγκέντρωση υποκαταστατών της τάξης του 0.1- 5 M προκειμένου να υπάρχουν σε ισορροπία οι μορφές αυτές. Παρόλο που τα σύμπλοκα του χαλκού με αλογόνα εμφανίζουν διαφορετικό φάσμα απορρόφησης το καθένα, ωστόσο όλα χαρακτηρίζονται από μία έντονη ταινία στα 273-281 nm. Τα σχετικά δεδομένα παρατίθενται στον **Πίνακα 3.3**. Επειδή τα ιόντα των αλογόνων δεν εμφανίζουν κενά δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας που απαιτούνται για MLCT μεταφορές, η φωτοχημεία των ενώσεων αυτών χαρακτηρίζεται από μεταφορές CTTS. Σύμφωνα με τη θεωρία του Mulliken, η ενέργεια των διεγερμένων καταστάσεων σε τέτοιου είδους μεταφορές καθορίζεται κυρίως από την ενέργεια ιοντισμού του μετάλλου και την ηλεκτρονιακή συγγένεια του δεσμικού τροχιακού του διαλύτη. Για αυτό το λόγο, σε υδατικά διαλύματα η απορρόφηση βρίσκεται σε στενό φάσμα μηκών κύματος (**Πίνακας 3.3**).

**Πίνακας 3.2:** Σύμπλοκα του Cu(I) με τις σταθερές τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Σύμπλοκο	K (M <sup>-1</sup> )	(M)
CuCl <sub>2</sub> <sup>-</sup>		5
3CuCl <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0,74±0,08	5
	1,05±0,15	3
	0,65±0,08	1,5
CuBr <sub>2</sub> <sup>-</sup>		5
CuBr <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	14,8±2,0	5
	10,8±2,0	5
	5,3±1,0	1
CuI <sub>2</sub> <sup>-</sup>		5
CuI <sub>3</sub> <sup>2-</sup>		5
CuI <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0,093±0,015	5
Cu(CN) <sub>2</sub> <sup>-</sup>		0
Cu(CN) <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	2,00±0,05*10 <sup>5</sup>	~0
Cu(CN) <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	32±15	~0

Η ενέργεια ενεργοποίησης μπορεί να εκτιμηθεί στα 290 kJ/mol για το μεταλλικό κέντρο <sup>38</sup>. Οι μοριακές απορροφητικότητες σε αυτές τις κορυφές αυξάνονται με τη σειρά Cl<sup>-</sup> < Br<sup>-</sup> < I<sup>-</sup>. Διαφαίνεται έτσι η άμεση εξάρτηση της μεταφοράς του e<sup>-</sup> από τον υποκαταστάτη. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές πολικότητες που εμφανίζουν τα ιόντα των αλογόνων. Σύμπλοκα με υποκαταστάτη τα κυανιούχα εμφανίζουν κάποιες ομοιότητες με τα προηγούμενα αν και οι απορροφήσεις τους είναι κυρίως χαρακτήρα MLCT. Αυτό συμβαίνει γιατί τα κυανιούχα είναι π-δέκτες <sup>39</sup>. Στον **Πίνακα 3.3** παρατίθενται οι φασματοσκοπικές παράμετροι που ανταποκρίνονται στις αντίστοιχες μεταφορές φορτίου. Οι ταινίες με τις χαμηλότερες ενέργειες εμφανίζονται σε μικρότερα μήκη κύματος σε σχέση με τα αντίστοιχα σύμπλοκα του χαλκού με αλογόνα. Αυτό αποδεικνύει ότι και σε αυτήν την περίπτωση ο υποκαταστάτης καθορίζει την ενέργεια μεταφοράς φορτίου.

Στα ουδέτερα διαλύματα, η διέγερση των CTTS καταστάσεων οδηγεί σε φωταύγεια σε όλα τα συστήματα χαλκού-αλογόνων υπό κατάλληλες συνθήκες (**Πίνακας 3.4**). Τα μήκη κύματος των εκπομπών βρίσκονται σε ένα στενό φάσμα γεγονός που δείχνει πως εδώ οι υποκαταστάτες παίζουν αμελητέο ρόλο. Οι μεγάλες διαφορές στους χρόνους ζωής υποδεικνύουν τη σειρά Br<sup>-</sup>>Cl<sup>-</sup>>I<sup>-</sup> και γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει ειδοποιός διαφορά σε σχέση με την προαναφερθείσα σειρά <sup>37</sup>.



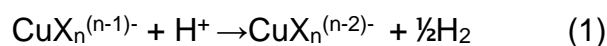
**Πίνακας 3.3:** Φασματοσκοπικές ιδιότητες των αλογόνο- και ψευδαλογόνο- συμπλόκων του Cu (I).

Σύμπλοκο	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$\tau^b$ (ns)	$\mu$ (M)
CuCl <sub>2</sub> <sup>-</sup>	233	943		1
	232	1060		3
		855		3
	231	1030		5
	274	186	670	1
		140		3
		16		3
		513	180	5
CuCl <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	230	1640		1
	231	1550		3
		1490		3
	230	1670		5
	276	3720	26	1
	274	3980		3
		3340		3
		4920	19	5
CuBr <sub>2</sub> <sup>-</sup>	271	1070		1
	275	1760		5
CuBr <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	281	9260		1
	277	8640	8,2	5
CuI <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	274	17000	4,3	5
Cu(CN) <sub>2</sub> <sup>-</sup>	244	5250	18	~0
	263	1670	42	~0
Cu(CN) <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	222	4940	12	~0
	250	1970	52	~0

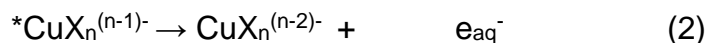
**Πίνακας 3.4:** Φασματοσκοπικές ιδιότητες των υποκαταστατών για σύμπλοκα της μορφής CuX<sub>3</sub><sup>2-</sup> για ιοντική ισχύ 5 M.

Υποκαταστάτης	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	$\tau$ (ns)	$K_H$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
Cl <sup>-</sup>	275	475	105	$5,8 \pm 10^8$
Br <sup>-</sup>	279	465	710	$6,2 \pm 10^8$
I <sup>-</sup>	284	493	14,3	$7,8 \pm 10^9$

Η συνεχής ακτινοβολία των χλώρο- και βρώμο - ενώσεων του χαλκού (I) με  $\lambda_{ir} > 313$  nm σε απαερωμένα όξινα διαλύματα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αέριου υδρογόνου με ταυτόχρονη οξειδωση του μεταλλικού κέντρου, σύμφωνα με την αντίδραση (1) <sup>40,41</sup>.



Το πρώτο βήμα για αυτή τη φωτοχημική διαδικασία είναι η “αποβολή” του ηλεκτρονίου από το διεγερμένο σύμπλοκο, σύμφωνα με την αντίδραση (2) <sup>42-44</sup>.



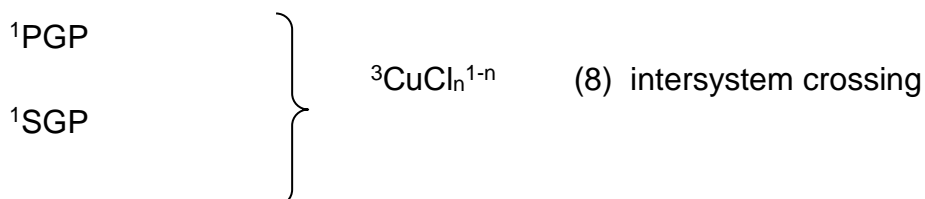
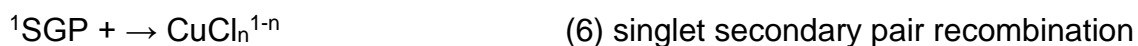
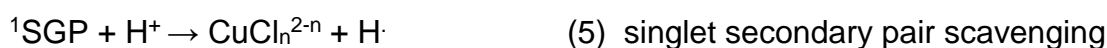
Γνωρίζοντας το ποσοστό της ακτινοβολίας που απορροφάται από τα διαφορετικά είδη των ενώσεων στο σύστημα και έχοντας κατά νου τη φωτοδραστικότητα και τον αριθμό σύνταξης της κάθε ένωσης, μπορεί να καθοριστεί η κβαντική απόδοση. Τέτοιοι υπολογισμοί απαιτούν τη γνώση των σταθερών ισορροπίας καθώς και κάθε γραμμομοριακή απορροφητικότητα στο μήκος κύματος που ακτινοβολούμε <sup>45</sup>. Η κβαντική απόδοση για τη φωτό-οξειδωση των συμπλόκων του χαλκού (I) με αλογόνα και ψευδαλογόνα φαίνεται στον **Πίνακα 3.5**. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η κβαντική απόδοση είναι σημαντικά μεγαλύτερη στα σύμπλοκα δις- σε σχέση με τα τρις- υποκατεστημένα. Η τάση της κβαντικής απόδοσης σε σχέση με την παραγωγή υδρογόνου ερμηνεύεται με το φαινόμενο των θερμικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν το σχηματισμό ενδιάμεσων υδριδίων (αντιδράσεις 12-14, παρατίθενται παρακάτω). Το ηλεκτρόνιο που αποσπάστηκε στην αντίδραση (2), σε όξινο διάλυμα δεσμεύεται από το υδρογονοκατιόν ( $\text{H}^+$ ) δίνοντας μία ρίζα υδρογόνου ( $\text{H}^\cdot$ ). Από τη στιγμή που το υδρογονοκατιόν είναι σε θέση να αντιδράσει με τη διεγερμένη κατάσταση, ο μηχανισμός που προτίνεται περιλαμβάνει τόσο την απλή όσο και την τριπλή κατάσταση, οδηγώντας έτσι σε σχηματισμό αυτής της ρίζας <sup>46</sup>.



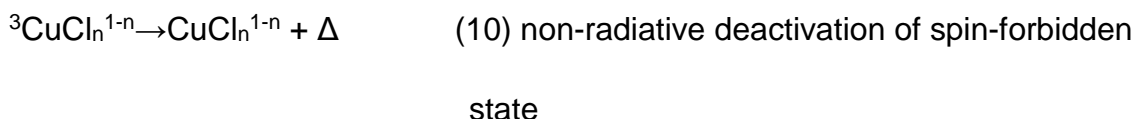
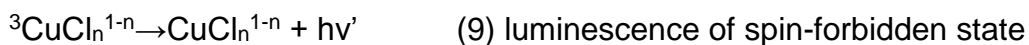
**Πίνακας 3.5:** Κβαντική απόδοση των αλογόνο- και ψευδαλογόνο- συμπλόκων του Cu (I) σε διάφορες συγκεντρώσεις

Σύμπλοκο	$\lambda_{exc}(nm)$	$\Phi_H$	$\Phi_N$	$\Phi_e$	$\mu (M)$	
CuCl <sub>2</sub> <sup>-</sup>	254	0,60			3	
	265	0,65			5	
	266				~0,7	1
	274	0,81			5	
		>0,51			5	
	296	0,74			5	
CuCl <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	254	0,29			3	
	265	0,09			5	
	274	0,07			5	
		0,12			5	
	296	0,14	5			
CuBr <sub>2</sub> <sup>-</sup>	266		0,67	1		
CuBr <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	266		0,34	1		
CuI <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	308		0,28	1		
			0,23	5		
Cu(CN) <sub>2</sub> <sup>-</sup>	254		0,31		~0	
			0,35		5	
			266		0,37	5
Cu(CN) <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	254		0,03		~0	
Cu(CN) <sub>2</sub> Cl <sup>2-</sup>	254		0,18		5	
	266		0,21		5	

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα, έχει βρεθεί ότι ο χρόνος ζωής του PGP στις ενώσεις του χαλκού (I) με κυάνιο είναι περίπου  $4 \times 10^{-11}$  s<sup>39</sup>. Αντίστοιχες τιμές αναμένονται και για τα σύμπλοκα Cu (I) με αλογόνα.



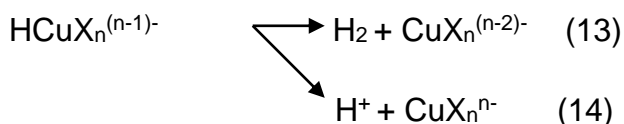
Η αντίδραση (5) είναι ανταγωνιστική της (6). Στο εύρος των συγκεντρώσεων, για το υδρογονοκατιόν, από 0.01- 1 M, η κβαντική απόδοση για το σχηματισμό του υδρογόνου βρέθηκε να είναι γραμμική συνάρτηση της  $[H^+]^{1/2}$ . Η συνάρτηση αυτή φτάνει στο μέγιστο πάνω από την τιμή 1 M γεγονός που οφείλεται στην απόσβεση των ηλεκτρονίων που διαφεύγουν της αρχικής αναδιαμόρφωσης <sup>42,47,48</sup>.



Ωστόσο, και η συνάρτηση  $1/\Phi \sim 1/[H^+]$  βρέθηκε γραμμική για αυτό το σύστημα, γεγονός που αποδεικνύει ότι λαμβάνει χώρα η αντίδραση των  $H^+$  με ένα σταθερό ενδιάμεσο προς παραγωγή διυδρογόνου <sup>47,49</sup>. Πιθανά ενδιάμεσα μπορεί να είναι κάποια σύμπλοκα της μορφής  $HCuX_2^-$  ή  $HCuX_3^{2-}$ , τα οποία δύνανται να σχηματιστούν σύμφωνα με την αντίδραση (12).

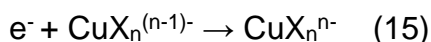


Η διάσπαση αυτών των σταθερών ενδιάμεσων οδηγεί στο σχηματισμό  $H_2$  δίνοντας διάφορες ενώσεις του χαλκού (0) με μεγαλύτερο χρόνο ζωής <sup>47,50-52</sup>.



Έχει παρατηρηθεί ότι ο σχηματισμός του  $[CuX_n]^{n-}$  μειώνεται με αύξηση της συγκέντρωσης των υδρογονοκατιόντων <sup>52</sup>. Αυξάνοντας την ιοντική ισχύ στα σύμπλοκα του χαλκού με το βρώμιο, παρατηρείται μείωση της κβαντικής απόδοσης για το σχηματισμό του σταθερού ενδιάμεσου <sup>47</sup>. Αυτό φυσικά εξηγεί το γεγονός ότι με μεγαλύτερη συγκέντρωση ιοντικού ενδιάμεσου, οδηγείται το σύστημα σε μείωση της ολικής κβαντικής απόδοσης όσον αφορά την παραγωγή του  $H_2$  σε χλώρο- και

βρώμο- όξινα διαλύματα. Όταν στο σύστημα δεν προστίθεται (ή δεν υπάρχει) κάποιος scavenger\*, με αύξηση της συγκέντρωσης του χαλκού (I) μειώνεται ο χρόνος ζωής του ενυδατωμένου ηλεκτρονίου που σχηματίζεται κατά την αρχική φωτοαντίδραση. Αυτό αποτελεί ουσιαστικά, συνέπεια της διμοριακής απόσβεσης από τις ενώσεις του χαλκού (I) που βρίσκονται στη θεμελιώδη κατάσταση.

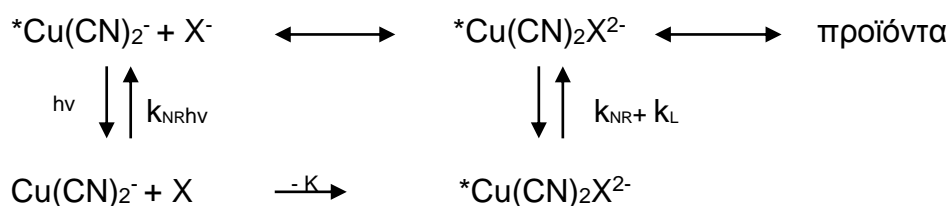


Παρά το γεγονός ότι τα σύμπλοκα του χαλκού (I) με αλογόνα και ψευδαλογόνα διεγείρονται μόνο στο UV, κάποια πειράματα που έλαβαν χώρα έδειξαν την καταλυτική δράση των ενώσεων και συγκεκριμένα μέσω των αντιδράσεων οξειδωσής τους. Μελετήθηκε η φωτο-οξειδωση του συμπλόκου του χαλκού(I) με βρώμιο στη κατάλυση προς παραγωγή διυδρογόνου. Προς ανάκτηση του βρωμιούχου χαλκού εφαρμόστηκε θερμική διάσπαση του διβρωμιούχου χαλκού σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 243 °C. Αυτό απαιτεί εξάτμιση του φωτολυτικού διαλύματος, με αποτέλεσμα όλη η διαδικασία να μην ευνοείται ενεργειακά <sup>37</sup>.

Όσον αφορά τα ετεροληπτικά σύμπλοκα του χαλκού με αλογόνα και κυανιούχα, αυτό που συμβαίνει είναι ότι το  $Cu(CN)_3^{2-}$  έχει μεγάλη σταθερά σχηματισμού. Το γεγονός αυτό δίνει τη δυνατότητα να φτιαχτούν διάφορα ετεροληπτικά σύμπλοκα του μετάλλου αυτού. Οι σταθερές σχηματισμού ανά βήμα αυτής της οικογένειας ενώσεων, είναι παρόμοιες με αυτές των αντίστοιχων τρις-υποκατεστημένων ενώσεων του χαλκού με αλογόνα. Οι εκπομπές των διεγερμένων καταστάσεων που εμφανίζουν τα σύμπλοκα αυτά διαφέρουν αρκετά από τις αντίστοιχες του  $*Cu(CN)_2^-$  και εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά, όσον αφορά τη φωταύγειά τους, με τις ομοληπτικές ενώσεις. Η εξάρτηση του χρόνου ζωής της φωταύγειας και της κβαντικής απόδοσής τους από τη συγκέντρωση των αλογόνων έδειξε ότι αυτές οι διεγερμένες καταστάσεις μπορούν να θεωρηθούν ως “exciplexes”, γιατί οι σταθερές σχηματισμού τους από ένα διεγερμένο σύμπλοκο  $Cu(CN)_2^-$  και ένα διεγερμένο ιόν αλογόνου (\*K) είναι τουλάχιστον μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές της θεμελιώδους κατάστασης στην ισορροπία (Πίνακας 3.6, Σχήμα 3.2).

. Πίνακας 3.6: Σταθερές ισορροπίας για τις διεγερμένες καταστάσεις καθώς και για τις θεμελιώδεις.

X <sup>-</sup>	K (M <sup>-1</sup> )	*K (M <sup>-1</sup> )
Cl <sup>-</sup>	0,70±0,12	11±3
Br <sup>-</sup>	2,5±0,6	27±4
I <sup>-</sup>	16±4	430±40



**Σχήμα 3.2** Ετεροληπτικά σύμπλοκα Cu (I) με αλογόνα και κυανιούχα

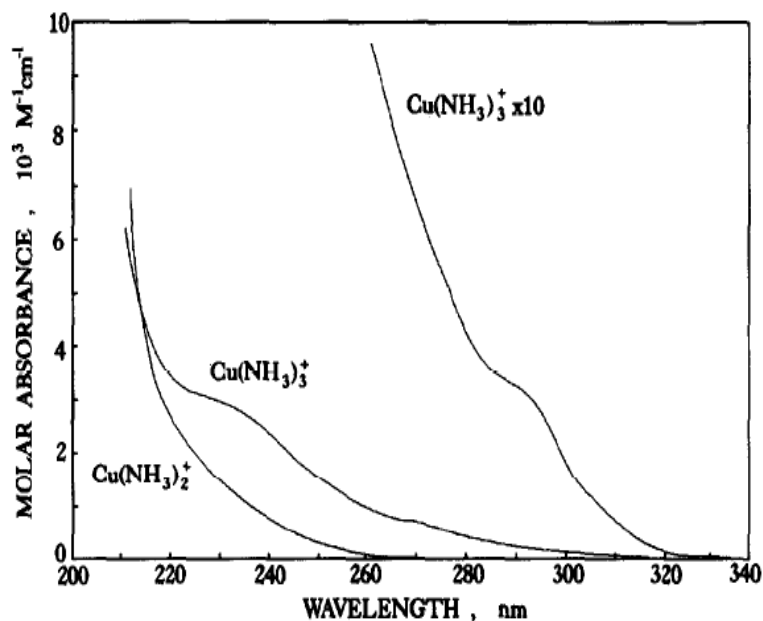
### 3.3.2 ΚΑΤΙΟΝΤΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ

Εδώ θα παρουσιαστούν σύμπλοκα με υποκαταστάτες αμίνες και ιμίνες. Όσον αφορά τις πρώτες, εμφανίζουν συμπληρωμένα τα τροχιακά χαμηλής ενέργειας. Σε αυτήν την περίπτωση, οι φωτοχημικές ιδιότητες καθορίζονται από d-d μεταπτώσεις του ηλεκτρονίου καθώς και CTTS μεταπτώσεις. Διαφαίνεται επίσης ότι εμφανίζουν κοινές ιδιότητες στη φωτοχημεία τους με τις ενώσεις χαλκού-αλογόνων. Τέλος, σύμπλοκα του χαλκού με αμίνες που εμφανίζουν μη συμπληρωμένα τροχιακά χαμηλής ενέργειας χαρακτηρίζονται από MLCT (metal to ligand charge transfer) μεταπτώσεις<sup>37</sup>.

Στα σύμπλοκα του χαλκού (I) με αμίνες, η πιο απλή ένωση που θα μπορούσε να δοθεί ως παράδειγμα είναι η σύμπλεξη του μετάλλου με αμμωνία ως υποκαταστάτη. Σε υδατικό διάλυμα οι ενώσεις  $Cu(NH_3)_2^+$  και  $Cu(NH_3)_3^+$  βρίσκονται σε ισορροπία<sup>53,54</sup>. Η σταθερά για αυτήν την ισορροπία είναι  $0,04-0,05 M^{-1}$  όταν η ιοντική ισχύς είναι 0-1 M. Το διάμμινο-σύμπλοκο εμφανίζει ένα σχετικά απλό φάσμα απορρόφησης στο UV ενώ από την άλλη το τριάμμινο-σύμπλοκο εμφανίζει το λιγότερο τρεις ταινίες με σημαντικά διαφορετικές κορυφές<sup>54</sup> (**Σχήμα 3.3, Πίνακας 3.7**).

**Πίνακας 3.7:** Φασματοσκοπικά μεγέθη του  $Cu(NH_3)_3^+$  σε υδατικό διάλυμα και κβαντικές αποδόσεις για την φωτο-οξειδωση του σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης σε συγκέντρωση 1M.

