



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

**ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΟΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»**

Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Cu(II) ΜΕ
ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΜΕΝΟ ΠΑΡΑΓΩΓΟ ΤΗΣ 2,9-(ΔΙΜΕΘΥΛΟ)-1,10-
ΦΑΙΝΑΝΘΡΟΛΙΝΗΣ (PDG_{luc}). ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΣΤ-
DNA ΚΑΙ IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥ ΔΡΑΣΗΣ**

ΚΙΝΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Χημικός

Αθήνα 2018

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ Cu(II) ΜΕ
ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΜΕΝΟ ΠΑΡΑΓΩΓΟ ΤΗΣ 2,9-(ΔΙΜΕΘΥΛΟ)-1,10
ΦΑΙΝΑΝΘΡΟΛΙΝΗΣ (PDG_{luc}). ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ CΤ-
DNA ΚΑΙ IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥ ΔΡΑΣΗΣ**

ΚΙΝΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

A.M.: 161808

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Κωνσταντίνος Μεθενίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χ.-Α. Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Κων/νος Μεθενίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Π. Κυρίτσης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 02/03/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη διπλωματική μου εργασία με θέμα τη σύνθεση και χαρακτηρισμό συμπλόκου $Cu(II)$ με παράγωγο της 2,9 διμεθυλο-1,10 φαινανθρολίνης, μελέτη της αλληλεπίδρασης του με CT-DNA και *in vitro* διερεύνηση της βιολογικής του δράσης ως πιθανού νέου αντικαρκινικού παράγοντα. Η επιτυχής σύμπλεξη του $Cu(II)$ με τον υποκαταστάτη ακολουθήθηκε από χαρακτηρισμό τόσο του υποκαταστάτη όσο και του συμπλόκου με χρήση διάφορων φασματοσκοπικών μεθόδων (IR, EPR, NMR, MS, UV-vis). Το εξεταζόμενο μεταλλικό σύμπλοκο έχει σχεδιαστεί με τη μέθοδο στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων (Drug Targeted Delivery). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, το μόριο του υποκαταστάτη φέρει μια ομάδα η οποία είναι ικανή να το μεταφέρει εκλεκτικά στο κύτταρο στόχο, αποφεύγοντας όσο το δυνατό περισσότερο συσσώρευση του σε υγιή κύτταρα. Η ομάδα που επιλέχθηκε ως τροποποιητής του αρχικού μορίου είναι ένας μονοσακχαρίτης, η γλυκόζη, που ως σάκχαρο χαρακτηρίζεται από την τάση συναρμογής στις αύλακες του DNA (Groove Binding Affinity). Σε συνέχεια της μελέτης, πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του υποκαταστάτη και του συμπλόκου του $Cu(II)$ με αυτόν, με το CT-DNA, με τη χρήση κυκλικού διχρωϊσμού (CD), φασματοσκοπίας (UV-Vis), φθορισμού, και ιζωδομετρίας. Ο υποκαταστάτης PDGluC αλληλεπιδρά με το CT-DNA με περισσότερους από έναν τρόπους. Αρχικά, για μικρούς λόγους, η πιθανότερη αλληλεπίδραση είναι σύνδεση μέσω αύλακας του DNA. Για μεγαλύτερους λόγους, όμως, προτείνεται κάποιο είδος παρεμβολής της PDGluC με το μόριο του DNA. Στο σύμπλοκο $Cu(II)$ -PDGluC, αντίθετα, φαίνεται να επικρατεί μόνο η παρεμβολή κλασσική ή μη κλασσική. Όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα, τόσο η ασύμπλεχτη PDGluC, όσο και το σύμπλοκο $Cu(II)$ -PDGluC παρουσίασαν μια σημαντική εκλεκτικότητα στην ορμονοεξαρτώμενη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη LNCaP. Πιο συγκεκριμένα, η κυτταροτοξικότητα που καταγράφηκε για το σύμπλοκο $Cu(II)$ -PDGluC στην κυτταρική σειρά LNCaP παρουσιάζει εξαιρετικά αποτελέσματα, παρόμοια με το Cisplatin.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοανόργανη Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: 1,10-φαινανθρολίνη, χαλκός(II), γλυκόζη, DNA, αντικαρκινική δράση

ABSTRACT

The present work is my thesis on the synthesis and characterization of Cu (II) complex with derivative of 2,9 dimethyl-1,10 phenanthroline, study of their interaction with CT-DNA and in vitro exploration of their biological activity as a possible new anticancer agent. The corresponding Cu(II) complex was successfully synthesized and fully characterized by various spectroscopic methods (IR, EPR, NMR, MS, UV-vis). This complex is expected to be equally characterized by selective anticancer action of 1,10-phenanthroline in conjunction with the cytotoxicity of metallic center, targeting synergistic effectiveness. These metal complexes are designed with the method drug targeted delivery (DTD). According to this method, the initial ligand has a certain molecular group which is capable of delivering it to the targeted cell avoiding accumulation to healthy cells. In addition, this specific group gives to the ligand and the metal complex of it new characteristic properties. In this study, the group that was chosen for the modulation of the ligand is glucose, a saccharide which gives to the initial molecule the desirable properties. Moreover, glucose as a sugar tends to interact with the DNA through its minor or major grooves (Groove Binding Affinity). In addition, their binding to CT-DNA was also been evaluated by UV-Vis spectroscopy, fluorescence, circular dichroism and viscometry. The PDGluc ligand interacts with CT-DNA in more than one way. Initially, for small ratios, the most likely interaction is groove binding. For larger ratios, however, some kind of intercalation with the DNA molecule is suggested. On the other hand, at the Cu(II) -PDGluc complex only the classical or partial intercalation appears. In terms of cytotoxicity, both the unblocked PDGluc and the Cu (II) -PDGluc complex showed a significant selectivity in the hormone-dependent human prostate cancer cell line LNCaP. In particular, the cytotoxicity recorded for the Cu (II) -PDGluc complex in the LNCaP cell line has excellent results, similar to Cisplatin.

SUBJECT AREA: Bioinorganic Chemistry

KEYWORDS: 1,10- phenanthroline, copper (II), glucose, DNA, anticancer activity

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η 1,10 ΦΑΙΝΑΝΘΡΟΛΙΝΗ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΗΣ	23
1.1 Η 1,10 φαινανθρολίνη.....	23
1.2 Η χημεία της 1,10 φαινανθρολίνης και των διάφορων παραγώγων της.....	24
1.3 Βιολογική δράση και εφαρμογές στη νόσο του καρκίνου	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ. Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ(Cu)	28
2.1 Η χρήση των μετάλλων στην Ιατρική.....	28
2.2 Ο Χαλκός (Cu).....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΟ DNA ΚΑΙ ΟΙ ΤΡΟΠΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ	35
3.1 Εισαγωγή.....	35
3.2 Η δομή του DNA.....	36
3.3 Το μοντέλο των Watson και Crick.....	38
3.4 Η Οι πιθανές διαμορφώσεις του DNA.....	40
3.5 Η Τρόποι αλληλεπίδρασης του DNA με μικρά μόρια	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΘΡΑΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ	49
4.1 Γενικά για τους μηχανισμούς.....	49
4.2 Ο ρόλος των υδαταθράκων	49
4.3 Σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης με γλυκοζυλιωμένα παράγωγα 1,10-φαινανθρολίνης.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΔΟΜΗΣ	54
5.1 Εισαγωγή.....	54
5.2 Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)	54

5.3	Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	55
5.4	Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR)	55
5.5	Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD)	56
5.6	Φθορισμομετρία (Fluorescence)	58
5.7	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	59
5.6	Ιξωδομετρία.....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΑ – ΜΙΚΡΟΣΥΣΚΕΥΕΣ		
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ		62
6.1	Αντιδραστήρια	62
6.2	Όργανα – Μικροσυσκευές	63
6.3	Μεθοδολογία - Παρασκευή διαλυμάτων.	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ		
ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ 2,9 - ΔΙΣ - [(2R, 3S, 4R, 5R) - 2, 3, 4, 5, 6-		
ΠΕΝΤΑΪΔΡΟΞΥΕΞΑΝΑΛΗ] -1,10-ΦΑΙΝΑΝΘΡΟΛΙΝΗΣ.....		
7.1	Σύνθεση της PDGluc.....	69
7.2	Συνθεση PDALC.....	69
7.3	Σύνθεση Βρωμιωμένου Προστατευμένου Σακχάρου (BzGlucBr).	70
7.4	Σύνδεση PDALC-BzGlucBr	71
7.5	Αποπροστασία PDBzGluc	72
7.6	Χαρακτηρισμός της PDALC.....	73
7.7	Χαρακτηρισμός του προστατευμένου σακχάρου.....	75
7.8	Χαρακτηρισμός της PDGluc	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ		
ΤΟΥ Cu(II) ΜΕ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ ΤΗΝ PDGluc.....		86
8.1	Σύνθεση του συμπλόκου Cu- PDGluc	86
8.2	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου	87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ PDGlc ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΜΕ ΤΟ CT-DNA	102
9.1 Φασματοσκοπία UV-Vis.....	102
9.2 Κυκλικός Διχρωϊσμός	105
9.3 Φθορισμομετρία.....	109
9.4 Ιξωδομετρία.....	116
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PDGlc και του Cu(II)-PDGlc ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ LNCaP και DU145.....	117
10.1 Αρχή μεθόδου	117
10.2 Πειραματική διαδικασία - Υλικά και όργανα	118
10.3 Διατήρηση – Ανάπτυξη κυττάρων	119
10.4 Κατάψυξη – Απόψυξη κυττάρων.....	120
10.5 Μέτρηση κυττάρων.....	120
10.6 Προσδιορισμός βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT	120
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125
Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια.....	129
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	133

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Η δομή της 1,10-Φαινανθρολίνης..	23
Σχήμα 2: Η Δομή της (α) bpy και (β) try	25
Σχήμα 3: Η δομή της 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης.....	26
Σχήμα 4: Η δομή των συμπλόκων [Cu(II)(HL1)] και [Cu(II)(HL2)].....	31
Σχήμα 5: Ο γλυκοζιτικός δεσμός β σε έναν νουκλεοζίτη.....	36
Σχήμα 6: Ο κορμός του DNA.	37
Σχήμα 7: (α) Η διπλή έλικα του DNA με τα βασικά χαρακτηριστικά της και (b) η δομή του DNA με χωροπληρωτικό μοντέλο.	39
Σχήμα 8: Οι τρεις βασικές διαμορφώσεις του DNA αντίστοιχα με χωροπληρωτικό μοντέλο και με την κατεύθυνση της κάθε αλυσίδας.....	41
Σχήμα 9: Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση συμπλόκου του Co με τον φωσφορικό σκελετό του DNA.	43
Σχήμα 10: Συναρμογή του μορίου νετροψίνη στη μικρή αύλακα της διπλής έλικας του DNA	44
Σχήμα 11: Παρεμβολή του συμπλόκου [PtCl(en)(ACRAMTU-S)](NO ₃) ₂ στη διπλή έλικα του DNA.	45
Σχήμα 12: A) Διάγραμμα ηλεκτρονιακής πυκνότητας της διπλής έλικας του DNA. (B) Διάγραμμα ηλεκτρονιακής πυκνότητας του TriplatinNC καθώς περιελίσσεται γύρω από τη διπλή έλικα του DNA. (C) Εικονικό μοντέλο σύνδεσης του TriplatinNC στη διπλή έλικα.....	47
Σχήμα 13: Η δυνατότητα περιστροφής του σακχάρου και ο σχηματισμός δεσμών H μέσω των-H και των -OH επηρεάζουν τη δραστηριότητα του μορίου.....	51
Σχήμα 14: Οι δομές των συμπλόκων του Pt(II) με υποκαταστάτες διαφοροποιημένους ως προς το είδος του γλυκοζίτη και το είδος του γλυκοζυτικού δεσμού.....	53
Σχήμα 15: Φάσματα CD για τις πιθανές διαμορφώσεις του DNA. Δεξιά εμφανίζεται πίνακας με τα μήκη κύματος των εμφανιζόμενων ταινιών.....	57
Σχήμα 16: Η πορεία σύνθεσης της PDALC	70

Σχήμα 17: Η πορεία σύνθεσης του σακχάρου	71
Σχήμα 18: Η πορεία σύνδεσης της PDALC και του σακχάρου.....	72
Σχήμα 19: Το NMR φάσμα του PDALC.....	73
Σχήμα 20: Το μόριο (αριθμημένα H) της PDALC	73
Σχήμα 21: Το IR φάσμα της PDALC	74
Σχήμα 22: Το NMR φάσμα του προστατευμένου σακχάρου.	75
Σχήμα 23: Το μόριο (αριθμημένα H) της προστατευμένης γλυκόζης.....	75
Σχήμα 24: Το IR φάσμα του προστατευμένου σακχάρου	76
Σχήμα 25: Το μόριο της PDGluc	77
Σχήμα 26: Φάσμα ^1H - ^1H COSY για την PDGluc	78
Σχήμα 27: Φάσμα NMR για την PDGluc σε διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).....	78
Σχήμα 28: Το μόριο (αριθμημένα H) της PDGluc	79
Σχήμα 29: Φάσμα ^1H - ^{13}C (HSQC) για την PDGluc σε διαλύτη d_6 -(DMSO), $\theta=25^\circ\text{C}$	80
Σχήμα 30: Φάσμα ^{13}C για την PDGluc σε διαλύτη d_6 -(DMSO), $\theta=25^\circ\text{C}$	80
Σχήμα 31: Το φάσμα IR για την PDGluc.	81
Σχήμα 32: Φάσμα φθορισμού της PDGluc συγκέντρωσης 10^{-4} M σε μεθανόλη, $\theta=25^\circ\text{C}$	83
Σχήμα 33: Το φάσμα UV – Vis της PDGluc στην περιοχή 230-500 nm σε διαλύτες H_2O ($\text{pH}=6$), μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ($\text{pH}=7.2$). $[\text{PDGluc}]=1 \times 10^{-4}$ M. $\theta=25^\circ\text{C}$	84
Σχήμα 34: Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού της PDGluc συγκέντρωσης $1,77 \times 10^{-4}$ M, στην περιοχή 220-500 nm, σε διαλύτη μεθανόλη, $b=1\text{cm}$, $\theta=25^\circ\text{C}$	85
Σχήμα 35: Η πορεία σύνθεσης του συμπλόκου	86
Σχήμα 36: Φάσμα IR για το σύμπλοκο.....	87
Σχήμα 37: Το φάσμα UV – Vis του στην περιοχή 230-500 nm σε διαλύτη μεθανόλη σε δυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και μεθανόλη-νερό.....	89

Σχήμα 38: Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση μεθανολικού διαλύματος PDGGluc 1×10^{-4} M με Cu(II) και σε θερμοκρασίες 20oC, 25oC, 30oC	91
Σχήμα 39: Υπολογισμός της σταθεράς σύνδεσης K_f με εφαρμογή της μεθόδου Scatchard.....	92
Σχήμα 40: Το διάγραμμα μεταβολής της $\ln K_f$ συναρτήσει του $1/T$	93
Σχήμα 41: Το φάσμα φθορισμού μεθανολικών και υδατικών διαλυμάτων (buffer φωσφορικών) διαλυμάτων του συμπλόκου Cu-PDGluc	94
Σχήμα 42: Φθορισμομετρική τιτλοδότηση του PDGGluc με ιόντα Cu(II). $[PDGGluc] = c_{nst} = 1 \times 10^{-4}$ M, $R=0.9$. $\theta=25^\circ\text{C}$, $d=1\text{cm}$	95
Σχήμα 43: Διάγραμμα % μείωσης του φθορισμού συναρτήσει της $[Cu(II)]$	96
Σχήμα 44: Διάγραμμα $F_0/F=f([Cu^{2+}])$	97
Σχήμα 45: Διάγραμμα $1/(F_0-F)=f(1/[Cu^{2+}])$	97
Σχήμα 46: Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού του συμπλόκου Cu-PDGluc και του ασύμπλεχτου υποκαταστάτη PDGGluc, σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 10^{-4} M, $b=1\text{ cm}$, $\theta=25^\circ\text{C}$	98
Σχήμα 47: Φάσμα X-band EPR	99
Σχήμα 48: Το φάσμα UV – Vis της PDGGluc στην περιοχή 230-500 nm Scatchard.....	103
Σχήμα 49: Υπολογισμός της σταθεράς σύνδεσης K_b με εφαρμογή της μεθόδου Scatchard.....	103
Σχήμα 50: Το φάσμα UV – Vis του συμπλόκου στην περιοχή 230-500 nm Scatchard	104
Σχήμα 51: Υπολογισμός της σταθεράς σύνδεσης K_b με εφαρμογή της μεθόδου Scatchard.....	105
Σχήμα 52: Φάσμα CD για το DNA-PDGluc.....	106
Σχήμα 53: Φάσμα CD για το σύστημα DNA-(Cu-PDGluc).....	107
Σχήμα 54: Το φάσμα διαφοράς του κυκλικού διχρωισμού για την PDGGluc	108
Σχήμα 55: (α) Φάσμα φθορισμού για το DNA-EtBr (β) διάγραμμα της έντασης φθορισμού στα 600 nm συναρτήσει της $[DNA]$ από δεδομένα του (α), $\lambda_{ex}=526\text{ nm}$	109
Σχήμα 56: Φάσμα φθορισμού DNA-EtBr-PDGluc, $\lambda_{ex}=526\text{ nm}$	110

Σχήμα 57: Φάσμα φθορισμού DNA-EtBr- Cu(II)-PDGluC, λ _{ex} .=526 nm.....	110
Σχήμα 58: Διάγραμμα Stern-Volmer για το σύστημα EtBr-DNA-[Cu-PDGluC].....	112
Σχήμα 59: Φάσμα φθορισμού διαλύματος PDGluC απουσία (R=0) και παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων DNA (R=0.72-14.3). [PDGluC]=cnst=1x10 ⁻⁴ , R=[DNA]/[PDGluC]. Θερμοκρασία 25°C. λ _{ex} .=273 nm	113
Σχήμα 60: Διάγραμμα μεταβολής του Fo/F σε συνάρτηση με τη [DNA] _{b.p.} [PDGluC]=cnst=1x10 ⁻⁴ M. [DNA]=0-1,43x10 ⁻³ M.PDGluC]. Θερμοκρασία 25°C.	114
Σχήμα 61: Διάγραμμα μεταβολής του log[(Fo-F)/F] σε συνάρτηση με τον log[DNA].	115
Σχήμα 62: Διάγραμμα ιξωδομετρίας για τη σειρά DNA-PDGluC.....	116
Σχήμα 63: Μορφολογικές διαφορές που παρατηρούνται στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP (ορμονοεξαρτώμενη) και DU145 (μη-ορμονοεξαρτώμενη) σε οπτικό μικροσκόπιο.....	117
Σχήμα 64: Η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίζεται από τη μέτρηση των επιπέδων του αναχθέντος MTT από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζώντων κυττάρων και εμφανίζεται ως αλλαγή χρώματος από ασθενώς κίτρινο σε έντονο κυανό.....	121
Σχήμα 65: Οι τιμές IC50 για την PDGluC και Cu(II)-PDGluC σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP (ορμονοεξαρτώμενη) και DU145 (μη-ορμονοεξαρτώμενη).....	122

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Τα βασικά χαρακτηριστικά του χαλκού.....	34
Πίνακας 2: Τα βασικά χαρακτηριστικά των διαμορφώσεων A-, B- και Z- DNA.....	41
Πίνακας 3: Οι λόγοι Rf των BzGlucose, PDALC και PD-BzGluc	71
Πίνακας 4: Πίνακας χημικών μετατοπίσεων της PDALC σε διαλύτη DMSO (σε παρένθεση και με πλάγια παρουσιάζεται η χημική πολλαπλότητα J).....	74
Πίνακας 5: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR της ουσίας PDALC.....	75
Πίνακας 6: Πίνακας χημικών μετατοπίσεων της προστατευμένης γλυκόζης σε διαλύτη DMSO	76
Πίνακας 7: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR του προστατευμένου σαγγάρου.....	77
Πίνακας 8: Πίνακας χημικών μετατοπίσεων της PDGluc σε διαλύτη DMSO (σε παρένθεση και με πλάγια παρουσιάζεται η χημική πολλαπλότητα J).....	79
Πίνακας 9: Απόδοση φάσματος ^{13}C και οι αντίστοιχες μετατοπίσεις, σε διαλύτη d6-DMSO.....	81
Πίνακας 10: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR της ουσίας PDGluc.....	82
Πίνακας 11: Μήκη κύματος εκπομπής για την PDGluc σε lex (nm)	83
Πίνακας 12: Απόδοση κορυφών του φάσματος Ορατού – Υπεριώδους για την PDGluc.....	84
Πίνακας 13: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR του συμπλόκου	87
Πίνακας 14: Απόδοση φάσματος Uv-Vis για το σύμπλοκο Cu-PDGluc	90
Πίνακας 15: Οι σταθερές σχηματισμού K_f (Lmol^{-1}) και σε παρένθεση τα $\ln K_f$ σε μεθανόλη στις διάφορες θερμοκρασίες.	92
Πίνακας 16: Μήκη κύματος εκπομπής για το Cu(II)-PDGluc σε lex (nm), σε διαλύτη μεθανόλη και Υδατικό διάλυμα (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7,2).....	94
Πίνακας 17: Αποτελέσματα EPR.....	100
Πίνακας 18: Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας (IC_{50}).....	123

Πίνακας 19: Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας (IC₅₀) συμπλόκων Pt με αποδεδειγμένες αντικαρκινικές ιδιότητες..... 123

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη διπλωματική μου εργασία με θέμα τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό του γλυκοζυλιωμένου παραγώγου της 1,10-φαινανθρολίνης, (PDG_{Gluc}), και του συμπλόκου του Cu(II) με την PDG_{Gluc}, τη μελέτη της αλληλεπίδρασης αυτών με CT-DNA και in vitro διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης. Η επιλογή του συγκεκριμένου υποκαταστάτη και του συγκεκριμένου μετάλλου βασίστηκε στις βιολογικές ιδιότητες που έχουν βρεθεί ότι παρουσιάζουν τόσο τα ίδια όσο και οι περισσότερες από τις παράγωγες ενώσεις τους. Τα πειράματα για την εργασία μας διεξήχθησαν στα εργαστήρια Ανόργανης Χημείας, του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Μεθενίτη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για όλα όσα μου έμαθε αυτό το χρονικό διάστημα, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την όμορφη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και που δέχθηκε να είναι μέλος της τριμελούς μου επιτροπής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Βαρβάρα Μαυροειδή για την πολύτιμη βοήθειά της στα βιολογικά πειράματα κάθε φορά που τη χρειαζόμουν, καθώς και την Δρ. Μαρία Πελεκάνου, Ερευνήτρια Α', στο Ινστιτούτο Βιοεπισημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος στο εργαστήριο της οποίας έγιναν βιολογικές μελέτες για τον υποκαταστάτη και το σύμπλοκο που συνέθεσα.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας για το φιλικό και ευχάριστο κλίμα που δημιουργήθηκε όλο αυτό το χρονικό διάστημα και ιδιαίτερα τους συνεργάτες μου Τιμόθεο Κωνσταντόπουλο και Γεωργία Μπεργελέ για την πολύτιμη βοήθεια, τη συμπαράστασή τους και την άψογη συνεργασία που είχαμε όλο το χρονικό διάστημα διεξαγωγής των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου που με στήριξε και σε αυτή τη φάση της ζωής μου.

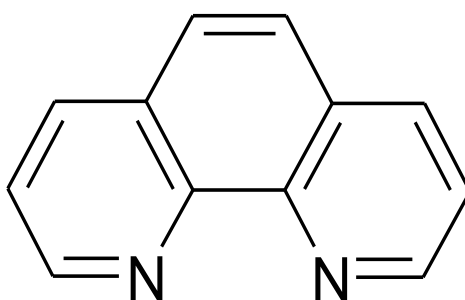
Κιντής Κωνσταντίνος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η 1,10 ΦΑΙΝΑΝΘΡΟΛΙΝΗ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΗΣ

1.1 Η 1,10 Φαινανθρολίνη

Η 1,10- Φαινανθρολίνη, που φαίνεται στο σχήμα 1, είναι μια οργανική ετεροκυκλική ένωση με Μοριακό Τύπο $C_{12}H_8N_2$ και Μοριακό Βάρος 180.21 g/mol. Η πυκνότητά της ισούται με 1.31g/cm^3 , έχει σημείο τήξεως στους 117°C και συναντάται με τη μορφή λευκών/υποκίτρινων κρυστάλλων. Είναι διαλυτή σε αρκετούς οργανικούς διαλύτες και σχηματίζει σύμπλοκα με πολλά μεταλλικά ιόντα δρώντας σαν χηλικός υποκαταστάτης μέσω των δύο ατόμων αζώτου (N).



Σχήμα 1: Η δομή της 1,10- Φαινανθρολίνης.

Η 1,10- Φαινανθρολίνη (phen) σαν υποκαταστάτης παρουσιάζει ομοιότητες με την 2,2'-διπυριδίνη (bipy) με τη διαφορά ότι δεσμεύει τα μεταλλικά ιόντα πιο ισχυρά μέσω των ατόμων N. Η phen παρουσιάζει ιδιαίτερο χημικό ενδιαφέρον λόγω της πλούσιας βιολογικής της δράσης, και της ενδιαφέρουσας χημείας συντονισμού που εμφανίζει. Χρησιμοποιείται επίσης σαν δείκτης για αντιδραστήρια αλκυλολιθίου κατ'αντιστοιχία με τα αντιδραστήρια Grignard. Τα αντιδραστήρια αυτά σχηματίζουν παράγωγα έντονα χρωματισμένα παρουσία της phen.

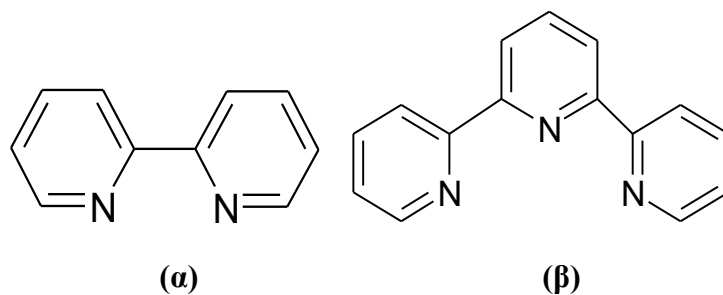
Αρκετά παράγωγα της έχουν μελετηθεί διεξοδικά καθότι παρουσιάζουν ιδιαίτερη βιολογική δράση. Τέτοια παράγωγα είναι: η 2,9,-διμεθυλο-1,10-φαινανθρολίνη (νεοκουπρίνη), η 3,4,7,8-τετραμέθυλο-1,10-φαινανθρολίνη, η 4,7-φαινυλο-1,10-φαινανθρολίνη και άλλα πολλά, οι ιδιότητες και η βιολογική δράση των οποίων θα αναλυθεί διεξοδικότερα και στη συνέχεια [1].

1.2 Η χημεία της 1,10 φαινανθρολίνης και των διάφορων παραγώγων της

Η 1,10- Φαινανθρολίνη είναι ένας κλασικός δισχιδής, χηλικός υποκαταστάτης που συνδέεται με μέταλλα των στοιχείων μεταπτώσεως και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο τόσο στην οργανική όσο και στην ανόργανη χημεία. Το μόριο της είναι άκαμπτο, επίπεδο, ετεροατομικό σύστημα φτωχό σε ηλεκτρόνια, με τα άτομα N τοποθετημένα έτσι ώστε να ευνοείται η πρόσδεση μεταλλικών κατιόντων.