$\lambda_{max}(nm)$	$\epsilon_{max}(M^{-1}cm^{-1})$	F	$\lambda_{ir}(nm)$	$\Phi_{H2}$
			313	0.39
295	170	0.0018	297	0.56
270	330	0.0043	274	0.46
			266	0.49
229	2880	0.051	246	0.39



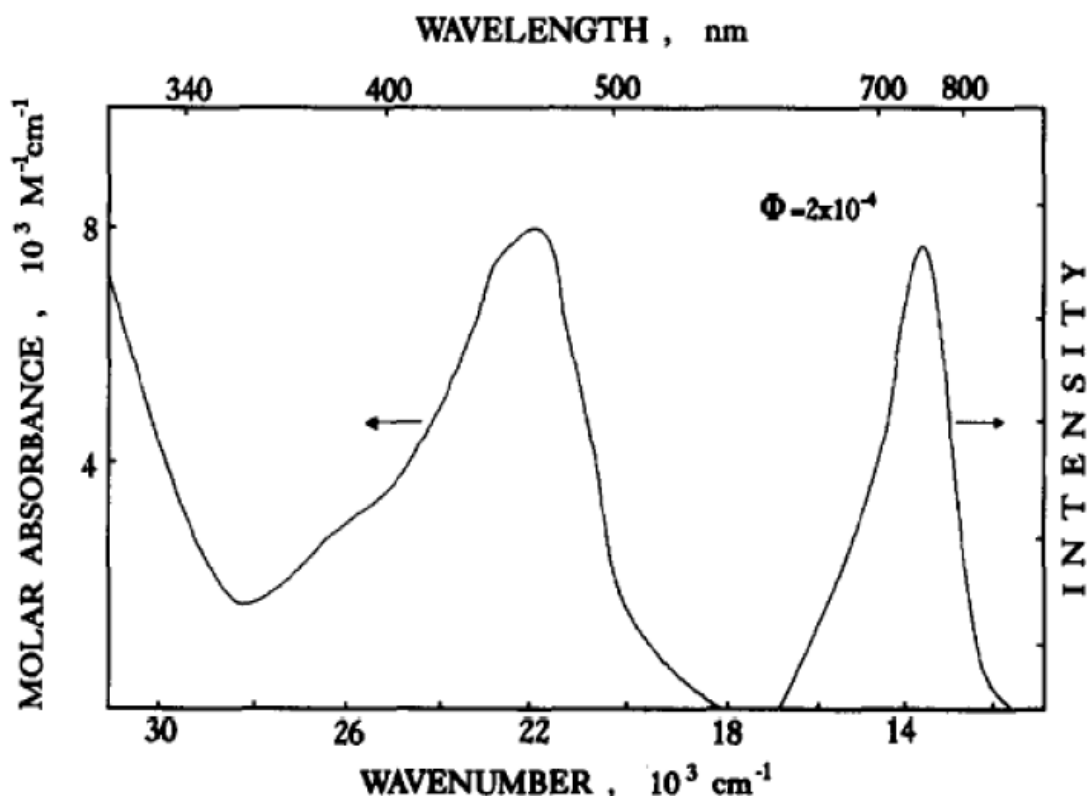
Σχήμα 3.3: Φάσμα απορρόφησης στο UV.

Οι διεγέρσεις αυτών των μεταπτώσεων οδηγούν στο σχηματισμό ενός ενυδατωμένου ηλεκτρονίου το οποίο μπορεί να δεσμευτεί επιτυχώς από το  $N_2O$  αλλά και από το  $NH_4^+$  <sup>53,55</sup>. Από αυτήν τη διαδικασία παράγεται υδρογόνο όπως φαίνεται στην αντίδραση (16).



Σε μήκη κύματος από 240- 320 nm μόνο η τριάμμινο-ένωση του χαλκού (I) αποδείχτηκε φωτοχημικά ενεργή και οι κβαντικές αποδόσεις επιβεβαιώνουν ότι οι ταινίες απορρόφησης έχουν χαρακτήρα CTTS (Πίνακας 3.7)

Ενδιαφέρον εμφανίζουν και τα πολυπυριδινικά-σύμπλοκα του χαλκού (I) ως προς τη φωτοχημεία τους. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν ισχυρές κορυφές στο ορατό που οφείλονται σε MLCT (metal to ligand charge transfer) μεταπτώσεις. Ένα ηλεκτρόνιο μεταβαίνει από ένα d-τροχιακό του μετάλλου σε ένα χαμηλό π\* τροχιακό του υποκαταστάτη <sup>56-61</sup>. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, το φάσμα απορρόφησης των συμπλόκων της μορφής  $Cu(NN)_2^+$  εμφανίζει ταινίες για τις οποίες όμως υπεισέρχονται αμφιβολίες για την απόδοσή τους. Οι αμφιβολίες αυτές προκύπτουν λόγω των συμμετριών των θεμελιωδών καταστάσεων <sup>62</sup>.

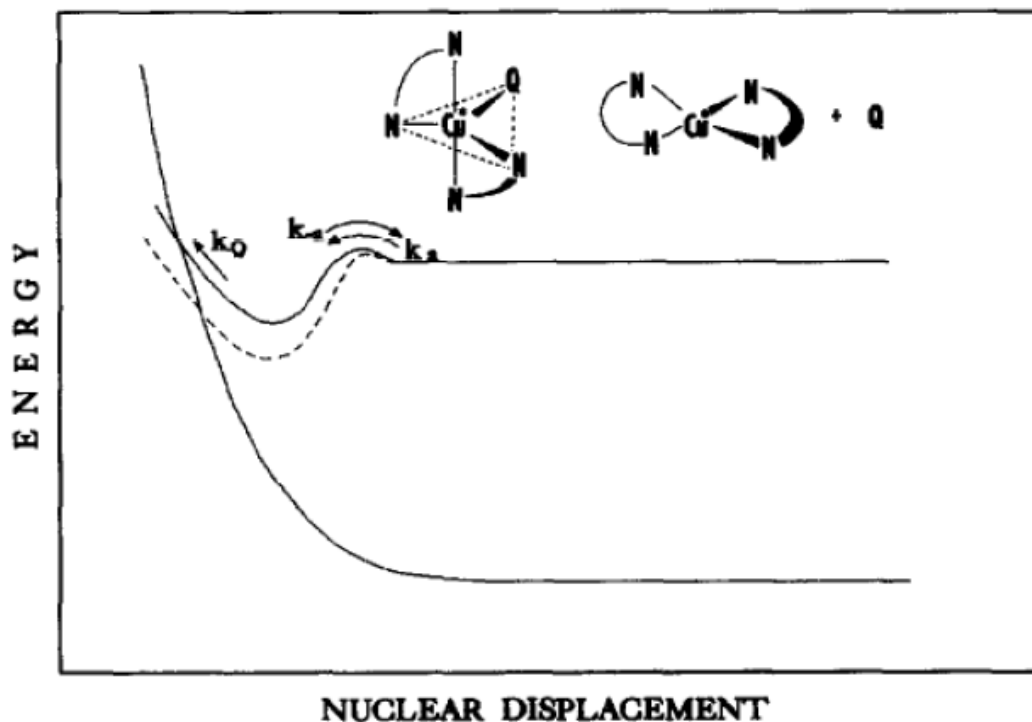


**Σχήμα 3.4:** Φάσμα εκπομπής  $\text{Cu}(\text{dmp})^{2+}$ .

Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες τα σύμπλοκα της μορφής  $\text{Cu}(\text{NN})^{2+}$ , εμφανίζουν χαρακτηριστικές ταινίες εκπομπής. Για παράδειγμα το  $\text{Cu}(\text{dmp})^{2+}$  (όπου  $\text{dmp} = 2, 9$  διμέθυλ-1,10-φαινανθολίνη) εμφανίζει φωτοφωταύγεια σε διχλωρομεθάνιο, σε θερμοκρασία δωματίου με  $\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ nm}$ ,  $\tau = 54 \text{ ns}$ ,  $\Phi = 2 \times 10^{-4}$  για συγκέντρωση περίπου  $3 \times 10^{-5}$  <sup>63</sup> (**Σχήμα 3.4**). Αυτή η εκπομπή οφείλεται σε MLCT διεγερμένη κατάσταση και δύναται να αποσβέννει από τα παράγωγα του νιτροβενζολίου μέσω σχηματισμού ενδιάμεσων συμπλόκων χωρίς μεταφορά ηλεκτρονίου. Τα αντίθετα ιόντα του διαλύματος επίσης εμφάνισαν φαινόμενα δέσμευσης και απόσβεσης (quenching), έτσι η επιδιάλυψη αύξησε το χρόνο ζωής της φωταύγειας <sup>64</sup>. Η ερμηνεία αυτού του φαινομένου σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό του exciplex (ερμ. Ένα σύμπλοκο που αποτελεί ενδιάμεση κατάσταση και δημιουργείται συχνά κατά την απόσβεση, είναι μια μέση κατάσταση της διεγερμένης κατάστασης και της θεμελιώδους, η πιο σημαντική ιδιότητά του είναι ο φθορισμός που εμφανίζει, που σχεδόν πάντα εμφανίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το φθορισμό της διεγερμένης κατάστασης) που προκύπτει από ένα ζευγάρι ιόντων στη θεμελιώδη τους κατάσταση. Η σειρά απόσβεσης που κατέχουν τα ιόντα ακολουθεί τη σειρά της δοτικής τους ισχύος. Αρκετοί διαλύτες που είναι επίσης βάσεις κατά Lewis, λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο ξεκινώντας από τον ασθενή δότη (π.χ. ακετονιτρίλιο) φτάνοντας στον ισχυρό δότη (π.χ. DMF). Έτσι, ανιχνεύεται εκπομπή (αμελητέα ή μη) στο ακετονιτρίλιο, στην αιθανόλη και στο νερό. Ο χρόνος ζωής της φωταύγειας του  $^*\text{Cu}(\text{dmp})^{2+}$  στο ακετονιτρίλιο μετρήθηκε  $2 \pm 0,3 \text{ ns}$  <sup>65</sup>. Στο διχλωρομεθάνιο οι αντιδράσεις απόσβεσης, είχε



προταθεί, ότι λαμβάνουν χώρα μέσω σχηματισμού 5- υποκατεστημένων συμπλόκων με δημιουργία ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του μεταλλικού κέντρου και της βάσης κατά Lewis <sup>63</sup> (Σχήμα 3.5) .



**Σχήμα 3.5:** Ενεργειακό διάγραμμα σχηματισμού του 5-υποκατεστημένου συμπλόκου.

Απόσβεση, μπορεί να γίνει σε παρόμοιες ενώσεις και με μεταφορά ηλεκτρονίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου συμπλόκου είναι το  $\text{Cu}(\text{dpp})^{2+}$  (όπου  $\text{dpp} = 2, 9$  diphenyl-1,10 phenanthroline) το οποίο σε διχλωρομεθάνιο μπορεί αποτελεσματικά να αποσβέννεται από κάποια σύμπλοκα του χρωμίου (III) παρουσιάζοντας ποικίλα δυναμικά αναγωγής <sup>66</sup>. Με βάση την ελεύθερη ενέργεια για τη μεταφορά του ηλεκτρονίου έχουν προταθεί τρεις μηχανισμοί απόσβεσης <sup>67</sup>.

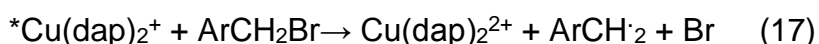
1. Οι “quenchers” που έχουν  $\Delta G^{0_{el}} \gg 0$ , εμφανίζουν σχετικά μικρή ενέργεια μεταφοράς και η τιμή του  $\Delta V$  είναι επίσης μικρή λόγω της έλλειψης των φαινομένων επιδιαλύτωσης ή μη λόγω φορτίου.
2. Στις περιπτώσεις όπου το  $\Delta G^{0_{el}}$  είναι μεγάλο κατά απόλυτη τιμή και αρνητικό, το ποσοστό αποδιέγερσης είναι σταθερό και τείνει στο όριο διάχυσης.
3. Όταν το  $\Delta G^{0_{el}}$  είναι θετικό αλλά σχετικά κοντά στην τιμή μηδέν, η μεταφορά του ηλεκτρονίου από την εξωτερική σφαίρα του πρόδρομου συμπλόκου, ο μηχανισμός εξαρτάται από την πίεση. Η αυξημένη επιδιαλύτωση καθώς και οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στο διαλύτη λόγω της ύπαρξης φορτίου έχουν ως

αποτελεσμα την μεγάλη κατ' απόλυτη τιμή και αρνητική ενέργεια ενεργοποίησης. Αυτό το φαινόμενο αυξάνεται δραματικά όταν ως “quencher” χρησιμοποιούνται τα νιτροβενζένια. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και για άλλους διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο, αποδεικνύοντας έτσι πως υπάρχει μία γενίκευση για τα φαινόμενα πίεσης σε διμοριακές αποσβέσεις <sup>68</sup>.

Μεταφορά ηλεκτρονίου μέσω απόσβεσης σε MLCT μεταφορές έλαβε χώρα και με σύμπλοκα του Co(III) σε μίγμα νερό/αιθανόλη (70/30 vol%) <sup>69</sup>. Η αποτελεσματικότητα ήταν αρκετά χαμηλή και η κβαντική απόδοση ήταν περίπου  $10^{-3}$ . Αποδείχτηκε ότι το σύμπλοκο του χαλκού ήταν ευαίσθητο στη φύση των συμπλόκων του κοβαλτίου και στην πολικότητα του διαλύτη.

Οι αντιδράσεις απόσβεσης που συνοδεύονται από μεταφορά ηλεκτρονίων δύναται να μελετηθούν για φωτοκαταλυτικές εφαρμογές στα σύμπλοκα του  $\text{Cu}(\text{NN})^{2+}$ . Μελετήθηκε η ένωση  $\text{Cu}(\text{dpp})^{2+}$  που χρησιμοποιήθηκε ως φωτοευαίσθητοποιητής για τη διάσπαση του νερού. Οι μελετητές έφτιαξαν ένα σύστημα που περιείχε  $\text{AC}^-$  ως “ηλεκτρονόμο” για τη μεταφορά ενέργειας, ΤΕΟΑ ως θυσιαζόμενο δότη ηλεκτρονίων καθώς και  $\text{MV}^{2+}$  ως δέκτη ηλεκτρονίων. Ακόμη περιείχε και κολλοειδή λευκοχρύσου για παραγωγή υδρογόνου. Το κύριο μονοπάτι για το σχηματισμό του υδρογόνου σε αυτό το σύστημα περιλαμβάνει μεταφορά ενέργειας μεταξύ των  $^*\text{Cu}(\text{dpp})^{2+}$  και του  $\text{AC}^-$  και όχι την άμεση μεταφορά του ηλεκτρονίου μέσω απόσβεσης από το  $\text{MV}^+$ . Έτσι το  $\text{Cu}(\text{dpp})^{2+}$  εμφανίζει πλεονεκτήματα σε σχέση με το  $\text{Cu}(\text{dmp})^{2+}$  έχοντας μεγαλύτερο χρόνο ζωής στη διεγερμένη κατάσταση σε πολικούς διαλύτες εξαιτίας της πιο αποτελεσματικής προάσπισης από της φαίνυλο- ομάδες <sup>70</sup>. Η φωτοκαταλυτική αναγωγή του Co(III) σε μίγμα αιθανόλη/νερό (60/40 vol%) πιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ετεροληπτικά σύμπλοκα του χαλκού. Η διέγερση του χαλκού (I) όσον αφορά την MLCT αναγωγή εμφανίζει μία ταινία στα 360 nm <sup>71</sup>. Οι ενώσεις του χαλκού (II) που σχηματίστηκαν, ανάχθηκαν από την ελεύθερη αιθανόλη φωτοχημικά. Βάζοντας μεγαλύτερη ποσότητα νερού στο διάλυμα παρατηρήθηκε αύξηση του χρόνου ζωής των διεγερμένων καταστάσεων στα σύμπλοκα του χαλκού (I) και έτσι αποδείχτηκε η φωτο-καταλυτική δράση. Αυτό δοκιμάστηκε επίσης και με  $\text{MV}^{2+}$  ως δέκτη ηλεκτρονίων <sup>72</sup>. Όταν η τριφαίνυλο αντικαταστάθηκε από μεγαλύτερες φωσφίνες όπως η τρις-ρ-μεθοξυ-φαινυλοφωσφίνη, οι διεγερμένες καταστάσεις είχαν μεγαλύτερο χρόνο ζωής και έτσι βελτιώθηκε η κβαντική απόδοση <sup>73</sup>.

Τα σύμπλοκα του  $\text{Cu}(\text{NN})^{2+}$  με μεγαλύτερες MLCT καταστάσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη φωτοκατάλυση οργανικών αντιδράσεων, όπως φαίνεται στην αντίδραση (17).



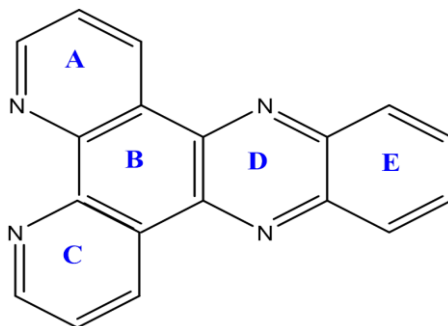
Για παράδειγμα, στη μετατροπή του νιτροβενζολίου με αλογόνα, στα αντίστοιχα διβενζυλικά τους παράγωγα χρησιμοποιήθηκε το  $\text{Cu}(\text{dap})^{2+}$  ως

φωτοευαισθητοποιητής σε διχλωρομεθάνιο <sup>74</sup>. Απουσία οξυγόνου, το διβενζυλικό προϊόν σχηματίζεται από το διεγερμένο μέσω διαφόρων τρόπων ενώ σε διαλύματα παρουσία O<sub>2</sub>, η νιτροβενζαλδεΐδη παράχθηκε σχεδόν ποσοτικά. Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιήθηκε ως θυσιαζόμενος δότης ηλεκτρονίων για να επαναφέρει το Cu(dap)<sup>2+</sup>. Σε διαλύματα ακετονιτριλίου παρουσία οξυγόνου σύμπλοκα του Cu (I) με υποκαταστάτες τα bry και τα rhen αποδείχτηκαν αποτελεσματικά στη φωτολυτική οξειδωση (λ > 315 nm) της φαινόλης σε παραβενζοκινόνη <sup>75</sup>.

### 3.4 ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ dipyrido[3,2-a:2'3'-c]phenazine ( – dppz).

Ο υποκαταστάτης dppz διαθέτει πέντε αρωματικούς δακτυλίους (**Σχήμα 3.6**). Η ηλεκτρονιακή του δομή έχει δύο χαμηλά μη συμπληρωμένα μοριακά τροχιακά, με ξεχωριστές χωρικές κατανομές. Έτσι έχουμε τα τροχιακά:

- b1(ψ): το οποίο επεκτείνεται σε όλον τον ABC δακτύλιο και συχνά αναφέρεται ως π\*(rhen) μοριακό τροχιακό. Έχει σημαντικό εύρος στο χηλικό άτομο του αζώτου και σχεδόν κανένα εύρος στα άτομα αζώτου της φαιναζίνης.
- b1(ρhz): το οποίο επεκτείνεται σε όλον το δακτύλιο BDE, με σημαντικό εύρος στα άτομα του αζώτου της φαιναζίνης (**Σχήμα 3.7**), αλλά σε κανένα από τα χηλικά άτομα του αζώτου.



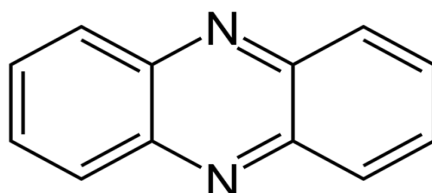
**Σχήμα 3.6:** Δομή dppz

Σύμπλοκα με υποκαταστάτες dppz, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως:

- ενώσεις εκπομπής ηλεκτροφωταύγειας, σε ηλεκτρονικές συσκευές εκπομπής φωτός
- υποστρώματα για τη σύνθεση πολυμερών <sup>76</sup>.

Ο υποκαταστάτης αυτός έχει τέτοια δομή που επιτρέπει τη σύνδεση του συμπλόκου στο DNA μέσω παρεμβολής, επιτρέποντας έτσι στη διεγερμένη

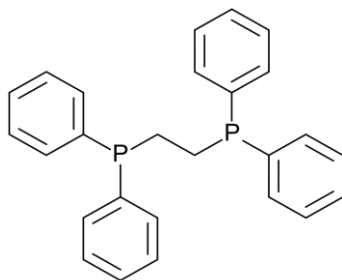
κατάσταση του συμπλόκου να επιδείξει το φαινόμενο του μοριακού διακόπτη φωτός «light switch effect». Επομένως διασφαλίζεται μια πιο ξεκάθαρη φωτοφυσική συμπεριφορά του συμπλόκου, καθώς δεν υπάρχουν και άλλες MLCT διεγερμένες καταστάσεις σε κοντινά ενεργειακά επίπεδα μεταξύ τους. Η πλειοψηφία αυτών των συμπλόκων είναι πολλά υποσχόμενα για τη θεραπεία καρκινικών όγκων και χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για τη Φωτοδυναμική Θεραπεία του καρκίνου.



**Σχήμα 3.7:** Δομή φαινανζίνης

### 3.5 ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗΣ 1,2-Bis(diphenylphosphine)ethane.

Ο dppe ή το αιθάνο-1,2-διυλοδισ(διφαινυλφωσφάνιο) κατά IUPAC είναι ένας συχνά χρησιμοποιούμενος υποκαταστάτης (**Σχήμα 3.8**, **Σχήμα 3.9**).

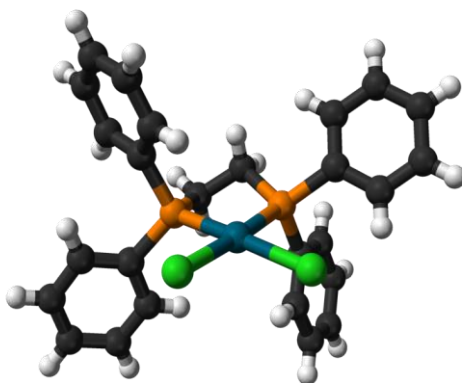
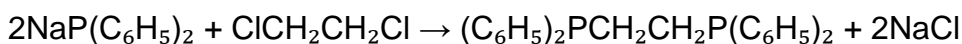


**Σχήμα 3.8:** Δομή dppe

Πρόκειται για ένα δισχιδή χηλικό υποκαταστάτη και η παρασκευή του διεξάγεται μέσω της αλκυλίωσης του  $\text{NaPPh}_2$ , το οποίο παρασκευάζεται από την τριφαινυλοφωσφίνη ( $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ ) ως εξής:



Το  $\text{NaP}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$  το οποίο οξειδώνεται άμεσα από τον αέρα, υφίσταται επεξεργασία με 1,2-διχλωροαιθάνιο για να δώσει dppe.



**Σχήμα 3.9:** Κρυσταλλική δομή ενός συμπλόκου με dprpe.

Ο μοριακός τύπος της ένωσης είναι  $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{P}_2$ , έχει μοριακή μάζα 398.42 g/mol και το σημείο τήξης του κυμαίνεται στα 140 με 142°C .

### Αναγωγή

Δύο ενδεικτικές αντιδράσεις αναγωγής του dprpe είναι αυτές με το λίθιο και η υδρόλυσή του αντίστοιχα.

- $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{PPh}_2 + 4\text{Li} \rightarrow \text{PhLiP}(\text{CH}_2)_2\text{PLiPh} + 2\text{PhLi}$
- $\text{PhLiP}(\text{CH}_2)_2\text{PLiPh} + 2\text{PhLi} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{PhP}(\text{CH}_2)_2\text{PPh} + 4\text{LiOH} + 2\text{C}_6\text{H}_6$

### Οξειδωση

Η επεξεργασία του dprpe με συμβατικά οξειδωτικά όπως το υπεροξείδιο ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και το υδατικό διάλυμα βρωμίου, δεν επιφέρει μεγάλες αποδόσεις dprpe.

Σύμπλοκα με υποκαταστάτη dprpe αλλά και γενικότερα με φωσφίνες, χρησιμοποιούνται ευρέως ως ομοιογενείς καταλύτες για ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων. Εν κατακλείδι, στη φωτοδυναμική θεραπεία, μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο, τα φωτοενεργά σύμπλοκα μπορούν να δράσουν ως ενώσεις αναφοράς ώστε να πάρουμε πληροφορίες για το DNA. Πολλές λειτουργίες/ιδιότητες των συμπλόκων σχετίζονται άμεσα με τη φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του DNA και του χρωμοφόρου. Έτσι, η ανάπτυξη αυτής της έρευνας δύναται να οδηγήσει σε βελτιστοποίηση των μοντέλων των φαρμάκων. Στην περίπτωση των συμπλόκων του χαλκού, οι φωτοχημικές ιδιότητες είναι συχνά αρκετά ευαίσθητες στο γειτονικό περιβάλλον και για αυτό το λόγο είναι πιθανό να εμφανίσουν μοναδικές ιδιότητες <sup>4</sup>.

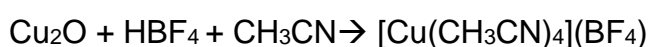
## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ/ΥΛΙΚΑ/ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

#### 4.1 ΥΛΙΚΑ/ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του υποκαταστάτη και του συμπλόκου αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich και Alfa Aesar. Το σύμπλοκο του χαλκού συντέθηκε από το αρχικό αντιδραστήριο τετράκις ακετονιτρίλιο του Cu(I) με αντισταθμιστικό φορτίο το τετραφθοροβορικό ανιόν, όπως φαίνεται στην αντίδραση:



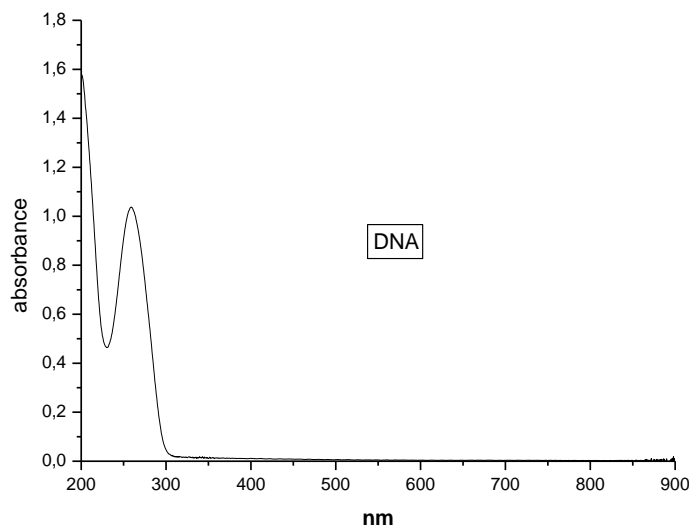
σύμφωνα με βιβλιογραφική αναφορά <sup>53</sup>.

Για τις DNA-δεσμευτικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε φυσικό DNA από θύμο αδένα βοοειδούς (calf thymus DNA, CT-DNA), που αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma Aldrich ως μετά νατρίου άλας. Για τα πειράματα της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε αгарόζη από τη Sigma, ενώ το πλασμίδιο pBR322 αγοράστηκε ως lyophilized powder από τη Sigma Aldrich. Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν tris-[hydroxymethyl]-amino-methane- base (Tris Base) και το αντίστοιχο υδροχλωρικό άλας (Tris-HCl) τα οποία αγοράστηκαν από την εταιρεία Alfa Aesar. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν σε νερό milli-Q.

#### 4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

##### 4.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ CT-DNA.

Παρασκευάζεται διάλυμα DNA με διάλυση ινών φυσικού DNA από θύμο αδένα βοοειδούς (C.T.-DNA), περίπου 3 mg σε 3 mL διαλύματος NaCl 0.1M, υπό ανάδευση για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου. Η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος DNA ανά νουκλεοτίδιο που προκύπτει, υπολογίζεται με φασματοσκοπία απορρόφησης, αφού γνωρίζουμε το συντελεστή μοριακής απορρόφησης της κορυφής στα 284 nm, που είναι  $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Ο λόγος της UV απορρόφησης στα 260:280 nm είναι 1.9:1, κάτι που υποδηλώνει ότι το DNA είναι ελεύθερο από πρωτεΐνες <sup>54</sup>. Η συγκέντρωση είναι της τάξης  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ . Η αραιώση μέρους από το πυκνό διάλυμα με μεγάλη ιοντική ισχύ γίνεται με ρυθμιστικό διάλυμα, οπότε προκύπτει διάλυμα με της τάξης των  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Να σημειωθεί ότι το πυκνό διάλυμα μπορεί να παραμείνει στο ψυγείο το πολύ για 4 μέρες και πριν την επαναχρησιμοποίηση του ελέγχεται με φάσμα ηλεκτρονικής απορρόφησης.



**Σχήμα 4.1:** Διάγραμμα Απορρόφησης Διαλύματος DNA.

#### 4.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl (5 Mm) με NaCl (50 Mm), pH=7.0 .

Ζυγίζοντας 0.394 g Tris-HCl ( $M_r=157.60$ ) και 1.461 g NaCl και διαλύονται σε λιγότερο από 500 mL  $H_2O$  milli-Q. Τέλος, το pH ρυθμίζεται με προσθήκη διαλύματος NaOH 1 M στο 7.2 και συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 500 mL.

Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl (50 Mm) / NaCl (18 mM), pH=7.2 .

Το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την αλληλεπίδραση των συμπλόκων με πλασμίδιο DNA pBR322, και παρασκευάζεται ως εξής: διαλύονται 0.788 g Tris-HCl ( $M_r=157.60$ ) και 1.052 g NaCl σε 100 mL  $H_2O$  milli-Q, και ρυθμίζεται το pH στο 7.2 με την προσθήκη NaOH.

Ρυθμιστικό Διάλυμα «Φόρτωσης» TBE 10x (Tris – Borate – EDTA) 100 mL (Loading Buffer).

Το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης σε συγκέντρωση 1xTBE. Διαλύονται 10.8 g Tris-base ( $M_r=121.14$ ), 5.5 g βορικού οξέος και 0.75 g δινάτριο EDTA ( $M_r=372.24$ ) σε 100 mL  $H_2O$  milli-Q. Το πυκνό αυτό ρυθμιστικό διάλυμα έχει pH=8.3 (χωρίς ρύθμιση) και συγκέντρωση 890 Mm Tris base, 890 mM βορικού οξέος και 20 mM EDTA. Μέρος



αυτού του διαλύματος αραιώνεται 10 φορές για να προκύψει το επιθυμητό 10×TBE ρυθμιστικό διάλυμα, συγκέντρωσης 89 mM TrisBase, 89 mM βορικού οξέος και 2 mM EDTA, που χρησιμοποιείται στη «φόρτωση» της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

### 4.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

*Σημείωση: σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες από χαλαζία, οπτικής διαδρομής 1.000 cm.*

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR): Τα φάσματα πρωτονίου  $^1\text{H-NMR}$  ελήφθησαν σε κυψελίδες (σωληνάκια) NMR 5nm σε δευτεριωμένους διαλύτες σε θερμοκρασία δωματίου, σε NMR Varian 300 MHz

Φασματοσκοπία Ορατού - Υπεριώδους (UV-Vis): Τα φάσματα απορρόφησης ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Cary 300 E (Varian) σε κυψελίδα δέσμης του 1.000cm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Φασματοσκοπία Υπερύθρου IR: Τα IR φάσματα ελήφθησαν σε στερεά κατάσταση σε δισκία KBr σε φασματοφωτόμετρο IR Affinity-1 Shimadzu.

Φασματομετρία Μάζας : Τα φάσματα ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο μάζας LTQ-ORBIT RAPVELOS, Electro spray Ionization Source, Source Voltage (kV) 4.01, Sheath gas flow rate 8, Auxiliary gas flow rate 0, Capillary Temperature 275 (Celsius), σε διαλύτη μεθανόλη.

Κυκλική Βολταμμετρία (CV): Τα κυκλικά βολταμμογραφήματα ελήφθησαν με ποτενσιοστάτη τύπου AFCBP1 από την Pine Instrument Company.

Κυκλικός Διχρωισμός (CD): Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού ελήφθησαν σε διχρωγράφο Jasco J- 815 CD συνδεδεμένο με H/Y (ΕΚΕΦΕ/ Δημόκριτος) στην περιοχή 200- 400nm με βήμα 0.2 nm και ροή αζώτου υπό πίεση 10 barr. Τα διαλύματα μετρήθηκαν σε θερμοκρασία 25 °C και το καθένα είχε όγκο 3 mL.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ [Cu(2,2'-dis-COOEt-dppz)<sub>2</sub>](BF<sub>4</sub>)

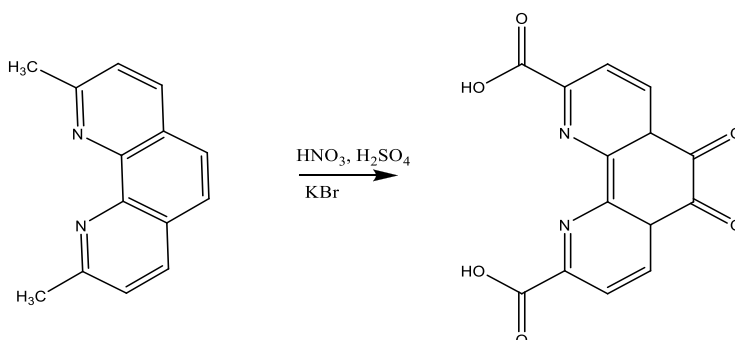
Σημείωση: Το σύμπλοκο [Cu(2,2'-dis-COOEt-dppz)<sub>2</sub>](BF<sub>4</sub>) θα αναφέρεται ως **Σύμπλοκο (1)**.

#### 5.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ: διαιθυλεστέρας της 2,9-δικαρβοξυ-διπυριδυλοφαιναζίνης(dppz(COOEt)<sub>2</sub>)<sup>55,56</sup>.

##### 1<sup>ο</sup> Στάδιο Σύνθεσης.

Σε γουδί λειοτρίβονται και αναμειγνύονται 0.5 g νεοκουπρούνης (2,9-διμεθυλο-1,10-φαινανθρολίνη) και 0.41 g βρωμιούχο κάλιο έως ότου οι δύο στερεές ουσίες να σχηματίσουν ένα ομοιογενές μίγμα. Τοποθετείται το μίγμα σε σφαιρική φιάλη με μαγνητάκι υπό ανάδευση και σε παγόλουτρο (για έλεγχο της θερμοκρασίας), έπειτα προστίθεται στάγδην μίγμα που αποτελείται από 5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 2.5 mL HNO<sub>3</sub>. Μετά το πέρας της προσθήκης του μίγματος οξέων, στη φιάλη εφαρμόζεται ψυκτήρας. Το σύστημα βράζεται με αναρροή για 3 h και προκύπτει διαυγές πορτοκαλί διάλυμα. Το διάλυμα αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό σε Buchner, από όπου και λαμβάνεται κίτρινο στερεό. Το στερεό αφήνεται όλο το βράδυ στο φούρνο για ξήρανση. Παραλαμβάνεται το στερεό (2,9 δικαρβοξυ-1,10 φαινανθρολίνη 5,6 διόνη).

Η αντίδραση που πραγματοποιείται σε αυτό το στάδιο σύνθεσης είναι η εξής:



2,9-διμεθυλο-1,10-φαινανθρολίνη

2,9 δικαρβοξυ-1,10 φαινανθρολίνη 5, 6 διόνη

Μικροποσότητα διαλυτοποιείται σε σωληνάκι του NMR, με διαλύτη δευτεριωμένο DMSO (χρώμα διαλύματος: ανοιχτό κίτρινο).

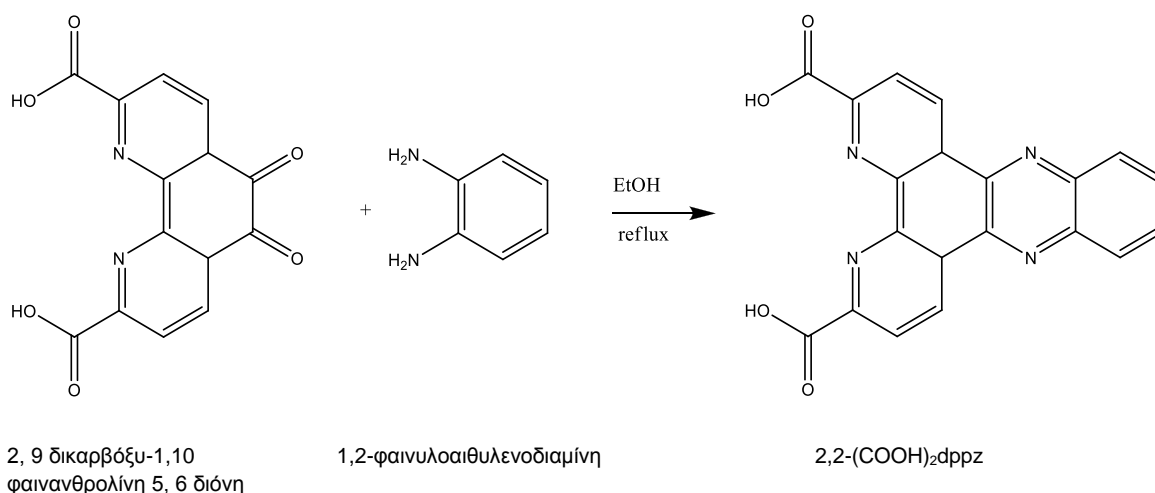
Στο στάδιο αυτό παρασκευάστηκαν 0.72157 g διόνης ( $M_r=298.21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $0.0024196707 \text{ mol}$ ) από 0.5 g άνυδρης νεοκουπροΐνης ( $M_r=217.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $0.0023012841 \text{ mol}$ ) και η απόδοση υπολογίζεται από την σχέση: ( $\alpha=n_{\text{πειρ.}}/n_{\text{θεωρ.}}$ ).

Για τη νεοκουπροΐνη υπολογίστηκε:  $m=0.5 \text{ g}$ ,  $M_r=217.27 \text{ g/mol}$ ,  $n=0.0023 \text{ mol}$ , για τη διόνη υπολογίστηκε:  $m=0.2169 \text{ g}$ ,  $M_r=298.21 \text{ g/mol}$ ,  $n=0.00073 \text{ mol}$ .

Υπολογισμός απόδοσης ( $\alpha=n_{\text{πειρ.}}/n_{\text{θεωρ.}}$ ):  $\alpha=0.00073/0.0023=0.317=31.7\%$ .

## 2<sup>ο</sup> Στάδιο Σύνθεσης.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται στο στάδιο αυτό είναι η εξής:



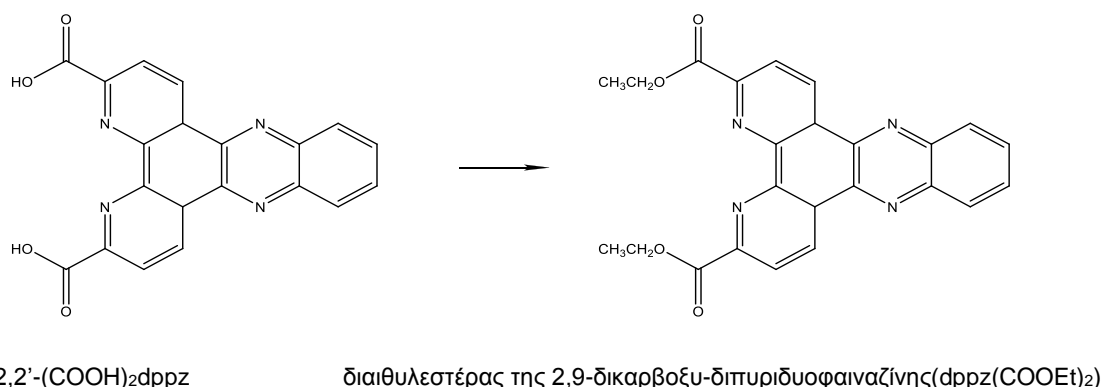
Στο στάδιο αυτό τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη ποσότητα της διόνης (0.2 g,  $M_r=298.21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $n= 0.00067 \text{ mol}$ ) και 35 mL αιθανόλης. Έπειτα και υπό ήπια ανάδευση προστίθεται η 1,2-φαινυλοαιθυλενοδιαμίνη (0.0735 g,  $M_r=108.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Μετά την προσθήκη όλων, στη σφαιρική φιάλη εφαρμόζεται ψυκτήρας. Η φιάλη τοποθετείται σε ελαιόλουτρο, όπου ρυθμίζεται η θερμοκρασία και το μίγμα βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση και βρασμό με αναρροή για περίπου 15 min. Λαμβάνεται πορτοκαλί ίζημα το 2,2'-(COOH)<sub>2</sub>dppz. Το τελικό προϊόν ανακρυσταλλώνεται από βραστό νερό ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της ορθο-φαινυλενοδιαμίνης που δεν αντέδρασε.

Υπολογίστηκε: για 1,2-phen:  $m=0.079 \text{ g}$ ,  $M_r=108.14 \text{ g/mol}$ ,  $n=0.00073 \text{ mol}$

Για 2,2(COOH)<sub>2</sub>dppz:  $m=0.21 \text{ g}$ ,  $M_r=370.32 \text{ g/mol}$ ,  $n=0.000567 \text{ mol}$ .

Υπολογισμός απόδοσης:  $\alpha=0.000567/0,00073=0.7767=77.67\%$ .

### 3<sup>ο</sup> Στάδιο Σύνθεσης.



Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται εστεροποίηση του υποκαταστάτη για να πάρει τελικά την τελική μορφή με την οποία συμμετέχει στην ένωση. 0.1 g από το 2,2-(COOH)<sub>2</sub>dppz βράζονται με αναρροή σε 15 mL αιθανόλης και προστίθενται λίγες σταγόνες πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ως καταλύτη. Με την πρόοδο της αντίδρασης σχηματίζεται ίζημα χρώματος κρεμ-πορτοκαλί. Μετά από 24 h και αφού ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί διήθηση σε Buchner και το στερεό που παραλαμβάνεται είναι ο τελικός υποκαταστάτης με τη μορφή διαιθυλεστέρας της 2,9-δικαρβοξυ-διπυριδυοφαιναζίνης (dppz(COOEt)<sub>2</sub>).

Υπολογίστηκε: για 2,2'(COOH)<sub>2</sub>-dppz: m=0.1 g, Mr=370.32 g/mol, n=0.00027 mol

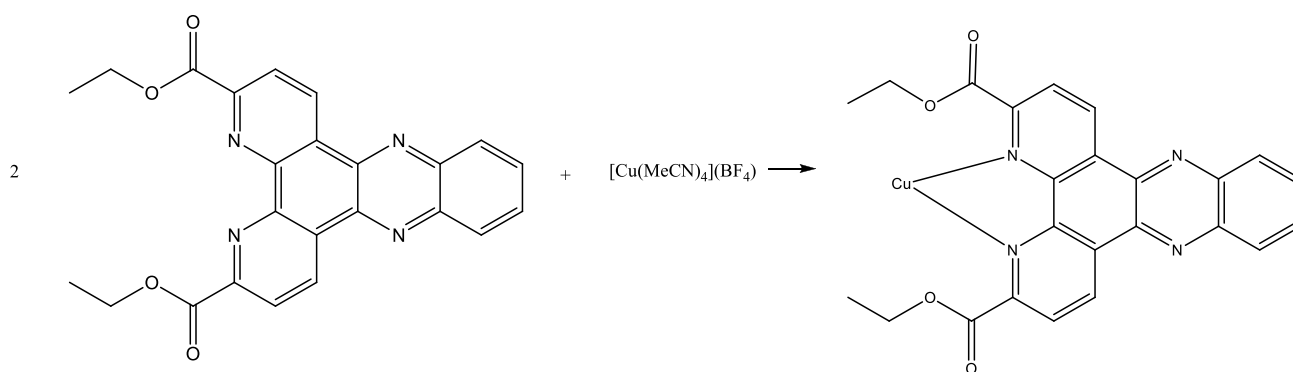
Για 2,2 (COOEt)<sub>2</sub>-dppz : m= 0.02 g, Mr=426.42 g/mol, n=0.000047 mol.

Υπολογισμός απόδοσης:  $\alpha= 0.1737= 17.37\%$ .