Η phen συμπεριφέρεται σαν ασθενής βάση σε υδατικό διάλυμα. Η PKa της ισούται με 4,95 και η βασικότητά της είναι αξιοσημείωτα χαμηλότερη από αυτή των αλειφατικών διαμινών, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα χαρακτηριστικά των ηλεκτρονιακά φτωχών ετεροατομικών δακτυλίων και την επακόλουθη χαμηλή σ-δοτική ικανότητα των ατόμων N. Παρόλα αυτά όμως επιτυγχάνεται και μάλιστα σε αξιοσημείωτο βαθμό η πρόσδεση μετάλλων. Σε υδατικά διαλύματα ευνοείται ο σχηματισμός οκταεδρικών συμπλόκων τύπου $[M(phen)(H_2O)_4]^{2+}$, $[M(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$ και $[M(phen)_3]^{2+}$ με τα μέταλλα της πρώτης σειράς των στοιχείων μεταπτώσεως. Η σταθερά σχηματισμού των συμπλόκων της μορφής $[M(phen)]^{2+}$ κυμαίνεται από 4,13 για το $[Mn(phen)]^{2+}$ έως και 9,25 για το $[Cu(phen)]^{2+}$. Η σταθερότητα αυτών των συμπλόκων είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή των αντίστοιχων συμπλόκων της αιθυλενοδιαμίνης (en). Στα σύμπλοκα με τη phen, η συνεισφορά της εντροπίας είναι μεγαλύτερη κυρίως λόγω της υδροφοβικής της φύσης και της επακόλουθης μεγάλης επιδιόρθωσης των μεταλλικών ιόντων κατά το σχηματισμό συμπλόκων. Ταυτόχρονα η χαμηλή σ-δοτικότητα των ατόμων N, αντισταθμίζεται από την π-δεκτικότητα της phen. Μόνο το σύμπλοκο $[Fe(phen)_3]^{2+}$ παρουσιάζει συνεισφορά ενθαλπίας μεγαλύτερη από το $[Fe(en)_3]^{2+}$ εξαιτίας του σχηματισμού σταθερού συμπλόκου χαμηλού σπιν d^6 ηλεκτρονιακής διαμόρφωσης [2].

Συγκριτικά με την 2,2' διπυριδίνη (bpy) και την 2,2', 6,6' τριπυριδίνη (tpy), η phen διαθέτει τα δύο άτομα N δότες που είναι αντικριστά και στραμμένα προς το εσωτερικό του μορίου κάτι που ευνοεί την ισχυρή δέσμευση των μετάλλων. Αντίθετα στις bpy και tpy, παρόμοια διάταξη των ατόμων N διαταράσσεται από την ελεύθερη περιστροφή γύρω από το δεσμό/ους που συνδέουν τους ετεροαρωματικούς εξαμελείς δακτυλίους. Οι δομές των phen, bpy και tpy φαίνονται στο σχήμα 2.



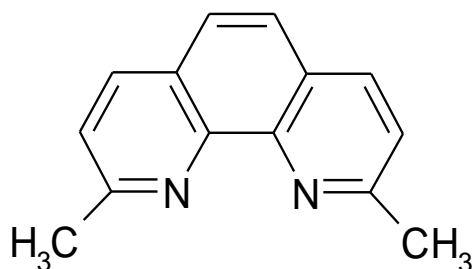
Σχήμα 2: Η Δομή της (α) bry και (β) try.

Σε υδατικά διαλύματα η rhen στο UV εμφανίζει απορροφήσεις στα 229 και 265 nm. Η τελευταία αποδίδεται σε μια π - π^* μετάπτωση στη χαμηλότερη απλή διεγερμένη κατάσταση. Η διέγερση στα 307 nm προέρχεται από μια ταινία εκπομπής φθορισμού από τα 380 nm λόγω της ακτινοβολίας αποδιέγερσης της $^1\pi$ - π^* κατάστασης. Η έλλειψη π ηλεκτρονίων στις rhen, bry και try τις καθιστά καλούς π δέκτες και σταθεροποιούνται με μεταλλικά ιόντα σε χαμηλές οξειδωτικές καταστάσεις. Εξαιτίας της παρουσίας των χαμηλής ενέργειας π^* τροχιακών του υποκαταστάτη, τα σύμπλοκα εμφανίζουν ισχυρές MLCT ταινίες μετάπτωσης στο UV [2].

Τα τελευταία χρόνια ακολουθούνται αποτελεσματικές πορείες σύνθεσης παραγώγων της rhen ώστε να ενεργοποιείται ο πυρήνας της χημικώς, σε διάφορες θέσεις των δακτυλίων. Η κατευθυνόμενη σύνθεση παραγώγων με δομικές αλλαγές στις θέσεις 2 και 9 αποτελεί μία από τις προτιμώμενες οδούς. Αντίθετα, συμμετρική υποκατάσταση στις θέσεις 3,8-, 4,7-, και 5,6- είναι λιγότερο κοινή και λιγότερο λειτουργικά αυτού του είδους τα παράγωγα. Η συνηθέστερη πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση 2- μόνο ή 2,9- διυποκατεστημένων παραγώγων είναι η 2,9- διμέθυλο, 1,10-φαινανθρολίνη ή αλλιώς νεοκουπρίνη. Αυτή μέσω καλά προσδιορισμένων διαδικασιών μετατρέπεται εύκολα σε χρήσιμα συνθετικά για την ανάπτυξη πολυσχιδών και μακροκυκλικών υποκαταστατών που έχουν ενσωματωμένη την ομάδα της rhen, ή αποτελούν και τα ίδια πολυδοντικούς υποκαταστάτες.

Η 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνη ή νεοκουπροΐνη, η οποία φαίνεται στο σχήμα 3, είναι ένα ετεροαρωματικό παράγωγο της φαινανθρολίνης που όπως και η δεύτερη μπορεί να δράσει ως συμπλεκτικός παράγοντας. Είναι ένα ανοιχτόχρωμο κίτρινο στερεό με σημείο τήξεως 162-164 °C, μετρίως διαλυτό στο νερό και πλήρως διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες όπως η ακετόνη, η αιθανόλη, το βενζόλιο και στους

διάφορους αιθέρες. Οι τροποποιημένες φαινανθρολίνες στις θέσεις 2 και 9 είναι ανάμεσα στις πλέον μελετημένες ενώσεις όσον αφορά τη βιολογική δραστηριότητά τους. Η νεοκουπροΐνη έχει χρησιμοποιηθεί ως συμπλεκτικός παράγοντας από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα σε πολλά μέταλλα μετάπτωσης. Έχει βρεθεί ότι συμπλέκεται εκλεκτικά με τον Cu¹⁺. Με άλλα μέταλλα, όπως ο λευκόχρυσος σχηματίζει επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα του τύπου [PtX₂(neocuproine)].[3]



Σχήμα 3: Η δομή της 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης.

1.3 Βιολογική δράση και εφαρμογές στη νόσο του καρκίνου

Σύμπλοκα της φαινανθρολίνης με μια πληθώρα μεταλλικών ιόντων, όπως Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Ln³⁺, Ru²⁺, Rh³⁺ και Os²⁺, είναι γνωστά για την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με το DNA, με τρόπο που τις περισσότερες φορές περιλαμβάνει διάσπαση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Όπως και στην περίπτωση άλλων επίπεδων ετεροαρωματικών μορίων, ο ακριβής τρόπος αλληλεπίδρασης με το DNA εξαρτάται από την αρχική διαμόρφωση του DNA, αλλά και τα δομικά χαρακτηριστικά του συμπλόκου. Τα σύμπλοκα της φαινανθρολίνης μπορούν να δράσουν ως παρεμβολείς στην έλικα του DNA, όταν αλληλεπιδρούν με την A και τη B διαμόρφωσή του, ενώ η πιθανότητα να δράσει μέσω παρεμβολής στην Z διαμόρφωση του DNA είναι μικρή. Το παραπάνω οφείλεται στο ότι τα ζεύγη των βάσεων του DNA στην Z διαμόρφωση είναι λιγότερο οργανωμένα, κάτι που εμποδίζει την εισαγωγή αναμεσά τους του ετεροαρωματικού συστήματος, χωρίς να προκαλέσει έντονες αλλοιώσεις στη δομή της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Επιπλέον, τα σύμπλοκα της φαινανθρολίνης μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA είτε μέσω δέσμευσης στην μικρή ή τη μεγάλη αύλακά του, χωρίς όμως να δρουν με παρεμβολή. Σε αυτές τις περιπτώσεις το συγκρότημα DNA-συμπλόκου σταθεροποιείται από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην φαινανθρολίνη και στον φωσφορικό σκελετό του DNA, καθώς και από αλληλεπιδράσεις τύπου C-H...π

ανάμεσα στο ετεροαρωματικό σύστημα και στα ζεύγη των αζωτούχων βάσεων του DNA[6].

Η αλληλεπίδραση των μεταλλικών συμπλόκων της φαινανθρολίνης με το DNA μπορεί να ακολουθείται από διάσπαση της διπλής έλικας, το οποίο μπορεί να πραγματοποιείται, είτε μέσω ενός υδρολυτικού μηχανισμού που περιλαμβάνει αλληλεπίδραση του μεταλλικού κέντρου του συμπλόκου με μια φωσφορική ομάδα και διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, είτε μέσω μιας οξειδωτικής πορείας. Στη δεύτερη περίπτωση πραγματοποιείται μια απόσπαση υδρογόνου από μια ριβόζη ή μια δεοξυριβόζη δημιουργώντας έτσι μια ρίζα σακχάρου. Με την αναδιοργάνωση της ρίζας οδηγούμαστε στην διάσπαση της διπλής έλικας. Το ποιος από τους δυο παραπάνω μηχανισμούς θα ακολουθηθεί εξαρτάται άμεσα από το μεταλλικό κατιόν που είναι συμπλεγμένο με την φαινανθρολίνη. Ενώ τα σύμπλοκα του Cu^{2+} ή του Fe^{2+} δίνουν οξειδωτική διάσπαση του DNA, τα σύμπλοκα του Zn^{2+} και των λανθανίδων δρουν κυρίως ως υδρολυτικοί παράγοντες του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Στην πρώτη περίπτωση, η οξειδωτική δράση οφείλεται στον σχηματισμό ριζών υδροξυλίου που παράγονται μέσω των αντιδράσεων Fenton ή μπορεί να περιλαμβάνουν τον σχηματισμό ισχυρών M – O ομάδων. Ακόμη, τα σύμπλοκα του Rh^{3+} και του Ru^{2+} με την φαινανθρολίνη μπορούν να δράσουν μέσω φωτοδιάσπασης του DNA. Οι ικανότητες των συμπλόκων αυτών να συνδέονται, αλλά και να διασπών το DNA, μπορούν να τροποποιηθούν με κατάλληλη τροποποίηση του υποκαταστάτη τους, δηλαδή της φαινανθρολίνης. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να επιτευχθούν ιδιότητες ιδιαίτερα επιθυμητές, όπως η σύνδεση του συμπλόκου σε περιοχές του DNA με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων.

Η βιολογική και αντικαρκινική δράση της 2,9-(διμεθύλο)-1,10-φαινανθρολίνης είναι ανάλογη με αυτή των υποκατεστημένων φαινανθρολινών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Εδιαφέρον παρουσιάζουν μόρια τα οποία έχουν τροποποιηθεί με κατάλληλες δραστικές ομάδες στις μεθυλιωμένες θέσεις 2 και 9. Αποτέλεσμα αυτού είναι η σύνθεση μορίων και κατ' επέκταση συμπλόκων με νέες ιδιότητες που είναι ελεγχόμενες από τον μοριακό σχεδιασμό που πραγματοποιείται[7].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΤΑΛΛΑ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ: Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ (Cu)

2.1 Η χρήση των Μετάλλων στην Ιατρική

Παρόλου τα μέταλλα και τα σύμπλοκα αποτελούν τομέα της Ανόργανης Χημείας, ήδη από τις αρχές του 20ου αιώνα, πρόσφατα έγινε γνωστή η καθοριστική σημασία των μεταλλικών ιόντων στα βιολογικά συστήματα. Ανόργανα στοιχεία εισάγονται τεχνητά σε βιολογικά συστήματα για την διερεύνηση της δομής και δράσης αυτών (probes). Βαρέα μέταλλα όπως ο υδράργυρος και ο λευκόχρυσος χρησιμοποιούνται στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X, για την εύρεση της δομής βιομακρομορίων, ενώ σύμπλοκες ενώσεις μετάλλων χρησιμοποιούνται τόσο ως διαγνωστικά όσο και ως θεραπευτικά φάρμακα. [5]. Η παρουσία κατάλληλων μετάλλων στις σωστές ποσότητες είναι όχι μόνο ευεργετική αλλά και απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία των οργανισμών. Οι φαρμακευτικές ενώσεις που δοσθήσουν μεταλλικό κέντρο, έχουν το πλεονέκτημα ότι εν συγκρίσει με τις αντίστοιχες οργανικές, το μεταλλικόσύμπλοκο μπορεί να αλλάζει τον αριθμό συναρμογής του, τη γεωμετρία αλλά και την οξειδωτική του κατάσταση. Τα παραπάνω επιτρέπουν τη ρύθμιση της χημικής του ενεργότητας τόσο κινητικά (ταχύτητα εναλλαγής των υποκαταστατών), όσο και θερμοδυναμικά (ισχύς δεσμών μετάλλου-υποκαταστάτη, οξειδοαναγωγικά δυναμικά κ.α.) [6].

Αφετηρία για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων μεταλλικών ενώσεων με την επιθυμητή βιολογική δραστηριότητα αποτέλεσε η κατανόηση του τρόπου δράσεως των μεταλλο-φαρμάκων σε μοριακό επίπεδο, κάτι που οδήγησε στην ανακάλυψη μορίων με ευρύ φάσμα φαρμακευτικών εφαρμογών. Τα σύμπλοκα κατατάσσονται σε επτά κύριες κατηγορίες, ανάλογα με τη λειτουργικότητα του μεταλλικού κέντρου και του υποκαταστάτη: 1) Το σύμπλοκο είναι ενεργό ως έχει, 2) Το σύμπλοκο είναι ένα πρόδρομο φάρμακο και είναι ενεργό μετά από μετασχηματισμό, 3) Το μεταλλικό κέντρο λειτουργεί ως ενισχυτής της ακτινοβολίας, 4) Το σύμπλοκο περιέχει ραδιονουκλίδιο, 5) Το μέταλλο ή τα προϊόντα της βιο-μετατροπής του είναι ενεργά, 6) Ο υποκαταστάτης είναι βιολογικά ενεργός και 7) Μόνο μέρος του συμπλόκου είναι ενεργό. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένες κύριες κατηγορίες συμπλόκων, τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά ή έχουν εισέλθει σε κλινικές δοκιμές.[7][8][9]

Σύμπλοκα του χρυσού (Au) χρησιμοποιούνται ως αντιαιθρικά φάρμακα, με κυριότερα τα υδατοδιαλυτά θειολικά σύμπλοκα του Au(I)[10]. Σύμπλοκα του

αργύρου (Ag(I)) και του αντιμονίου(Sb(V)) χρησιμοποιούνται ως αντιμολυσματικά μέσα[11]. Σύμπλοκα του γαδολινίου (Gd(III)) όπως τα $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$ (Magnevist) αλλά και σύμπλοκα του μαγγανίου (Mn(II)) όπως το $[Mn(DPDP)]$ (Teslascan) χρησιμοποιούνται ως παράγοντες απεικόνισης στην μαγνητική τομογραφία, MRI [12,13]. Το σύμπλοκο του Gd(III) με την μοτεξαφρίνη (Motexafrin, παράγωγο πορφυρίνης), εφαρμόζεται κλινικά ως ραδιοευαισθητοποιητής (Xcytrin, Gd-Tex), για την ακτινοθεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του εγκεφάλου.[13].

Παράγωγα των πορφυρινών με τις εμπορικές ονομασίες Photofrin, Levulan, Visudyne και Foscan χρησιμοποιούνται στην φωτοδυναμική θεραπεία. Τα σύμπλοκα διαφόρων μετάλλων με πορφυρίνες και φθαλοκυανίνες δρουν επίσης ως φωτοευαισθητοποιητές και αποτελώντας την δεύτερη γενιά φωτοευαισθητοποιητών[14].

Ενώσεις του βισμούθιου χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, όπως σύφιλη, υπέρταση, δερματικές μολύνσεις και γαστροεντερικές διαταραχές. Η βιολογική δράση των ενώσεων του βισμούθιου πιθανώς να οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους και με ένζυμα [15][16]. Τα ραδιοφάρμακα αποτελούν μια άλλη ιδιαίτερη κατηγορία φαρμάκων με έντονο κλινικό ενδιαφέρον. Τα ραδιοϊσότοπα χρησιμοποιούνται τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία. Ως διαγνωστικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν ακτινοβολία γή ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν ακτίνες β^+ [17,18]. Το 80% των ραδιοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως, είναι ραδιοφάρμακα επισημασμένα με το ισότοπο ^{99m}Tc .

Σήμερα όμως, μεγαλύτερο μέρος των ερευνών του πεδίου της Ανόργανης Ιατρικής Χημείας αφορά τη σύνθεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων. Ο καρκίνος κατατάσσεται στις πρώτες τρεις αιτίες θανάτου παγκοσμίως και είναι δύσκολο, αν όχι αδύνατο, να βρεθούν φάρμακα τα οποία συγχρόνως να είναι δραστικά έναντι της ασθένειας και να εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα. Για τους λόγους αυτούς καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια να σχεδιαστούν νέας γενιάς χημειοθεραπευτικά φάρμακα που θα εμφανίζουν εκλεκτική στόχευση των κακοήθων όγκων, γεγονός που θα έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση μόνο των καρκινικών κυττάρων και την μείωση ή ακόμα και την εξάλειψη των παρενεργειών[19].

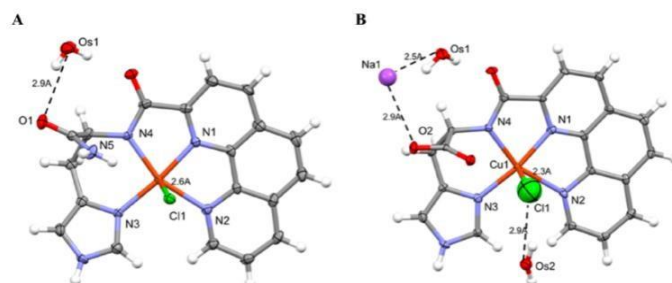
Τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα με βάση το μέταλλο είναι αυτά του λευκοχρύσου. Ο λευκόχρυσος είναι το πρώτο μέταλλο που το σύμπλοκό του, *cis*-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος(II) [PtCl₂(NH₃)], γνωστό και ως *cisplatin* αποδείχθηκε ότι έχει ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες και σήμερα θεωρείται ένα από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά. Εκτός από τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου, ενώσεις του ρουθηνίου όπως τα Ru(II) και Ru(III), θεωρούνται κατάλληλα για χρήση ως αντικαρκινικά φάρμακα, κυρίως λόγω της παρόμοιας, με αυτή του λευκοχρύσου, κινητικής αντικατάστασης των υποκαταστατών. Εκτός των ανωτέρω ενδεικτικών παραδειγμάτων μεταλλοφαρμάκων και άλλα σύμπλοκα ή οργανομεταλλικές ενώσεις των Au(I), Au(III), Pt(IV), Pt(II), Ir(III), Os(II), La(III), Sn(IV), Rh(III), Ru(II), Ru(III), Mo(VI), As(III), Ga(III), Cu(II), Co(III), Fe(III), Ti(IV), έχουν συντεθεί, χαρακτηριστεί και έχει μελετηθεί η *in vitro* ή/και η *in vivo* βιολογική τους δραστηριότητα [20][21].

Η συμμετοχή του χαλκού σε αυτό το πλήθος των βιολογικών διεργασιών έδωσε το έναυσμα για την παρασκευή και τη μελέτη διαφόρων συμπλόκων του χαλκού με πιθανή βιολογική δράση. Ένας μεγάλος αριθμός συμπλόκων Cu(I) και Cu(II) έχει συντεθεί και μελετηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς, όπως ως αντιμυκητιακοί και αντιβακτηριακοί παράγοντες, ως μέσα αντιμετώπισης της ελονοσίας, στη θεραπεία της νόσου Alzheimer και πρόσφατα ως πιθανό φάρμακο για την καταπολέμηση της νόσου Parkinson, της αμυοτροφικής σκλήρυνσης, του διαβήτη, διαφόρων φλεγμονών (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα, ελκών του δέρματος), καρδιαγγειακών παθήσεων, αλλά και της λειψμανίας[22].

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

αμίνες[23].

Σύμπλοκα του Cu(II) με αρωματικές αμίνες αναφέρεται ότι εμφανίζουν δραστικότητα έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων. Ο μηχανισμός της δράσης τους δεν οφείλεται σε σύνδεση με το DNA και είναι ακόμα υπό διερεύνηση.



Σχήμα 4: Η δομή των συμπλόκων [Cu(II)(HL1)] και [Cu(II)(HL2)].

Για παράδειγμα, τα σύμπλοκα [Cu(II)(HL1)] και [Cu(II)(HL2)], όπου HL1 και HL2 υποκαταστάτες, όπου το μόριο φαινανθρολίνης είναι συνδεδεμένο με παράγωγα ιστιδίνης, εμφανίζουν ισχυρή τοξικότητα έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου και είναι δραστικότερα σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη (Σχήμα 4). Το σύμπλοκο [Cu(II)(HL1)] αλληλεπιδρά με το DNA, παρεμποδίζει την ενσωμάτωση της θυμιδίνης στο DNA και της ουριδίνης στο RNA. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει διακοπή της κυτταρικής αναπνοής και της σύνθεσης του RNA, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με τις κυτταρικές διεργασίες [24][25].

Μια κατηγορία αντικαρκινικών, και όχι μόνο, φαρμάκων με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον αποτελούν τα νανοϋλικά. Με τη νανοτεχνολογία αναμένεται να αναπτυχθούν νέες γενιάς χημειοθεραπευτικά, που θα έχουν τη δυνατότητα να αντιμετωπίσουν τα προβλήματα της συμβατική χημειοθεραπείας, όπως η βιοδιαθεσιμότητα, η ειδική στόχευση, η αποικοδόμηση, η διαλυτότητα κ.ά [26]. Ιδιαίτερα στον τομέα των αντικαρκινικών φαρμάκων, οι νανοϊατρικές ενώσεις θεωρούνται τα νέες γενιάς χημειοθεραπευτικά φάρμακα, κυρίως λόγω της εκλεκτικότητας που παρουσιάζουν για τα κύτταρα και τους ιστούς, ενώ ήδη χρησιμοποιούνται στην θεραπεία του καρκίνου, των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και της αποβολής οργάνων από μεταμόσχευση [27][28].

Επομένως, η αλληλεπίδραση του DNA με σύμπλοκα των στοιχείων μεταπτώσεως παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας των ποικίλων εφαρμογών

τους στη θεραπεία του καρκίνου. Τέλος, η πλειοψηφία των συμπλόκων ενώσεων που αναφέρθηκαν έχει ως μόριο στόχο το DNA. Για το λόγο αυτό η μελέτη της αλληλεπίδρασης του DNA με σύμπλοκα των στοιχείων μεταπτώσεως παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας των ποικίλων εφαρμογών τους στη θεραπεία του καρκίνου [6].

2.2 Ο Χαλκός(Cu)

Ο χαλκός (Cu) ανήκει στην 4η περίοδο, στην 11η ομάδα και στον d-τομέα του περιοδικού πίνακα. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, θα πρέπει να ήταν γνωστό ως μέταλλο ήδη από το 5.000 π.Χ, διαπιστώθηκε όμως ότι από το 3.500 π.Χ άρχισε η παραλαβή του ως μέταλλο με την αναγωγή των ορυκτών του από άνθρακα. Η διεθνής ονομασία του, copper, προέρχεται από την λατινική Cuprum, το ρωμαϊκό όνομα της Κύπρου.[29]

Ο χαλκός σχηματίζει ενώσεις στις οξειδωτικές καταστάσεις +1 έως και +4, αλλά μόνο η +2 είναι σταθερή. Η κατάσταση οξείδωσης +4 (d^7) εμφανίζεται σε ορισμένα οξείδια ενώ η κατάσταση οξείδωσης +3 (d^8) θεωρείται ασυνήθιστη, διότι ανάγεται εύκολα. Ο Cu(III) είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας με δυναμικό αναγωγής 2.4V, ωστόσο στη κατάσταση αυτή παρουσιάζει ενδιαφέρον επειδή εμπλέκεται σε συγκεκριμένες βιολογικές διαδικασίες.

Στην κατάσταση οξείδωσης +1 (d^{10}) ο χαλκός είναι διαμαγνητικός και αν δεν είναι συμπλεγμένος με υποκαταστάτες που πολώνονται εύκολα, είναι άχρωμος. Σε υδατικά διαλύματα ο Cu(I) είναι πολύ ασταθής και διασπάται ($2 \text{CuI} \rightleftharpoons \text{CuII} + \text{Cu0}$) λόγω της μεγάλης ενέργειας υδατώσεως του δισθενούς κατιόντος. Παρ' όλα αυτά ο Cu(I) μπορεί να σταθεροποιηθεί είτε σε μικρής διαλυτότητας ενώσεις, είτε με σύμπλεξη με υποκαταστάτες που έχουν π-δεκτικό χαρακτήρα.

Ο συνηθέστερος αριθμός σύνταξης είναι 4 (αλλά είναι δυνατοί και χαμηλότεροι όπως 3 ή 2), ενώ η γεωμετρία είναι τετραεδρική. Στην κατάσταση οξείδωσης +2 (d^9) ο χαλκός είναι παραμαγνητικός και σχηματίζει σύμπλοκα τα οποία είναι έγχρωμα λόγω των d-d μεταπτώσεων. Στα σύμπλοκα με αριθμό συναρμογής 4, 5 και 6 κυριαρχούν οι παραμορφωμένες γεωμετρίες με ποικίλα μήκη και γωνίες δεσμών. Στα σύμπλοκα με αριθμό συναρμογής 6 επικρατεί επίπεδη τετραγωνικά παραμορφωμένη οκταεδρική διαμόρφωση, λόγω φαινομένου Jahn-Teller, παρότι θα αναμενόταν κανονική οκταεδρική γεωμετρία. Σε μερικές σπάνιες περιπτώσεις αυτό

οδηγεί σε συμπίεση του οκταέδρου, στη λεγόμενη «2+4» σύμπλεξη, με πιο ακραία την περίπτωση απώλειας δύο αξονικών υποκαταστατών οπότε και προκύπτει επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία [30][31][32].

Το ιόν του Cu(II) θεωρείται οριακά "σκληρό" οξύ και είναι ιδιαίτερα σταθερό σε υδατικά διαλύματα. Στα σύμπλοκα του Cu(II) κυριαρχεί η συναρμογή μέσω σκληρών ατόμων-δοτών, όπως O και N, ενώ η πλειοψηφία των συμπλόκων του Cu(I) περιέχει υποκαταστάτες με P- και S- δότες [33]. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζουν οι μικτοί N-, O- δότες, όπως οι βάσεις Schiff, διότι δίνουν σύμπλοκα, όχι μόνο τετραγωνικά, αλλά και τετραγωνικά πυραμιδικά, κατόπιν διμερισμού.

Εξαιτίας της σχετικά χαμηλής συμμετρίας που εμφανίζει ο Cu(II) σ' ένα δεδομένο χημικό περιβάλλον, η ακριβής ερμηνεία των φασμάτων UV-Vis είναι κάπως δύσκολη, αν και η δομή d^9 είναι το αντίστροφο της απλής δομής d^1 . Στο φάσμα UV-Vis για τα σύμπλοκα του Cu(II) η περιοχή των χαμηλών ενεργειών κυριαρχείται από τις μεταπτώσεις από πλήρη d τροχιακά στο ημισυμπληρωμένο $dx^2 - y^2$ τροχιακό. Τετραγωνικά σύμπλοκα του Cu(II) εμφανίζουν ταινίες απορρόφησης στην περιοχή από ~500 έως 1000 nm, ενώ τα τετραεδρικά σύμπλοκα εμφανίζουν ταινίες απορρόφησης στην περιοχή 1000 - 2000 nm. Οι μεταπτώσεις αυτές είναι γενικά απαγορευμένες (λόγω ηλεκτρικής διπολικής ροπής), με αποτέλεσμα να έχουν ασθενείς εντάσεις $< 200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Πρέπει να σημειωθεί πως οι $d \rightarrow d$ μεταπτώσεις είναι συχνά μαγνητικά επιτρεπτές. Αυτός ο κανόνας επιλογής παίζει σπουδαίο ρόλο στην ερμηνεία των φασμάτων CD οπτικά ενεργών κέντρων χαλκού. Οι $d \rightarrow d$ μεταπτώσεις εμφανίζουν συχνά υψηλής έντασης διχρωικά σήματα σε σχέση με την ένταση των ταινιών απορρόφησης (παράγοντας ανισοτροπίας του Kuhn).