### **5.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ: [Cu(2,2'-dis-COOEtdppz)<sub>2</sub>](BF<sub>4</sub>).**

Το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης περιλαμβάνει την προσθήκη του μετάλλου (Cu<sup>(II)</sup>) στον υποκαταστάτη <sup>56</sup>. Η προσθήκη αυτή γίνεται σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:





*Σημείωση: το σύμπλοκο ενώνεται με δύο μόρια υποκαταστάτη με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με μόνη διαφορά στη διάταξη του υποκαταστάτη στο χώρο.*

15 mL ξηρού διχλωρομεθανίου φέρονται σε φιάλη Schlenk και απαερώνονται. Έπειτα η φιάλη ανοίγεται υπό αργό και προστίθενται 0.0194 g  $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4](\text{BF}_4)$ . Όταν διαλυθεί το στερεό προστίθενται 0.0526 g του υποκαταστάτη και το διάλυμα γίνεται αμέσως μωβ. Αφήνεται για τρεις ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προστίθεται ίσος όγκος εξάνιου, οπότε και καταβυθίζεται μπλε-μωβ στερεό. Μετά από τρεις ώρες στην κατάψυξη διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται όλο το βράδυ. Ζυγίζονται 0.045 g συμπλόκου. Μονοκρύσταλλοι του συμπλόκου για ανάλυση με ακτίνες X απομονώθηκαν με διάχυση ατμών διαιθυλαιθέρα σε διάλυμα χλωροφορμίου του συμπλόκου. Η απόδοση υπολογίζεται ίση με 73%.

Υπολογίστηκε: για  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4](\text{BF}_4)$ :  $m=0.00738$  g,  $M_r=314.56$  g/mol,  $n=0.00002346$  mol

Για το σύμπλοκο:  $m=0.045$  g,  $M_r=1002.2$  g/mol,  $n=0.0445$  mmol

Υπολογισμός απόδοσης:  $\alpha=73$  %.

### 5.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ (1).

*Σημείωση: σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες από χαλαζία, οπτικής διαδρομής 1.000cm.*

#### Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).

Τα φάσματα πρωτονίου  $^1\text{H-NMR}$  ελήφθησαν σε κυψελίδες (σωληνάκια) NMR 5 nm με δευτεριωμένους διαλύτες σε θερμοκρασία δωματίου.

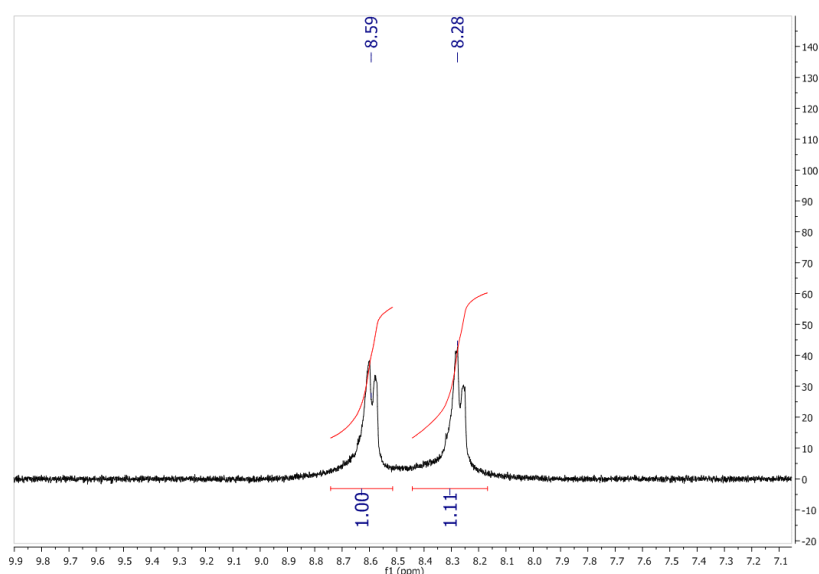
## Φασματοσκοπία Ορατού - Υπεριώδους (UV-Vis).

Τα φάσματα απορρόφησης ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Cary 300 E (Varian) σε κυβελίδα δέσμης του 1.000 cm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

### 5.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ.

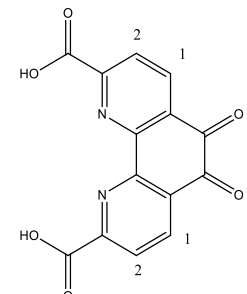
Στο 1<sup>ο</sup> στάδιο της σύνθεσης: 2, 9 δикаρβοξυ-1,10 φαινανθρολίνη 5, 6 διόνη

Παρατίθεται το εξής φάσμα NMR:



**Σχήμα 5.1:** Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της 2, 9 δикаρβοξυ-1,10 φαινανθρολίνης 5, 6 διόνης.

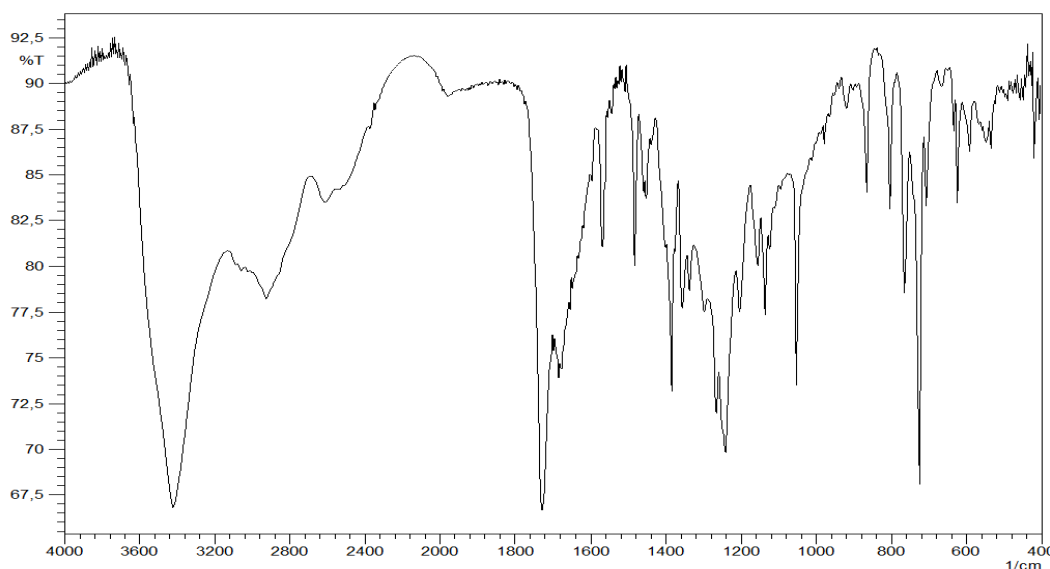
**Πίνακας 5.1:** Σύγκριση Πειραματικών και Βιβλιογραφικών Δεδομένων για τη 2, 9 δикаρβοξυ-1,10 φαινανθρολίνη 5, 6 διόνη .

	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ</b>	<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ</b>	<b>ΑΠΟΔΟΣΗ</b>
	<b>ΔΕΔΟΜΕΝΑ</b> <sup>77</sup>	<b>ΔΕΔΟΜΕΝΑ</b>	<b>ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ</b>
	8.25	8.27 (d, 2 H)	Θέση 1
	8.58	8.60 (d, 2 H)	Θέση 2

Αναμένονται δύο κορυφές, όπως εμφανίζονται, εξαιτίας των δύο διαφορετικών ομάδων υδρογόνου (εκείνα που εμφανίζονται στα 8.60 ppm είναι πιο προασπισμένα εξαιτίας της καρβοξυλικής ομάδας). Τα υδροξύλια δεν εμφανίζονται εξαιτίας του ότι είναι ανταλλάξιμα και τέλος παρατηρείται μια μικρή απόκλιση από τα βιβλιογραφικά δεδομένα (της τάξης του 0.02), που όμως δεν επηρεάζει την πορεία της σύνθεσης. Περαιτέρω κορυφές που ίσως εμφανίζονται δικαιολογούνται εξαιτίας της ύπαρξης υγρασίας ή μη καλής δευτερίωσης του διαλύτη.

2ο στάδιο της σύνθεσης: 2,2(COOH)<sub>2</sub>-dppz.

Παρατίθενται τα εξής φάσματα:

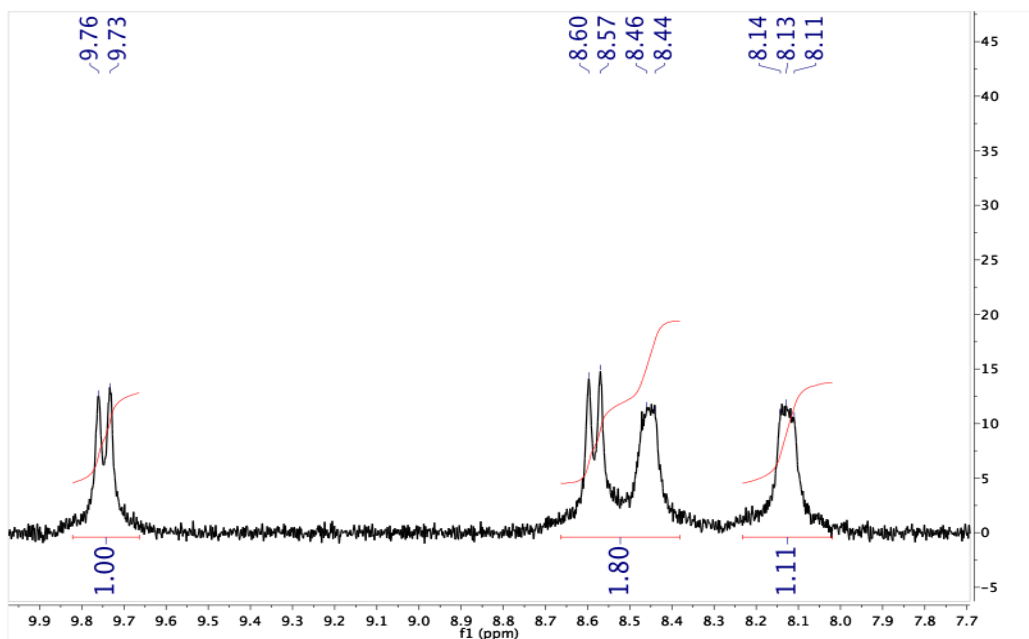


**Σχήμα 5.2:** Φάσμα IR για το 2,2(COOH)<sub>2</sub>-dppz.

Παρατηρούνται οι κορυφές:

- σε συχνότητα 3450 cm<sup>-1</sup> που οφείλεται στην παρουσία τάσης O-H και συγκεκριμένα καρβοξυλομάδα
- σε συχνότητα 1750 cm<sup>-1</sup> οφείλεται στην ύπαρξη τάσης C=O, λόγω καρβοξυλομάδας και της διόνης
- σε συχνότητα 1370 cm<sup>-1</sup> οφείλεται στην ύπαρξη τάσης C-N=C σε αρωματικό δακτύλιο
- σε συχνότητα 1240 cm<sup>-1</sup> οφείλεται στην ύπαρξη τάσης C-C=O.

Περαιτέρω κορυφές που ίσως εμφανίζονται δικαιολογούνται εξαιτίας της ύπαρξης υγρασίας.



Σχήμα 5.3: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  για το  $2,2(\text{COOH})_2\text{-dppz}$ .

Πίνακας 5.2: Σύγκριση Πειραματικών και Βιβλιογραφικών Δεδομένων για το  $2,2(\text{COOH})_2\text{-dppz}$ .

	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ	ΑΠΟΔΟΣΗ
	ΔΕΔΟΜΕΝΑ	ΔΕΔΟΜΕΝΑ	ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
	9.8	9.75 (d, 2 H)	Θέση 1
	8.17	8.13 (d, 2 H)	Θέση 4
	8.63	8.59 (d, 2 H)	Θέση 2
	8.5	8.46 (d, 2 H)	Θέση 3



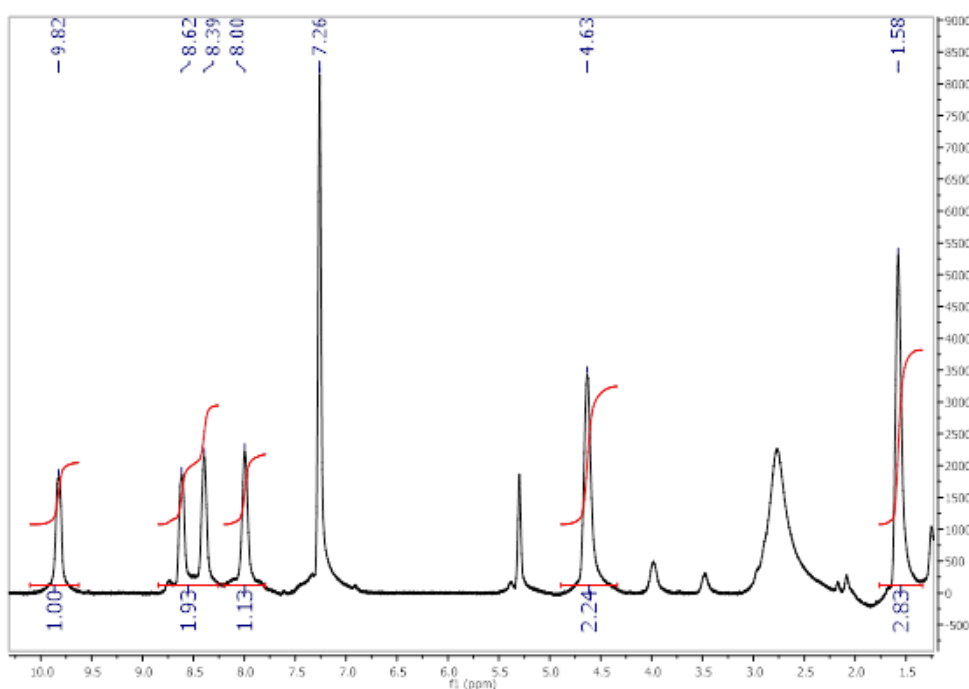
Στο φάσμα NMR παρατηρούνται:

- 4 κορυφές που οφείλονται στην ύπαρξη 4 μη ισοδύναμων ομάδων H
- η κορυφή στα 9.75 ppm οφείλεται στα δύο H που βρίσκονται στον **Πίνακα 5.2** με αριθμό 1 που είναι τα πιο αποπροασπισμένα.
- Η κορυφή στα 8.6 ppm οφείλεται είναι διπλή και οφείλεται στα H με το νούμερο 2 στον **Πίνακα 5.2**
- η κορυφή στα 8.5 ppm οφείλεται στα H με το νούμερο 3 που είναι πιο προασπισμένα.
- Τέλος η κορυφή στα 8.1 ppm οφείλεται στα H με τον αριθμό 4 του προαναφερθέντος πίνακα.

Όλα τα παραπάνω δεδομένα μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ουσία συντέθηκε και έτσι προχωρήσαμε στο επόμενο στάδιο για την σύνθεση του **Συμπλόκου (1)**.

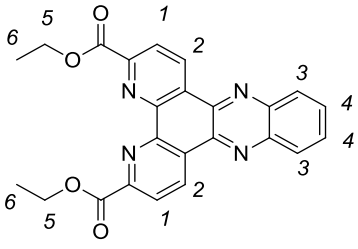
3ο στάδιο της σύνθεσης: 2,2'(COOEt)<sub>2</sub>-dppz

Παρατίθενται το εξής φάσμα:



**Σχήμα 5.4:** Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR για το 2,2'(COOEt)<sub>2</sub>-dppz σε CDCl<sub>3</sub>.

**Πίνακας 5.3:** Πειραματικά Δεδομένα για το 2,2'(COOEt)<sub>2</sub>-dppz.

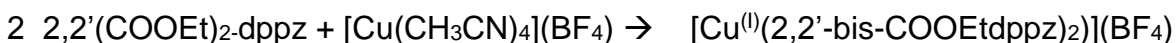
Χημικός τύπος	Πειραματικά Δεδομένα	Απόδοση Πρωτονίων
	9.83 (s, 2 H)	Θέση 1
	8.62 (d, 2 H)	Θέση 2
	8.39 (d, 2 H)	Θέση 3
	8.00 (s, 2 H)	Θέση 4
	4.63 (d, 4 H)	Θέση 5
	1.58 (t, 6 H)	Θέση 6

Στο παραπάνω φάσμα NMR παρατηρούνται:

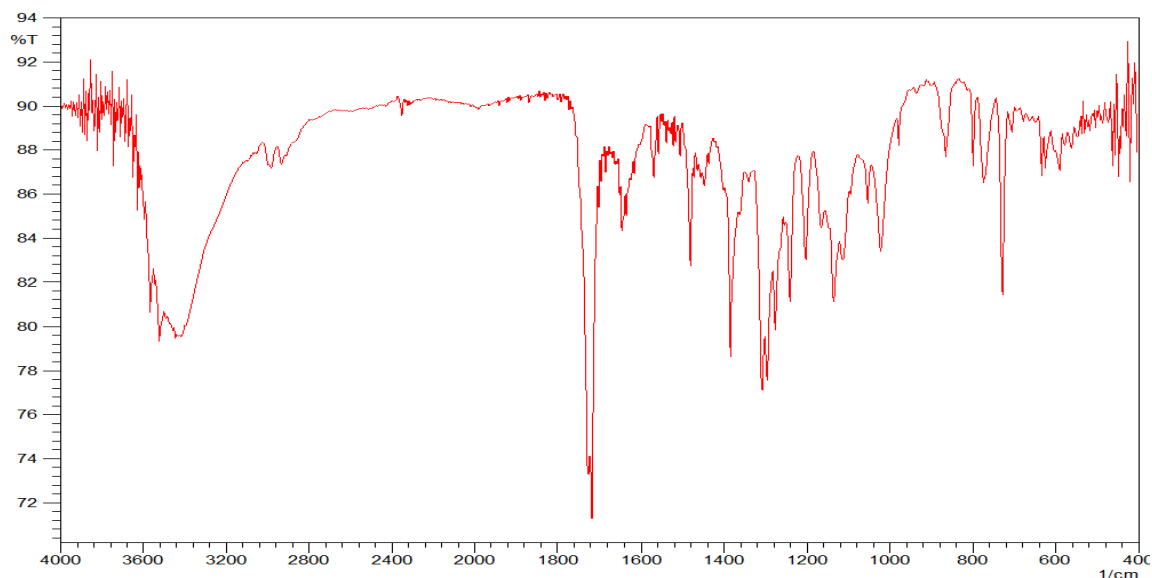
- 6 κύριες κορυφές που οφείλονται στην ύπαρξη 6 μη ισοδύναμων ομάδων H
- η κορυφή στα 1.58 ppm οφείλεται στα 6 H των δύο ομάδων CH<sub>3</sub> της εστερομάδας
- η κορυφή στα 4.64 ppm οφείλεται στα 4 H ομάδας CH<sub>2</sub> της εστερομάδας
- η κορυφή στα 8.00 ppm οφείλεται στα αρωματικά 2 H του φαιναζινικού δακτυλίου
- η κορυφή στα 8.40 ppm οφείλεται στα αρωματικά 2 H του φαιναζινικού δακτυλίου
- η κορυφή στα 8.62 ppm οφείλεται στα αρωματικά 2 H του φαινανθρολινικού δακτυλίου
- η κορυφή στα 9.83 ppm οφείλεται στα 2 H των φαινανθρολινικών δακτυλίων που βρίσκονται δίπλα στην εστερομάδα.

## 5.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ (1).

Σύνθεση του συμπλόκου σύμφωνα με την αντίδραση:



Παρατίθεται φάσμα IR του τελικού συμπλόκου:

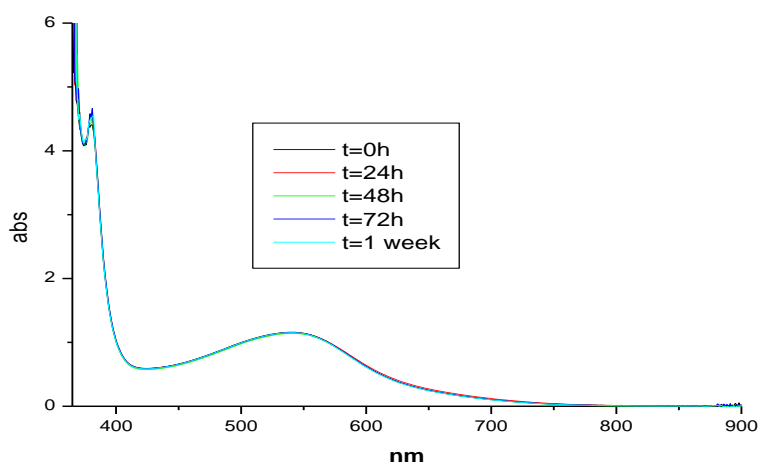


**Σχήμα 5.5:** Φάσμα IR για το σύμπλοκο **(1)**.

Παρατηρούμε κορυφές στις εξής συχνότητες:

- στα  $1730\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται σε τάση C=O λόγω των εστερικών ομάδων
- στα  $1250\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται σε τάση C-O δείγμα της ύπαρξης εστεροποιημένης ομάδας.

Ακολουθώς παρατίθεται το φάσμα ορατού-υπεριώδους για το σύμπλοκο **(1)** σε διάλυμα MeOH ( $C=10^{-4}\text{ M}$ ), προκειμένου να μελετηθεί η σταθερότητά του.



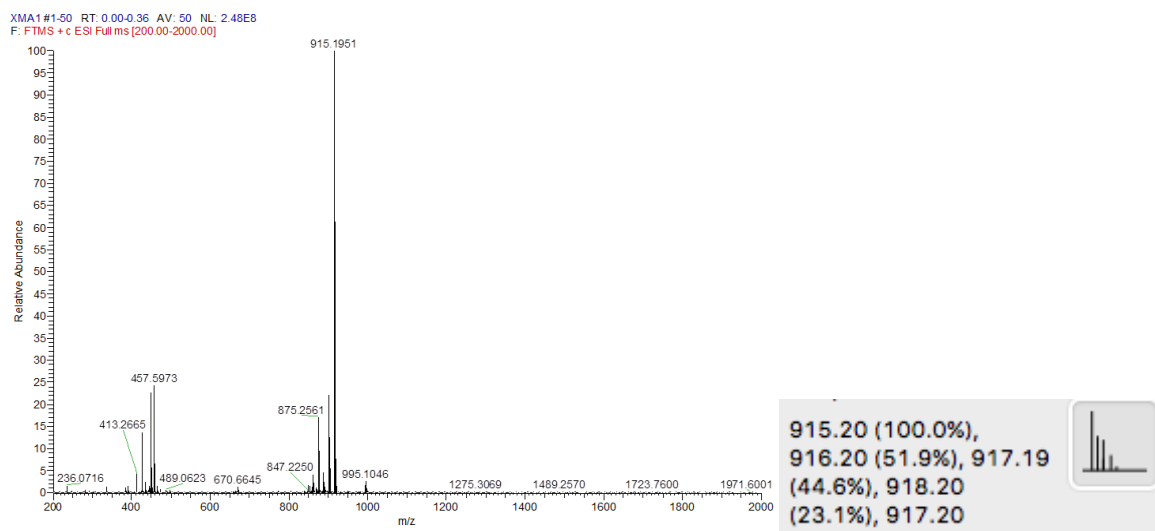
**Σχήμα 5.6:** Φάσμα Απορρόφησης του συμπλόκου **(1)** σε MeOH.