Ο χαλκός είναι απαραίτητος για κάθε οργανισμό ως ιχνοστοιχείο. Το βασικό όργανο, όπου συσσωρεύεται ο χαλκός, είναι το ήπαρ και δευτερευόντως τα νεφρά, ο εγκέφαλος και ο σπλήνας. Η αποθηκεύσιμη μορφή του χαλκού είναι η σερουλοπλασμίνη, η οποία απελευθερώνεται από το ήπαρ σε περίπτωση ανάγκης. Ο χαλκός μπορεί να βρεθεί στο αίμα, ως συστατικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων για την ενεργοποίηση του σιδήρου κατά το σχηματισμό της αιμοσφαιρίνης, σε ορισμένα ένζυμα, καθώς και στο μυϊκό, σκελετικό και νευρικό σύστημα, συμβάλλοντας στην καλή λειτουργία τους. Ο δεύτερος σημαντικός βιολογικός ρόλος του χαλκού αφορά τη μεταφορά του στο σώμα, χάρη στην οποία ελέγχονται οι δύο σοβαρότερες

ασθένειες που προκαλούνται από την έλλειψη χαλκού, δηλαδή η νόσος του Wilson και το σύνδρομο Kroyky. Ο ρόλος του χαλκού στα βιολογικά συστήματα εστιάζεται κυρίως σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που σχετίζονται με την αναγωγή του οξυγόνου προς νερό και τη μεταφορά του οξυγόνου[34].

Πίνακας 1: Τα βασικά χαρακτηριστικά του χαλκού.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΤΟ DNA ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ

3.1 Εισαγωγή

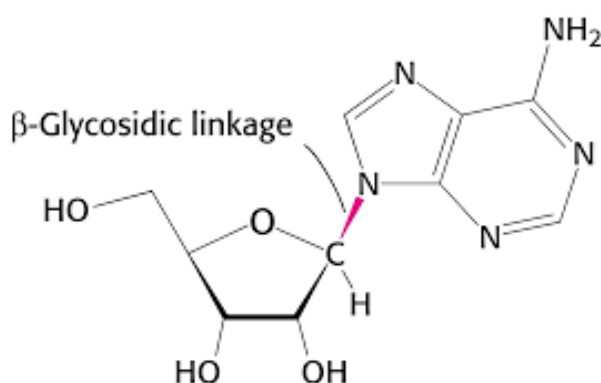
Το DNA αποτελεί βιολογικό στόχο για πολλές χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται κλινικά με στόχο την αντιμετώπιση μιας ποικιλίας παθήσεων. Για παράδειγμα, ένας μεγάλος αριθμός καρκίνων, βακτηριακών μολύνσεων και ιών θεραπεύονται με τη χρήση φαρμάκων που αλληλεπιδρούν μη-ομοιοπολικά με το DNA, ωστόσο η δραστηριότητα μερικών αντικαρκινικών παραγόντων είναι αποτέλεσμα ομοιοπολικής σύνδεσης. Πολλά απ'αυτά τα φάρμακα ασκούν τις θεραπευτικές τους ιδιότητες παρεμβαίνοντας στη φυσιολογική σύνθεση και αντιγραφή του DNA. Αυτό μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση των κλώνων, άλλες οργανικές βλάβες, ή την αλληλεπίδραση με τοποϊσομεράσες (ένζυμα που εμπλέκονται στη μεταγραφή και αντιγραφή του DNA). Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα παρενεργειών μέσω των μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων που επηρεάζουν υγιή κύτταρα, είναι επιθυμητή η ανάπτυξη αντικαρκινικών παραγόντων με σκοπό τη στόχευση βιοχημικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα αποκλειστικά σε καρκινικά κύτταρα. Αυτό θα οδηγήσει στην ανάπτυξη περισσότερο αποτελεσματικών θεραπειών, με μείωση της τοξικότητας που μπορεί να επιφέρει μια θεραπεία στον ασθενή[36].

Τα τελευταία 30 χρόνια έχει εμφανιστεί ένα διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση κινητικά αδρανών συμπλόκων μετάλλων μεταπτώσεως ως συμπλεκτικών παραγόντων στο DNA και στο RNA. Τα σύμπλοκα αυτά διαθέτουν φασματοσκοπικά και φωτοχημικά χαρακτηριστικά τα οποία επιτρέπουν τη λεπτομερή και άμεση μελέτη της αλληλεπίδρασης τους με το γενετικό υλικό. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα από μια πληθώρα τρόπων καθένας από αυτούς καθοριζόμενος από την εκάστοτε δομή του συμπλόκου. Οι αμέτρητες δομικές τροποποιήσεις των συμπλόκων αυτών, καθώς και η διαρκώς βελτιούμενη πορεία των τεχνικών που διαθέτουμε για την εξερεύνηση της σύνδεσης του DNA με τα σύμπλοκα αυτά, μας βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης των μορίων αυτών ως θεραπευτικούς παράγοντες, αλλά και της λειτουργίας του ίδιου του γονιδιώματος [35].

3.2 Η δομή του DNA

Τα νουκλεϊκά οξέα DNA και RNA έχουν ιδανική κατασκευή για το ρόλο τους στη φύση ως φορέων γενετικών πληροφοριών, διότι είναι ομοιοπολικές δομές. Τα μακρομόρια αυτά είναι γραμμικά πολυμερή δομημένα από παρόμοιες μονάδες συνδεδεμένες η μία στην άκρη της άλλης. Κάθε μονάδα του πολυμερούς αποτελείται από τρία επιμέρους συστατικά: ένα σάκχαρο, μια φωσφορική ομάδα και μια βάση. Η αλληλουχία των βάσεων χαρακτηρίζει τη μοναδικότητα ενός νουκλεϊκού οξέος και αντιπροσωπεύει μια γραμμική μορφή πληροφοριών.

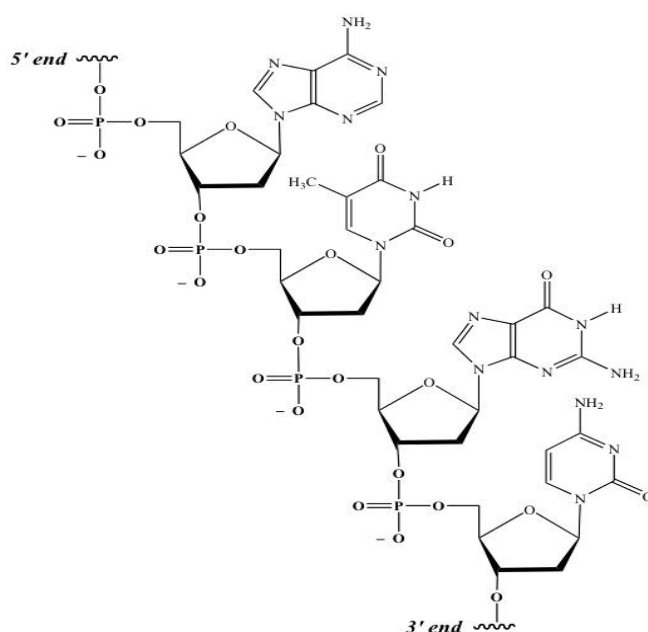
Μια μονάδα που αποτελείται από μια βάση δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο ονομάζεται *νουκλεοζίτης*. Στο DNA οι τέσσερις μονάδες νουκλεοζιτών ονομάζονται δέοξαδενοσίνη, δέοξυγουανοσίνη, δέοξυκυτιδίνη και θυμιδίνη. Σε κάθε περίπτωση, το N-9 μιας πουρίνης ή το N-1 μιας πυριμιδίνης συνδέεται στο C-1' του σακχάρου. Η βάση βρίσκεται επάνω από το επίπεδο του σακχάρου όταν η δομή γράφεται με τον κλασικό τρόπο, δηλαδή η διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού Νείναι β (Σχήμα 5). Ένα νουκλεοτίδιο είναι ο φωσφορικός εστέρας του νουκλεοζίτη.



Σχήμα 5: Ο γλυκοζιτικός δεσμός β σε έναν νουκλεοζίτη.

Το σάκχαρο στο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) είναι δεοξυριβόζη. Το συνθετικό δέοξυ- προσδιορίζει ότι το 2'-άτομο C του σακχάρου δεν έχει το άτομο οξυγόνου που βρίσκουμε συνδεδεμένο στο 2'-άτομο C της ριβόζης (το σάκχαρο στο ριβονουκλεϊκό οξύ, RNA). Τα σάκχαρα στα νουκλεϊκά οξέα συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Ειδικότερα η 3'-υδροξυλική ομάδα (3'-OH) μιας μονάδας σακχάρου ενός νουκλεοτιδίου έχει εστεροποιηθεί με τη φωσφορική ομάδα, και αυτή με τη σειρά της συνδέεται στην 5'-υδροξυλική ομάδα του γειτονικού

σακχάρου. Η αλυσίδα των σακχάρων που συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς ονομάζεται κορμός του νουκλεϊκού οξέος (Σχήμα 6). Με τον τρόπο αυτό, η πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα που δημιουργείται έχει ένα σκελετό που αποτελείται από επανάληψη των μορίων φωσφορική ομάδα – πεντόζη – φωσφορική ομάδα – πεντόζη. Ανεξάρτητα από τον αριθμό των νουκλεοτιδίων, από τα οποία αποτελείται η πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα, το πρώτο της νουκλεοτίδιο έχει πάντα μια ελεύθερη φωσφορική ομάδα συνδεδεμένη στον 5' άνθρακα της πεντόζης του και το τελευταίο νουκλεοτίδιο της έχει ελεύθερο το υδροξύλιο του 3' άνθρακα της πεντόζης του. Για το λόγο αυτό αναφέρεται ότι ο προσανατολισμός της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας είναι 5' 3'.



Σχήμα 6: Ο κορμός του DNA.

Οι δύο βάσεις είναι παράγωγα της *πουρίνης* – η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) και οι άλλες δύο είναι παράγωγα της *πυριμιδίνης* – η κυτοσίνη (C) και η θυμίνη (T). Οι βάσεις αυτές έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ειδικά ζεύγη που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου σχηματίζοντας και σταθεροποιώντας ταυτόχρονα τη διπλή έλικα. Μεταξύ της αδενίνης και της θυμίνης σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου, ενώ μεταξύ της γουανίνης και της κυτοσίνης τρεις δεσμοί υδρογόνου. Οι μεταξύ τους συνδεδεμένες βάσεις, δηλαδή τα ζεύγη A-T και G-C, καλούνται συμπληρωματικά[37].

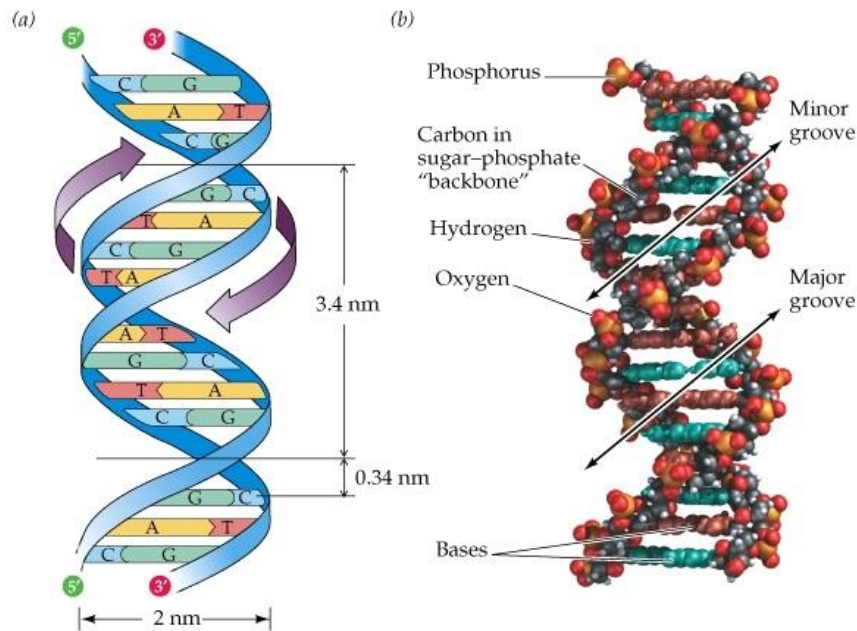
3.3 Η διπλή έλικα του DNA

Η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων εξειδικευμένου ζευγαρώματος βάσεων ανακαλύφθηκε στη διάρκεια μελετών που είχαν στόχο τον καθορισμό της τρισδιάστατης δομής του DNA. Ο Maurice Wilkins και η Rosalind Franklin φωτογράφησαν ίνες DNA με τη μέθοδο της περίθλασης ακτίνων X. Τα χαρακτηριστικά των σχημάτων περίθλασης υποδηλώνουν ότι το DNA αποτελείται από δύο αλυσίδες που στρέφονται σε μια κανονική δομή έλικας. Οι James Watson και Francis Crick, βασιζόμενοι σε αυτά και σε άλλα αποτελέσματα κατέληξαν σε ένα δομικό μοντέλο για το DNA που ήταν συμβατό με τα περιθλασιγράμματα, αλλά συγχρόνως αποτέλεσε και πηγή αξιοσημείωτα οξυδερκών παρατηρήσεων για τις λειτουργικές ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων.

Τα κύρια στοιχεία του μοντέλου Watson-Crick για το DNA που έδωσαν οι περιθλάσεις ακτίνων Χ είναι τα εξής:

- Το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν στο χώρο μια δεξιόστροφη διπλή έλικα. Οι αλυσίδες αυτές έχουν αντίθετες κατευθύνσεις.
- Η διπλή έλικα έχει ένα σταθερό σκελετό που αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μόρια φωσφορικής ομάδας – δεοξυριβόζης ενωμένων με φωσφοδιεστερικό δεσμό. Ο σκελετός αυτός είναι υδρόφιλος και βρίσκεται στο εξωτερικό του μορίου. Προς το εσωτερικό του σταθερού αυτού σκελετού βρίσκονται οι αζωτούχες βάσεις που είναι υδρόφοβες.
- Οι βάσεις είναι σχεδόν κάθετες στον άξονα της έλικας και απέχουν μεταξύ τους 3,4 Å. Η ελικοειδής δομή επαναλαμβάνεται κάθε 34 Å επομένως υπάρχουν 10 βάσεις για κάθε στροφή έλικας. Γενικά υπάρχει μια στροφή 36 μοιρών ανά βάση.
- Η διάμετρος της έλικας του DNA είναι 20 Å.

Στην επιφάνεια της διπλής έλικας του DNA σχηματίζεται μια μεγάλη (ευρεία) αύλακα (majorgroove) και μια μικρή (στενή) αύλακα (minorgroove), καθώς οι κλώνοι πλησιάζουν ή απομακρύνονται ο ένας από τον άλλο κατά την περιέλιξη των αλυσίδων (Σχήμα 7). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι γλυκοζιτικοί δεσμοί που συνδέουν το ζεύγος βάσεων με κάθε δακτύλιο του σακχάρου δεν είναι απευθείας απέναντι ο ένας από τον άλλο. Λόγω αυτού οι δύο κορμοί σακχάρων φωσφορικών δεν είναι ισοδύναμα κατανομημένοι κατά μήκος της ελικοειδούς δομής [35].



Σχήμα 7: (α) Η διπλή έλικα του DNA με τα βασικά χαρακτηριστικά της και (β) η δομή του DNA με χωροπληρωτικό μοντέλο.

Η τοποθέτηση των βάσεων, της μίας επάνω στην άλλη, συμβάλλει στη σταθερότητα της διπλής έλικας κατά δύο τρόπους. Πρώτον, τα γειτονικά ζεύγη βάσεων έλκονται μεταξύ τους λόγω των δυνάμεων Vander Waals. Τα επίπεδα ενέργειας που σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις VanderWaals είναι σχετικά χαμηλά. Σε μια δομή διπλής έλικας, όμως, ο μεγάλος αριθμός των ατόμων που βρίσκονται σε αποστάσεις Vander Waals έχει ως αποτέλεσμα το άθροισμα πολλών ασθενών δυνάμεων να γίνεται εξαιρετικά σημαντικός παράγοντας σταθερότητας για το μόριο. Δεύτερον, η δομή διπλής έλικας σταθεροποιείται από φαινόμενα υδροφοβικότητας. Τετοια φαινόμενα είναι η τοποθέτηση των βάσεων, ή οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων και έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την έκθεση των περισσότερο πολικών επιφανειών στο εξωτερικό του μορίου προς τη πλευρά του περιβάλλοντος νερού. Το στοιβάγμα των βάσεων ευνοείται επίσης από τις στερεοδιατάξεις των σακχάρων του κορμού που είναι πενταμελείς δακτύλιοι με σχεδόν άκαμπτη δομή. Η ακαμψία στα σάκχαρα επηρεάζει και τη μονόκλωνη αλλά και τη δίκλωνη ελικοειδή μορφή[37].

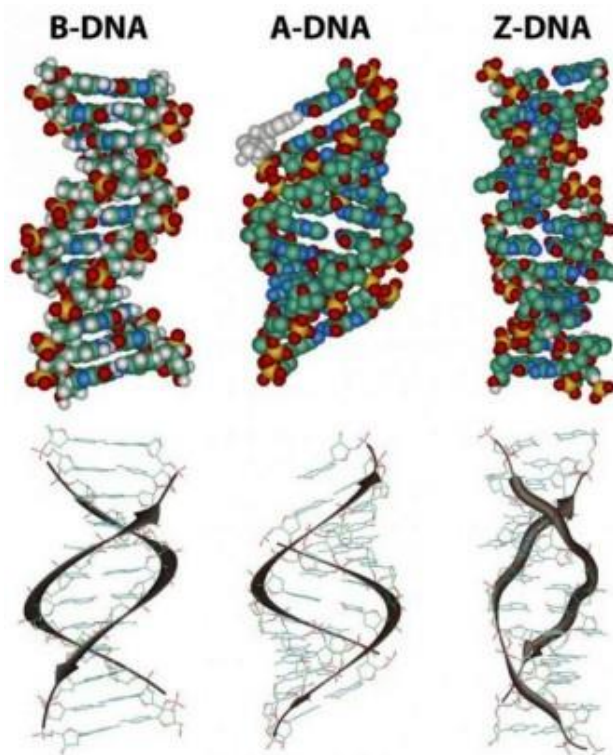
3.4 Οι πιθανές διαμορφώσεις του DNA

Το DNA μπορεί να υιοθετήσει μια ποικιλία διαδορετικών τρισδιάστατων διαμορφώσεων. Το DNA σπάνια υπάρχει ως μια μοναδική μορφή. Αντίθετα προτιμά να σχηματίζει δίκλωνες ή "διπλές" δομές, από τις οποίες οι πιο κοινές είναι γνωστές ως A, B, και Z διαμορφώσεις.

Η πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα της **διαμόρφωσης B** (Σχήμα 8) αποτελείται από μια δεξιόστροφη έλικα. Σε αυτή τη διαμόρφωση η έλικα κάνει μια πλήρη στροφή ανά 10 ζεύγη βάσεων, έχει διάμετρο περίπου 24 Å και βήμα περίπου 35,5 Å (Πίνακας 2) [38].

Όπως η διαμόρφωση B, έτσι και η **διαμόρφωση A** (Σχήμα 8) αποτελείται από μια δεξιόστροφη έλικα. Συγκριτικά όμως με τη διαμόρφωση B, το μέσο μεταξύ των ζευγών βάσεων βρίσκεται έξω απ' το κέντρο του άξονα της έλικας, και έχει γωνία κλίσης περίπου 19°. Το βήμα της έλικας στη διαμόρφωση A (~ 28 Å) είναι σημαντικά μικρότερο απ' ότι στη B (~ 36 Å), έχοντας 11 ζεύγη βάσεων ανα στροφή αντί για 10. Η αύξηση βήματος έλικας ανά ζεύγος βάσεων είναι πολύ πιο χαμηλή (~ 2,6 Å) σε σχέση με αυτή της B (~ 3,4 Å). Σημαντικό επίσης είναι ότι η διαμόρφωση της δεοξυριβόζης στην A είναι C3'-endo (N), αντί για C2'-endo (S) διαμόρφωση που συναντάμε στη B (Πίνακας 2α). Τη διαμόρφωση αυτή αποκτούν μόρια DNA που είναι αφυδατωμένα [38].

Ένας άλλος τύπος διαμόρφωσης DNA είναι η **διαμόρφωση Z** (Σχήμα 8). Η δομή της διαφέρει αισθητά από αυτή των A και B, καθώς αποτελείται από μια αριστερόστροφη έλικα. Στη δομή της Z το ζεύγος G-C ακολουθεί το κλασικό μοντέλο Watson-Crick, αλλά τα κατάλοιπα κυτοσίνης έχουν μια *anti*διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού, ενώ τα κατάλοιπα της γουανίνης αποκτούν μια *syn*διαμόρφωση γεγονός που οδηγεί σε μια μορφή «ζιγκ-ζαγκ» της έλικας. Καθώς η αλληλουχία εναλλάσσεται μεταξύ G και C, εναλλάσσονται επίσης και τα σάκχαρα μεταξύ τη *syn* και *anti* διαμόρφωση. Μια ακόμη διαφορά είναι ότι το κατάλοιπο δεοξυγουανωσίνης είναι στη C3'-endo (N) διαμόρφωση, ενώ το κατάλοιπο δεοξυκυτιδίνης στη C2'-endo (S) διαμόρφωση [38].



Σχήμα 8: Οι τρεις βασικές διαμορφώσεις του DNA αντίστοιχα με χωροπληρωτικό μοντέλο και με την κατεύθυνση της κάθε αλυσίδας.

Πίνακας 2: Τα βασικά χαρακτηριστικά των διαμορφώσεων A-, B- και Z- DNA.

Παράμετρος	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Κατεύθυνση έλικας	Δεξιόστροφη	Δεξιόστροφη	Αριστερόστροφη
Διάμετρος	~ 25,5 Å	~23,7 Å	~18,4 Å
Ζεύγη βάσεων ανά στροφή έλικας	10,7	10,5	12
Στροφή έλικας ανά ζεύγος βάσεων	33 ⁰	36 ⁰	60 ⁰ (ανά διμερές)
Βήμα έλικας	28,2 Å	35,5 Å	44,6 Å
Αύξηση βήματος έλικας ανά ζεύγος βάσεων	2,56 Å	3,38Å	3,71 Å
Διαμόρφωση γλυκοζιτικού δεσμού	<i>anti</i>	<i>anti</i>	C, T, A: <i>anti</i>

			G: <i>syn</i>
Πτύχωση σακχάρων	C3'- <i>endo</i>	C2'- <i>endo</i>	C, T, A: C2'- <i>endo</i> G: C3'- <i>endo</i>
Μεγάλη Αύλακα	Στενή, Βαθεία	Ευρεία, Βαθεία	Επίπεδη
Μικρή Αύλακα	Ευρεία, Ρηχή	Στενή, Βαθεία	Στενή, Βαθεία

3.5 Τρόποι αλληλεπίδρασης του DNA με μικρά μόρια

Το DNA αποτέλεσε στόχος για την ανακάλυψη αντικαρκινικών φαρμάκων πριν ακόμα γίνει γνωστή η δομή του. Αποδείχτηκε ότι ενώσεις που είχαν αναγνωριστεί εμπειρικά για την αντικαρκινική τους δράση, είχαν ως μόριο στόχο το DNA είτε προκαλώντας αλλαγές απευθείας στο ίδιο το μόριο, είτε λειτουργούσαν ως αναστολείς ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της ακαιρεότητας του DNA, ή για τη παροχή δομικών συστάδων για εκείνο. Με την ανακάλυψη της δομής του DNA από τους Watson και Crick το 1953, καθιερώθηκαν πολλές θεραπευτικές ουσίες που είχαν ως στόχο τους το DNA. Τα μεταλλικά σύμπλοκα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA μέσω ομοιοπολικών ή μη ομοιοπολικών μηχανισμών.

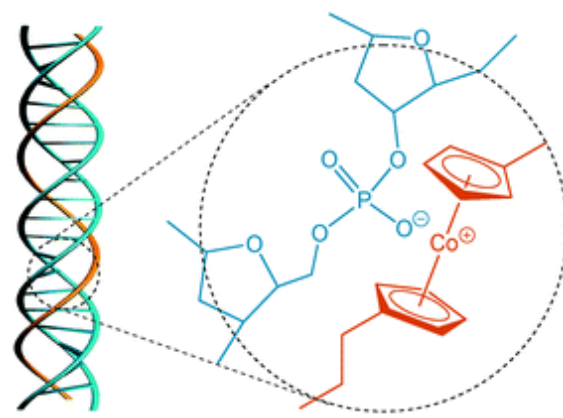
Μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση (non-covalent interaction)

Υπάρχουν τρεις γενικοί τρόποι που χαρακτηρίζουν τη μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση των μικρών μορίων-συμπλόκων με το δίκλωνο DNA: η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση (electrostatic interaction), η συναρμογή στις αύλακες (groove binding) και η παρεμβολή (intercalation). Τελευταία έχει ανακαλυφθεί και ένας νέος τρόπος σύνδεσης, η σύζευξη μέσω φωσφορικών ομάδων (phosphate clamp). Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις προκύπτουν εξαιτίας της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό σκελετό της διπλής έλικας και στις θετικά φορτισμένες απολήξεις των υποκαταστατών των συμπλόκων, του φορτίου του μετάλλου, ή του συνολικού φορτίου του συμπλόκου. Η συναρμογή στις αύλακες περιλαμβάνει δύο ειδών αλληλεπιδράσεις: τη συναρμογή στη μεγάλη αύλακα (major groove binding) και τη συναρμογή στη μικρή αύλακα (minor groove binding). Και οι δύο περιπτώσεις περιλαμβάνουν σύνδεση με δεσμούς Υδρογόνου ή Van Der Waals αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων με τις αζωτούχες βάσεις του DNA. Η παρεμβολή προκύπτει όταν τα σύμπλοκα παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών

βάσεων του DNA. Πολλά γνωστά σύμπλοκα έχουν δείξει περισσότερους του ενός τρόπους αλληλεπίδρασης με το DNA. Αυτή τους η ικανότητα είναι ίσως ο κύριος λόγος της ικανοποιητικής θεραπευτικής τους ισχύος.

Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση (electrostatic interaction):

Αυτού του είδους οι αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα ανάμεσα σε ένα κατιοντικό σύμπλοκο και στον ανιοντικό φωσφορικό σκελετό του DNA (Σχήμα 9). Η διπλή έλικα σταθεροποιείται μέσω εξουδετέρωσης του αρνητικού φορτίου οπότε και μειώνονται οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των γειτονικών φωσφορικών ομάδων. Σύμφωνα με προσεγγίσεις το θετικό φορτίο μπορεί να προκαλέσει μείωση στην ενέργεια των LUMO τροχιακών του υποκαταστάτη, ευνοώντας έτσι την αλληλεπίδραση με τα HOMO τροχιακά των βάσεων του DNA. Η *εξωτερική συναρμογή* αποτελεί έναν βασικό τρόπο ηλεκτροστατικού τύπου αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA.

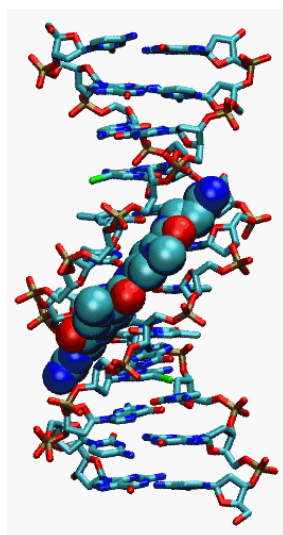


Σχήμα 9: Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση συμπλόκου του Co με τον φωσφορικό σκελετό του DNA.

Συναρμογή στις αύλακες (groovebinding):

Αυτό το είδος συναρμογής περιλαμβάνει απευθείας αλληλεπίδραση του υποκαταστάτη του συμπλόκου με τα άκρα των ζευγών βάσεων στη μεγάλη ή στη μικρή αύλακα του DNA (Σχήμα 10), αφού πρώτα ο υποκαταστάτης έχει μετακινηθεί υδρόφοβα από το διάλυμα στη διπλή έλικα του DNA. Υδρόφοβοι, μη επίπεδοι υποκαταστάτες ευνοούν τη συναρμογή στη μικρή αύλακα. Στις αλληλεπιδράσεις με τη μικρή αύλακα κυριαρχούν ηλεκτροστατικές, Vander Waals, υδροφοβικές και

υδρογονοδεσμικές δυνάμεις. Τυπικό χαρακτηριστικό των μορίων αυτών είναι ότι περιέχουν αρκετούς αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπεται η κίνηση συμπληρωματικά με τη μικρή αύλακα του DNA. Απαραίτητη προϋπόθεση, για τη σύνδεση ενός μικρού μορίου στη μικρή αύλακα, είναι το ημικυκλικό του σχήμα το οποίο είναι συμπληρωματικό ως προς αυτό της μικρής αύλακας. Στο εσωτερικό του ημικυκλίου υπάρχουν ομάδες N-H μέσω των οποίων σχηματίζει δεσμούς H με τα ζεύγη AT. Η πρόσδεση στα ζεύγη GC δεν είναι δυνατή λόγω του N-3 της γουανίνης. Παραδείγματα κατιοντικών δεσμευτικών παραγόντων που συνδέονται στη μικρή αύλακα του DNA είναι τα φυσικά προϊόντα της νετροψίνης (netropsin) και δυσταμυκίνης (distamycin) καθώς και άλλα συνθετικά μόρια[39]. Στο Σχήμα 10 παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση της νετροψίνης με το DNA.



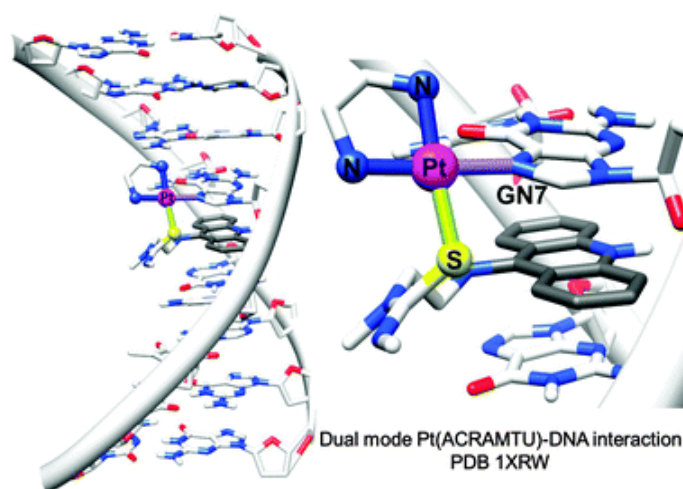
Σχήμα 10: Συναρμογή του μορίου νετροψίνη στη μικρή αύλακα της διπλής έλικας του DNA.

Παρεμβολή (intercalation):

Οι αλληλεπιδράσεις των μεταλλικών συμπλόκων με τα πολυνουκλεοτίδια δεν περιορίζονται σε εκείνες που αφορούν την άμεση πρόσδεση του μεταλλικού ιόντος στο κέντρο του βιοπολυμερούς. Αντιθέτως, μια αφθονία εξαιρετικά επιλεκτικών αλληλεπιδράσεων προκύπτει από ένα σύνολο ασθενέστερων μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συμπλόκων και του νουκλεϊκού οξέος. Τα μεταλλικά σύμπλοκα που δρουν με αυτόν τον τρόπο καλούνται μεταλλοπαρεμβολείς και φέρουν στους υποκαταστάτες τους επίπεδες αρωματικές ομάδες. Στην παρεμβολή το

αρωματικό μέρος της ένωσης μετακινείται από το διάλυμα στην περιοχή που λαμβάνει χώρα η παρεμβολή, μια ευνοϊκή αλληλεπίδραση (υδρόφοβη), αφού ο αρωματικός δακτύλιος του υποκαταστάτη παρεμβάλλεται ανάμεσα στα επίσης υδρόφοβα ζεύγη βάσεων. Έτσι έχουμε αύξηση της απόστασης των ζευγών βάσεων στις θέσεις παρεμβολής, ώστε να μπορέσουν να εισέλθουν αυτά τα μόρια. Υποκαταστάτες, όπως η φαιναθρολίνη, προσανατολίζονται παράλληλα στα ζεύγη βάσεων, μακριά από το μεταλλικό κέντρο, στοιβάζονται εύκολα στη διπλή έλικα και σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων διπόλου – διπόλου μέσω σημαντικής αλληλοεπικάλυψης π – ηλεκτρονίων. Τα αντισταθμιστικά φορτία μπορούν και απομακρύνονται ευκολότερα, αφού καθώς ξετυλίγεται η διπλή έλικα, αυξάνεται η απόσταση των φωσφορικών ομάδων και μειώνεται η πυκνότητα του εντοπισμένου φορτίου. Όσο πιο εκτεταμένοι είναι οι αρωματικοί υποκαταστάτες, τόσο πιο πολύ ευνοείται η παρεμβολή. [39].

Στο Σχήμα 11 παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση του DNA με το σύμπλοκο $[PtCl(en)(ACRAMTU-S)](NO_3)_2$, όπου ACRAMTU= ακριδινυλθουρία [40][41][42].



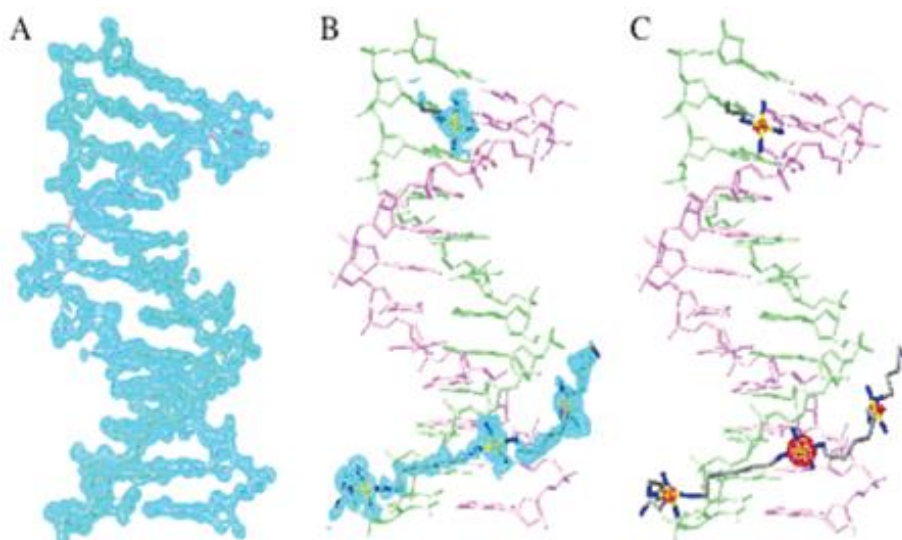
Σχήμα 11: Παρεμβολή του συμπλόκου $[PtCl(en)(ACRAMTU-S)](NO_3)_2$ στη διπλή έλικα του DNA.

Σύσφιξη μέσω φωσφορικών ομάδων (phosphateclamp):

Σχετικά πρόσφατες έρευνες έχουν ρίξει φως σε έναν νέο τρόπο αλληλεπίδρασης συγκεκριμένων πολυπυρηνικών συμπλόκων του Pt(II) με το DNA, τα οποία εμφανίζουν μια τριπυρηνική σύζευξη, που εκτείνεται κατά μήκος του φωσφορικού σκελετού της διπλής έλικας του DNA. Αυτός εμφανίζεται να είναι ένας

τρίτος τρόπος σύνδεσης, με αλληλεπιδράσεις που χρησιμοποιούν αποκλειστικά τις λειτουργικές ομάδες του φωσφορικού σκελετού. Η σύνδεση αυτή αποκλίνει από τις προηγούμενες, δηλαδή τη συναρμογή στις αύλακες και την παρεμβολή. Η σύζευξη στο φωσφορικό σκελετό επιτυγχάνεται, όπως αναφέραμε, με πολυπυρηνικά παράγωγα συμπλόκων του Pt(II), τα οποία μπορούν να ενωθούν με μόρια-υποκαταστάτες που διαφέρουν ως προς το μήκος, τον προσανατολισμό και τη δραστηριότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το $[\{Pt(NH_3)_3\}-2-\mu-\{trans-Pt(NH_3)_2(NH_2(CH_2)_6NH_2)_2\}]$ ή απλούστερα (1, TriplatinNC-A). Το TriplatinNC (Σχήμα 3.9) είναι ένα πολύ-λειτουργικό μόριο που προσδέεται στο DNA, με τρία κατιοντικά κέντρα Pt(II) και δυνατότητα σχηματισμού δεσμών Υδρογόνου. Τα κέντρα Pt(II) συνδέονται με εύκαμπτα, υδρόφοβα θραύσματα αλλά χωρίς τη δυνατότητα σχηματισμού ομοιοπολικής δέσμησης. Το TriplatinNC-A δεν μπορεί να παρεμβληθεί στα ζεύγη των βάσεων και δεν μπορεί να προσδεθεί σε καμία από τις δύο αύλακες του DNA αλλά συνδέεται με τα άτομα O των φωσφορικών ομάδων και έτσι είναι ξεκάθαρο πως αλληλεπιδρά με τον φωσφορικό σκελετό. Τα τρία σύμπλοκα του τριπυρηνικού συστήματος είναι τα επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα τετρα-άμμιο Pt(II), τα οποία σχηματίζουν δισχιδή N-O-N σύμπλοκα με τα άτομα OP του σκελετού σε ένα μοτίβο που ονομάζεται «σφιγκτήρας φωσφορικών». Η αντίδραση φαίνεται να προτιμά τα O2P έναντι των O1P ατόμων σύμφωνα με την παρακάτω σειρά δραστηριότητας: O2P > O1P > οξυγόνο βάσεων και σακχάρων > N.

Το TriplatinNC εκτείνεται κατά μήκος του φωσφορικού σκελετού με έναν τρόπο σύνδεσης που αποκαλούμε “Backbone Tracking” και διατρέχει τη μικρή αύλακα με έναν τρόπο που ονομάζεται “Groove Spanning” (Σχήμα 12). Οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται λόγω της σύνδεσης προκαλούν μια κάμψη στη μεγάλη αύλακα του DNA. Αυτή η κάμψη πιθανώς να οφείλεται στην αλληλεπίδραση ενός Na^+ με μια βάση του DNA[43].



Σχήμα 12:Α) Διάγραμμα ηλεκτρονιακής πυκνότητας της διπλής έλικας του DNA.

(Β)Διάγραμμα ηλεκτρονιακής πυκνότητας του TriplatinNC καθώς περιελίσσεται γύρω από τη διπλή έλικα του DNA. (C) Εικονικό μοντέλο σύνδεσης του TriplatinNC στη διπλή έλικα.

Ομοιοπολική σύνδεση (covalent interaction)

Τα μεταλλικά ιόντα, τα οποία θεωρούνται καλά οξέα κατά Lewis, αλληλεπιδρούν ομοιοπολικά με τις βάσεις του DNA (π.χ. κατάλοιπα του N-7 της G). Αν και η ομοιοπολική σύνδεση των μεταλλικών συμπλόκων με τα νουκλεϊκά οξέα γενικά ελέγχεται κινητικά, ο ρυθμός και η θέση της μεταλλείωσης μπορούν να διαμορφωθούν εύκολα από την αρχική αναστρέψιμη ετεροπολική συνδεδεμένη προ-ένωση. Καθώς το DNA είναι ένα πολυανιόν, το στάδιο πριν τη σύνδεση είναι ιδιαίτερα σημαντικό, αν το μεταλλικό σύμπλοκο είναι κατιοντικού χαρακτήρα. Η ομοιοπολική αλληλεπίδραση είναι μη αντιστρέψιμη και οδηγεί στο σχηματισμό ενώσεων που εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η μεταλλείωση αυτού του τύπου περιλαμβάνει δύο στάδια: 1) την υδρόλυση του μεταλλικού συμπλόκου που οδηγεί στο σχηματισμό δραστικών υδατικών ειδών και 2) την πυρηνόφιλη προσβολή των πουρινών από τα μεταλλοσύμπλοκα, κάτι που οδηγεί στη σύμπλεξη μεταλλικού ιόντος και βάσεων του DNA. Ο αριθμός και η γεωμετρία των ομάδων που απομακρύνονται, καθώς και η θέση σύμπλεξης καθορίζουν τις αλλαγές που πιθανώς προκαλέσει η μεταλλείωση στη δευτεροταγή δομή του DNA (π.χ. κάμψη, στρέβλωση, σχηματισμός μόνο- και πόλυ- λειτουργικών ενώσεων προσθήκης ή δια- και ενδο- σταυροδεσμών (cross-linking) με την διπλή έλικα, τοπική χαλάρωση της

έλικας κ.τ.λ.). Χαρακτηριστικό παράδειγμα ομοιοπολικής σύνδεσης είναι η αλκυλίωση. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, μεγάλος αριθμός αλκυλιωτικών παραγόντων έχουν συνθεθεί στη προσπάθεια να ελεγχθεί η χημική τους δραστηριότητα. Οι ενώσεις που προκαλούν αλκυλίωση είναι έντονα ηλεκτρόφιλες ενώσεις που αντιδρούν χημικά με πυρηνόφιλες ομάδες του DNA, για να σχηματίσουν ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες αντιδρούν κατά προτίμηση με το N-7 της γουανίνης και το N-3 της αδενίνης του DNA. Έτσι το ζευγάρι του DNA μπορεί να ανασταλεί πράγμα που οδηγεί στην αποκωδικοποίηση του DNA. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες δεν δρουν σε κάποια συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου, παρόλα αυτά όμως είναι τοξικότεροι για τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση της κυτταρικής διαίρεσης. Σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα είναι χρήσιμοι για τις αντινεοπλασματικές τους ιδιότητες.[39]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΘΡΑΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

4.1 Γενικά για τους μηχανισμούς

Η θεραπεία του καρκίνου που βασίζεται σε μεταλλοσύμπλοκα, όπως έχει αναφερθεί, είναι μεγάλης σημασίας και κυρίως για τους κακοήθεις όγκους. Όμως, η αποτελεσματικότητά τους, αλλά και η εφαρμογή τους περιορίζονται από τις συστηματικές και έντονες παρενέργειές τους, όπως και από την ανάπτυξη της κυτταρικής αντίστασης σε αυτά. Πολλοί μηχανισμοί στόχευσης και μεταφοράς των φαρμάκων (DTD) αυτών έχουν αναπτυχθεί για την αποφυγή των μειονεκτημάτων που εμφανίζουν τα παραπάνω φάρμακα. Οι μηχανισμοί αυτοί διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: 1) τους ενεργητικούς μηχανισμούς και 2) τους παθητικούς μηχανισμούς.

Οι ενεργητικοί DTD μηχανισμοί χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες μοριακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο φάρμακο και στο καρκινικό κύτταρο ή τον καρκινικό ιστό. Οι παθητικοί μηχανισμοί από την άλλη επιτυγχάνονται με την εκμετάλλευση της αυξημένης διαπερατότητας των κυττάρων στους καρκινικούς ιστούς. Οι βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να υπάρξει ένα ενεργητικό DTD περιλαμβάνουν σύζευξη του συμπλόκου με συγκεκριμένα στοχευτικά μόρια ή ενθυλάκωση του φαρμάκου σε μόρια- ξενιστές.

Στην περίπτωση που θέλουμε να έχουμε παθητικό DTD, κατασκευάζονται μοριακά συγκροτήματα του φαρμάκου μαζί με λειτουργικά πολυμερή ή νανοσωματίδια. Σε πολλές περιπτώσεις DTD περιέχονται τόσο ενεργητικοί, όσο και παθητικοί μηχανισμοί, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και να μειώνονται οι παρενέργειες. Αυτές οι καινοτόμες στρατηγικές θεραπείας του καρκίνου είναι αποτελέσματα πολύ πρόσφατων κλινικών ερευνών όσον αφορά στη θεραπεία που χρησιμοποιεί σύμπλοκα του λευκόχρυσου, χαλκού, ρουθηνίου, αλλά και άλλων μετάλλων [44].

4.2 Ο ρόλος των υδαταθράκων

Οι ενεργητικοί μηχανισμοί χρησιμοποιούν βιοενεργές ουσίες, όπως είναι: i) οι ορμόνες, ii) οι υδατάνθρακες, iii) τα διφωσφονικά, iv) τα πεπτίδια και v) οι πρωτεΐνες [45].

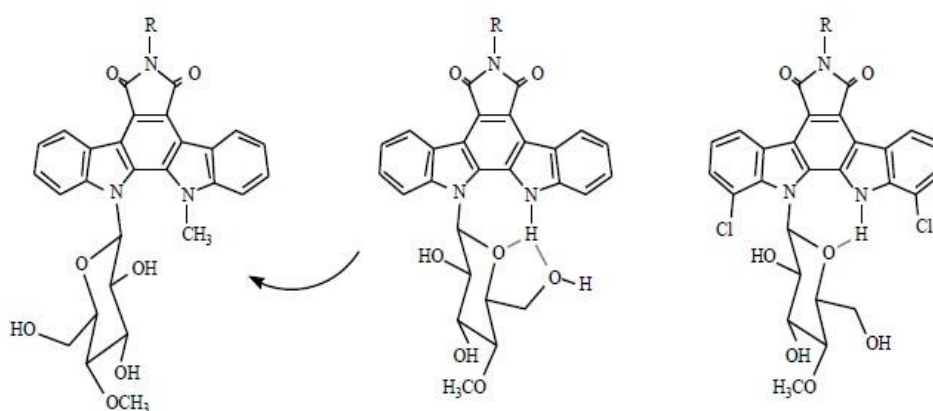
Υδατανάνθρακες: Οι υδατανάνθρακες, όπως μονοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες είναι βασικά συστατικά των γλυκολιπιδίων και των γλυκοπρωτεϊνών, καθώς και δομικά στοιχεία των νουκλεοτιδίων. Τα καρκινικά κύτταρα συνήθως παρουσιάζουν έναν διαφοροποιημένο μεταβολισμό σακχάρων και κυρίως γλυκόζης, για να μπορέσουν μέσω της γλυκόλυσης να παράγουν αρκετή ενέργεια, για να επιβιώσουν στο υποξικό περιβάλλον των κακοηθών βλαβών. Έτσι, οι υδατάνθρακες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μόρια μεταφορείς του φαρμάκου (Σχήμα 16). Οι φυσικοί υδατάνθρακες, όπως και τα συνθετικά τους παράγωγα, διαθέτουν πολλά άτομα δότες, τα οποία μπορούν να συμπλεχθούν με το μεταλλικό κέντρο, και έτσι να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο που παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλους υποκαταστάτες, όπως βιοσυμβατότητα, ευκολία διάσχισης των κυτταρικών μεμβρανών, μη τοξικότητα και υδατοδιαλυτότητα. Το σημαντικότερο όμως είναι πως τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν υποδοχείς που αναγνωρίζουν εκλεκτικά ορισμένα είδη σακχάρων και έτσι τα συμπλεγμένα φάρμακα θα μπορούν με ευκολία να προσδεθούν στα κύτταρα στόχους.[46].

Λόγω των πολλών εφαρμογών των γλυκοζιτών στη βιολογική χημεία, το ενδιαφέρον για τη χρήση τόσο των φυσικών όσο και συνθετικών υδατανθράκων έχει αυξηθεί. Οι συνθετικοί υδατάνθρακες και οι συμπυκνωμένοι γλυκοζίτες ερευνώνται ως προς τη δράση τους σε μια πληθώρα βιολογικών διαδικασιών, όπως οι φλεγμονές, η κυτταρική αναγνώριση, η ανοσολογική απόκριση, η μετάσταση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι αμινογλυκοζίτες ανήκουν στην οικογένεια φυσικών ψευδοολιγοσακχαριτών που αποτελούνται από δύο έως πέντε μονομερή και έχουν μια αναλογία σχεδόν 1:1 ανάμεσα στις αμινο- και υδρόξυ-ομάδες τους.

Κλινικά, αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών συμπεριλαμβανομένων πολλών ασθενειών που προκαλούνται από Gram⁻ βακτήρια. Η αντιβιοτική δράση των αμινογλυκοζιτών οφείλεται στην ικανότητά τους να αναστέλλουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών, καθώς προσδένονται στα ριβοσώματα των βακτηρίων. Συνήθως, οι αμινογλυκοζίτες προσδένονται στην A πλευρά στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (30S) του βακτηριακού ριβοσώματος, οδηγώντας σε λάθος κατά την ανάγνωση στη διαδικασία της μετάφρασης [47].

Αναμενόμενη είναι και η αλληλεπίδραση των αμινογλυκοζιτών με τα νουκλεϊκά οξέα, κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων φορτίων ανάμεσα στις αμινομάδες

και στον φωσφορικό σκελετό των μακρομορίων αυτών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εξάρτηση της δράσης των γλυκοζυλιωμένων μορίων από τη διαμόρφωση του σακχάρου στον χώρο. Λόγω της ελευθερίας του γλυκοζυτικού δεσμού, το σάκχαρο που είναι συνδεδεμένο με το αρχικό μόριο μπορεί να περιστρέφεται και να σχηματίζει δεσμούς H με τα άζωτα των δακτυλίων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δραστηριότητα του εξαιτίας της παρεμπόδισης του ενεργού κέντρου του μορίου. Η πρώτη δομή χαρακτηρίζεται ως ενεργή, ενώ οι άλλες 2 ως ανενεργές. Οι πιθανές διαμορφώσεις που μπορεί να πάρει το μόριο φαίνονται στο Σχήμα 13 [48].



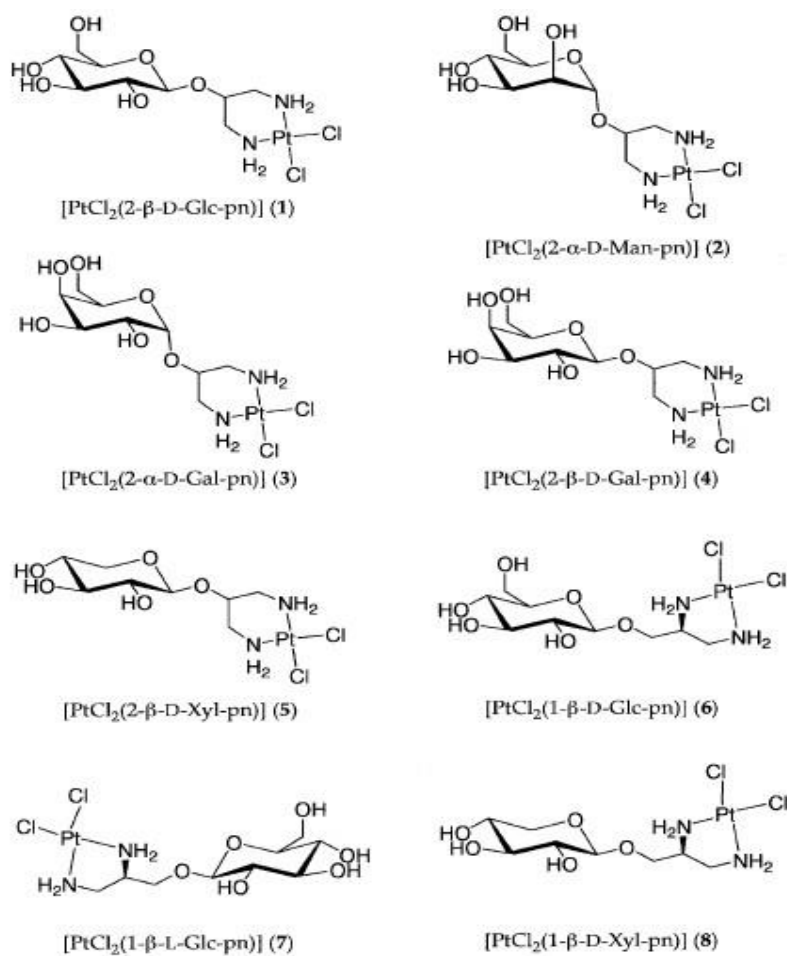
Σχήμα 13: Η δυνατότητα περιστροφής του σακχάρου και ο σχηματισμός δεσμών H μέσω των-H και των-OH επηρεάζουν τη δραστηριότητα του μορίου.

4.3 Σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης με γλυκοζυλιωμένα παράγωγα 1,10-φαινανθρολίνης

Χαρακτηριστικά παραδείγματα συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης και κυρίως του Cu(II) με γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της 1,10-φαινανθρολίνης, έχουν μελετηθεί τόσο ως προς τις δομικές τους, αλλά και ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες. Γενικά τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να διαθέτει ένας υποκαταστάτης, για να μπορεί να αλληλοεπιδράσει με το DNA είναι να περιέχει ένα επίπεδο αρωματικό τμήμα, με σκοπό να εξασφαλιστούν οι π αλληλεπιδράσεις με τις αρωματικές βάσεις του DNA. Πολλά μόρια συνδέονται με πλευρικές αλυσίδες, ουδέτερες ή θετικά φορτισμένες, ώστε να ευνοηθούν οι αλληλεπιδράσεις εξωτερικά του μακρομορίου ή η συναρμογή σε κάποια από τις αύλακές του, μέσω φορτίου στην πρώτη περίπτωση και δεσμών H στη δεύτερη. Στην περίπτωση μεταλλο- οργανικών

ενώσεων, το θετικό φορτίο του μετάλλου φαίνεται να αντικαθιστά τον ρόλο του K^+ ή Na^+ στη σταθεροποίηση της δομής του μακρομορίου. Στα μόρια αυτά, το αρχικό αρωματικό σύστημα της 1,10-φαινανθρολίνης ενώνεται με έναν αμινογλυκοζίτη, όπου μέσω της αμινομάδας συνδέεται με ένα σάκχαρο, όπως η D-γλυκόζη, η D-γαλακτόζη, η D-μανόζη, η L-ραμνόζη και η L-φουκόζη. Με βάση αυτές τις μελέτες, τα μόρια αυτά, καθώς και τα σύμπλοκά τους με μέταλλα μετάπτωσης εμφανίζουν εξαιρετικές ιδιότητες σύνδεσης με το DNA, καθώς την ίδια τάση ακολουθεί η κυτταροτοξικότητά τους και η αντικαρκινική τους δράση. Φαίνεται πως η συνδεδεμένη ομάδα του σακχάρου έχει την τάση να αναγνωρίζει περιοχές του DNA πλούσιες σε G, καθώς αυτό δίνει τη δυνατότητα να δημιουργηθεί ένα μοτίβο μορίων και ομάδων που θα πρέπει να διαθέτουν, με σκοπό να υπάρχει επιτυχής συναρμογή στις αύλακες μέσω αυτών των ομάδων. Η θέση της υποκατάστασης στον αρωματικό δακτύλιο της φαινανθρολίνης είναι συνήθως η θέση 5, εξαιτίας της συνθετικής ευκολίας που παρουσιάζει η θέση αυτή, καθώς και της δραστηκότητάς της.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ενώσεων αποτελούν σύμπλοκα του λευκοχρύσου με υποκαταστάτες που ήδη χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά φάρμακα (Σχήμα 14). Τα σύμπλοκα αυτά έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα, ώστε να φέρουν ομάδες υδατανθράκων. Τέτοια μόρια σχεδιάστηκαν βάσει του oxaliplatin, με σκοπό να ξεπεραστούν παρενέργειες που προκαλούνταν στους ασθενείς από το cisplatin και τα παράγωγά του. Η τροποποίηση αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι τα μόρια αυτά έπρεπε να διαθέτουν ομάδες που να αυξάνουν την εκλεκτικότητα ως προς την πρόσληψή τους από τα ασθενή και όχι τα υγιή κύτταρα. Ένας ακόμη στόχος ήταν και η αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς τους, καθώς διακρίνονται για τη σταθερότητά τους σε υδατικά διαλύματα λόγω αργής υδρόλυσης, με σκοπό την ομαλή αποβολή των μορίων αυτών από τους νεφρούς. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η συσσώρευση των βαρέων μετάλλων στον οργανισμό και κατ' επέκταση η συστηματική τοξικότητα [49].



Σχήμα 14: Οι δομές των συμπλόκων του Pt(II) με υποκαταστάτες διαφοροποιημένους ως προς το είδος του γλυκοζίτη και το είδος του γλυκοζυτικού δεσμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΔΟΜΗΣ

5.1 Εισαγωγή

Γενικά οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χημικής ανάλυσης, όπου ανήκει και η φασματοφωτομετρία UV-VIS, χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την επίλυση διαφόρων χημικών προβλημάτων, που σχετίζονται με τη δομή, την κινητική, την ταυτοποίηση, την ποσοτική ανάλυση διαφόρων ενώσεων, κ.α.