Η κορυφή που παρατηρείται στα 550 nm οφείλεται σε MLCT μετάπτωση και είναι εκείνη που είναι υπεύθυνη για το χρώμα του συμπλόκου. Η γραμμομοριακή απορροφητικότητα της βρέθηκε ίση με  $\epsilon = 6.8 \times 10^3\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ . Ακόμη παρατηρείται μία

ακόμη κορυφή η οποία οφείλεται στις  $\pi \rightarrow \pi^*$  μεταπτώσεις στα 284 nm με  $\epsilon = 7.5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Το σύμπλοκο παραμένει σταθερό όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα ακόμα και μετά το πέρας μιας εβδομάδας.

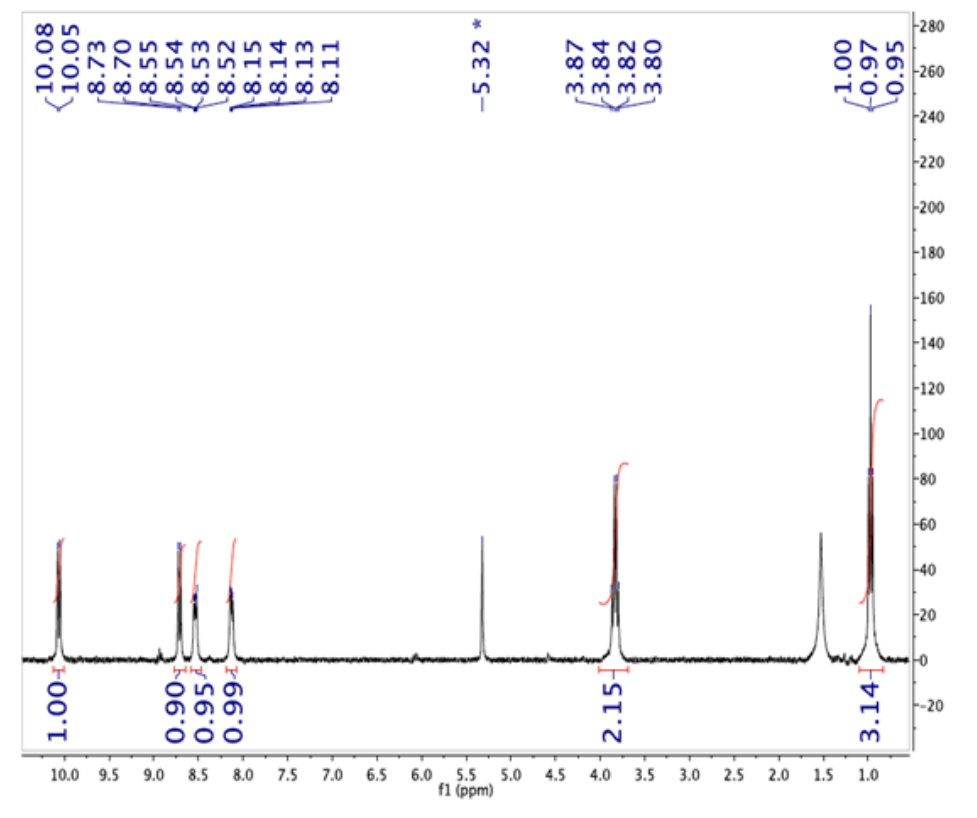
## Φασματομετρία Μάζας

Το φάσμα μάζας ελήφθη σε διαλύτη μεθανόλη στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Το φάσμα MS παρουσιάζεται παρακάτω στο **Σχήμα 5.7**. Εμφανίζεται η κύρια κορυφή στα 915.19 όπου και αναμένουμε περίπου το 100% της μάζας. Το φορτίο του χαλκού είναι (+1). Το αποτέλεσμα συμφωνεί με τον μοριακό τύπο της ένωσης όπως φαίνεται και από το θεωρητικό διάγραμμα.



**Σχήμα 5.7:** Φάσμα μάζας του συμπλόκου (**1**), (αριστερά δίνεται το φάσμα και δεξιά το θεωρητικό φάσμα που βρέθηκε μέσω υπολογιστή).

Ακολουθως, παρατίθενται το φάσμα NMR του συμπλόκου σε δευτεριωμένο διαλύτη διχλωρομεθάνιο. Στον Πίνακα 5.4 καταγράφονται οι χαρακτηριστικές κορυφές που φαίνονται και στο φάσμα.



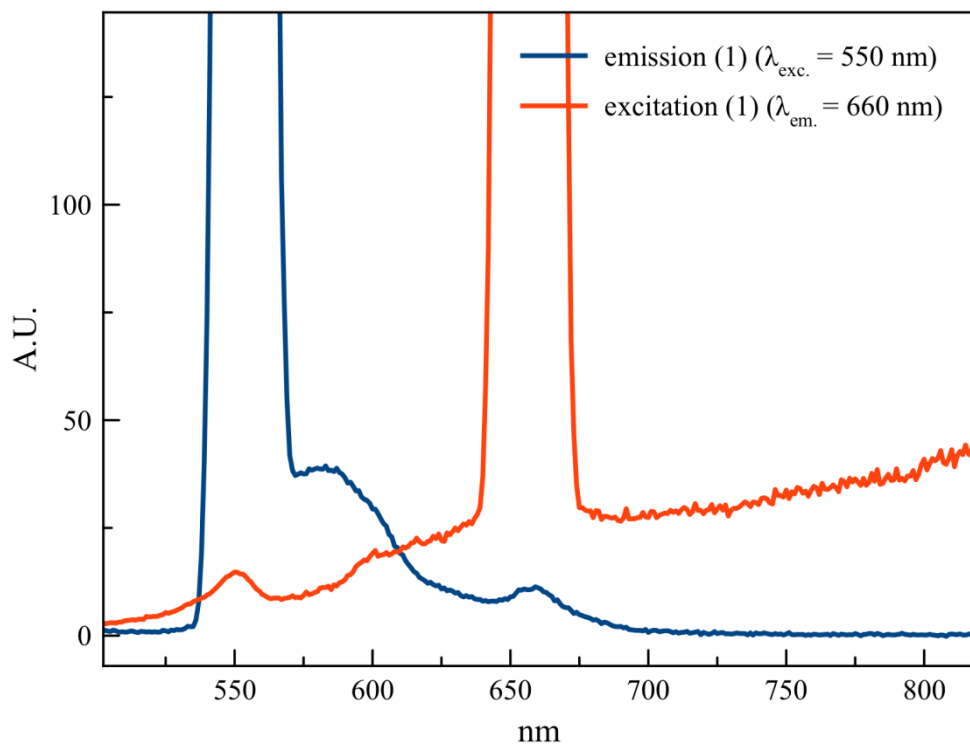
Σχήμα 5.8: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του συμπλόκου (1).

Πίνακας 5.4: Πειραματικά Δεδομένα για το σύμπλοκο (1).

Σύμπλοκο (1)	Πειραματικά Δεδομένα	Απόδοση Πρωτονίων
	10,08 (d, 2H)	Θέση 1
	8,70 (d, 2H)	Θέση 2
	8,50 (d, 2H)	Θέση 3
	8,13 (d, 2H)	Θέση 4
	3,80 (m, 4H)	Θέση 5
	1,0 (t, 6H)	Θέση 6

## Φθορισμομετρία συμπλόκου (1)

Παρατίθενται το φάσμα φθορισμού του συμπλόκου (1) σε διαλύτη MeOH. Στο **Σχήμα 5.9** βλέπουμε το φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα αντίστοιχα μήκη κύματος. Παρατηρείται, ότι το σύμπλοκο (1) εμφανίζει φθορισμό στα 660 nm.



**Σχήμα 5.9:** Φάσμα φθορισμού του συμπλόκου (1) σε διαλύτη MeOH.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ [Cu(2,2'-dis-COOEt-dppz)<sub>2</sub>](BF<sub>4</sub>) ΚΑΙ [Cu(dppz)(dprpe)](BF<sub>4</sub>) ΜΕ ΤΟ DNA.

Οι κυριότερες τεχνικές που χρησιμοποιήσαμε για να παρακολουθήσουμε τις αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων που συνθέσαμε με φυσικό DNA είναι η τιτλοδότηση UV-Vis, η ιξωδομετρία, η ηλεκτροφόρηση, ο κυκλικός διχρωισμός, η φθορισμομετρία, και η κυκλική βολταμμετρία .

#### 6.1 ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ UV-vis

Η εφαρμογή της φασματοσκοπίας ηλεκτρονικής απορρόφησης στη μελέτη της αλληλεπίδρασης των μορίων με το DNA είναι μία από τις πιο χρήσιμες τεχνικές. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σύμπλοκα που δεσμεύονται με το DNA μέσω παρεμβολής, συνήθως, παρουσιάζουν υποχρωισμό, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης στοιβάγματος ανάμεσα σε ένα αρωματικό χρωμοφόρο υποκαταστάτη και τα ζεύγη βάσεων του DNA.

Τα διαλύματα για την τιτλοδότηση απορρόφησης παρασκευάστηκαν ως εξής: σταθερή συγκέντρωση συμπλόκου  $2 \times 10^{-5}$  M επωάστηκε με διάφορες συγκεντρώσεις DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα και μετρήθηκε η απορρόφησή τους (στις 24 h). Τα πειραματικά δεδομένα από την τιτλοδότηση UV-Vis προσαρμόζονται στην παρακάτω εξίσωση, προκειμένου να υπολογιστεί η σταθερά σύνδεσης  $K_b$ .

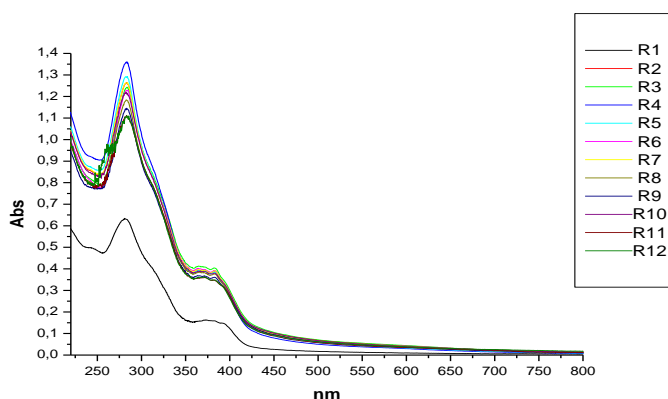
$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

Όπου:

- [DNA]: η συγκέντρωση του DNA σε κάθε λόγο R,
- $\epsilon_a$ : συντελεστής μοριακής απορρόφησης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος του κάθε διαλύματος (υπολογίζεται ως  $A_{obs}/[complex]$ ),
- $\epsilon_b$ : συντελεστής μοριακής απορρόφησης του δεσμευμένου με το DNA συμπλόκου,
- $\epsilon_f$ : συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ελεύθερου (μη δεσμευμένου) συμπλόκου.

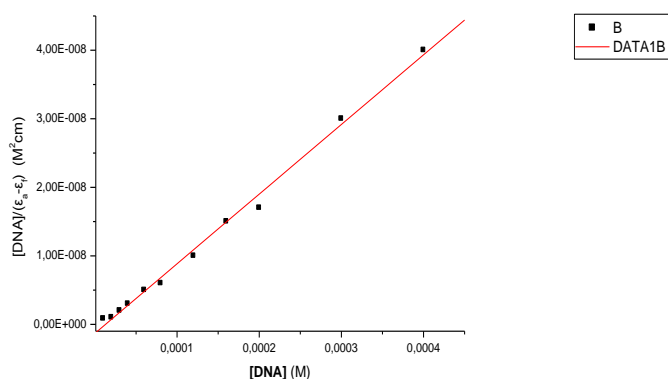
Η γραφική παράσταση του  $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  συναρτήσει της  $[DNA]$  δίνει μια γραμμική ευθεία με κλίση  $1/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  και τομή στον άξονα y ίση με  $1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$ , αντίστοιχα. Με τη βοήθεια της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων υπολογίζεται η

σταθερά σύνδεσης  $K_b$  από το λόγο της κλίσης προς την τομή, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin 8.0.



**Σχήμα 6.1:** Φάσμα τιτλοδότησης του συμπλόκου (1) -  $[\text{complex}]_{\text{TEAL}}=2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[\text{DNA}]=0-30 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

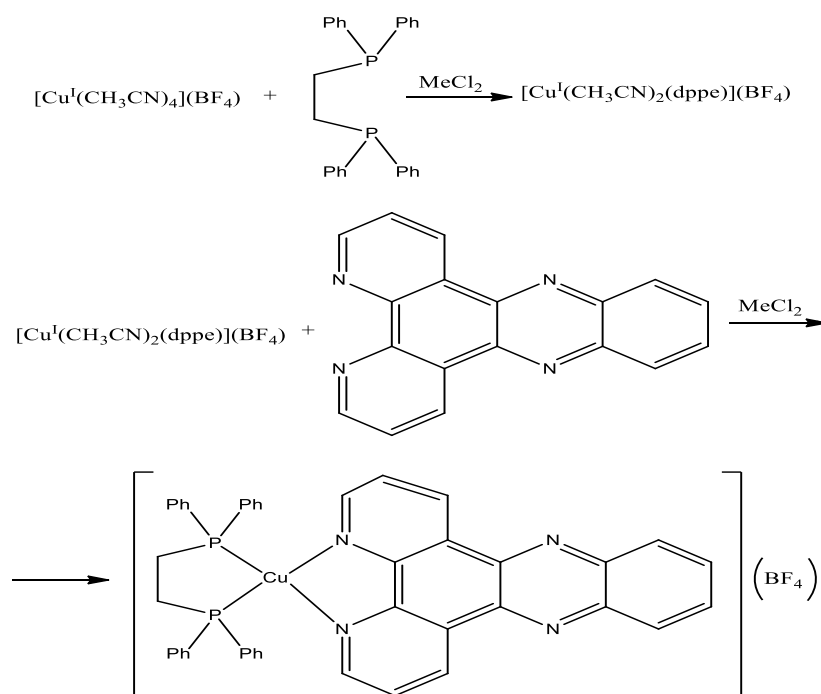
Η εύρεση της σταθεράς σύνδεσης του συμπλόκου επιτυγχάνεται μελετώντας αλλαγές της απορρόφησης της κορυφής στα 384 nm (αναφέρεται στον υποκαταστάτη  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Το διάγραμμα μεταβολής του λόγου  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  συναρτήσει της  $[\text{DNA}]$  δίνεται στο παρακάτω σχήμα. Η σταθερά σύνδεσης που υπολογίζεται με αυτόν τον τρόπο βρέθηκε ίση με  $K_b = 7.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  στα 384 nm. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η σταθερά σύνδεσης είναι αντίστοιχη με αυτή που παρατηρείται για τα σύμπλοκα του  $\text{Ru}^{2+}$  με  $\text{dpprz}$  υποδεικνύοντας ότι το προς μελέτη σύμπλοκο συνδέεται μέσω παρεμβολής με το DNA.



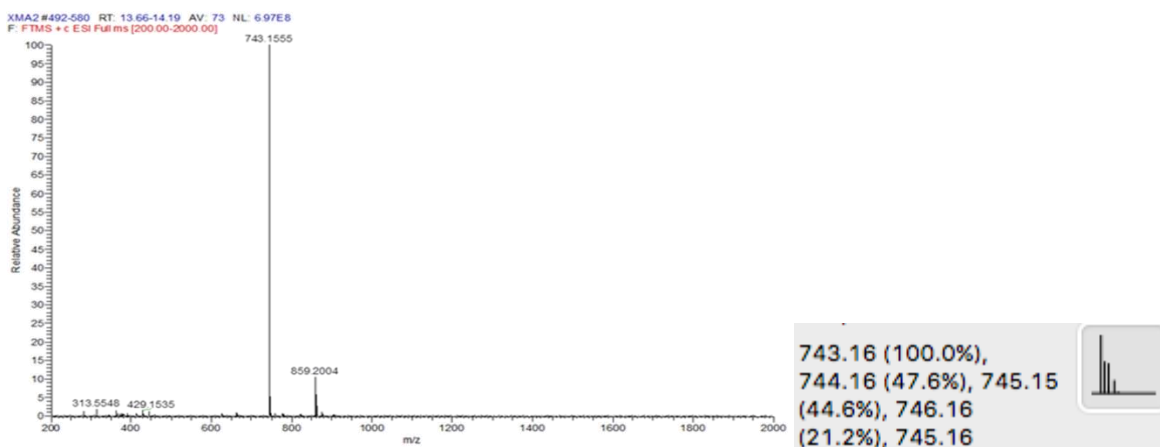
**Σχήμα 6.2:** Καμπύλη μεταβολής του λόγου  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  σε συνάρτηση της συγκέντρωσης  $[\text{DNA}]$  για την κορυφή στα 384 nm ( $K_b = 7.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) του συμπλόκου (1).



Η παραπάνω ακριβώς τεχνική ακολουθήθηκε και για τη μελέτη ενός ακόμα συμπλόκου του  $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{CH}_3\text{CN})_2(\text{dpppe})](\text{BF}_4)$  το οποίο παρασκευάστηκε στο εργαστήριό μας, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



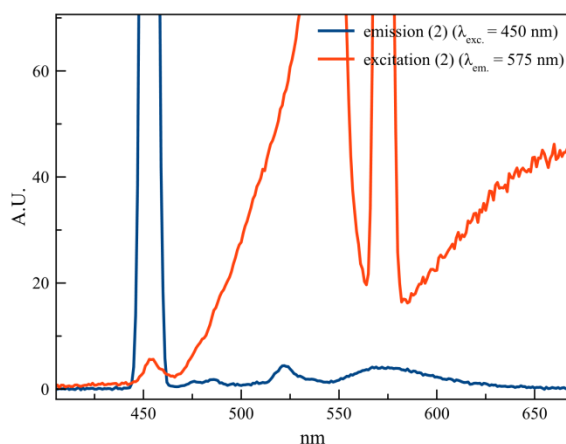
Το παραπάνω σύμπλοκο θα ονομάζεται από εδώ και στο εξής σύμπλοκο **(2)**. Δίδεται παρακάτω το φάσμα μάζας αυτού.



**Σχήμα 6.3:** Φάσμα μάζας συμπλόκου **(2)**, (αριστερά δίνεται το φάσμα και δεξιά το θεωρητικό φάσμα που βρέθηκε μέσω υπολογιστή).

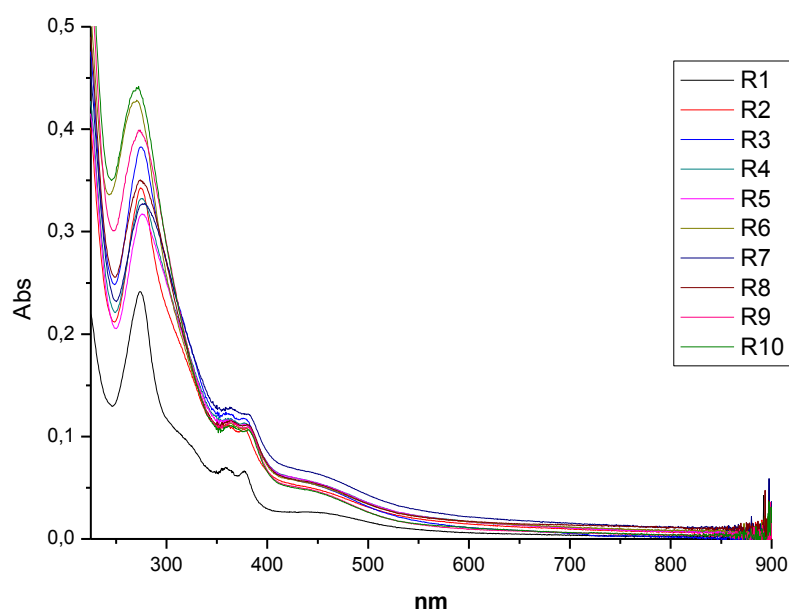
Παρατηρείται μία κύρια κορυφή στα 743.15 που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο όπως φαίνεται και από το θεωρητικό φάσμα. Το φορτίο εδώ είναι (+1) για το χαλκό (Σχήμα 6.3). Οι μετρήσεις έγιναν σε διαλύτη MeOH και η οργανολογία είναι η ίδια με το φάσμα μάζας του συμπλόκου (1).

Παρατίθενται και το φάσμα φθορισμού του συμπλόκου (2) σε διαλύτη MeOH. Στο Σχήμα 6.4 δίδεται το φάσμα διέγερσης καθώς και το φάσμα εκπομπής του συμπλόκου (2).

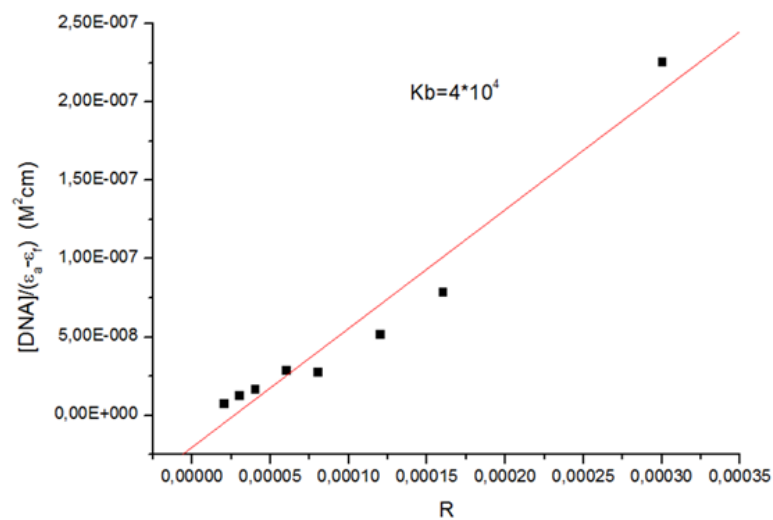


Σχήμα 6.4: Φάσμα φθορισμού του συμπλόκου (2) σε διαλύτη MeOH.

Η εύρεση της σταθεράς σύνδεσης του συμπλόκου επιτυγχάνεται μελετώντας αλλαγές της απορρόφησης της κορυφής στα 377 nm (Σχήμα 6.5), (αναφέρεται στον υποκαταστάτη  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δυο φορές και παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα μεταβολής του λόγου  $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  συναρτήσει της  $[DNA]$  (Σχήμα 6.6). Η σταθερά σύνδεσης υπολογίστηκε με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω και βρέθηκε ίση με  $K_b = 2.7(\pm 1,3) \times 10^4 M^{-1}$  στα 377 nm. Όπως φαίνεται λοιπόν, εμφανίζεται μια αρκετά ισχυρή σύνδεση μεταξύ του συμπλόκου και του DNA χαρακτηριστική για τα σύμπλοκα του χαλκού με διιμίνες.



**Σχήμα 6.5:** Φάσμα πιλοδότησης του συμπλόκου **(2)** με  $[\text{complex}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$  και  $[\text{DNA}] = 0 - 30 \times 10^{-5} \text{ M}$ .



**Σχήμα 6.6:** Καμπύλη μεταβολής του λόγου  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  σε συνάρτηση της συγκέντρωσης  $[\text{DNA}]$  για την κορυφή στα 377 nm του συμπλόκου **(2)**.

## 6.2 ΙΞΩΔΟΜΕΤΡΙΑ

Οι αλλαγές στη δομή του DNA που επέρχονται κατά τη σύνδεσή του με άλλα μόρια ή και ιόντα αποτελούν την πλέον αδιάσειστη απόδειξη όχι μόνο της ύπαρξης αλληλεπίδρασης αλλά και του είδους της. Η ιξωδομετρία είναι η κατ' εξοχήν υδροδυναμική μέθοδος για τη διερεύνηση αυτών των αλληλεπιδράσεων επειδή είναι πολύ ευαίσθητη στις μεταβολές της δομής και του μήκους των αλυσίδων των μακρομορίων, όπως π.χ. του DNA. Είναι δυνατόν, μάλιστα, με μετρήσεις του ιξώδους να διαγνωστεί το είδος της αλληλεπίδρασης, όπως π.χ. παρεμβολή, δέσμευση στις αύλακες κ.α. Ειδικότερα παρατηρείται ότι κλασικά μόρια παρεμβολείς αυξάνουν το ιξώδες του DNA, εφόσον παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών βάσεων της έλικας. Αντίθετα, υπό τις ίδιες συνθήκες, μόρια που δεσμεύονται αποκλειστικά στις αύλακες του DNA προκαλούν κάμψη ή / και περιστροφή της έλικας του DNA, μειώνοντας το μήκος της και κατά συνέπεια και το ιξώδες του μορίου.

Οι μετρήσεις του ιξώδους πραγματοποιήθηκαν σε θερμοστατούμενο ιξωδόμετρο SI Analytics στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Τα διαλύματα παρασκευάζονται με τον ίδιο τρόπο που ακολουθήθηκε στην προηγούμενη τεχνική, με τη διαφορά ότι εδώ διατηρούμε ίδια συγκέντρωση σε DNA ( $5 \times 10^{-5}$ ) και μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου, ώστε να σχηματισθούν διαλύματα διαφορετικών λόγων  $[\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$ . Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων έγιναν τουλάχιστον τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα, οι οποίες δεν έπρεπε να διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερο από 0.3 s και ο τελικός όρος ελήφθη ως ο τελικός χρόνος αυτών. Τα διαλύματα επώαστηκαν πριν μετρηθούν για 24 h.

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

Όπου:

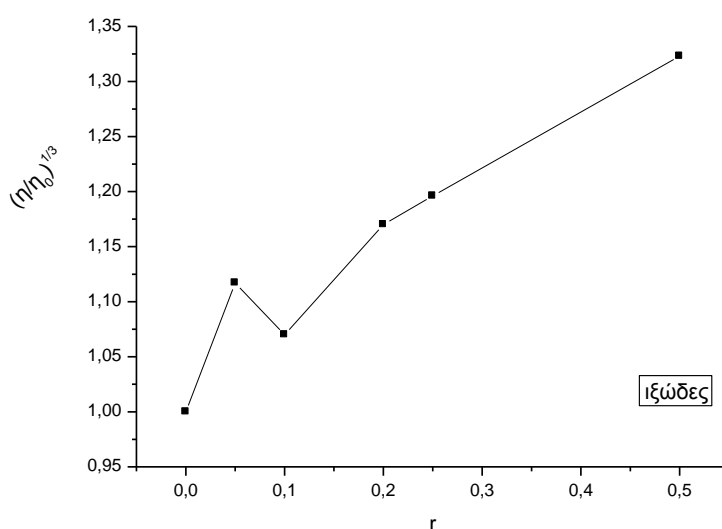
- t: ο χρόνος ροής σε του κάθε διαλύματος και
- $t_0$ : ο χρόνος ροής του διαλύτη

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

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

Όπου:

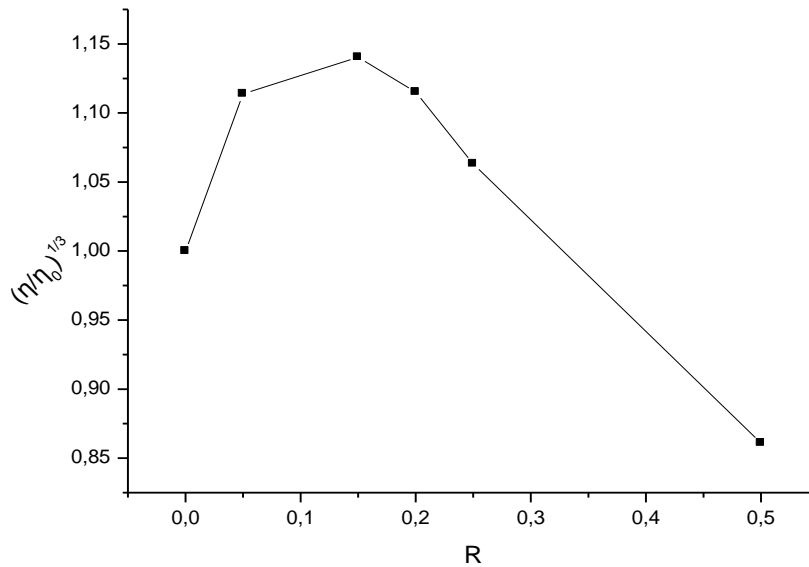
- $L, L_0$ : το πειραματικό μήκος του DNA, παρουσία και απουσία συμπλόκου, αντίστοιχα
- $n, n_0$ : τα σχετικά ιξώδη (για τις συγκεντρώσεις του πειράματος θεωρούνται κατά προσέγγιση ίσα με το ανηγμένο ιξώδες), παρουσία και απουσία συμπλόκου, αντίστοιχα
- $t, t_{DNA}, t_0$ : οι χρόνοι ροής των διαλυμάτων DNA παρουσία του συμπλόκου, του διαλύματος DNA και απουσία του συμπλόκου και του διαλύτη (ρυθμιστικό διάλυμα), αντίστοιχα.



**Σχήμα 6.7:** Η μεταβολή του  $L/L_0=(n/n_0)^{1/3}$  σε συνάρτηση του λόγου R μετά από 24 h επώαση για το σύμπλοκο **(1)**.

Στο **Σχήμα 6.7** παρατηρείται σημαντική αύξηση του ιξώδους γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση που πιθανώς λαμβάνει χώρα εδώ είναι η παρεμβολή.

Ομοίως, για το σύμπλοκο **(2)**, διατηρήθηκαν οι ίδιες συνθήκες και συγκεντρώσεις και παρατίθενται παρακάτω το διάγραμμα. Μέσω των πειραματικών αποτελεσμάτων παρατηρείται ότι σε χαμηλούς λόγους το ιξώδες αυξάνεται, άρα έχουμε πιθανή σύνδεση με παρεμβολή, ενώ όσο οι λόγοι αυξάνονται παρατηρείται μείωση του ιξώδους και συνεπώς ο υποκαταστάτης συνδέεται πιθανώς στις αύλακες του DNA (**Σχήμα 6.8**).



**Σχήμα 6.8:** Η μεταβολή του  $L/L_0=(\eta/\eta_0)^{1/3}$  σε συνάρτηση του λόγου R μετά από 24 h επώαση του συμπλόκου (2).

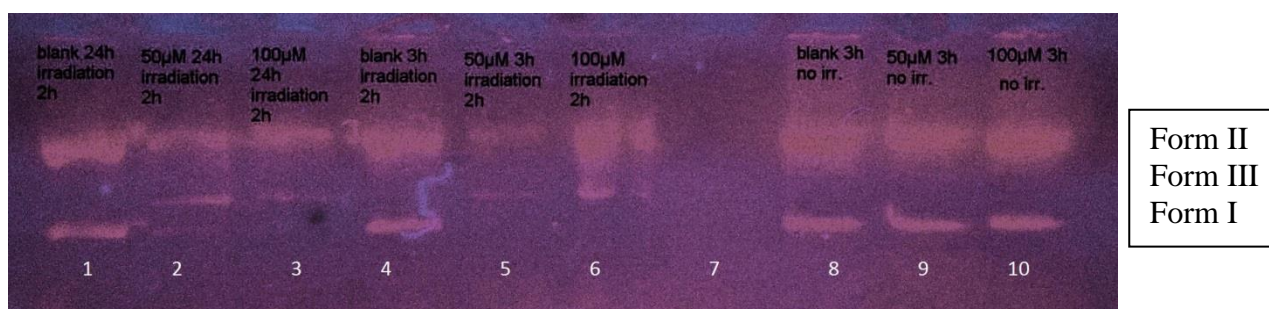
### 6.3 ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΟΥ DNA- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.

*Σημείωση: το βρωμίδιο του αιθιδίου είναι γνωστός μεταλλαξιογόνος παράγοντας και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση των διαλυμάτων και των gel.*

Αρχικά παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης (agarose gel) 1% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1×TBE (0.8 g αγαρόζης σε 80 mL διαλύματος). Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να γίνει διαυγές. Στο θερμό διάλυμα προστίθεται κατάλληλος όγκος βρωμιδίου του αιθιδίου (3.5 μL) ώστε να προκύψει συγκέντρωση 1 μg/mL. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 1×TBE υπό σταθερή τάση 100 V για περίπου 50 min.

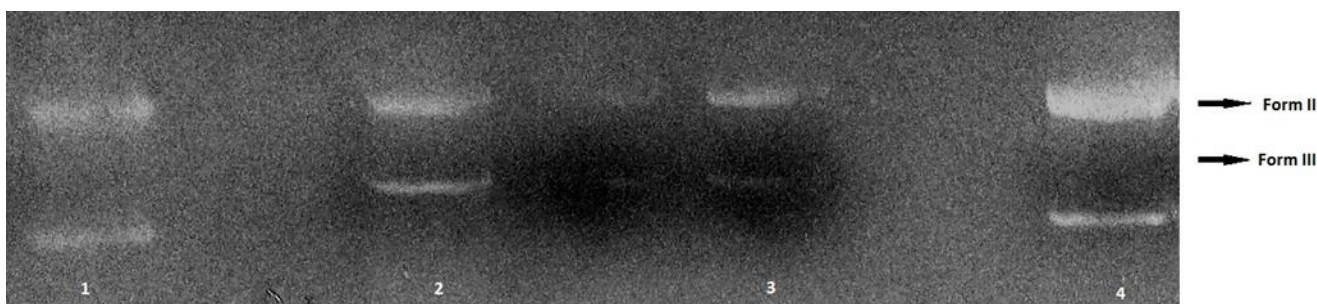
Για τα πειράματα της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε υπερελικωμένο (super coiled) pBR322 πλασμιδίου DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται για τα δείγματα είναι: 2 μL πλασμιδίου επωάζονται με διάφορες συγκεντρώσεις της υπό μελέτης ένωσης (50 μM και 100 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl με 18

mM NaCl, pH=7.2 (συνολικός όγκος διαλύματος=17  $\mu$ L). Τα δείγματα ακτινοβολούνται με λάμπα Xe 1000 W (Oriel, mod 68820, Universal Arc.) και μήκος κύματος ακτινοβόλησης  $\lambda > 335$  nm. Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1%, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος (loading buffer) 1xTBE υπό σταθερή τάση 100 V και για περίπου 50 min. Η απεικόνιση των ζωνών του DNA (staining) γίνεται με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο gel (τελική συγκέντρωση 1  $\mu$ g/mL. Τα gel εμφανίζονται με UV- Trans illuminator και φωτογραφίζονται με ψηφιακή κάμερα.



**Σχήμα 6.9:** Ηλεκτροφόρηση συμπλόκου **(1)**. **No 1:** τυφλό διάλυμα – επώαστηκε 24 h για να έχουμε τις ίδιες ακριβώς συνθήκες με τα δείγματα 2 και 3. **No 2 & 3:** δείγματα με συγκεντρώσεις 50 και 100  $\mu$ M έπειτα από 24 h επώαση και φωτισμό 2 h. **No 4 :** τυφλό διάλυμα- επώαστηκε 3 h για να έχουμε τις ίδιες ακριβώς συνθήκες με τα δείγματα 5 και 6. **No 5 & 6:** δείγματα με συγκεντρώσεις 50 και 100  $\mu$ M έπειτα από 3 ώρες επώαση και φωτισμό 2 ωρών. **No 7:** κενή θέση. **No 8:** τυφλό διάλυμα χωρίς φωτισμό. **No 9, 10:** δείγματα 50 και 100  $\mu$ M αντίστοιχα τα οποία επώαστηκαν 3 ώρες και δεν φωτίστηκαν.

Τα τυφλά διαλύματα περιέχουν 2  $\mu$ L πλασμιδίου, 13  $\mu$ L Buffer και 2  $\mu$ L χρωστικής ενώ τα δείγματα περιέχουν ό,τι και τα αντίστοιχα τυφλά διαλύματα και επιπλέον 4  $\mu$ L συμπλόκου **(1)** ώστε να επιτευχθεί η εκάστοτε επιθυμητή συγκέντρωση. Παρατηρούμε ότι τα δείγματα 2, 3 εμφανίζουν την μορφή III δηλαδή το πλασμίδιο όταν σε αυτό επιδρά το σύμπλοκο «ανοίγει» και εμφανίζει την γραμμική του μορφή. Ωστόσο, παρατηρείται και η μορφή I δηλαδή η ανοιχτή. Στα δείγματα 5, 6 παρατηρείται μόνο η γραμμική μορφή του πλασμιδίου γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα εμφάνισης ισχυρής αλληλεπίδρασης του πλασμιδίου με το σύμπλοκο **(1)**. Στις θέσεις 8, 9, 10 απλά παρατηρούμε ότι απουσία φωτισμού το σύμπλοκο είναι ανενεργό, το οποίο είναι επίσης επιθυμητό. Εδώ τα δείγματα στις θέσεις 9, 10 εμφανίζουν ακριβώς την ίδια εικόνα με το τυφλό της θέσης 8.

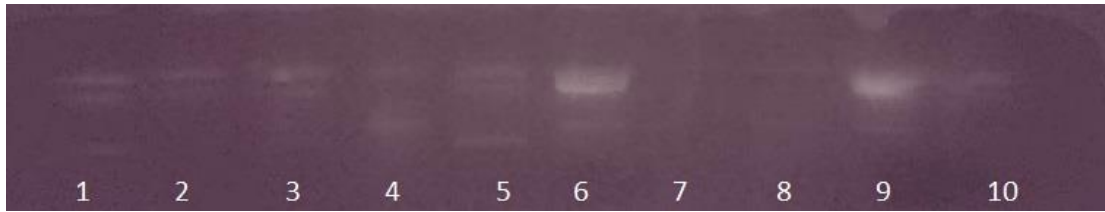


**Σχήμα 6.10:** Ηλεκτροφόρηση συμπλόκου (2). **No 1** : Τυφλό διάλυμα με  $V_{\text{TEΛ}}=17 \mu\text{L}$  (2  $\mu\text{L}$  DNA, 13  $\mu\text{L}$  Buffer, 2  $\mu\text{L}$  χρωστική). **No 2**: Διάλυμα συμπλόκου που έχει ακτινοβοληθεί, συγκέντρωσης  $C_1=0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  και  $V_{\text{TEΛ}}=17 \mu\text{L}$  (2  $\mu\text{L}$  DNA, 8  $\mu\text{L}$  Buffer, 5  $\mu\text{L}$  complex, 2  $\mu\text{L}$  χρωστική). **No 3**: Διάλυμα συμπλόκου που έχει ακτινοβοληθεί, συγκέντρωσης  $C_2=1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  και  $V_{\text{TEΛ}}=17 \mu\text{L}$  (2  $\mu\text{L}$  DNA, 8  $\mu\text{L}$  Buffer, 5  $\mu\text{L}$  complex, 2  $\mu\text{L}$  χρωστική). **No 4**: Διάλυμα συμπλόκου που δεν είχε ακτινοβοληθεί προηγουμένως, συγκέντρωσης  $C_1=0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  και  $V_{\text{TEΛ}}=17 \mu\text{L}$  (2  $\mu\text{L}$  DNA, 8  $\mu\text{L}$  Buffer, 5  $\mu\text{L}$  complex, 2  $\mu\text{L}$  χρωστική).

Στο παραπάνω διάγραμμα της ηλεκτροφόρησης παρατηρείται πως υπάρχουν δύο μορφές, οι μορφές II και III. Η μορφή II είναι η ανοιχτή κυκλική μορφή του DNA και η μορφή III απεικονίζει το γραμμικό DNA. Συνεπώς, γίνεται κατανοητό πως το σύμπλοκο το οποίο συνθέσαμε επιδρά ισχυρά στο DNA.

Σε μια προσπάθεια εύρεσης των δραστικών ειδών οξυγόνου που εμπλέκονται στο μηχανισμό φωτο- επαγόμενης διάσπασης του DNA, πραγματοποιήθηκε ακόμα ένα πείραμα ηλεκτροφόρησης (**Σχήμα 6.11**). Αυτή τη φορά, το υπερελικομένο πλασμίδιο επωάστηκε με τα σύμπλοκα παρουσία ROS αναστολέων και ακτινοβολήθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες με τα προηγούμενα πειράματα πηκτής αγαρόζης. Ως αναστολέας  $\text{OH}^\cdot$  χρησιμοποιήθηκε το DMSO, ενώ ως αναστολέας του  $^1\text{O}_2$  χρησιμοποιήθηκε το  $\text{NaN}_3$ . Η ακτινοβολήση έλαβε χώρα υπό αργό.





**Σχήμα 6.11:** Ηλεκτροφόρηση παρουσία αναστολέων για τα σύμπλοκα **(1)**, **(2)**.  
**No 1:** διάλυμα DNA – επώαστηκε 24 ώρες και φωτίστηκε 2 ώρες υπό αργό.  
**No 2:** τυφλό διάλυμα συμπλόκου **(1)** 50 μM έπειτα από 24 ώρες επώαση και φωτισμό 2 ωρών παρουσία οξυγόνου. **No 3 :** δείγμα συμπλόκου **(1)** 50 μM και 2 μL DMSO έπειτα από 24 ώρες επώαση και φωτισμό 2 ωρών υπό αργό.  
**No 4:** δείγμα συμπλόκου **(1)** 100 μM και DMSO 2 μL έπειτα από 24 ώρες επώαση και φωτισμό 2 ωρών υπό αργό. **No 5:** δείγμα συμπλόκου **(1)** με 50 μM και  $\text{NaN}_3$  έπειτα από 24 ώρες επώαση και φωτισμό 2 ωρών υπό αργό.  
**No 6:** τυφλό διάλυμα συμπλόκου **(2)** 50 μM έπειτα από 24 ώρες επώαση και φωτισμό 2 ωρών παρουσία οξυγόνου. **No 7:** δείγμα συμπλόκου **(2)** 50 μM και DMSO 2 μL έπειτα από 24 ώρες επώαση και φωτισμό 2 ωρών υπό αργό. **No 8:** δείγμα συμπλόκου **(2)** με 100 μM και DMSO 2 μL έπειτα από 24 ώρες επώαση και φωτισμό 2 ωρών υπό αργό. **No 9:** δείγμα συμπλόκου **(2)** 50 μM και  $\text{NaN}_3$  έπειτα από 24 ώρες επώαση και φωτισμό 2 ωρών υπό αργό. **No 10:** ΚΕΝΟ.

Παρατηρούμε ότι δυστυχώς οι ζώνες του DNA δεν φαίνονται επαρκώς ώστε να μπορούμε να αποφανθούμε ως προς το μηχανισμό της αντίδρασης. Αυτό που πρέπει να τονιστεί εδώ είναι πως το πείραμα αυτό χρήζει επανάληψης.

#### 6.4 ΚΥΚΛΙΚΟΣ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΣ

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το σύμπλοκο αλλάζει τη B-δομή του DNA πραγματοποιήθηκε το πείραμα του κυκλικού διχρωισμού. Τα νουκλεϊνικά οξέα είναι πολυμερή με μια σπονδυλική στήλη που αποτελείται από σάκχαρο και φωσφορικό άλας, και μια αρωματική βάση που συνδέεται ως δευτερεύουσα ομάδα με κάθε σάκχαρο. Οι ομάδες φωσφορικού άλατος έχουν ηλεκτρονικές μεταπτώσεις μόνο σε υψηλή ενέργεια, σε μήκη κύματος μικρότερα από 170 nm.