Τα πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων, οφείλονται στα παρακάτω:

- Χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα δείγματος.
- Το δείγμα δεν καταστρέφεται στο τέλος της ανάλυσης.
- Τα όργανα είναι μεγάλης ακρίβειας και ευαισθησίας.
- Ο χρόνος μέτρησης είναι γενικά πολύ μικρός.

Οι περισσότερες από τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους βασίζονται στην επίδραση κατάλληλης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μια ουσία, που δεσμεύεται από τα άτομα, ή τα μόρια της ύλης και προκαλεί ηλεκτρονικές διεγέρσεις, διεγέρσεις πυρήνων, αλλαγές στην περιστροφή και τη δόνηση των μορίων. Στη συνέχεια τα άτομα και τα μόρια επιστρέφουν συνήθως στην αρχική τους κατάσταση, αφού αποβάλλουν το ποσό της ενέργειας που απορρόφησαν. Η καταγραφή της έντασης της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος, ή τη συχνότητα της ακτινοβολίας αποτελεί το φάσμα απορρόφησης, που είναι γραμμικό στα άτομα και ταινίες στα μόρια [35].

5.2 Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis).

Απορρόφηση υπεριώδους (UV : 190 - 400 nm), ή ορατής ακτινοβολίας (visual 400-800 nm), προκαλεί μόνο ηλεκτρονικές διεγέρσεις, δηλαδή διεγέρσεις ηλεκτρονίων της στοιβάδας σθένους, που μεταβαίνουν από μια δεσμική σε μια αντιδεσμική κατάσταση, χωρίς όμως να αλλάζουν τον κύριο κβαντικό αριθμό. Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι, που ανιχνεύουν τις ηλεκτρονικές μεταπτώσεις μπορούν να παρέχουν λεπτομερείς πληροφορίες για τις ηλεκτρονικές και μαγνητικές ιδιότητες τόσο του μεταλλικού ιόντος όσο και των υποκαταστατών [50].

Η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους λοιπόν βοηθάει πάρα πολύ για τον προσδιορισμό της δομής των μεταλλικών συμπλόκων. Με τη μέθοδο UV-Vis

μπορούν να προσδιοριστούν τα ακόλουθα: 1) με ποιο/α άτομο/α συμπλέκεται το μέταλλο μελετώντας τις κορυφές που μετατοπίζονται κατά τη σύμπλεξη και την ένταση των κορυφών, 2) τη στοιχειομετρία του συμπλόκου εφαρμόζοντας τη μέθοδο συνεχών μεταβολών, JOB, 3) τη σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου, 4) την εξαγωγή θερμοδυναμικών μεγεθών, 5) σημαντικές πληροφορίες για την αλληλεπίδραση των μεταλλικών συμπλόκων με το DNA (τιτλοδότηση, καμπύλες θερμικής μετουσίωσης) [35].

5.3 Φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR)

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία (Infrared Spectroscopy, IR) θεωρείται σημαντική φασματοσκοπική τεχνική στην Οργανική Χημεία, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Στην περιοχή υπέρυθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (IR) συμβαίνουν απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις ή κάμψεις των δεσμών των μορίων για ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή, που μεταβάλλεται κατά την παραμόρφωση του μορίου και απορροφούν ισχυρά στην περιοχή υπέρυθρου. Εκτός από τις δονήσεις και τις κάμψεις υπάρχουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting), ή έχει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), κ.λπ. . Η ένταση μιας ταινίας IR εξαρτάται από τον τύπο της δόνησης και από τη διαφορά ηλεκτραρνητικότητας μεταξύ των ατόμων που συμμετέχουν στο δεσμό. Οι περισσότερες πληροφορίες μπορούν να διεξαχθούν από την περιοχή 1.400-4.000 cm^{-1} σ' ένα φάσμα IR. Από ένα φάσμα IR μπορούν αν ληφθούν πληροφορίες για τις λειτουργικές ομάδες μιας ένωσης με τελικό στόχο τον προσδιορισμό της δομής της [51].

5.4 Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR)

Η φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR), έχει βρει μεγάλη εφαρμογή στη μελέτη παραμαγνητικών συστημάτων. Το EPR μας βοηθά να διερευνήσουμε την ηλεκτρονιακή δομή μίας ένωσης. Η ηλεκτρονιακή δομή μιας ένωσης είναι ένας πολύ βασικός παράγοντας που μας δίνει πληροφορίες για τις

ιδιότητες της, τη χημική της δραστηριότητα, εάν το μόριο είναι παραμαγνητικό, οπτικά και άλλα χαρακτηριστικά. Ένα πείραμα EPR παρέχει πληροφορίες για τη συμμετρία του παραμαγνητικού μεταλλικού κέντρου και συνεπώς επηρεάζεται από την επίδραση του πεδίου των υποκαταστατών. Η τεχνική αυτή αποτελεί γενικά μια πιο αποτελεσματική, αλλά ταυτόχρονα και πιο περιορισμένη, ως προς την εφαρμογή της, μέθοδο μελέτης παραμαγνητικών συστημάτων, σε σχέση με τη μελέτη των μαγνητικών ιδιοτήτων τους. Οι δύο μέθοδοι αλληλεπικαλύπτονται αλλά και αλληλοσυμπληρώνονται. Η φασματοσκοπία EPR είναι μια πολύ υψηλής ευαισθησίας τεχνική, που απαιτεί μόνο μερικά μg δείγματος, σε αντίθεση με τη μελέτη μαγνητικών ιδιοτήτων, η οποία απαιτεί ποσότητες της τάξης των mg. Η τεχνική αυτή είναι, εν γένει, εφαρμόσιμη σε συστήματα με περιττό αριθμό ασύζευκτων ηλεκτρονίων, καθώς πολλοί παράγοντες συχνά δεν επιτρέπουν τη λήψη φασμάτων σε συστήματα με άρτιο αριθμό ασύζευκτων ηλεκτρονίων (“integer spin systems”). Τα συστήματα αυτά χαρακτηρίζονται ως EPR ανενεργά (“silent”).

Υπάρχουν δύο τεχνικές μέτρησης της απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας:

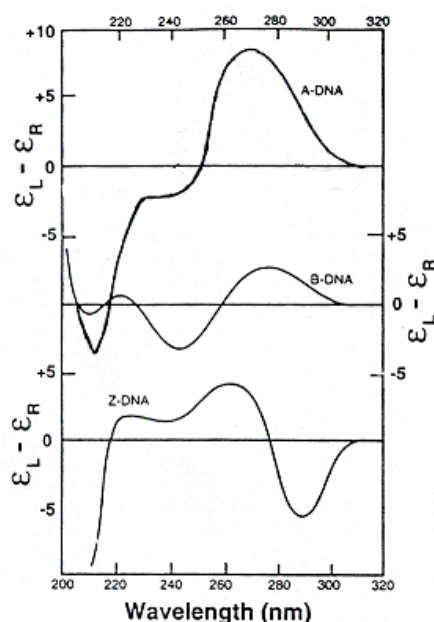
- Η τεχνική EPR συνεχούς κύματος (CW-EPR, continuous wave EPR), κατά την οποία το δείγμα ακτινοβολείται συνεχώς με ακτινοβολία στην περιοχή των μικροκυμάτων. Η τεχνική αυτή, αποτελεί και την «παραδοσιακή» μέθοδο μέτρησης.
- Η τεχνική παλμικού EPR (pulsed EPR), κατά την οποία στο δείγμα επιδρά ένας έντονος παλμός μικροκυματικής ακτινοβολίας. Στη μέθοδο αυτή μετράται η εκπομπή ακτινοβολίας κατά τη χαλάρωση (relaxation) του συστήματος, στη θεμελιώδη κατάσταση. Η τεχνική παλμικού EPR έχει το πλεονέκτημα πως δίνει τη δυνατότητα ελέγχου της ημιζωής της διεγερμένης κατάστασης, δεδομένου ότι η εν λόγω χαλάρωση εξαρτάται από αυτήν. Παρά το γεγονός πως η τεχνική αυτή είναι καινούρια και μόλις πρόσφατα έγινε εμπορικώς διαθέσιμη, έχει βρει πολλές εφαρμογές.

5.5 Κυκλικός Διγρωϊσμός (Circular Dichroism, CD)

Όπως ήδη είναι γνωστό όταν κυκλικά πολωμένα ακτινοβολία διαπεράσει ένα οπτικά ενεργό μέσο, τότε οι δύο κυκλικά πολωμένες συνιστώσες της ακτινοβολίας αυτής κινούνται με διαφορετική ταχύτητα (διαφορετικό δείκτη διαθλάσεως). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, όταν η ακτινοβολία εξέλθει από το μέσο

αυτό, να έχει υποστεί στροφή του επιπέδου πολώσεως της κατά γωνία α . Όταν, επιπλέον, η ακτινοβολία απορροφάται από την οπτικά ενεργό ουσία, τότε επειδή οι δύο συνιστώσες απορροφώνται διαφορετικά, έχουμε την εμφάνιση ενός φαινομένου που ονομάζεται κυκλικός διχρωσμός.

Τα χρωμοφόρα τα οποία είναι υπεύθυνα για τα φάσματα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) στα νουκλεϊνικά οξέα είναι οι πουρινικές και οι πυριμιδινικές βάσεις. Τα ίδια χρωμοφόρα είναι υπεύθυνα και για το διχρωϊκό σήμα. Οι παραπάνω βάσεις, οι οποίες εμφανίζουν ένα επίπεδο συμμετρίας, δεν θα έπρεπε κανονικά να εμφανίζουν οπτική ενεργότητα. Το σάκχαρο όμως που βρίσκεται ενωμένο στον C1' της δεοξυριβόζης επάγει μια ασυμμετρία και έτσι εμφανίζεται ένα ασθενές διχρωϊκό σήμα. Οι ταινίες του φάσματος CD είναι είτε θετικές είτε αρνητικές. Το στοίβαγμα των αρωματικών βάσεων επηρεάζει άμεσα τη μορφή των φασμάτων CD. Λόγω των υδρόφιλων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στο μόριο του DNA καθώς και λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βάσεων μέσω των π-ηλεκτρονίων το μόριο του DNA υιοθετεί ελικοειδή δομή. Οι ηλεκτρονικές μεταπτώσεις των βάσεων (χρωμοφώρων) μπορούν και αλληλεπιδρούν δίνοντας έτσι ισχυρά διχρωϊκά σήματα. Ανάλογα με τη διαμόρφωση του DNA (A-, B-, ή Z-) λαμβάνεται και διαφορετικό φάσμα CD, όπως αυτό γίνεται αντιληπτό και στο Σχήμα 15 [52].



Σχήμα 15. Φάσματα CD για τις πιθανές διαμορφώσεις του DNA. Δεξιά εμφανίζεται πίνακας με τα μήκη κύματος των εμφανιζόμενων ταινιών.

Οι αλληλεπιδράσεις του DNA με ένα άλλο μόριο, οι οποίες επιφέρουν αλλαγές στα δομικά χαρακτηριστικά της έλικάς του, γίνονται άμεσα αντιληπτές με τη βοήθεια της τεχνικής του κυκλικού διχρωισμού. Επίσης γίνονται άμεσα αντιληπτές οι πιθανές αλλαγές των φασματοσκοπικών ιδιοτήτων του μικρού, οπτικά ενεργού μορίου, που επιφέρει η αλληλεπίδρασή του με το DNA. Όταν όμως το μόριο που αλληλεπιδρά δεν είναι χειρόμορφο, δεν εμφανίζει φαινόμενα Cotton και έτσι δεν μπορεί να μελετηθεί με την τεχνική του κυκλικού διχρωισμού. Η ισχυρή, όμως σύνδεση ενός μη χειρόμορφου (μη οπτικά ενεργού) μορίου με ένα χειρόμορφο (οπτικά ενεργό) τοκαθιστά τελικά οπτικά ενεργό και έτσι ανιχνεύσιμο με την τεχνική του κυκλικού διχρωισμού. Παρατηρείται έτσι φαινόμενο της εξ επαγωγής κυκλικού διχρωισμού. [52]

5.6 Φθορισμομετρία (Fluorescence)

Τα τελευταία 20 χρόνια έχει παρατηρηθεί αύξηση της χρήσης της φασματοσκοπίας φθορισμού στις βιολογικές επιστήμες. Η φασματοσκοπία φθορισμού και ο φθορισμός συναρτήσει του χρόνου (time-resolved), θεωρούνται πρώτιστα ερευνητικά εργαλεία στη βιοχημεία και τη βιοφυσική και η χρήση τους έχει επεκταθεί. Στις μέρες μας, ο φθορισμός είναι μια φασματοσκοπία που χρησιμοποιείται εκτενώς στη βιοτεχνολογία, στη διαγνωστική ιατρική, την κυτταρομετρία ροής, την ιατροδικαστική και τη γενετική ανάλυση. Η φθορισμομετρία είναι ευαίσθητη τεχνική, και δεν είναι αναγκαία στις βιοχημικές μετρήσεις η χρήση ακριβών και δύσκολων τεχνικών που περιλαμβάνουν ραδιενεργούς ανιχνευτές. Έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση στη χρήση του φθορισμού για την απεικόνιση των κυττάρων και των μορίων. Η τεχνολογία της φθορισμομετρίας χρησιμοποιείται με πολλούς τρόπους από τους επιστήμονες [53].

Η φασματοφωτομετρία είναι η εκπομπή φωτός (luminescence) από οποιοδήποτε υπέρστρομα και λαμβάνει χώρα από ηλεκτρονικά διεγερμένες καταστάσεις. Η φασματοφωτομετρία αυτή χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, την φθορισμομετρία και τη φωσφορομετρία, ανάλογα με τη φύση της διεγερμένης κατάστασης. Στις διεγερμένες μονές καταστάσεις, το ηλεκτρόνιο στο διεγερμένο τροχιακό είναι συζευγμένο με ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο (αντίθετου spin) στο βασικό τροχιακό. Συνεπώς, η επιστροφή στη θεμελιώδη κατάσταση είναι επιτρεπτή λόγω spin και συμβαίνει γρήγορα με εκπομπή ενός φωτονίου. Ο ρυθμός εκπομπής του

φθορισμού είναι συνήθως 10^8 s^{-1} , κι επομένως ο τυπικός μέσος όρος ζωής είναι περίπου 10ns ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$). Ο χρόνος ζωής φθορισμού (τ) μιας φθορίζουσας ουσίας είναι ο μέσος χρόνος μεταξύ της διέγερσης και της επιστροφής στη θεμελιώδη κατάσταση. Είναι χρήσιμο να εξεταστεί το 1 ns συγκριτικά με την ταχύτητα του φωτός. Το φως ταξιδεύει 30 cm σε 1 νανοδευτερόλεπτο. Πολλές φθορίζουσες ουσίες έχουν μικρότερο χρόνο ζωής από ένα νανοδευτερόλεπτο. Εξαιτίας του μικρού χρόνου ζωής του φθορισμού, μετρήσεις της εκπομπής συναρτήσει του χρόνου απαιτούν περίπλοκες τεχνικές οπτικής και ηλεκτρονικής. Παρά την προστιθέμενη πολυπλοκότητα, η φθορισμομετρία συναρτήσει του χρόνου χρησιμοποιείται ευρέως εξαιτίας των αυξανόμενων διαθέσιμων πληροφοριών από τα δεδομένα, συγκρινόμενη με τις στατικές μετρήσεις. Επίσης, η πρόοδος στην τεχνολογία έχει κάνει τις μετρήσεις συναρτήσει του χρόνου ευκολότερες, ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται μικροσκοπία [53].

Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος φθορισμού λαμβάνεται το φάσμα διέγερσης (excitation) και το φάσμα εκπομπής (emission). Με τη βοήθεια φασμάτων φθορισμού μπορεί να προσδιορισθεί για παράδειγμα, η σταθερά σπόςβεσης Stern-Volmer (K_{sv}), να προσδιορισθεί πώς επιδρά το μέταλλο στο φθορισμό του υποκαταστάτη (π.χ. μείωση του φθορισμού του υποκαταστάτη κατά τη σύμπλεξη με το μέταλλο, quenching), να προσδιορισθεί η σταθερά σχηματισμού συμπλόκων και η σταθερά σύνδεσης μικρών μορίων με το DNA, καθώς επίσης αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την εξαγωγή πληροφοριών για τον τρόπο αλληλεπίδρασης μεταλλικών συμπλόκων με το DNA [9].

5.7 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια τεχνική που ανιχνεύει τον προσανατολισμό των πυρηνικών spin σε ένα μαγνητικό πεδίο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της τρισδιάστατης δομής ενός μορίου. Μπορεί να εφαρμοστεί σε συγκεκριμένους πυρήνες του υδρογόνου, ^1H , του άνθρακα ^{13}C , του αζώτου ^{15}N , του φθορίου ^{19}F και του φωσφόρου ^{31}P . Η θεωρία για το NMR είναι παρόμοια με το EPR, αλλά η εγκατάσταση είναι πολύ διαφορετική για τεχνικούς λόγους. Το NMR βασίζεται σε μια διαδικασία «χαλάρωσης» (relaxation), όπου η ακτινοβολία ραδιοσυχνότητας διεγείρει το μόριο

σε μια διεγερμένη κατάσταση και αυτό το οποίο μετριέται είναι ηεπιστροφή (η«χαλάρωση») του μορίου στη θεμελιώδη κατάσταση. Το παροδικό σήμα υπεισέρχεται ένα μετασχηματισμό Fourier, για να δώσει τελικά το φάσμα NMR.

Από τα πειράματα NMR μπορούν να προσδιοριστούν τέσσερις παράμετροι: η χημική μετατόπιση (δ), η ένταση των κορυφών (I), οι χρόνοι χαλάρωσης και η σταθερά σύζευξης. Τα σύγχρονα όργανα NMR μπορούν να αποδώσουν το συντονισμό σε πολλά πρωτόνια, ακόμα και σε αρκετά μεγάλα μόρια, όχι μόνο επειδή οι μαγνήτες μπορούν και παράγουν πολύ υψηλά πεδία (μέχρι και 900 mHz), αλλά και εξαιτίας της ανάπτυξης των πολυδιάστατων τεχνικών NMR. Το φάσμα NMR δυο διαστάσεων, ή φάσμα ομοπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^1H COSY (correlation spectroscopy, COSY) και το φάσμα NOESY βοηθούν στον προσδιορισμό των «γειτονικών» ατόμων. Αυτό γίνεται, διότι με το COSY μελετώνται τα πρωτόνια που βρίσκονται σε γειτονικά άτομα, ενώ με το φάσμα NOESY μπορούν να ανιχνευθούν δυο πρωτόνια που βρίσκονται σε απόσταση περίπου 0,5 nm το ένα με το άλλο, επειδή το ένα επηρεάζει το spin του άλλου [70]. Βέβαια, υπάρχουν και άλλες κατηγορίες φασμάτων NMR, όπως ετεροπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) που συσχετίζει τα πρωτόνια με τους άνθρακες που παρουσιάζουν σύζευξη κατά μήκος ενός απλού δεσμού. Το HSQC είναι ιδανικό για την μελέτη ενώσεων που δίνουν πολύπλοκα φάσματα, με κορυφές πολύ κοντά η μία στην άλλη. Επίσης, το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^{13}C CHMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) συσχετίζει τα πρωτόνια με τους άνθρακες που παρουσιάζουν σύζευξη κατά μήκος δύο ή τριών χημικών δεσμών [50].

5.8 Ιξωδομετρία

Οι μετρήσεις του ιξώδους, ή κοινώς η ιξωδομετρία, χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του μοριακού βάρους των νουκλεϊνικών οξέων και για τις επιδράσεις των διαλυτών στη μεγάλη μήκους δομή και διαμόρφωσή τους. Και ενώ η ιξωδομετρία δεν είναι μία συνηθισμένη μέθοδος για τη μελέτη των νουκλεϊνικών οξέων, ήταν μία από τις τεχνικές που οδήγησε, τη δεκαετία του 1960, στο θεμελιώδη χαρακτηρισμό του μοριακού βάρους και της ακαμψίας του DNA.

Είναι δυνατόν, μάλιστα, με μετρήσεις του ιξώδους να διαγνωσθεί το είδος της αλληλεπίδρασης, όπως π.χ. παρεμβολή, δέσμευση στις αύλακες, κ.ά. Ειδικότερα

παρατηρείται ότι κλασσικά μόρια παρεμβολείς αυξάνουντο 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 περιμετρικό μήκος της και κατά συνέπεια και το ιξώδες του μορίου.

Το σχετικό ιξώδες των νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται από τη σχέση:

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

όπου t ο χρόνος (sec) ροής του κάθε διαλύματος και t₀ ο χρόνος του διαλύτη. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων γίνονται τρεις διαφορετικές μετρήσεις, οι οποίες δεν διαφέρουν περισσότερο από 0,2 sec και τελικός χρόνος λαμβάνεται ο μέσος όρος. Η αύξηση του περιμετρικού μήκους της έλικας του DNA υπολογίζεται από τα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με την προσεγγιστική σχέση:

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

όπου L, L₀ το περιμετρικό μήκος του ραβδόμορφου DNA, παρουσία και απουσία του φαρμάκου αντίστοιχα, η, η₀ τα εσωτερικά ιξώδη (για τις πολύ αραιές συγκεντρώσεις του πειράματος κατά προσέγγιση ίσα με τα ανηγμένα ιξώδη) παρουσία και απουσία του φαρμάκου αντίστοιχα, t, t_{DNA} και t₀ είναι οι χρόνοι ροής των διαλυμάτων DNA παρουσία του φαρμάκου, του διαλύματος DNA απουσία φαρμάκου και του διαλύτη (ρυθμιστικό διάλυμα) αντίστοιχα.

Αναλυτικότερα, η B-μορφή του DNA υιοθετεί τη δομή μίας σχετικά στενής δεξιόστροφης έλικας διαμέτρου 23,7Å και μακροσκοπικά θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ραβδόμορφη. Τα επίπεδα οργανικά αρωματικά μόρια, που συνηθίζουν να αλληλεπιδρούν με τη διπλή έλικα του DNA παρεμβάλλοντας το σύστημα των δακτυλίων τους μεταξύ των ζευγών βάσεων του, διαχωρίζουν τα ζεύγη των βάσεων μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται κατά απόσταση περίπου ίση με το πάχος τους, αποελίσσοντας τοπικά τη διπλή έλικα. Όπως είναι φυσικό, η θεωρούμενη ως κανονική περιστροφή των 36° μεταξύ δύο διαδοχικών ζευγών βάσεων μειώνεται, ανάλογα με τη στερεοχημική δομή του μορίου που παρεμβάλλεται. Έτσι, κάθε μόριο παρεμβολέας αυξάνει το περιμετρικό μήκος του ραβδόμορφου DNA [52].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΑ – ΜΙΚΡΟΣΥΣΚΕΥΕΣ –
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

6.1 Αντιδραστήρια

- **Cu(CIO₄)₂·6H₂O:** Alfa Aesar GmbH &CoKG.
- **2, 9-Dimethy;-1,10-phenanthroline:** Alfa Aesar GmbH &Co KG.
- **D(+)- Glucose Monohydrat:** FerakBerlin.
- **Benzoyl chloride:** Alfa Aesar GmbH &Co KG,99+%.
- **Hydrobromic acid solution:** SIGMA ALDRICH, 33% wt in aceticacid.
- **Pyridine:** Chem- LabNV.
- **THF:** J.T. Baker.
- **CH₃OH:** SIGMA ALDRICH,99.8%.
- **CD₃OD:** Euriso top, 99.8% σεD.
- **CH₃CH₂OH:** Carlo ErbaReagents.
- **H₂O:** απότησυσκευήαπιονισμένουδάτοςMilli-QplusτηςMillipore.
- **DMSO:** Carlo ErbaReagents.
- **DMSO D₆:**Euriso-top.
- **Selenium (IV) oxide:** Alfa Aesar GmbH &CoKG.
- **1,4 Dioxane:** SIGMAALDRICH.
- **Acetonitrile:** Carlo ErbaReagents.
- **Na₂HPO₄·7H₂O:** Merck.
- **KH₂PO₄:** Merck.
- **NaCl:** PENTA.
- **KBr:** Merck.
- **Calf Thymus DNA:** ίνεςφυσικού DNA απόθύμοαδέναβοοειδούς typeII, μετά νατρίουάλας, 42%.
- **Medium (D-MEM):** BiochemAG.
- **Θρυψίνη-EDTA:** BiochemAG.
- **FBS:** PAALaboratories.
- **L-Γλουταμίνη:** PAALaboratories.
- **Πενικιλίνη:** Biochem AG.

- **LNCaP Cell Line human: SIGMAALDRICH.**

6.2 Όργανα – Μικροσυσκευές

- **Φασματοφωτόμετρο UV-VisCARY 3E:** συνδεδεμένο με H/Y και κυκλοφορητή ύδατος στο θερμοστατούμενο πολλαπλό υποδοχέα κυψελίδων, Varian
- **Φασματοφωτόμετρο CD J 715:** spectropolarimeter, JascoCorp
- **pH-μετρο Xenon:** ηλεκτρόδιο λευκοχρύσου RUSSELCMAWL/3.7/180
- **Ψηφιακός Αναλυτικός Ζυγός ADAM:** $\pm 0.1\text{mg}$
- **Μικροπιπέτες:** ‘Precision Variable-Volume Pipettes’ i) 100-1000 μL High Tech. Lab., ISO 9001 και ii) 10-100 μL , Hamilton, ISO9001
- **Κυψελίδα UV-Vis:** από χαλαζία, οπτικής διαδρομής 1cm
- **Κυψελίδες NMR:** NMR tubes, SDS, διαμέτρου 5mm και μήκους 178mm
- **Φασματοφωτόμετρο NMR:** 300 MHz, Varian
- **Ιξωδόμετρο:** SI Analytics CK300
- **EPR:** Bruker ESP380E
- **Φασματοφωτόμετρο IR:** IRAffinity-1, Shimadzu
- **Φθορισμόμετρο λάμπας Xe:** Shimadzu Spectrofluorophotometer RF 5301PC
- **Φασματοφωτόμετρο ELISA:** Sirio S Seac RADIM-Group Diachel ELISA platereader

6.3 Μεθοδολογία - Παρασκευή διαλυμάτων

A) Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη

Ο χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη (PDGluc) έγινε με τη βοήθεια των ακόλουθων μεθόδων: Φασματοσκοπίας μάζας, Φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H-NMR-COSY}$, HSQC , ^{13}C), Φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και φθορισμομετρίας.

Φασματοσκοπία Υπερύθρου

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

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Λήφθηκε φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και φάσμα $^1\text{H} - ^1\text{HCO}SY$, σε διάλυμα συγκέντρωσης 15 μM , σε διαλύτη δευτεριωμένο διμέθυλοσουλφοξείδιο, DMSO και στους 25 °C.

Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Παρασκευάστηκαν διαλύματα της PDGluc σε διαλύτες μεθανόλη, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, νερό συγκεντρώσεων 10^{-4}M . Για τα συγκεκριμένα παρασκευασθέντα διαλύματα λήφθηκαν φάσματα UV-Vis στην περιοχή 230-600 nm και 200-600 nm σε διαλύματα με διαλύτη μεθανόλη και σε θερμοκρασία 25 °C. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα με $b = 1\text{cm}$.

Φθορισμομετρία

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σε διαλύματα της PDGluc σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 10^{-4}M . Το μήκος κύματος διέγερσης της PDGluc είναι 271 nm, 290 nm 312 nm και 326 nm (excitation wavelength) και μετρήθηκε ο φθορισμός της από τα 300-900 nm και το μήκος κύματος διέγερσης από 220-400 nm.

B) Χαρακτηρισμός του συμπλόκου

Ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου του Cu (II) με την PDGluc, πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες τεχνικές: Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), Φθορισμομετρία και Φασματοσκοπία EPR.