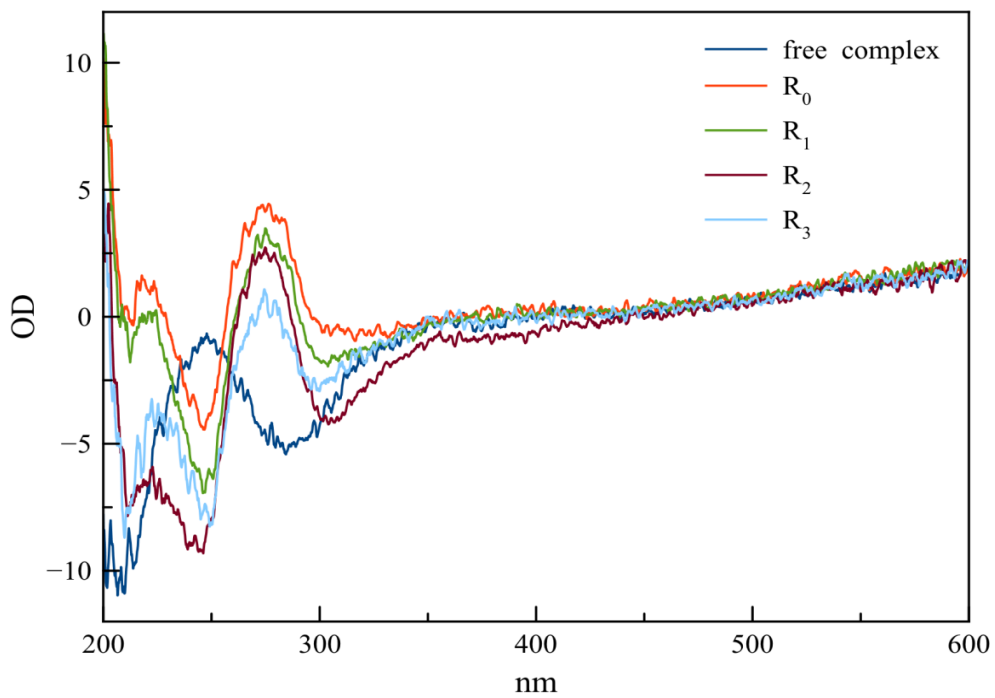
Το σάκχαρο, που είναι η ριβόζη στην περίπτωση του RNA και η δεοξυριβόζη στην περίπτωση του DNA, έχει ηλεκτρονικές ταινίες απορρόφησης χαμηλής έντασης που αρχίζουν περίπου στα 190 nm. Τα χρωμοφόρα στα νουκλεϊνικά οξέα είναι οι βάσεις: αδερίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C), και ουρακίλη (U) στην περίπτωση του RNA, και αδερίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, και

θυμίνη (T) στην περίπτωση του DNA. Οι βάσεις από μόνες τους έχουν ένα επίπεδο συμμετρίας, και έτσι δεν είναι πραγματικά οπτικά ενεργές. Εντούτοις, η ριβόζη και η δεοξυριβόζη είναι ασύμμετρα σάκχαρα, και δεδομένου ότι οι βάσεις είναι συνδεδεμένες με τον C1' άνθρακα αυτών των σακχάρων, το σάκχαρο μπορεί να δώσει το φαινόμενο του κυκλικού διχρωισμού στις ταινίες απορρόφησης των χρωμοφόρων βάσεων.

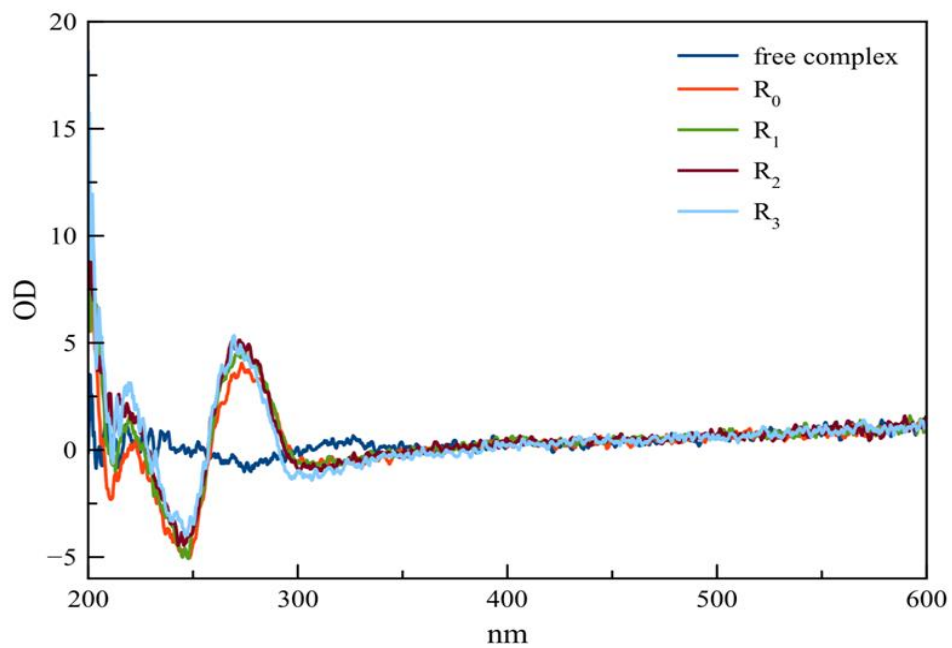
Ο κυκλικός διχρωισμός των νουκλεϊκών οξέων εξαρτάται κυρίως από τη γεωμετρία στοίβαξης των βάσεων. Ο συνδυασμός των υδρόφοβων επιπέδων (αρωματικό π-σύστημα βάσεων και των υδρόφιλων άκρων των βάσεων (ομάδες NH, NH<sub>2</sub> και CO) αναγκάζουν τις βάσεις να στοιβαχτούν και ωθούν το μακρομόριο να υιοθετήσει ελικοειδή δομή. Η χειραλικότητα που προκαλείται στις ελικοειδείς δομές από τα ασύμμετρα σάκχαρα δίνει στο μόριο συνολικά μια έξοχη ασυμμετρία. Οι ηλεκτρονικές μεταπτώσεις των χρωμοφόρων είναι πλέον σε άμεση γεινίαση και μπορούν να αλληλεπιδράσουν, δίνοντας έτσι ισχυρά διχρωικά σήματα.

Παρασκευάστηκαν λόγοι  $[complex]/[DNA]$  οι οποίοι είναι  $R=0$ ,  $R_1=0,05$ ,  $R_2=0,1$  και  $R_3=0,25$  ( $C_{DNA}=10^{-5}$  M) και για τα δύο σύμπλοκα. Επίσης, για κάθε σύμπλοκο ελήφθησαν τα αντίστοιχα φάσματα που περιείχαν μόνο την ουσία, σε διαλύτη ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Παρακάτω δίνονται τα διαγράμματα (**Σχήμα 6.12**, **Σχήμα 6.13**). Παρατηρείται ότι για  $R_0=0$ , δηλαδή εκεί που υπάρχει μόνο το DNA βλέπει κανείς τις δύο χαρακτηριστικές κορυφές του, την αρνητική στα 246 nm και τη θετική στα 278 nm. Οποιαδήποτε αλλαγή σε αυτές τις κορυφές παρατηρείται, συνεπάγεται αλληλεπίδραση συμπλόκου-DNA.

Όπως εύκολα παρατηρεί κανείς στο **Σχήμα 6.12** με την αύξηση της συγκέντρωσης του συμπλόκου (**1**) μειώνεται η ένταση της κορυφής στα 275 nm που είναι χαρακτηριστική της δεξιόστροφης έλικας και αυξάνεται η αρνητική ταινία στα 248 nm που οφείλεται στις π-π\* αλληλεπιδράσεις. Δεν παρατηρείται μετατόπιση των δύο κορυφών. Αυτό σημαίνει ότι πιθανότατα η αλληλεπίδραση που εμφανίζεται εδώ είναι η παρεμβολή χωρίς να παρατηρείται μεταβολή της ελικότητας τουλάχιστον για τους λόγους που ελήφθησαν τα φάσματα.



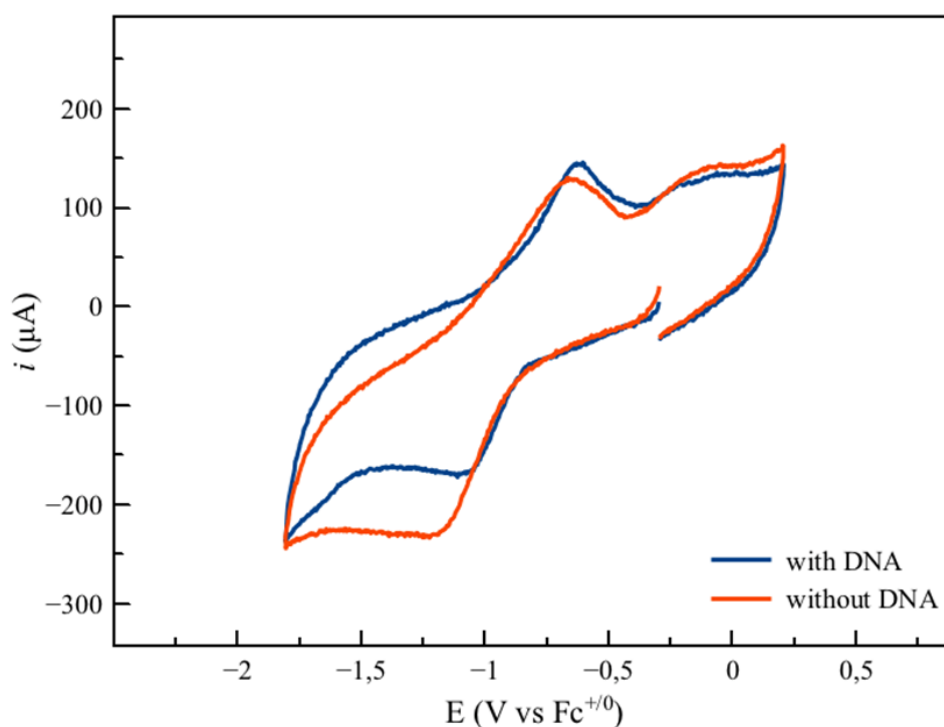
**Σχήμα 6.12:** Διάγραμμα κυκλικού διχρωισμού για το σύμπλοκο (1).



**Σχήμα 6.13:** Διάγραμμα κυκλικού διχρωισμού για το σύμπλοκο (2).

Στο πείραμα του συμπλόκου **(2)**, το οποίο έλαβε χώρα στις ίδιες συνθήκες με το σύμπλοκο **(1)** παρατηρείται μια μικρή αύξηση της έντασης και των δύο κορυφών καθώς αυξάνεται η συγκεντρώνση του συμπλόκου **(2)** χωρίς μετατόπιση των κορυφών. Ταυτόχρονα φαίνεται ότι μεταβάλλεται και το φάσμα του συμπλόκου **(2)** με απόσβεση της κορυφής στα 320 nm. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα αυτή η ένωση να αλληλεπιδρά μέσω παρεμβολής αλλά και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Το τελευταίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα της ιξωδομετρίας.

Για το σύμπλοκο **(2)**, ελήφθη κυκλικό βολταμογράφημα. Αυτό για το σύμπλοκο **(1)** δεν ήταν εφικτό καθώς δεν εμφάνιζε καλή διαλυτότητα σε κανέναν διαλύτη στις απαιτούμενες- για το πείραμα- συγκεντρώσεις.



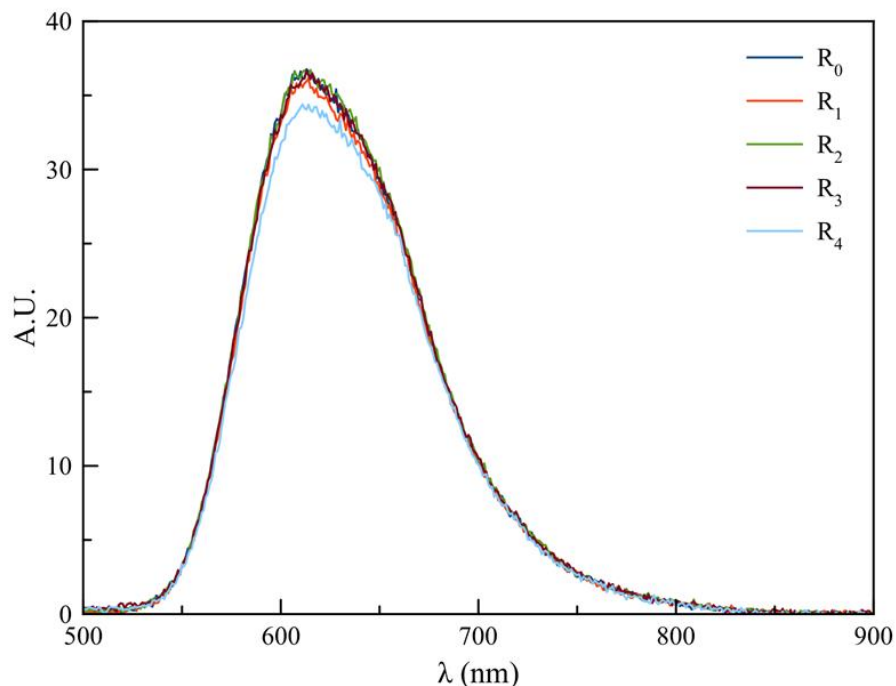
**Σχήμα 6.14:** Διάγραμμα κυκλικής βολταμμετρίας για το σύμπλοκο **(2)**.

Η πειραματική μελέτη του συμπλόκου **(2)** με τη διαδικασία της κυκλικής βολταμμετρίας έγινε παρουσία και απουσία DNA. Γενικά, αυτή η μέθοδος εμφανίζεται να είναι ένα χρήσιμο συμπλήρωμα των προαναφερθέντων τεχνικών αλληλεπίδρασης μίας ουσίας με το DNA. Παρατηρείται στο **Σχήμα 6.14** ότι παρουσία DNA το βολταμογράφημα μετατοπίζεται σε θετικότερες τιμές ρεύματος καθώς και θετικότερες τιμές δυναμικών. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα σε μεγάλες συγκεντρώσεις το σύμπλοκο **(2)** να δρα και παρεμβολικά στο DNA, κάτι που μέχρι τώρα δεν είχαμε δει από τις άλλες τεχνικές.

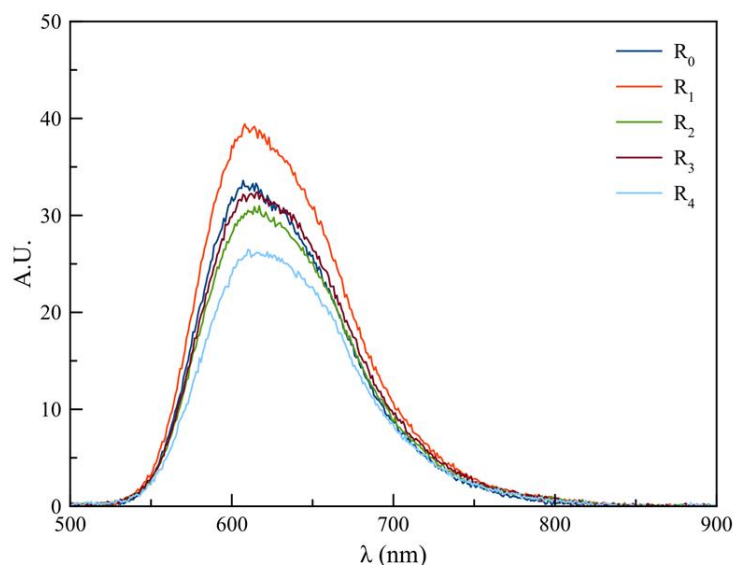
## 6.5 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

Τα πειράματα εκπομπής πραγματοποιήθηκαν πανομοιότυπα και για τα δύο σύμπλοκα. Παρασκευάστηκαν τέσσερις λόγοι  $[\text{complex}]/[\text{DNA}]$  από το καθένα καθώς και το αντίστοιχο τυφλό ( $R_0$ ) τα οποία επωάστηκαν 24 h. Ο κάθε λόγος R περιέχει και συγκεκριμένη ποσότητα  $[\text{DNA}]/[\text{E.B.}] = 1$ , βρωμιούχου αιθιδίου, ο οποίος αποτελεί κλασικό παρεμβολέα του DNA. Ο λόγος ύπαρξης του E.B. στα δείγματα είναι ότι και τα δύο σύμπλοκα φθορίζουν αλλά ο φθορισμός τους είναι αρκετά μικρός. Η λογική που ακολουθήθηκε επομένως ήταν να παρατηρήσουμε τι παθαίνει ο η ένταση του φθορισμού του E.B. μέσα στο DNA παρουσία των συμπλόκων σε διάφορες συγκεντρώσεις κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση του DNA.

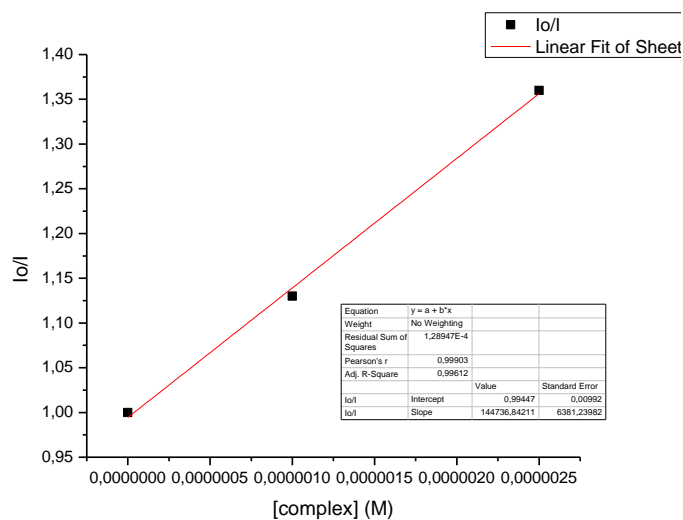
Στο **Σχήμα 6.15** παρατηρούμε το φάσμα εκπομπής του αιθιδίου παρουσία του συμπλόκου **(1)** και βλέπουμε ότι αυξάνοντας τη συγκέντρωσή του οι αλλαγές των φασμάτων είναι σχεδόν ανεπαίσθητες εκτός από τον μεγαλύτερο λόγο ( $R_4$ ) όπου η ένταση της εκπομπής μειώνεται. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα το σύμπλοκο **(1)** δρα ανταγωνιστικά ως προς το αιθίδιο και μειώνει το φθορισμό του.



**Σχήμα 6.15:** Φάσμα εκπομπής του αιθιδίου παρουσία συμπλόκου **(1)**.



**Σχήμα 6.16 (α):** Φάσμα εκπομπής αιθιδίου παρουσία συμπλόκου (2).



**Σχήμα 6.16 (β):** Διάγραμμα Stern-Volmer ( $\lambda_{\text{emission}} = 630 \text{ nm}$ ) διαλύματος DNA-βρωμίδιο του αιθιδίου κατά την προσθήκη συμπλόκου (2) που συνδέεται με το DNA μέσω παρεμβολής. Η τιμή  $K_{\text{sv}}$  βρέθηκε ίση με  $1,45 \times 10^5$ .

Στο **Σχήμα 6.16 (α)** βλέπουμε το φάσμα εκπομπής του αιθιδίου του βρωμιδίου παρουσία του συμπλόκου (2) όπου παρατηρούμε σημαντική μείωση του φθορισμού. Αυτό προφανώς οφείλεται στην ικανότητα του συμπλόκου (2) να αντικαταστά το αιθίδιο του βρωμιδίου και πιθανόν να ανταγωνίζεται για την ίδια θέση σύνδεσης του DNA. Από το **Σχήμα 6.16 (β)** και τη σχέση:

$I_0/I=1+K_{sv}[\text{complex}]$ , όπου  $I_0$  και  $I$  είναι οι εντάσεις εκπομπής απουσία και παρουσία του συμπλόκου μπορούμε να υπολογίσουμε την σταθερά Stern-Volmer,  $K_{sv}$ .

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

#### 7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυτταροτοξική μελέτη των συμπλόκων **(1)** και **(2)** έγινε με τη μέθοδο MTT. Για τον προσδιορισμό της τιμής  $IC_{50}$  κατασκευάζεται γραφική παράσταση της % βιωσιμότητας των κυττάρων σύμφωνα με την εξίσωση:

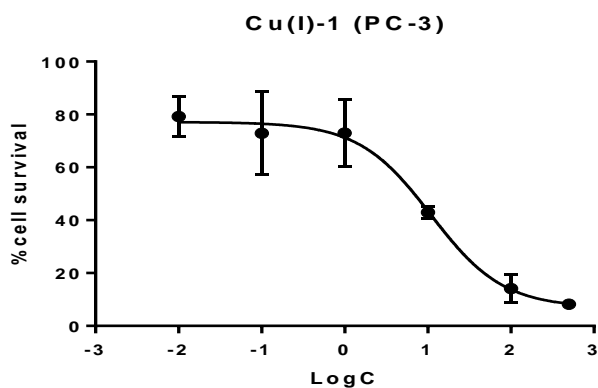
$$\% \text{cellviability} = (OD_i / OD_{\text{control}}) * 100$$

Η τιμή αυτή είναι η συγκέντρωση (σε  $\mu\text{M}$ ) στην οποία παρατηρείται θνησιμότητα των κυττάρων σε ποσοστό 50 % και εκφράζει το μέτρο της κυτταροτοξικότητας μιας ένωσης. Επομένως, όσο χαμηλότερη είναι αυτή η τιμή τόσο πιο τοξική είναι η ένωση αυτή. Για τον προσδιορισμό της τιμής αυτής κατασκευάζονται σιγμοειδείς καμπύλες για κάθε σύμπλοκο και χρησιμοποιείται ως τυφλό το γνωστό αντικαρκινικό cis-platin. Μελετήθηκαν και τα δύο σύμπλοκα σε τρεις διαφορετικές σειρές, την **PC-3** (prostate cancer), την **U-87MG** (glioblastoma, καρκινική σειρά στο κεφάλι), και τέλος την **3-T3** (λιπώδης φυσιολογικός ιστός ποντικού).

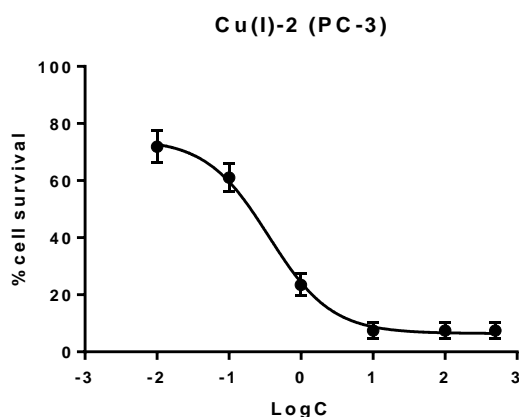
#### 7.2 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ **(1)** ΚΑΙ **(2)** ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ PC-3.

Για τον προσδιορισμό της τιμής αυτής κατασκευάζονται σιγμοειδείς καμπύλες για κάθε σύμπλοκο και χρησιμοποιείται ως τυφλό το αντικαρκινικό cis-platin. Μελετήθηκαν και τα δύο σύμπλοκα σε τρεις ανθρώπινες καρκινικές σειρές, την **PC-3** (prostate cancer), την **U-87MG** (glioblastoma), και την **3-T3** (λιπώδης ιστός). Παρατηρούμε από τον **Πίνακα 7.1** ότι οι τιμές του  $IC_{50}$  σε σύγκριση με το cis-platin είναι για το σύμπλοκο **(1)** μεγαλύτερες από το τυφλό (**Σχήμα 7.3**) το οποίο συνεπάγεται ότι απαιτείται πολύ μεγάλη συγκέντρωση συμπλόκου **(1)** για την νέκρωση των καρκινικών κυττάρων. Το σύμπλοκο **(2)** όμως, εμφανίζει πολύ καλή τιμή στις ίδιες καρκινικές σειρές αφού είναι πολύ χαμηλότερη από το τυφλό. Αυτό μας ενθαρρύνει αφού σημαίνει ότι σε μικρές συγκεντρώσεις το σύμπλοκο **(2)** είναι ικανό να προκαλέσει νέκρωση των καρκινικών κυττάρων.

Παρακάτω (Σχήμα 7.1, Σχήμα 7.2) παρατίθενται και τα αντίστοιχα διαγράμματα των καμπυλών.



Σχήμα 7.1: Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο (1) στην σειρά PC-3.

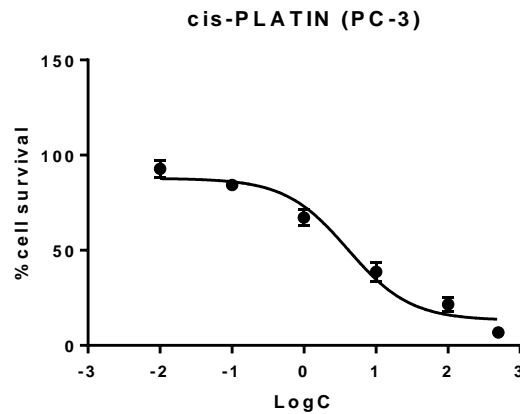


Σχήμα 7.2: Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο (2) στην σειρά PC-3.

Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα για την καρκινική σειρά PC-3.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	IC <sub>50</sub> / PC-3
Σύμπλοκο (1)	12,8±0.8
Σύμπλοκο (2)	0,3689±0.06
cis-platin (τυφλό)	3,18±1.2

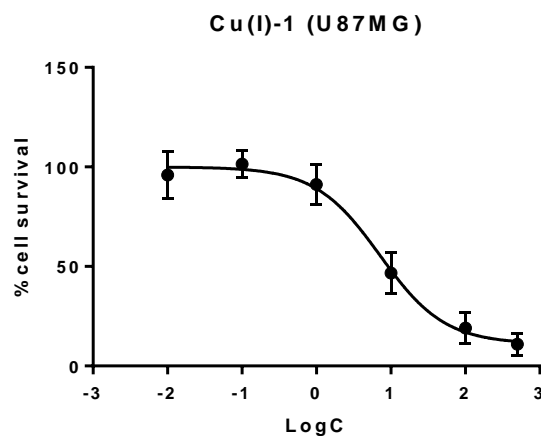




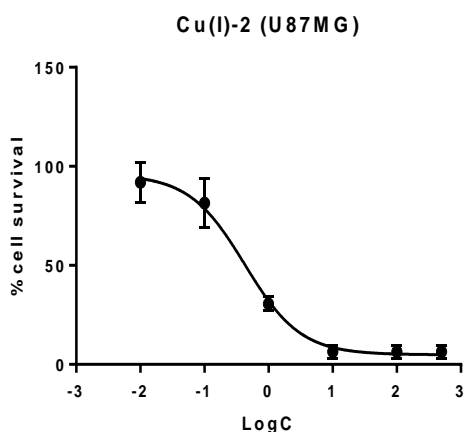
**Σχήμα 7.3:** Σιγμοειδής καμπύλη για το τυφλό (cis-platin) στην σειρά PC-3.

### 7.3 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (1) ΚΑΙ (2) ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ U-87MG.

Εδώ μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων στην καρκινική σειρά U-87MG. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον **Πίνακα 7.2** ενώ το **Σχήμα 7.4** και **Σχήμα 7.5** απεικονίζουν τη σιγμοειδή καμπύλη του συμπλόκου (1) και (2) αντίστοιχα. Το **Σχήμα 7.6** απεικονίζει το cis-platin.

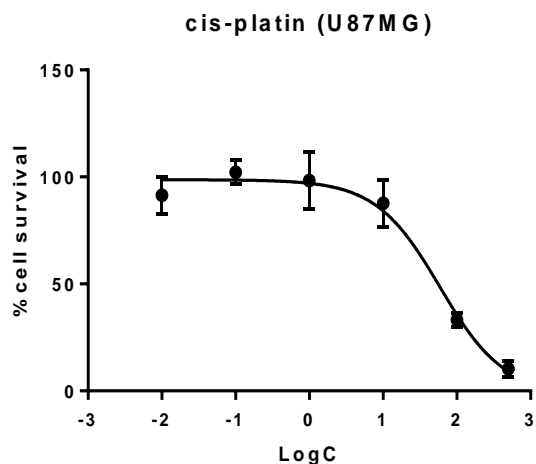


**Σχήμα 7.4:** Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο (1) στην σειρά U-87MG.



**Σχήμα 7.5:** Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο (1)

στην σειρά U-87MG.



**Σχήμα 7.6:** Σιγμοειδής καμπύλη τυφλού.

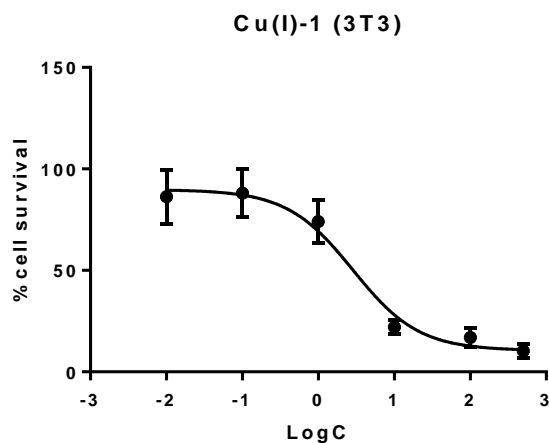
**Πίνακας 7.2:** Αποτελέσματα για την καρκινική σειρά U-87MG.

<b>ΔΕΙΓΜΑΤΑ</b>	<b>EC50_U87MG (μM)</b>
<b>Σύμπλοκο (1)</b>	<b>7,537±2,3</b>
<b>Σύμπλοκο (2)</b>	<b>0,4775±0,011</b>
<b>cis-platin (τυφλό)</b>	<b>48,00333±5.1</b>

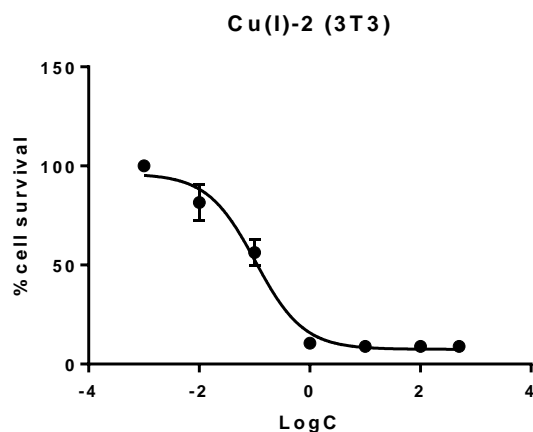
Είναι φανερό ότι και τα δύο σύμπλοκα δρουν με εξαιρετική τοξικότητα απέναντι στα καρκινικά κύτταρα αυτής της σειράς. Ειδικά το σύμπλοκο (2) δίνει πάρα πολύ χαμηλή τιμή όπως και στην προηγούμενη σειρά. Εδώ όμως και το σύμπλοκο (1) δίνει εξαιρετική τιμή συγκρινόμενη με το cis-platin.

#### 7.4 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ (1) ΚΑΙ (2) ΣΤΗ ΣΕΙΡΑ 3-T3.

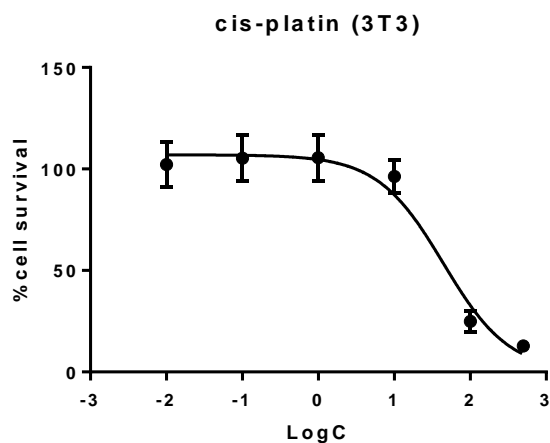
Εδώ μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων στη σειρά 3-T3 που είναι υγιή κύτταρα ποντικού. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 7.3 ενώ το Σχήμα 7.7 και Σχήμα 7.8 απεικονίζουν τη σιγμοειδή καμπύλη του συμπλόκου (1) και (2) αντίστοιχα. Το Σχήμα 7.9 απεικονίζει το cis-platin.



Σχήμα 7.7: Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο (1) στην σειρά 3-T3.



Σχήμα 7.8: Σιγμοειδής καμπύλη για το σύμπλοκο (2) στην σειρά 3-T3.



**Σχήμα 7.9:** Σιγμοειδής καμπύλη για το τυφλό στην σειρά 3-T3.

**Πίνακας 7.3:** Αποτελέσματα για την καρκινική σειρά 3-T3.

<b>ΔΕΙΓΜΑΤΑ</b>	<b>3T3</b>
<b>Σύμπλοκο (1)</b>	<b>3.06±0,11</b>
<b>Σύμπλοκο (2)</b>	<b>0.10±0,043</b>
<b>cis-platin (τυφλό)</b>	<b>42,12±7.9</b>

Παρατηρούνται πολύ χαμηλές τιμές και για τα δύο σύμπλοκα σε σχέση με το cis-platin. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα σύμπλοκα **(1)**, **(2)** προσβάλλουν τη συγκεκριμένη σειρά υγιών κυττάρων και η δράση τους χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου  $[\text{Cu}(2,2'\text{-bis-COOEtDppz})_2](\text{BF}_4)$  με φασματοσκοπία NMR, FT-IR, UV-vis και MS .

Τα σύμπλοκο αυτό καθώς και το σύμπλοκο  $[\text{Cu}(\text{dppz})(\text{dprpe})](\text{BF}_4)$  μελετήθηκαν κατά την αλληλεπίδραση τους με φυσικό DNA από θύμο αδένου βοειδούς. Η αλληλεπίδραση μελετάται με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους, με φασματοσκοπία εκπομπής, με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού, με ιξωδομετρία, κυκλική βολταμμετρία και ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης. Τα αποτελέσματα δείχνουν για το σύμπλοκο του  $[\text{Cu}(2,2'\text{-bis-COOEtDppz})_2](\text{BF}_4)$  ότι αλληλεπιδρά με το CT-DNA μέσω παρεμβολής. Η σταθερά σύνδεσης προσδιορίστηκε σε  $7.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  στα 384 nm. Για το σύμπλοκο του  $[\text{Cu}(\text{dppz})(\text{dprpe})](\text{BF}_4)$  η αλληλεπίδραση με το DNA είναι τόσο μέσω παρεμβολής όσο και ηλεκτροστατικά μέσω συναρμογής στην εξωτερική αύλακα. Η σταθερά σύνδεσης προσδιορίστηκε σε  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  στα 377 nm.

Τα δύο σύμπλοκα μελετήθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης, όπου παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει διάσπαση του DNA θερμικά λόγω της αλληλεπίδρασής του με τα σύμπλοκα **(1)** και **(2)**, αλλά μετά από ακτινοβολήση λόγω σχηματισμού  $^1\text{O}_2$ , παρατηρείται η γραμμική μορφή του πλασμιδίου.

Μελέτη της κυτταροτοξικής τους δράσης έναντι δύο καρκινικών σειρών PC-3 (προστάτη) και U-87MG (γλυοβλαστώματος) έδειξε ότι και τα δύο σύμπλοκα παρουσιάζουν πολύ καλά αποτελέσματα συγκρινόμενα με το κλινικά εφαρμοζόμενο φάρμακο της cis-πλατίνας.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) K.A. Δημόπουλος; Σ. Αντωνόπουλος. *Βασική Βιοχημεία*; 2000.
- (2) L. Stryer. *Βιοχημεία*, 2013, 5 Ed, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης; 2013; Vol. 5 Ed,.
- (3) Metcalfe, C.; Thomas, J. A. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32 (4), 215–224.
- (4) Boger, D. L.; Johnson, D. S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35 (13-14), 1438–1474.
- (5) Strekowski, L.; Wilson, B. *Non-Covalent Chem. Interact. Mech. Consequences* **2007**, 623 (1–2), 3–13.
- (6) Wilson, W. D. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Meth-Cohn, S. D. B. N., Ed.; Pergamon: Oxford, 1999; pp 427–476.
- (7) Strekowski, L., A. C. *Adv Detail. React Mech* **1992**, 2, 61–109.
- (8) Kopka, M. L.; Fratini, A. V.; Drew, H. R.; Dickerson, R. E. *J. Mol. Biol.* **1983**, 163 (1), 129–146.
- (9) Taberner, L.; Verdaguer, N.; Coll, M.; Fita, I.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Rich, A.; Aymami, J. *Biochemistry (Mosc.)* **1993**, 32 (33), 8403–8410.
- (10) Gao, Q.; Williams, L. D.; Egli, M.; Rabinovich, D.; Chen, S. L.; Quigley, G. J.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88 (6), 2422–2426.
- (11) Triesscheijn, M.; Baas, P.; Schellens, J. H. M.; Stewart, F. A. *The Oncologist* **2006**, 11 (9), 1034–1044.
- (12) von Tappeiner H, Jesionek H. *Munch Med Wochenschr* **1903**, 47, 2042–2044.
- (13) von Tappeiner HA, Jodlbauer A. Die. *Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen: Gesammelte Untersuchungen Über die Photodynamische Erscheinung.*; F.C.W. Vogel: Leipzig, Germany, 1907.
- (14) Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R et al. *J Natl Cancer Inst* **1975**, 55, 115–121.
- (15) Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A et al. *Cancer Res* **1978**, 38, 2628–2635.
- (16) Kelly JF, Snell ME. *J Urol* **1976**, 115, 150–151.

- (17) Foote, C. S. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54* (5), 659–659.
- (18) Henderson, B. W.; Gollnick, S. O.; Snyder, J. W.; Busch, T. M.; Kousis, P. C.; Cheney, R. T.; Morgan, J. *Cancer Res.* **2004**, *64* (6), 2120–2126.
- (19) Morlet, L.; Vonarx-Coinsmann, V.; Lenz, P.; Foultier, M.-T.; de Brito, L. X.; Stewart, C.; Patrice, T. *J. Photochem. Photobiol. B* **1995**, *28* (1), 25–32.
- (20) Veenhuizen RB, Ruevekamp MC, Oppelaar H et al, *J. Int J Cancer* **1997**, *73*, 230–235.
- (21) Ris HB, Altermatt HJ, Stewart CM et al. *Int J Cancer* **1993**, *55*, 245–249.
- (22) Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. *J Natl Cancer Inst* **1961**, *26*, 1–11.
- (23) Divaris, D. X.; Kennedy, J. C.; Pottier, R. H. *Am. J. Pathol.* **1990**, *136* (4), 891–897.
- (24) Ma, L.; Moan, J.; Berg, K. *Int. J. Cancer* **1994**, *57* (6), 883–888.
- (25) Rezzoug, H.; Barberi-Heyob, M.; Merlin, J.; Bolotine, L.; Lignon, D.; Guillemin, F. *Bull. Cancer (Paris)* **1996**, *83* (10), 816–822.
- (26) van Geel, I. P. J.; Oppelaar, H.; Oussoren, Y. G.; Van Valk, M. A. D.; Stewart, F. A. *Int. J. Cancer* **1995**, *60* (3), 388–394.
- (27) Yow, C. M. .; Chen, J. .; Mak, N. .; Cheung, N. .; Leung, A. W. . *Cancer Lett.* *157* (2), 123–131.
- (28) van den Bergh H. *Endoscopy* **1998**, *30* (4), 392–407.
- (29) Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Kelly, J. In *Less Common Metals in Proteins and Nucleic Acid Probes; Structure and Bonding*; Springer Berlin Heidelberg, 1998; Vol. 92, pp 163–216.
- (30) Nordén B1, Lincoln P, Akerman B, Tuite E. *Met Ions Biol Syst* **1996**, *33*, 177–252.
- (31) B. Norden, P. L.; B. Akerman, E. T. *Probing of Nucleic Acids by Metal Ion Complexes of Small Molecules*; Metal Ions in Biological Systems; CRC Press, 1996; Vol. 33.
- (32) Juris, A.; Balzani, V.; Barigelletti, F.; Campagna, S.; Belser, P.; von Zelewsky, A. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *84*, 85–277.
- (33) Balzani, V.; Ballardini, R. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52* (2), 409–416.
- (34) K. Kalyanasundaram, *Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes*, Academic Press, London, 1992.

- (35) Bruhn, S. L.; Toney, J. H.; Lippard, S. J. In *Progress in Inorganic Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 2007; pp 477–516.
- (36) M. Sip, M. Leng. *Nucleic Acids and Molecular Biology, Volume 7* 1993.
- (37) Horváth, O. *Coord. Chem. Rev.* **1994**, 135–136, 303–324.
- (38) Ferraudi, G.; Muralidharan, S. *Coord. Chem. Rev.* **1981**, 36 (1), 45–88.
- (39) Horváth, A.; Zsilák, Z.; Papp, S. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **1989**, 50 (1), 129–139.
- (40) Davis, D. D.; King, G. K.; Stevenson, K. L.; Birnbaum, E. R.; Hageman, J. H. *J. Solid State Chem.* **1977**, 22 (1), 63–70.
- (41) Stevenson, K. L.; Davis, D. D. *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* **1976**, 12 (12), 905–909.
- (42) Davis, D. D.; Stevenson, K. L.; Davis, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100 (17), 5344–5349.
- (43) Horvath, O.; Fendler, J. H.; Stevenson, K. L. *Inorg. Chem.* **1993**, 32 (2), 227–230.
- (44) Stevenson, K. L.; Berger, R. M.; Grush, M. M.; Stayanoff, J. C.; Horváth, A.; Horváth, O. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **1991**, 60 (2), 215–227.
- (45) J. Sýkora, J. Š.; D. Valigura. *Chem Zvesti* **1981**.
- (46) Stevenson, K. L.; Braun, J. L.; Davis, D. D.; Kurtz, K. S.; Sparks, R. I. *Inorg. Chem.* **1988**, 27 (20), 3472–3476.
- (47) Stevenson, K. L.; Grush, M. M.; Kurtz, K. S. *Inorg. Chem.* **1990**, 29 (17), 3150–3153.
- (48) Horváth, O.; Papp, S. *J. Photochem.* **1985**, 30 (1), 47–61.
- (49) Noyes, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78 (21), 5486–5490.
- (50) Stevenson, K. L.; Kaehr, D. M.; Davis, D. D.; Davis, C. R. *Inorg. Chem.* **1980**, 19 (3), 781–783.
- (51) Horváth, O.; Papp, S. *J. Photochem.* **1985**, 31 (2–3), 211–222.
- (52) Horváth, O. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **1988**, 44 (3), 259–265.
- (53) Horvath, O.; Stevenson, K. L. *Inorg. Chem.* **1989**, 28 (13), 2548–2551.
- (54) Bjerrum, Jannik. *Acta Chem. Scand.* **1986**.
- (55) Braish, T. F.; Duncan, R. E.; Harber, J. J.; Steffen, R. L.; Stevenson, K. L. *Inorg. Chem.* **1984**, 23 (24), 4072–4075.
- (56) Irving, H.; Williams, R. J. P. *J. Chem. Soc. Resumed* **1953**, No. 0, 3192–3210.



- (57) Day, P.; Sanders, N. *J. Chem. Soc. Inorg. Phys. Theor.* **1967**, No. 0, 1536–1541.
- (58) Ichinaga, A. K.; Kirchoff, J. R.; McMillin, D. R.; Dietrich-Buchecker, C. O.; Marnot, P. A.; Sauvage, J. P. *Inorg. Chem.* **1987**, 26 (25), 4290–4292.
- (59) Parker, W. L.; Crosby, G. A. *J. Phys. Chem.* **1989**, 93 (15), 5692–5696.
- (60) R.M. Berger, A. K. I. and D. R. M. **1987**.
- (61) McGarvey, J. J.; Bell, S. E. J.; Bechara, J. N. *Inorg. Chem.* **1986**, 25 (24), 4325–4327.
- (62) R.M. Everly and D.R. McMillin, *J Phys Chem* **1991**, 95, 9071.
- (63) Blaskie, M. W.; McMillin, D. R. *Inorg. Chem.* **1980**, 19 (11), 3519–3522.
- (64) Everly, R. M.; McMillin, D. R. *Photochem. Photobiol.* **1989**, 50 (6), 711–716.
- (65) Palmer, C. E. A.; McMillin, D. R.; Kirmaier, C.; Holten, D. *Inorg. Chem.* **1987**, 26 (19), 3167–3170.
- (66) Gamache, R. E.; Rader, R. A.; McMillin, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107 (5), 1141–1146.
- (67) Crane, D. R.; Ford, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113 (22), 8510–8516.
- (68) Crane, D. R.; Ford, P. C. *Inorg. Chem.* **1993**, 32 (11), 2391–2393.
- (69) Ahn, B.-T.; McMillin, D. R. *Inorg. Chem.* **1981**, 20 (5), 1427–1432.
- (70) A. Edel, P.A. Marnot, J.P. SAUVAGE, Y.-Y. *Nouv J Chim* **1984**, 8, 495.
- (71) Sakaki, G. Koga, F. Sato, K. Ohkubo, *J Chem Soc Dalton Trans* **1959**.
- (72) Sakaki, S.; Koga, G.; Ohkubo, K. *Inorg. Chem.* **1986**, 25 (14), 2330–2333.
- (73) Sakaki, S.; Koga, G.; Hinokuma, S.; Hashimoto, S.; Okubo, K. *Inorg. Chem.* **1987**, 26 (11), 1817–1819.
- (74) J.M. Kern, J.P. Sauvage, *Chem Comm* **1987**, 546.
- (75) J. Sykora, A. Lopatova, M. Molcan. In *12th Conf. Coord. Chem.*; Slovak Technical University Press: Bratislava, 1989; p 377.
- (76) Horvath, R.; Gordon, K. C. *Inorganica Chim. Acta* **2011**, 374 (1), 10–18.
- (77) Gislason, K.; Sigurdsson, S. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (1), 264–267.