Φασματοσκοπία Υπερύθρου

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

Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Παρασκευάστηκαν διαλύματα του συμπλόκου σε διαλύτες μεθανόλη, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, νερό συγκεντρώσεων 10^{-4}M . Για τα συγκεκριμένα παρασκευασθέντα διαλύματα λήφθηκαν φάσματα UV-Vis στην περιοχή 230-600 nm και 200-600 nm σε διαλύματα με διαλύτη μεθανόλη και σε θερμοκρασία 25 °C. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα με $b = 1\text{cm}$.

Φθορισμομετρία

Στο σύμπλοκο που συνθέσαμε, μετρήθηκε η ένταση φθορισμού του, σε διάλυμά του συγκέντρωσης 10^{-4} M, σε διαλύτη μεθανόλη. Το μήκος κύματος διέγερσης (excitation wavelength) του Cu-PDGluc ήταν 235 nm, 275 nm και 295 nm.

Φασματοσκοπία EPR

Παρασκευάστηκε διάλυμα του συμπλόκου Cu-PDGluc σε διαλύτη νερό-γλυκερίνη 1:1 και λήφθηκε φάσμα EPR, X band, σε 70K και συχνότητα mw 9,701203 GHz.

Γ) Μελέτη της αλληλεπίδρασης με DNA

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

Παρασκευή διαλύματος DNA

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

Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

i) **Παρασκευή αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--K}_2\text{HPO}_4$.** Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 1,7867 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και αραιώνονται με απιονισμένο νερό milli-Q σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα A). Έπειτα ζυγίζονται 0,9073 g K_2HPO_4 και αραιώνονται ομοίως με νερό milli-Q σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα B). Εν συνεχεία αναμιγνύονται 58,7 mL του διαλύματος A και 41,3 mL του διαλύματος B σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζεται το αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--K}_2\text{HPO}_4$, το οποίο έχει $\text{pH} \approx 7$ και μετριέται κάθε φορά πριν τη χρήση του.

ii) **Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10.** Παρασκευάζεται με 1:10 αραιώση του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--K}_2\text{HPO}_4$. Δηλαδή,

μεταφέρονται 10 mL του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται με απιονισμένο νερό milli-Q.

iii) Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10 με Na^+ , 0,1 M σε NaCl. Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 0,5844g NaCl και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Η φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή είτε με το παραπάνω παρασκευασθέν ρυθμιστικό διάλυμα DNA 1:10, είτε προστίθενται σε αυτήν 10 mL του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ και το υπόλοιπο συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό milli-Q.

Παρασκευή διαλύματος DNA και υπολογισμός της συγκέντρωσής του.

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

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

Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της PDGluC και του συμπλόκου με το DNA παρασκευάστηκαν 2 σειρές διαλυμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα, μια για την PDGluC και μια για το σύμπλοκο, διατηρώντας σταθερή είτε τη συγκέντρωση της PDGluC είτε τη συγκέντρωση του συμπλόκου και ίσες με 11,3 μM , και μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του DNA έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[\text{DNA}]/[\text{PDGluC}]$, $R=[\text{DNA}]/[\text{Cu-PDGluC}]$). Σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε

κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε τελικά η ποσότητα [μεθανολικό διάλυμα PDGluс ή Cu-PDGluс + μεθανόλη] να παραμένει σταθερή και ίση με 2% v/v. Τα διαλύματα αυτά παρέμειναν για επώαση 24 h. Στα διαλύματα αυτά, λήφθηκαν φάσματα UV-Vis, από 600-200 nm, σε θερμοκρασία 25°C.

Κυκλικός Διχρωϊσμός

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

Φθορισμομετρία

Άλλη μια τεχνική που εφαρμόστηκε για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των ενώσεων μας (PDGluс και Cu-PDGluс) με το DNA είναι η φθορισμομετρία μέσω πειραμάτων ανταγωνισμού με το βρωμιούχο αιθίδιο. Αρχικά, θα πρέπει να βρούμε σε ποια αναλογία $[DNA]/[EtBr]$ υπάρχει κορεσμός του DNA με το EtBr. Για να πραγματοποιηθεί αυτό παρασκευάστηκε μια σειρά διαλυμάτων DNA-EtBr, στην οποία παρέμεινε σταθερή η τελική συγκέντρωση του EtBr και ίση με 3,125 μM σε τελικό όγκο 8 mL και μεταβαλλόταν η συγκέντρωση του DNA έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[DNA]/[EtBr]$). Σε αυτήν την περίπτωση δεν πραγματοποιήθηκε επώαση των διαλυμάτων DNA-EtBr. Ως μήκος κύματος διέγερσης επιλέχθηκε 526 nm για να μετρηθεί η ένταση φθορισμού του EtBr. Αφού βρέθηκε ο κορεσμός του DNA με το EtBr σε αναλογία $[DNA]/[EtBr]=8/1$, παρασκευάστηκαν 2 σειρές διαλυμάτων (DNA-EtBr-PDGluс και DNA-EtBr- Cu-PDGluс) διατηρώντας σταθερή την αναλογία $[DNA]/[EtBr]$ (όπου η τελική συγκέντρωση του DNA ήταν ίση με 25 μM και η τελική συγκέντρωση του EtBr ήταν ίση με 3,125 μM) και μεταβαλλόταν η συγκέντρωση της PDGluс ή του Cu-PDGluс έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[X]/[DNA-EtBr]$, X: PDGluс, Cu-PDGluс). Σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε

τελικά η ποσότητα [μεθανολικό διάλυμα PDGluC ή Cu-PDGluC+μεθανόλη] να παραμένει σταθερό και ίσο με 2% v/v. Τα διαλύματα αυτά παρέμειναν για επώαση 24 h.

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

Ιξωδομετρία

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΗ 2,9-ΔΙΣ-[(2R, 3S, 4R, 5R) -2,3,4,5,6-ΠΕΝΤΑΪΔΡΟΞΥΕΞΑΝΑΛΗ]-1,10-ΦΑΙΝΑΝΘΡΟΛΙΝΗΣ

7.1 Σύνθεση της PDGluc

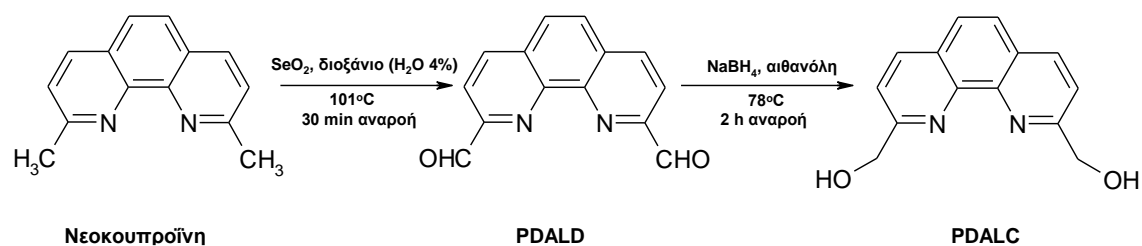
Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός νέου παραγώγου της 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης, όπου οι μέθυλο-ομάδες της συνδέθηκαν με δύο μόρια γλυκόζης μέσω ενός αιθερικού δεσμού. Τα άτομα δότες εξακολουθούν να είναι τα άζωτα όπως και στο αρχικό μόριο. Η αναλυτική πορεία σύνθεσης της 2,9-δισ-[(2R, 3S, 4R, 5R) -2,3,4,5,6-πενταϊδροξυεξανάλη]-1,10φαινανθρολίνης ή για λόγους συντομίας **PDGluc** πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Καθηγητή Κ.Μεθενίτη και περιγράφεται παρακάτω:

7.2 Σύνθεση PDALC

2,3 g (21 mmol) SeO_2 διαλύονται σε 50 mL διοξάνιο και 2 mL H_2O υπό συνεχή ανάδευση έως να διαλυθούν πλήρως οι κρύσταλλοι του στερεού. Παράλληλα 2 g (9,6 mmol) 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης διαλύονται σε 50 ml διοξάνιο. Στο θερμό διάλυμα του SeO_2 προστίθεται στάγδην το διάλυμα της 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης σε χρόνο 30 λεπτών και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε ελαιόλουτρο (101 °C) με χρήση αναρροής για 30 λεπτά επιπλέον. Κατά την ανάμιξη το διάλυμα από διαυγές έγινε πορτοκαλί-κόκκινο.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται εν θερμώ διήθηση από celite για την απομάκρυνση υπολειμμάτων του SeO_2 και έκπλυση με θερμό διοξάνιο. Το διήθημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματιού για 24 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό, έκπλυση με διεθυλαιθέρα (3 x 10 mL) και παραλαμβάνεται πορτοκαλί στερεό (**PDALD**) το οποίο ανακρυσταλλώνεται από THF. Ζυγίστηκε 1,4 g PDALD ($\alpha = 70\%$). Σε σφαιρική φιάλη που περιείχε 150 mL αιθανόλη διαλύονται 1,4 g (6 mmol) PDALD και 0,9 g (24 mmol) NaBH_4 . Το διάλυμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση με αναρροή (78° C) για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολουθεί διήθηση, ψύξη για 24 ώρες και συμπύκνωση του διαλύματος μέχρι ξηρού. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl προς απομάκρυνση NaBH_4 που δεν έχει αντιδράσει και ακολουθεί διήθηση υπό κενό οπου

το ίζημα (PDALC) εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Ζυγίστηκαν 0,63 g (2,6 mmol) PDALC ($\alpha = 31,5\%$).[55][56]



Σχήμα 16: Η πορεία σύνθεσης της PDALC.

7.3 Σύνθεση Βρωμιωμένου Προστατευμένου Σακχάρου (BzGlucBr)

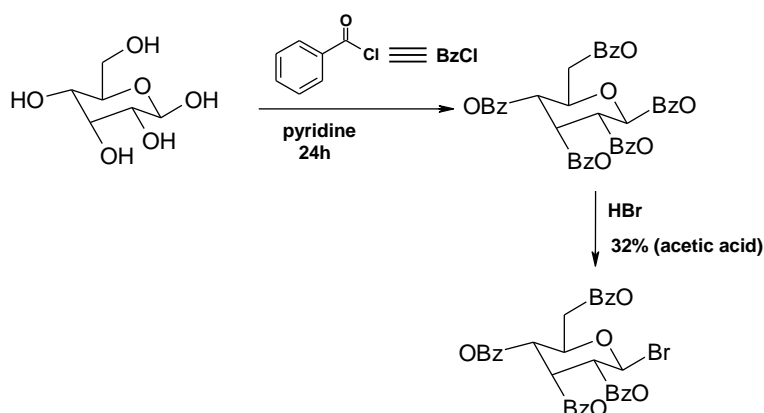
5 g (27,8 mmol) D-(+)-γλυκόζης προστέθηκαν σε 50 mL πυριδίνης σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη και τοποθετήθηκαν σε υδρόλουτρο υπό ήπια θέρμανση προς πλήρη διάλυση του στερεού και στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο με την θερμοκρασία να φτάνει τους 10-12 °C. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται στάγδην 13,9 mL (240 mmol) βενζύλοχλωριδίου για 40 min και το μίγμα παραμένει υπό μηχανική ανάδευση για 24 h.

Προστέθηκαν στη συνέχεια 67,5 mL H₂O και ακολουθεί εκχύλιση με DCM (3x100 mL). Απομονώθηκε η οργανική φάση. Έγινε έκπλυση με 100 mL H₂O, 100 mL HCl 1N και 2 φορές με 100 mL κορεσμένου υδατικού διαλύματος NaHCO₃ και κρατήθηκε η οργανική φάση. Τέλος έγινε ξήρανσή της με MgSO₄ και αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 ώρες.

Μετά τις 24 ώρες πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση μέχρι το διάλυμα να γίνει σκούρο ελαιώδες, προσθήκη 30 mL DCM και ψύξη σε παγόλουτρο μέχρι τους 0° C. Στη συνέχεια προστέθηκαν στάγδην 23,7 mL (120 mmol) HBr 32% σε οξικό οξύ για 30 λεπτά υπό μηχανική ανάδευση για 24 h. Κατόπιν προστέθηκαν 30 mL DCM, έγινε έκπλυση με κρύο H₂O 3x50 mL, με NaHCO₃ 3x50 mL (για εξουδετέρωση του HBr) και κρατήθηκε η οργανική φάση. Έγινε ξήρανσή της με MgSO₄ και παρέμεινε υπό ανάδευση για 24 ώρες.

Τέλος έγινε απλή διήθηση για να συγκρατηθεί το MgSO₄ και διήθηση υπό κενό μέσω ενεργού άνθρακα. Πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση μέχρι ξηρού και ανακρυστάλλωση με διαιθυλαιθέρα και πετρελαιοειδή, με αποτέλεσμα να

καταβυθιστεί λευκό στερεό. Έγινε διήθηση υπό κενό για παραλαβή του στερεού. Ζυγίστηκαν 7,44 g στερεού (5,3 mmol) στερεής προστατευμένης γλυκόζης ($\alpha=19,1\%$).[57]



Σχήμα 17: Η πορεία σύνθεσης του σακχάρου.

7.4 Σύνδεση PDALC-BzGlucBr

0,15 g (6 mmol) NaH, 1mmol (0,24 g) PDALC και 10 ml άνυδρο THF προστίθενται και το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση 1 ώρα υπό ατμόσφαιρα Ar. Στη συνέχεια, 0,54 g (2 mmol) βενζυλιωμένου σακχάρου διαλυμένα σε 20 mL άνυδρου THF προστίθενται στάγδην σε χρονικό διάστημα 30 λεπτών και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες. Παρατηρείται μεταβολή του χρώματος από υποκίτρινο σε σκούρο καφέ. Μετά τις 24 ώρες ακολουθεί συμύκνωση μέχρι ξηρού, προσθήκη 10 ml νερού και εκχύλιση με 20 mL DCM. Παραλαμβάνεται η οργανική φάση και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού όπου και παραλαμβάνεται το ανοιχτόχρωμο καφέ στερεό που αποτελεί τον προστατευμένο υποκαταστάτη.

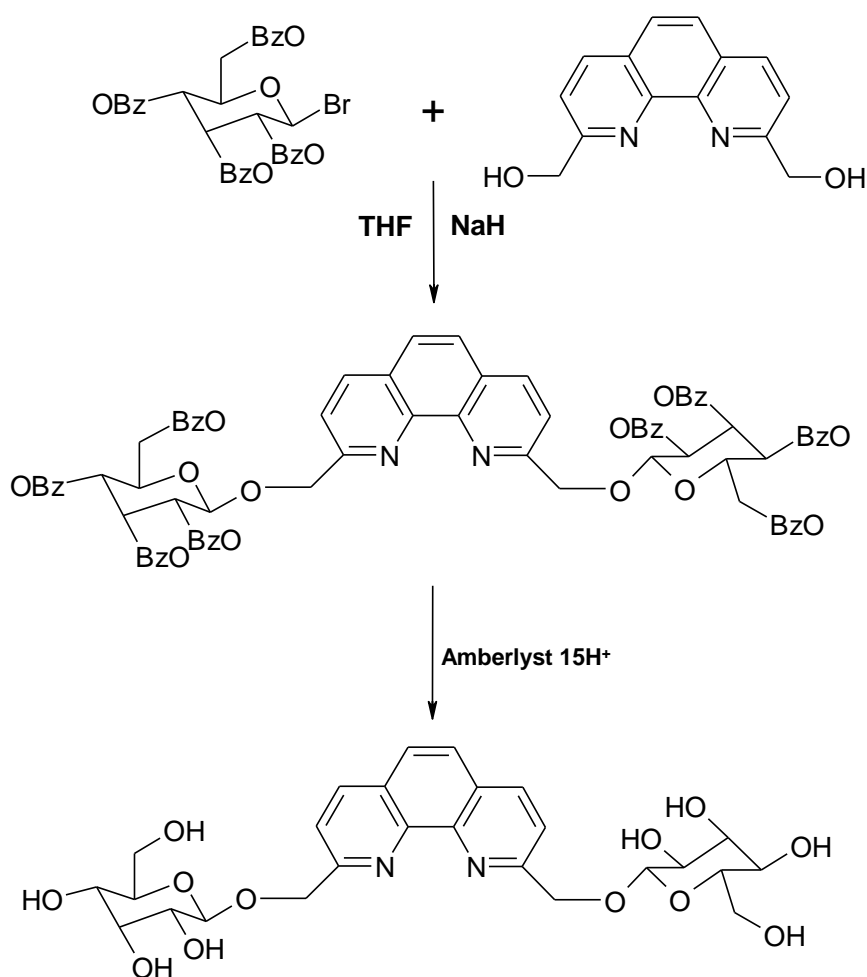
Για τον καθαρισμό του στερεού πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης μίγμα $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ (6% CH_3OH).[54][55]

Πίνακας 3: Οι λόγοι Rf των BzGlucose, PDALC και PD-BzGluc.

Ένωση	Rf
BzGlucose	1
PDALC	0.1
PD-BzGluc	0.5

7.5 Αποπροστασία PDBzGluc

0,3 g (0,22 mmol) PDBzGluc διαλύονται σε 10 mL μίγματος $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ με αναλογία 1:2 και στο διάλυμα αυτό γίνεται προσθήκη 0,3 mL CH_3ONa και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη ρητίνης Amberlyst[®] 15H⁺ ενεργοποιημένη με HCl 1N. Η προσθήκη γίνεται έως το pH του διαλύματος να βρίσκεται μεταξύ 7 και 8. Ακολουθεί διήθηση από από ηθμό προς απομάκρυνση της ρητίνης και συμπύκνωση έως το υπόλειμμα να είναι σκούρο κίτρινο και ελαιώδες. Το έλαιο με απομάκρυνση από τη σφαιρική φιάλη διαλύεται στον ελάχιστο όγκο νερού και λυοφιλιώνεται. Έτσι παραλαμβάνουμε τον πλήρως αποπροστατευμένο υποκαταστάτη PDGluc ως ανοιχτόχρωμο καφέ στερεό.[54][55]

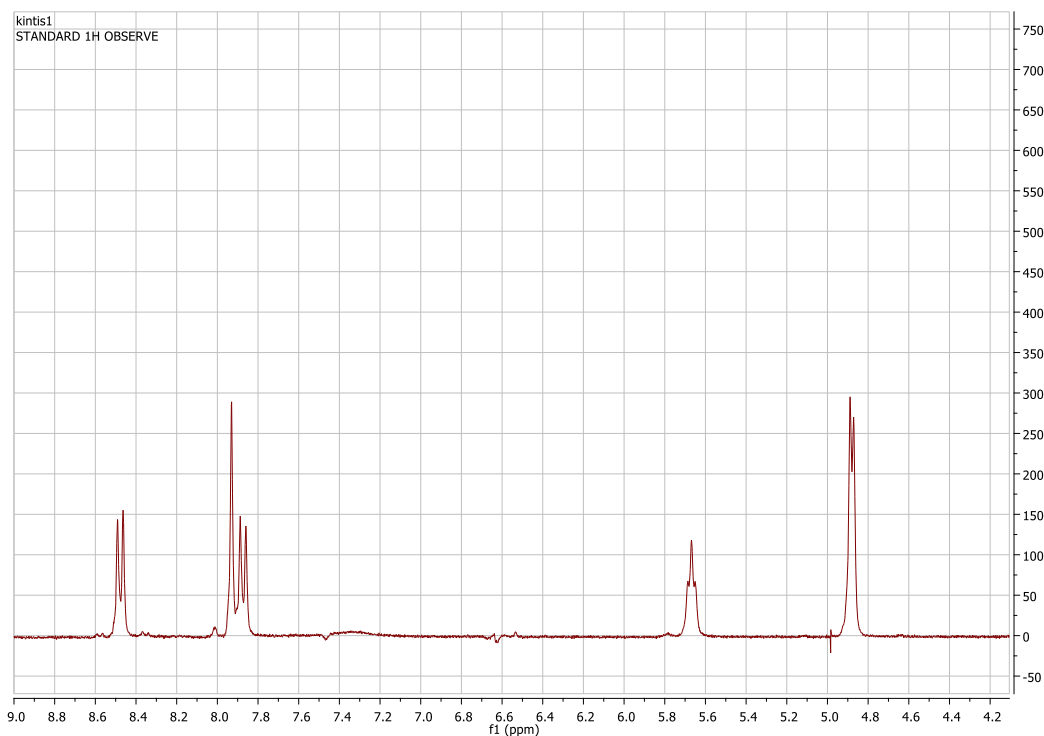


Σχήμα 18: Η πορεία σύνδεσης της PDALC και του σακχάρου.

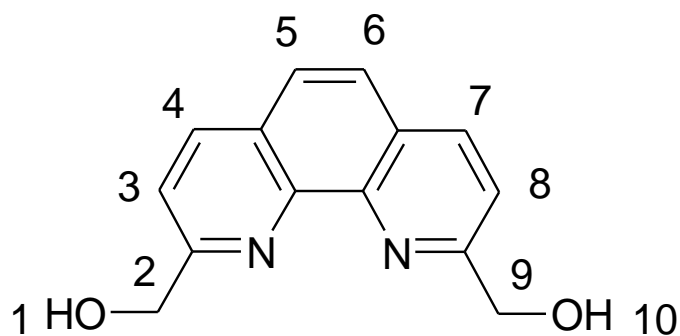
7.6 Χαρακτηρισμός της PDALC

$^1\text{H-NMR}$ Φασματοσκοπία

Το PDALC χαρακτηρίστηκε επίσης με φασματοσκοπία NMR. Για να ληφθεί το φάσμα αυτό παρασκευάστηκε διάλυμα του στερεού με DMSO. Το NMR φάσμα του PDALC φαίνεται στο Σχήμα 19.



Σχήμα 19. Το NMR φάσμα του PDALC



Σχήμα 20. Το μόριο (αριθμημένα H) της PDALC

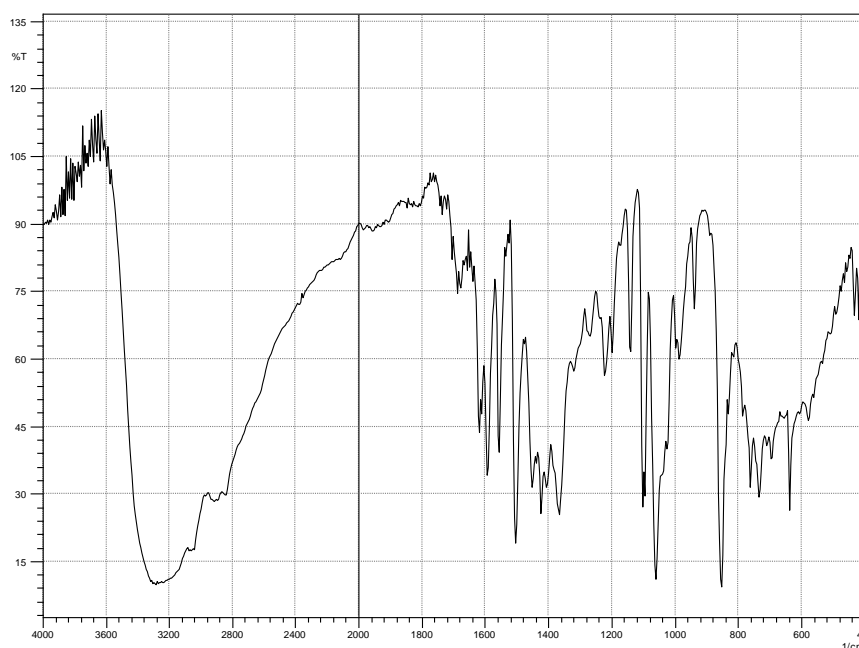
Η απόδοση των κορυφών του $^1\text{H NMR}$ του φάσματος της PDALC (Σχήμα 20) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.[60]

Πίνακας 4: Πίνακας χημικών μετατοπίσεων της PDALC σε διαλύτη DMSO (σε παρένθεση και με πλάγια παρουσιάζεται η χημική πολλαπλότητα *J*)

Πρωτόνια	δ, ppm
H _{4,7}	7,95 (s)
H _{3,8}	7,9 (d)
H _{5,6}	8,5 (d)
H _{2,9}	4,9 (s)
H _{1,10} - OH	5,7 (d)

Φασματοσκοπία IR

Το PDALC χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία IR. Για να ληφθεί το φάσμα αυτό παρασκευάστηκε παστίλια του PDALC με KBr υπό πίεση 10 τόνων. Το φάσμα IR φαίνεται στο Σχήμα 21 που ακολουθεί.



Σχήμα 21. Το IR φάσμα της PDALC

Από το παραπάνω φάσμα IR μπορούμε να εντοπίσουμε τις χαρακτηριστικές και αναμενόμενες κορυφές για την PDALC. Οι σημαντικότερες ταινίες του φάσματος IR της φαίνονται στον Πίνακα 5. [58][62].

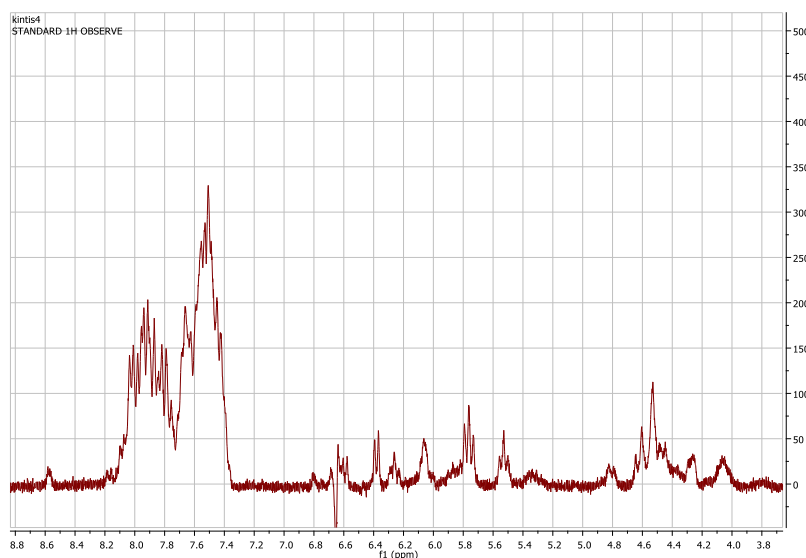
Πίνακας 5: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR της ουσίας PDALC.

Κυματαριθμός, cm-1	Απόδοση
3000-3050	Δόνηση έκτασης δεσμού C-H
1400	Δόνηση τάσης δεσμού C=C
1620	Δόνηση έκτασης δεσμού C=N
1150-1050	Δόνηση έκτασης δεσμού C-O-H

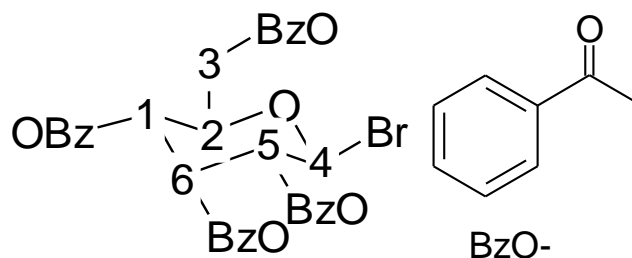
7.7 Χαρακτηρισμός του προστατευμένου σακχάρου

¹H-NMR Φασματοσκοπία

Το προστατευμένο σάκχαρο χαρακτηρίστηκε επίσης με φασματοσκοπία NMR. Για να ληφθεί το φάσμα αυτό παρασκευάστηκε διάλυμα του στερεού με DMSO. Το NMR φάσμα του σακχάρου φαίνεται στο Σχήμα 22.



Σχήμα 22. Το NMR φάσμα του προστατευμένου σακχάρου



Σχήμα 23. Το μόριο (αριθμημένα H) της προστατευμένης γλυκόζης.

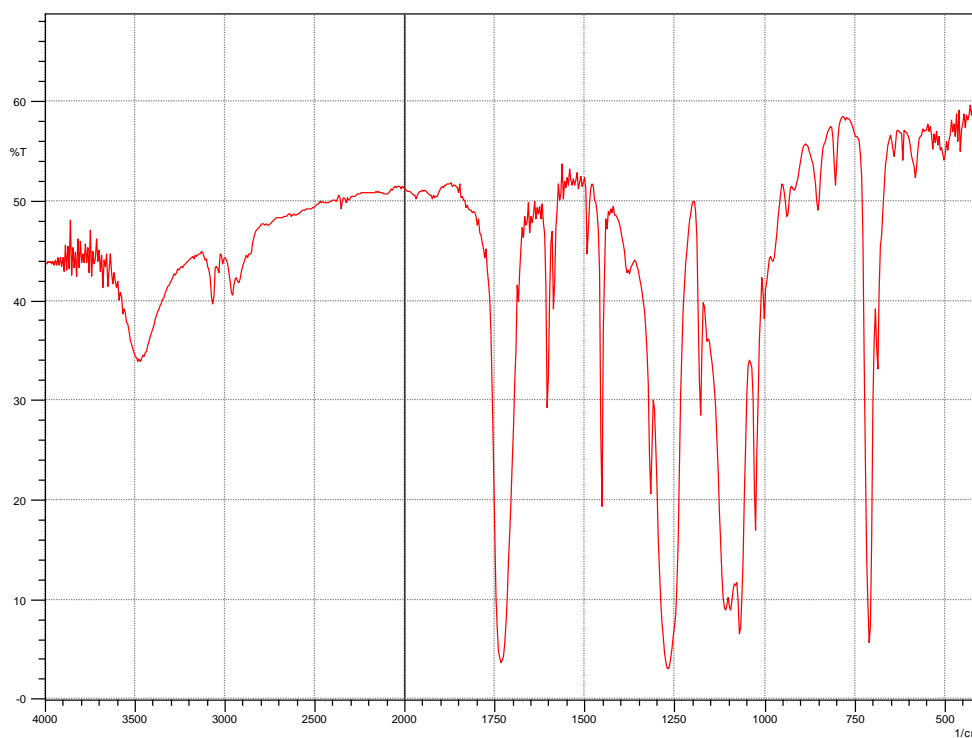
Η απόδοση των κορυφών του ¹H NMR του φάσματος της προστατευμένης γλυκόζης (Σχήμα 23) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Πίνακας χημικών μετατοπίσεων της προστατευμένης γλυκόζης σε διαλύτη DMSO.

Πρωτόνια	δ , ppm
H _{BzO}	7,4-8,12
H ₃	4,5
H ₄	6,65
H _{1,2,5,6}	5,45-6,4

Φασματοσκοπία IR

Το προστατευμένο σάκχαρο χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία IR. Για να ληφθεί το φάσμα αυτό παρασκευάστηκε παστίλια του σακχάρου με KBr υπό πίεση 10 τόνων. Το φάσμα IR φαίνεται στο Σχήμα 24 που ακολουθεί.



Σχήμα 24. Το IR φάσμα του προστατευμένου σακχάρου

Από το παραπάνω φάσμα IR μπορούμε να εντοπίσουμε τις χαρακτηριστικές και αναμενόμενες κορυφές του προστατευμένου σακχάρου. Οι σημαντικότερες ταινίες του φάσματος IR της φαίνονται στον Πίνακα 7.

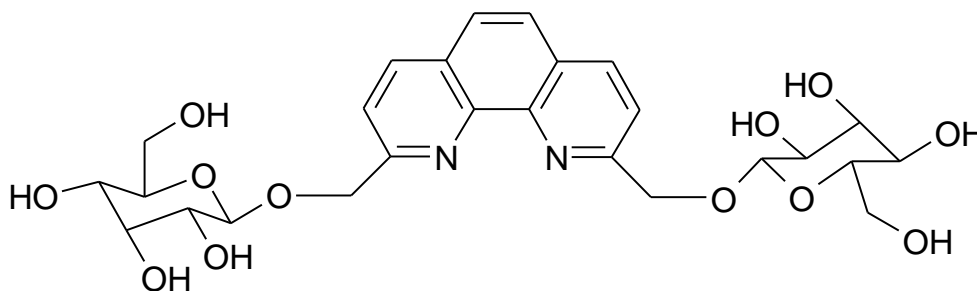
Πίνακας 7: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR του προστατευμένου σαγγάρου.

Κυματαριθμός, cm ⁻¹	Απόδοση
3000-3050	δόνηση έκτασης δεσμού C-H
1620-1400	δόνηση τάσης δεσμού C=C
1750-1680	δόνηση έκτασης δεσμού C=O
1300-1000	δόνηση έκτασης δεσμού C-O
700	δόνηση έκτασης δεσμού C-Br

7.8 Χαρακτηρισμός της PDGluc

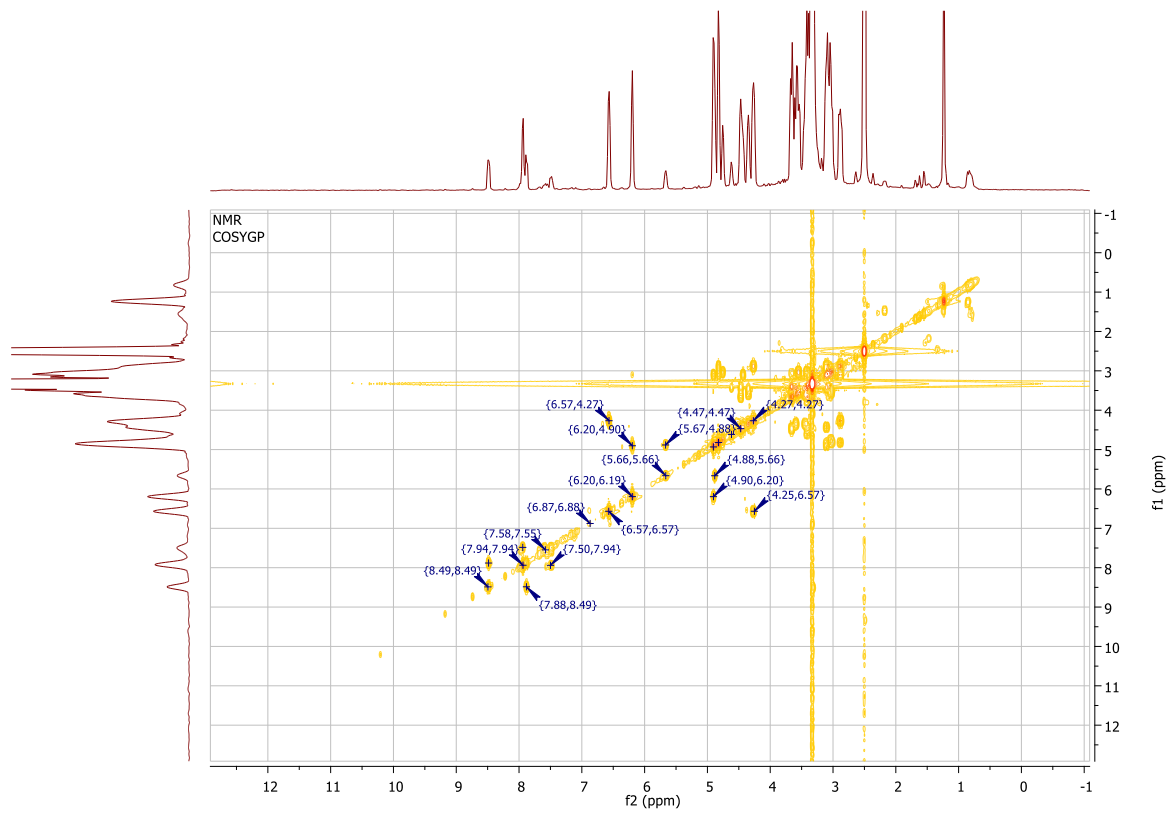
¹H-NMR Φασματοσκοπία

Το μόριο της PDGluc έχει συνολικά 32 πρωτόνια. Τα φάσματα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ως διαλύτη DMSO-d₆, με συγκεντρώσεις [PDGluc]= 5 mg/mL. Η αρίθμηση του μορίου δεν έγινε κατά IUPAC.

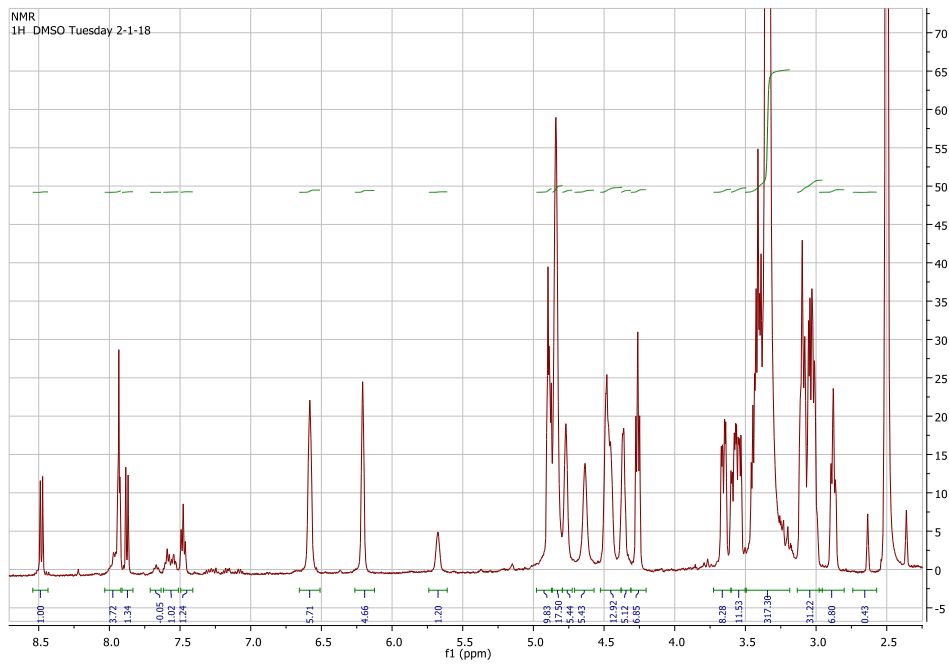


Σχήμα 25: Το μόριο της PDGluc.

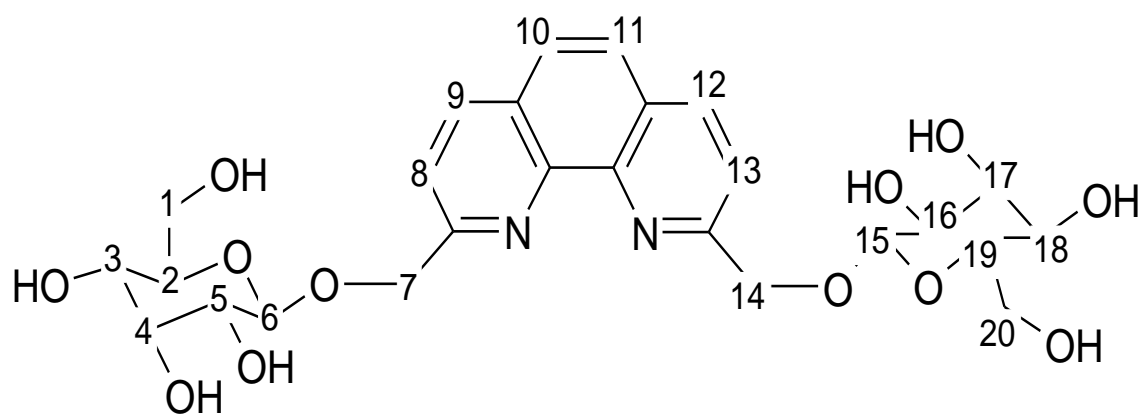
Παρακάτω παρουσιάζεται το φάσμα ¹H-NMR (Σχήμα 27) και 2D-COSY (Σχήμα 26) καθώς και τα φάσματα ¹³C (Σχήμα 29) και HSQC της PDGluc (Σχήμα 30) και με βάση αυτό έγινε η απόδοση των κορυφών και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 [60].



Σχήμα 26: Φάσμα 1H-1HCOSY για την PDGluc.



Σχήμα 27: Φάσμα NMR για την PDGluc σε διαλύτη διμεθλοσουλφοξείδιο (DMSO).



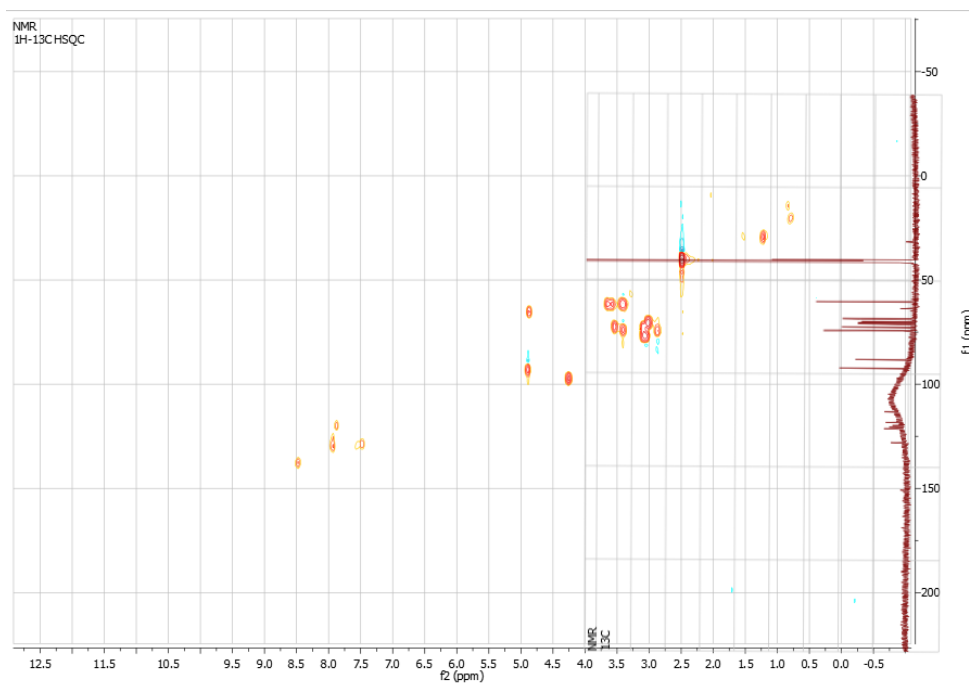
Σχήμα 28. Το μόριο (αριθμημένα H) της PDGlc.

Πίνακας 8: Πίνακας χημικών μετατοπίσεων της PDGlc σε διαλύτη DMSO (σε παρένθεση και με πλάγια παρουσιάζεται η χημική πολλαπλότητα *J*).

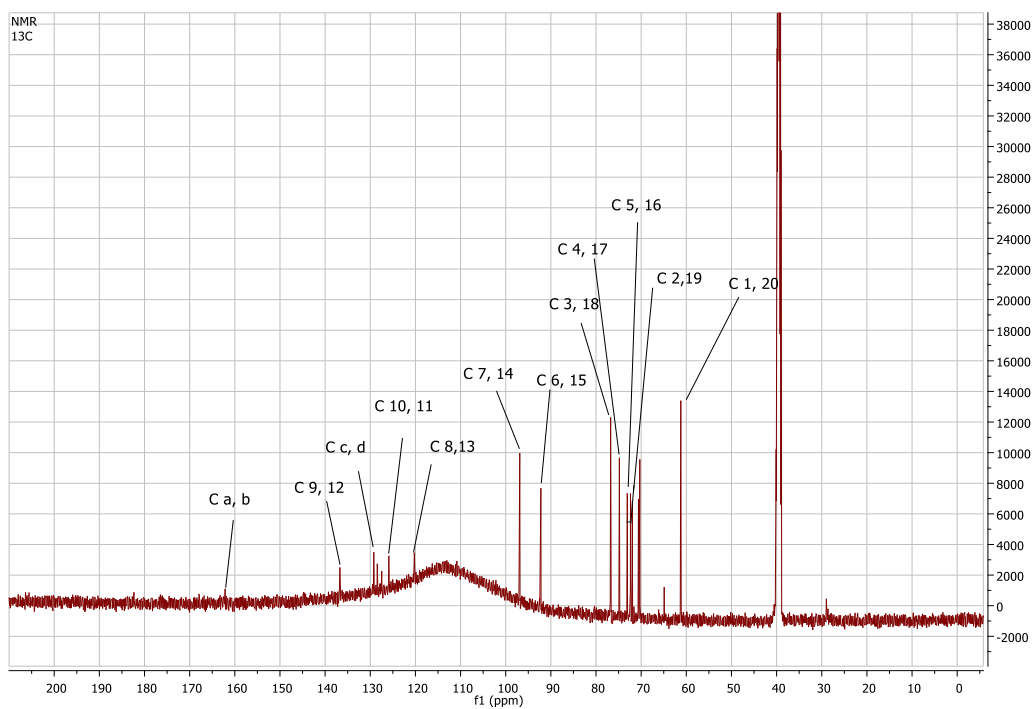
Πρωτόνια	δ, ppm	Πρωτόνια	δ, ppm
H _{-9,12}	7,95(s)	H _{-4,17}	3.25(m)
H _{-10,11}	8,5 (d)	H _{-5,16}	3.00(m)
H _{-8,13}	7,9 (d)	H _{-6,15}	4.3(m)
H _{-7,14}	4,9 (s)	H _{-1,20(-OH)}	6.55(d)
H _{-1,20}	4.5(m)	H _{-3,18(-OH)}	6.55(d)
H _{-2,19}	3.80(m)	H _{-4,17(-OH)}	6.20(d)
H _{-3,18}	3.20(m)	H _{-5,16(-OH)}	6.20(d)

Φασματοσκοπία HSQC

Τα φάσματα HSQC και ^{13}C -NMR παρουσιάζονται στα Σχήματα 29 και 30, αντίστοιχα.



Σχήμα 29: Φάσμα ^1H - ^{13}C (HSQC) για την PDGluc σε διαλύτη d_6 -(DMSO), $\theta=25^\circ\text{C}$.



Σχήμα 30: Φάσμα ^{13}C για την PDGluc σε διαλύτη d_6 -(DMSO), $\theta=25^\circ\text{C}$.

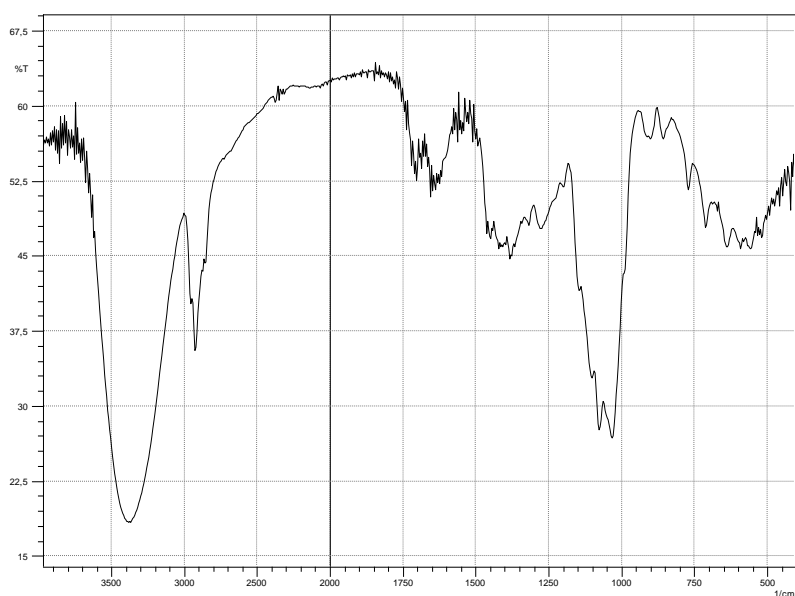
Με βάση το φάσμα δύο διαστάσεων HSQC (Σχήμα 29) έγινε η απόδοση των κορυφών του ^{13}C -NMR φάσματος της PDGluc (Σχήμα 28) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Απόδοση φάσματος ^{13}C και οι αντίστοιχες μετατοπίσεις, σε διαλύτη d6- DMSO.

Άτομα C	ppm
C a,b	163.46
C 9,12	137.39
C c,d	129.17
C 10,11	126.20
C 8,13	120.78
C 7,14	97.83
C 6,15	93.14
C 3,18	77.19
C 4,17	74.51
C 5,16	73.12
C 2,19	72.52
C 1,20	61.42

Φασματοσκοπία IR

Το φάσμα IR για την PDGluc φαίνεται στο Σχήμα 29.



Σχήμα 31. Το φάσμα IR για την PDGluc.

Από το παραπάνω φάσμα IR μπορούμε να εντοπίσουμε τις χαρακτηριστικές και αναμενόμενες κορυφές για τον υποκαταστάτη. Οι σημαντικότερες ταινίες του φάσματος IR της PDGluc φαίνονται στον Πίνακα 10. [58].

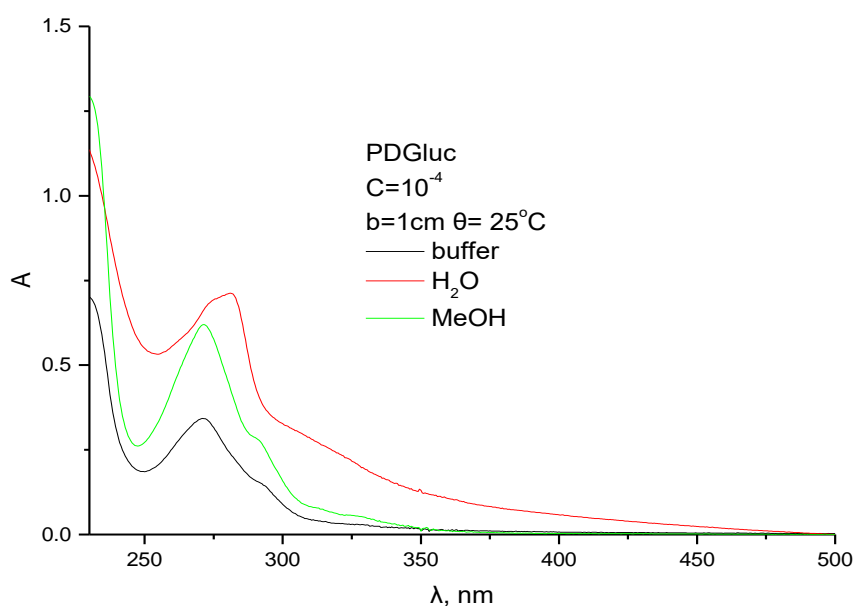
Πίνακας 10: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR της ουσίας PDGluc.

Κυματαριθμός, cm⁻¹	Απόδοση
1090	Δόνηση έκτασης δεσμού -C-O-H
1284	Δόνηση τάσης δεσμού -C-O-C-
1413	Δόνηση έκτασης δεσμού -C-O-
1556	Δόνηση έκτασης δεσμού -C=N-
1725	Δόνηση τάσης δεσμού -C=C-
2926	Δόνηση έκτασης δεσμών αρωματικών -H
3421	Δόνηση έκτασης δεσμού -O-H

Φασματοσκοπία Ορατού-Υπεριώδους.

UV-Vis

Στο Σχήμα 32 παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης της PDGluc στην περιοχή 230-500 nm, $c=1 \times 10^{-4}$ M, $b=1$ cm, $\theta=25^\circ\text{C}$ για διαλύτες H₂O (pH=6), μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH=7.2).



Σχήμα 32: Το φάσμα UV – Vis της PDGluc στην περιοχή 230-500 nm σε διαλύτες H₂O (pH=6), μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH=7.2). [PDGluc]= 1x10⁻⁴ M. θ=25°C.

Στα φάσματα της PDGluc σε όλους τους διαλύτες, διακρίνονται δύο κορυφές στα περίπου 270-280 nm και στα 290-295 nm. Παρατηρώντας την ταινία στην περιοχή μικρότερης ενέργειας, γίνεται αντιληπτό ότι αποτελείται από τουλάχιστον τρεις αλληλοεπικαλυπτόμενες ταινίες απορρόφησης. Οι ταινίες αυτές αποδίδονται στις π-π* μεταπτώσεις του επίπεδου αρωματικού συστήματος της 1-,10 φαινανθρολίνης. Οι βασικές κορυφές που παρατηρούνται συνοψίζονται στον Πίνακα 11.

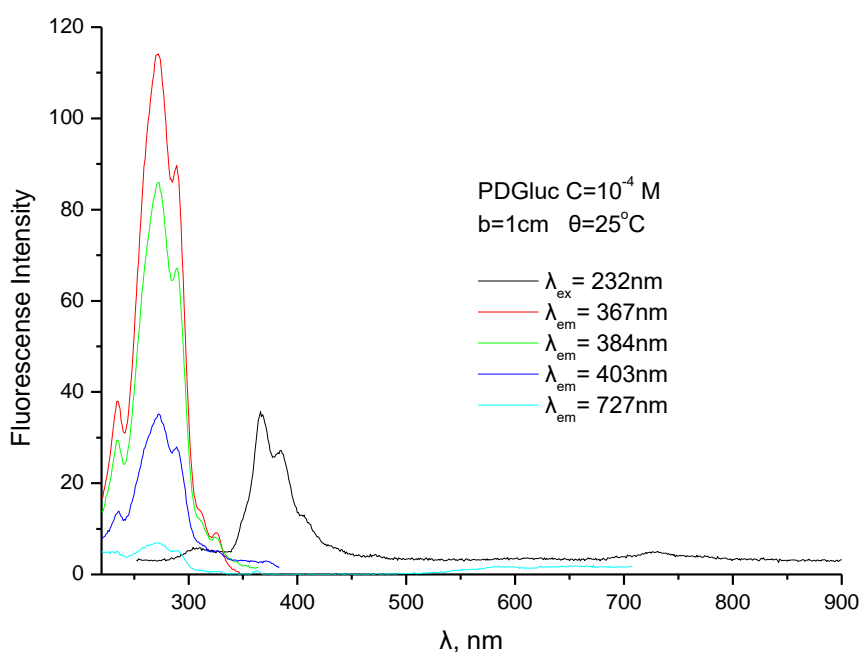
Πίνακας 11: Απόδοση κορυφών του φάσματος Ορατού – Υπεριώδους για την PDGluc.

Διαλύτης	λ _{max} (nm)	ε (M ⁻¹ /cm ⁻¹)	Απόδοση
Μεθανόλη	271	6224	π-π*
	294	2687	
	326	564	
H ₂ O pH=6	274	6881	π-π*
	281	7134	
	320	2434	

Buffer Phosphates (pH=7.2)	271	3470	$\pi-\pi^*$
	294	1398	
	326	337	

Φθορισμομετρία

Μια άλλη τεχνική που εφαρμόστηκε για το χαρακτηρισμό της PDGluc είναι η φθορισμομετρία. Το φάσμα εκπομπής και διέγερσης της PDGluc σε μεθανόλη παρουσιάζονται στο Σχήμα 33 και στον Πίνακα 12 συνοψίζονται τα μήκη κύματος εκπομπής της PDGluc στον συγκεκριμένο διαλύτη.



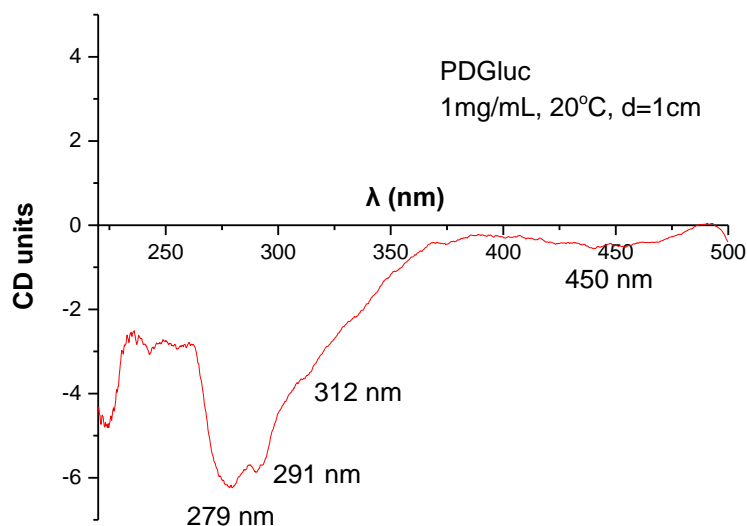
Σχήμα 33: Φάσμα φθορισμού της PDGluc συγκέντρωσης 10^{-4} M σε μεθανόλη, $\theta=25^{\circ}\text{C}$.

Πίνακας 12: Μήκη κύματος εκπομπής για την PDGluc σε λ_{ex} (nm).

Ένωση	Μήκος κύματος διέγερσης, nm	Μήκος κύματος εκπομπής, nm
PDGluc	232	367, 384, 403, 727
	271	367, 384, 403, 727
	290	367, 384, 403, 727

Κυκλικός Διχρωσμός (CD)

Στο Σχήμα 34 που ακολουθεί δίδεται το φάσμα κυκλικού διχρωσμού μεθανολικού διαλύματος της PDGluc συγκέντρωσης $1,77 \times 10^{-4}$ M στην περιοχή 220-500 nm σε $\theta=25^\circ\text{C}$.



Σχήμα 34: Το φάσμα κυκλικού διχρωσμού της PDGluc συγκέντρωσης $1,77 \times 10^{-4}$ M, στην περιοχή 220-500nm, σε διαλύτη μεθανόλη, $b=1\text{cm}$, $\theta=25^\circ\text{C}$

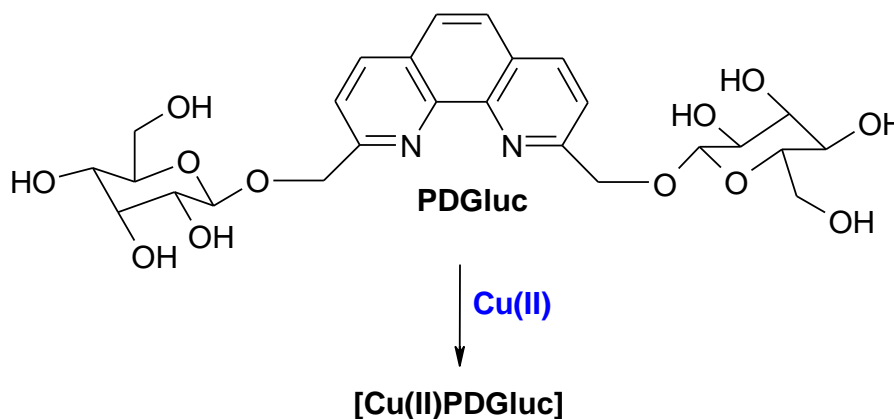
Η PDGluc παρουσιάζει διχρωικά σήματα με ελάχιστα στα 279 nm, 291 nm, 312 nm (ώμος) και ένα πολύ ασθενές σήμα στα 450 nm, μήκη κύματος που συμπίπτουν με αυτά που συναντώνται στα UV-Vis ηλεκτρονικά φάσματα. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού η D-γλυκόζη είναι οπτικά ενεργός και λόγω γειτνίασης θα μπορούσε να καταστήσει οπτικά ενεργές τις μεταπτώσεις που οφείλονται στην φαινανθρολινική ομάδα του μορίου (vicinal effect).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

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

8.1. Σύνθεση του συμπλόκου Cu- PDGluc.

Η σύνθεση του συμπλόκου του Cu(II) πραγματοποιήθηκε ως εξής: σε μια σφαιρική φιάλη των 50 mL διαλύθηκαν 30,0 mg (0,05 mmol) της PDGluc σε 5 mL μεθανόλης σε σταθερή θερμοκρασία 60°C και προστέθηκε σε αυτό 5 mL μεθανολικού διαλύματος $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [18,0 mg (0,05 mmol)]. Πραγματοποιήθηκε θέρμανση με αναρροή στους 60°C για 6 ώρες. Το χρώμα του αρχικά υποκίτρινου διαλύματος του υποκαταστάτη μεταβλήθηκε σε σκούρο πράσινο αμέσως μετά την προσθήκη του διαλύματος του μετάλλου. Μετά το πέρας των 6 h, το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Στη συνέχεια πραγματοποιείται συμπύκνωση έως ξηρού και παραλαμβάνεται πράσινο στερεό το οποίο ανακρυσταλλώνεται από ακετονιτρίλιο. Ακολουθεί διήθηση για παραλαβή του πράσινου στερεού και έκπλυσή του με πετρελαϊκό αιθέρα. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 63%. Η σύνθεση του προαναφερόμενου συμπλόκου φαίνεται και σχηματικά στο Σχήμα 35.[55][56]



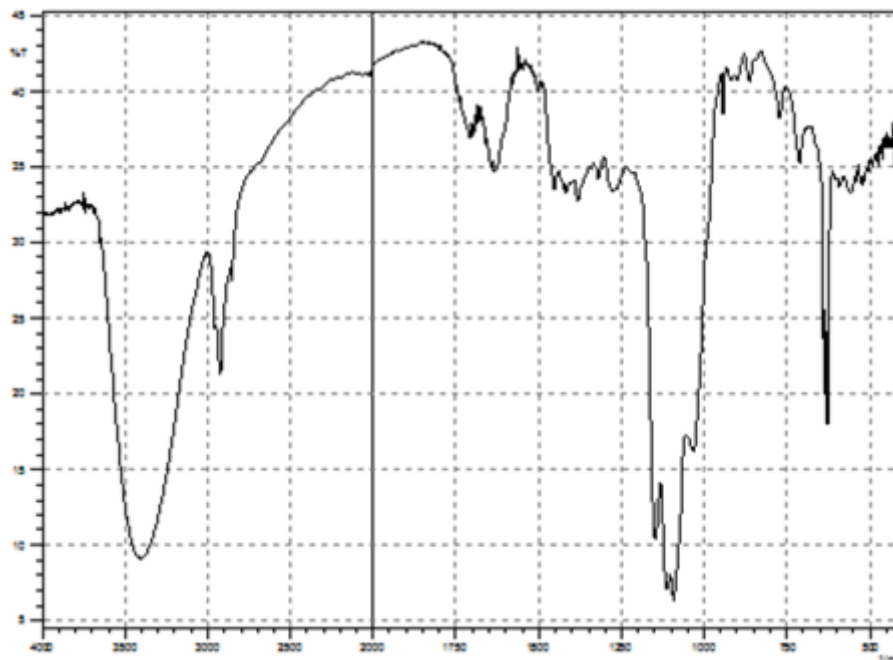
Σχήμα 35: Η πορεία σύνθεσης του συμπλόκου.

Λόγω απουσίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων δεν μπορεί να καθοριστεί με βεβαιότητα η δομή ή/και η στοιχειομετρία.

8.2. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου.

Φασματοσκοπία IR

Το φάσμα IR που λήφθηκε για το σύμπλοκο παρουσιάζεται στο Σχήμα 36.



Σχήμα 36: Φάσμα IR για το σύμπλοκο.

Οι αποδόσεις των ταινιών του φάσματος IR του συμπλόκου συνοψίζονται στον Πίνακα 13. [60-63].

Πίνακας 13: Χαρακτηριστικές ταινίες φάσματος IR του συμπλόκου.

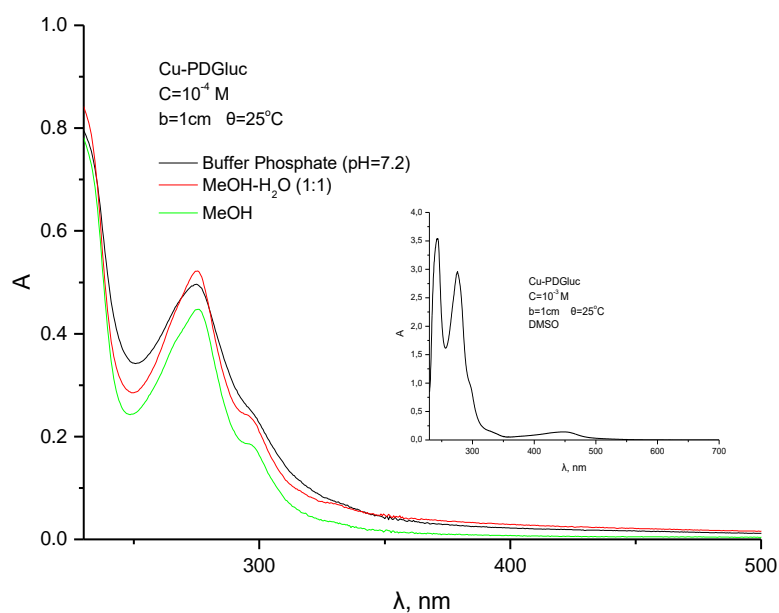
Κυματαριθμός, cm^{-1}		
PDGluc	complex	Απόδοση
1070	1088	Δόνηση έκτασης δεσμού - C-O-H
1273	1300	Δόνηση τάσης δεσμού -C- O-C-
1417	1417	Δόνηση έκτασης δεσμού - C-O-

1447	1451	Δόνηση τάσης δεσμού - C=C-
1638	1629	Δόνηση έκτασης δεσμού - C=N-
2926	2885	Δόνηση έκτασης δεσμών αρωματικών -H
3421	3525	Δόνηση έκτασης δεσμού - O-H
-	627 1110	ClO₄⁻

Το φάσμα IR επιβεβαιώνει ότι ο Cu(II) συμπλέκεται με την PDGluc μέσω των ατόμων N της 1,10-φαινανθρολίνης. Αυτό γίνεται αντιληπτό διότι οι ταινίες που επηρεάζονται περισσότερο αφορούν το δεσμό C=N της 1,10-φαινανθρολίνης, και γενικότερα την περιοχή 1400-1650 cm⁻¹ που εμφανίζονται οι δεσμοί του φαινανθρολινικού δακτυλίου. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι στα 627 και στα 1110 cm⁻¹ εμφανίζονται δυο νέες κορυφές ενδεικτικές των υπερχλωρικών ανιόντων που δρουν ως αντισταθμιστικά και ενδέχεται να συμπλέκονται με το σύμπλοκο.

Φασματοσκοπία Ορατού-Υπεριώδους

Άλλη μία τεχνική που εφαρμόστηκε για το χαρακτηρισμό του συμπλόκου είναι η φασματοσκοπία UV-Vis. Το φάσμα UV-Vis για το σύμπλοκο σε διαλύτη μεθανόλη ή υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH=7.2) παρουσιάζονται στο Σχήμα 37 και επιβεβαιώνει τη σύμπλεξη των ιόντων Cu(II) με την PDGluc.



Σχήμα 37: Το φάσμα UV – Vis του στην περιοχή 230-500 nm σε διαλύτη μεθανόλη σε δυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και μεθανόλη-νερό. Στο ένθετο σχήμα το UV – Vis του στην περιοχή 230-500 nm σε διαλύτη μεθανόλη

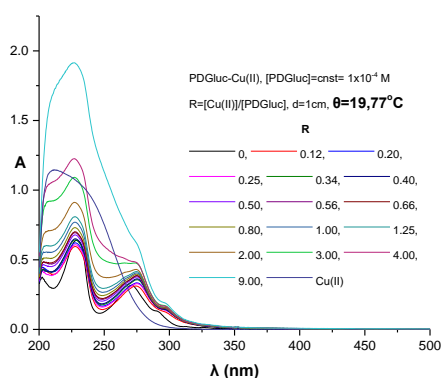
Τα φάσματα στην περιοχή των ταινιών απορρόφησης του υποκαταστάτη (intraligand) παρουσιάζουν διαφορές από αυτά του ελεύθερου υποκαταστάτη, τόσο στα μεθανολικά όσο και στα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα. Στην περίπτωση των μεθανολικών διαλυμάτων, η απορρόφηση στα 271 nm του ελεύθερου υποκαταστάτη μετατοπίζεται στα 276 nm, ο ώμος στα 294 nm μετατοπίζεται στα 299 nm και ο ώμος στα 326 nm είναι πλέον ορατός στα 331 nm. Στην περίπτωση των υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, η απορρόφηση στα 271 nm του ελεύθερου υποκαταστάτη μετατοπίζεται στα 275 nm και αυξάνεται η έντασή της. Ο ώμος στα 294 nm μετατοπίζεται στα 299 nm, ενώ ο ώμος στα 326 nm είναι πλέον ορατός στα 332 nm. Τέλος σε πυκνό διάλυμα με διαλύτη DMSO (ένθετο σχήμα στο Σχήμα 37), παρατηρείται ευρεία ταινία απορρόφησης στην περιοχή 370-470 nm, με μέγιστο στα 446-450 nm. Η ταινία αυτή έχει αποδοθεί σε μετάπτωση LMCT, καθώς σε τέτοιου είδους αρωματικά συστήματα παρατηρείται μεταφορά ηλεκτρονιακής πυκνότητας από τον υποκαταστάτη προς το μεταλλικό κέντρο[59]. Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του συμπλόκου στα δύο συστήματα διαλυτών.

Πίνακας 14: Απόδοση φάσματος UV-Vis για το σύμπλοκο Cu-PDGluc.

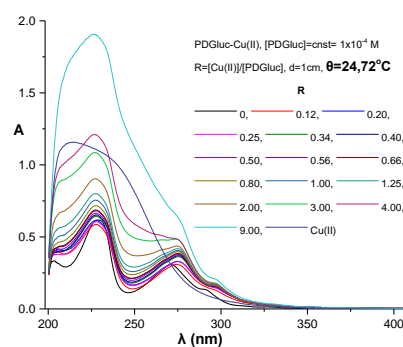
Διαλύτης	λ_{\max} (nm)	ϵ (M^{-1}/cm^{-1})	Απόδοση
μεθανόλη	276	4472	$\pi-\pi^*$
	299	1819	
	331	329	
Buffer Phosphates (pH=7.2)	275	4973	$\pi-\pi^*$
	299	2373	
	332	704	

Προσδιορισμός σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου Cu(II)-PDGluc

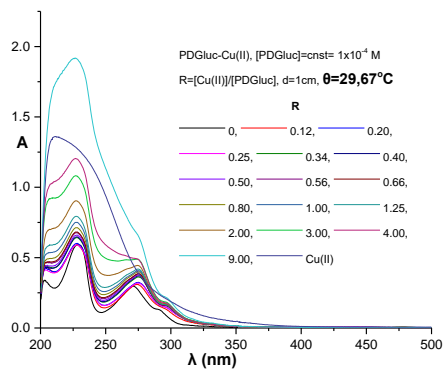
Με φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση είναι δυνατόν να υπολογιστεί η σταθερά σχηματισμού K_f του συμπλόκου Cu(II)-PDGluc. Παρασκευάστηκε σειρά μεθανολικών διαλυμάτων τελικής συγκέντρωσης σε PDGluc ίσης με 1×10^{-4} M, προσθέτοντας συγκεκριμένο όγκο μεθανολικού διαλύματος $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[Cu(II)]/[PDGluc]$). Στα διαλύματα αυτά λήφθηκε φάσμα UV-Vis, από 500-200 nm, με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm, σε θερμοκρασίες 20, 25 και 30°C (Σχήμα 38 α-δ).



(α)



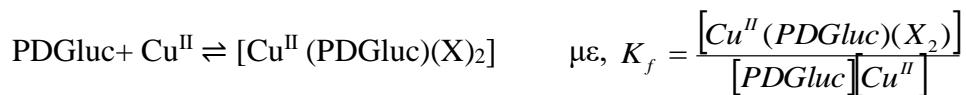
(β)



(v)

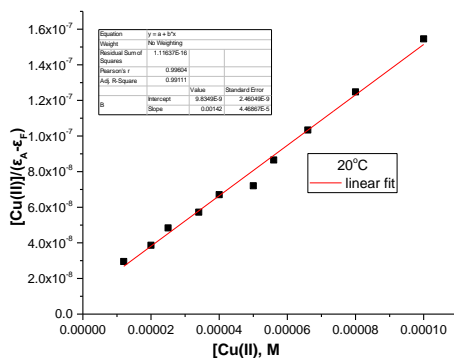
Σχήμα 38: Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση μεθανολικού διαλύματος PDGluC 1×10^{-4} M με Cu(II) και σε θερμοκρασίες 20°C, 25°C, 30°C.

Η ισορροπία που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:

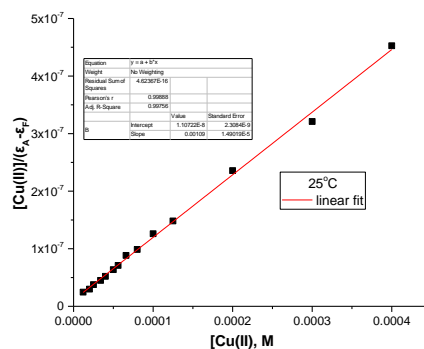


από τη σχέση:
$$\frac{[\text{Cu(II)}]}{\varepsilon_A - \varepsilon_F} = \frac{[\text{Cu(II)}]}{\varepsilon_B - \varepsilon_F} + \frac{1}{K_f(\varepsilon_B - \varepsilon_F)}$$

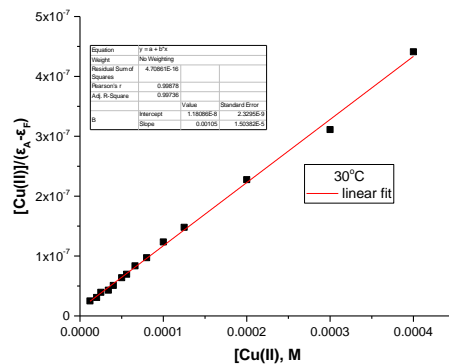
Όπου ε_F , ε_B και ε_A είναι οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης στα 300 nm του μη συμπλεγμένου (ελεύθερου) υποκαταστάτη, του συμπλεγμένου με τα ιόντα Cu(II) και του διαλύματος που περιέχει το μίγμα τους. Από την παραπάνω σχέση παρατηρείται ότι ο λόγος $[\text{Cu(II)}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_F)$ είναι γραμμική συνάρτηση της $[\text{Cu(II)}]$ και η σταθερά K_f υπολογίζεται από την αρχή επί της τεταγμένης ($[\text{Cu(II)}] = 0$) (Σχήμα 39 α-δ). [67]



(α)



(β)



(γ)

Σχήμα 39: Υπολογισμός της σταθεράς σύνδεσης K_f με εφαρμογή της μεθόδου Scatchard.

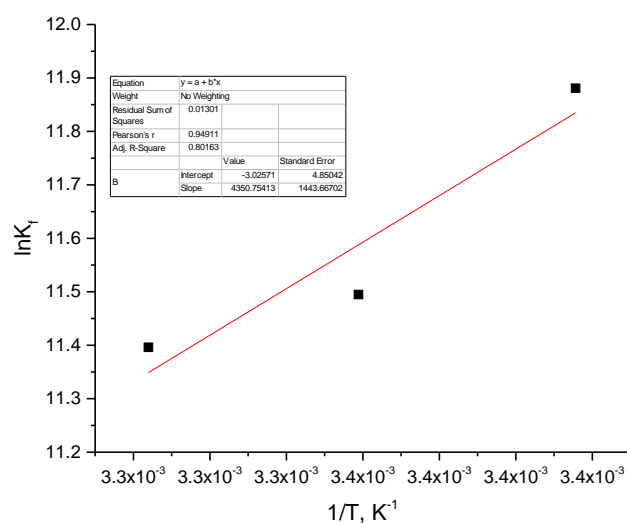
Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται οι σταθερές σχηματισμού, όπως υπολογίστηκαν από το Σχήμα 39.

Πίνακας 15: Οι σταθερές σχηματισμού K_f ($L \cdot mol^{-1}$) και σε παρένθεση τα $\ln K_f$ σε μεθανόλη στις διάφορες θερμοκρασίες.

Θερμοκρασία	20 °C	25 °C	30 °C
	$1,44 \cdot 10^5$ (11,88)	$9,82 \cdot 10^4$ (11,49)	$8,90 \cdot 10^4$ (11,40)

Οι τιμές των K_f και $\ln K_f$ είναι συγκρίσιμες με τις τιμές αντίστοιχων M:L=1:1 συμπλόκων του Cu(II) που συναντώνται στη βιβλιογραφία [74-77]. Παρατηρούμε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας οι τιμές των K_f μειώνονται, που σημαίνει ότι η ισορροπία σχηματισμού είναι εξώθερμη.

Μπορούμε έτσι να υπολογίσουμε τα θερμοδυναμικά μεγέθη ΔG° , ΔS , ΔH με τη βοήθεια του διαγράμματος $\ln K_f = f(1/T)$ (Σχήμα 40), όπου K_f είναι οι σταθερές σχηματισμού που προέκυψαν πειραματικά όπως παρουσιάστηκαν και παραπάνω και T οι αντίστοιχες θερμοκρασίες που λήφθηκαν τα φάσματα UV-Vis.



Σχήμα 40: Το διάγραμμα μεταβολής της $\ln K_f$ συναρτήσει του $1/T$.

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

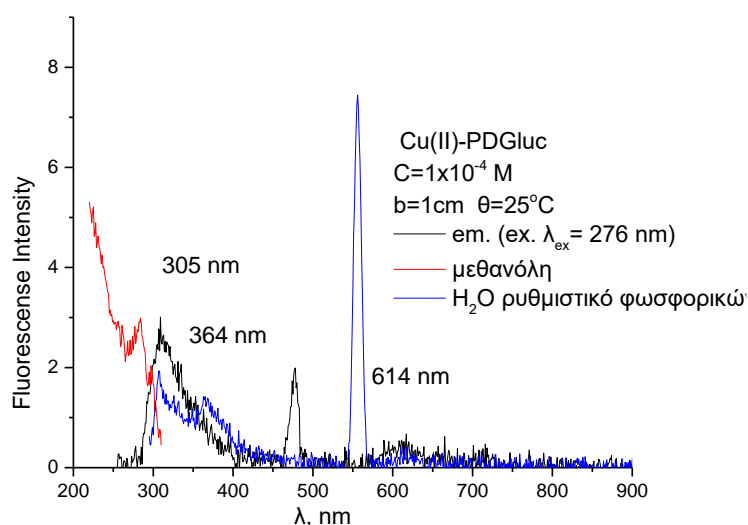
$$\ln K_f = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R},$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S,$$

Συνεπώς, από το παραπάνω διάγραμμα Σχήμα 40 προκύπτει ότι $\Delta H = -36,2 \text{ kJ/mol}$, $\Delta S = -25,2 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ και $\Delta G^\circ = -28,5 \text{ kJ/mol}$. Συνεπώς, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η αντίδραση σχηματισμού του συμπλόκου είναι μια αυθόρμητη και εξώθερμη αντίδραση, εφόσον ΔG° έχει αρνητική τιμή.

Φθορισμομετρία

Το φάσμα εκπομπής για το σύμπλοκο (Σχήμα 41) λήφθηκε σε μεθανολικό διάλυμα του συμπλόκου με συγκέντρωση 10^{-4} M , με κυψελίδα φθορισμού $d=1 \text{ cm}$, σε θερμοκρασία 25°C .



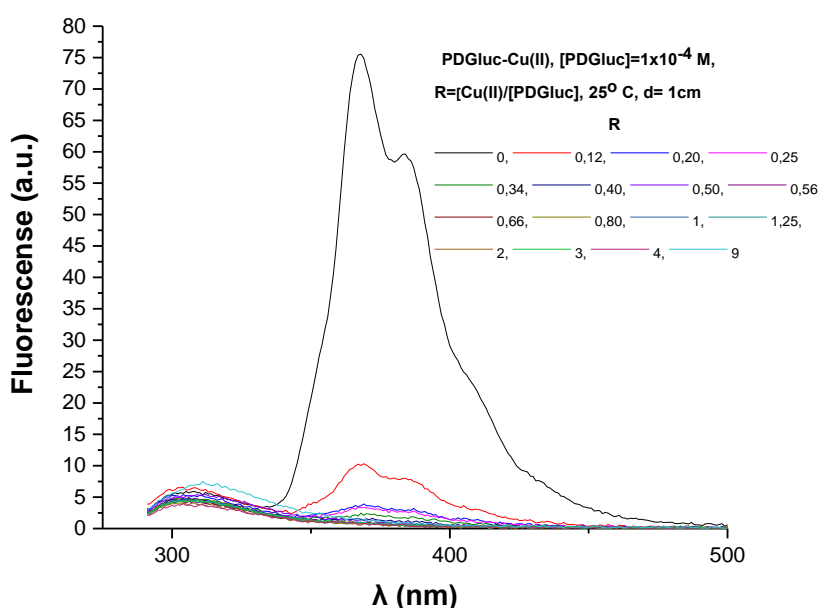
Σχήμα 41: Το φάσμα φθορισμού μεθανολικών και υδατικών διαλυμάτων (buffer φωσφορικών) διαλυμάτων του συμπλόκου Cu-PDGluC.

Το σύμπλοκο Cu-PDGluC δεν φαίνεται να εμφανίζει, σε μεθανολικά διαλύματα, ιδιαίτερο φθορισμό για μήκος κύματος διέγερσης 276 nm, δηλ. όπου παρουσιάζει το μέγιστο απορρόφησης στο ηλεκτρονικό φάσμα ορατού-υπεριώδους. Επίσης, παρουσιάζεται ο φθορισμός του συμπλόκου σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH=7,2), σε μήκος κύματος διέγερσης 276 nm. Στον Πίνακα 16 παρατίθενται τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής για το σύμπλοκο PDGluC.

Πίνακας 16: Μήκη κύματος εκπομπής για το Cu(II)-PDGluC σε lex (nm), σε διαλύτη μεθανόλη και Υδατικό διάλυμα (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7,2).

	Μήκος κύματος διέγερσης, nm	Μήκος κύματος εκπομπής, nm
Μεθανολικό διάλυμα	284	305 350 (sh)
Υδατικό διάλυμα (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7,2)	284	305 364

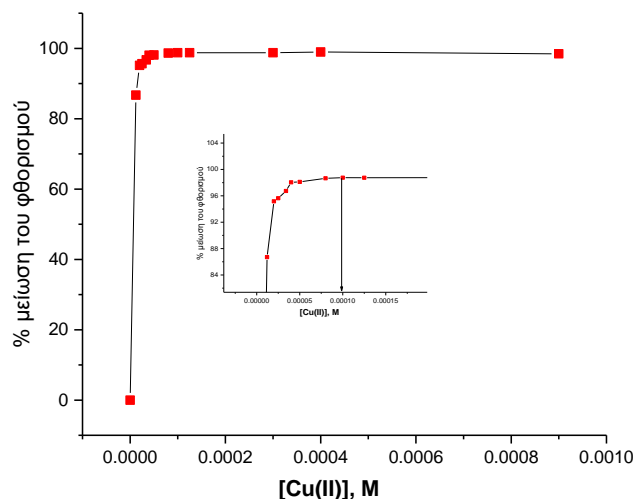
Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε μια σειρά μεθανολικών διαλυμάτων, όπου η τελική συγκέντρωση του υποκαταστάτη διατηρήθηκε σταθερή και ίση με 1×10^{-4} M. Στα διαλύματα αυτά προστέθηκε, διαφορετική κάθε φορά, ποσότητα μεθανολικού διαλύματος Cu(II) έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R=[\text{Cu(II)}]/[\text{PDGluc}]$) και ελήφθησαν τα φάσματα φθορισμού στους 25°C και με κυψελίδα οπτικής διαδρομής $d=1\text{cm}$ (Σχήμα 42). Το μήκος κύματος διέγερσης (excitation wavelength) ήταν 271 nm, διότι μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε την επίδραση των ιόντων Cu(II) στον φθορισμό της PDGluc.



Σχήμα 42: Φθορισμομετρική τιτλοδότηση του PDGluc με ιόντα Cu(II). $[\text{PDGluc}] = \text{const} = 1 \times 10^{-4}$ M, $R=0-9$. $\theta=25^\circ\text{C}$, $d=1$ cm.

Όπως γίνεται εμφανές στο παραπάνω φάσμα φθορισμού (Σχήμα 42) η ένταση φθορισμού της PDGluc μειώνεται καθώς αυξάνεται η ποσότητα του διαλύματος του Cu(II). Συνεπώς, τα ιόντα Cu(II) αποσβένουν το φθορισμό του υποκαταστάτη. Αυτό υποδηλώνει ότι το προκύπτον σύμπλοκο δεν έχει τόσο ισχυρή ένταση φθορισμού όσο έχει η PDGluc πριν την προσθήκη οποιασδήποτε ποσότητας ιόντων Cu(II). Για το συγκεκριμένο μήκος κύματος διέγερσης (330 nm) εμφανίζονται στο φάσμα φθορισμού 2 κορυφές με μήκη κύματος εκπομπής 367 και 384 nm και ένας ώμος στα 403 nm. Στις κορυφές αυτές στο φάσμα φθορισμού, δεν παρατηρείται ιδιαίτερη

μετατόπιση των μηκών κύματος στο μέγιστο της εκπομπής καθώς προστίθενται τα ιόντα Cu(II). Η μείωση της έντασης του φθορισμού της PDGluC γίνεται καλύτερα αντιληπτή στο Σχήμα 43.



Σχήμα 43: Διάγραμμα % μείωσης του φθορισμού συναρτήσει της [Cu(II)].

Παρατηρούμε ότι, η % μείωση του φθορισμού ολοκληρώνεται μέχρι $[Cu(II)] = 1 \times 10^{-4}$ M (R=1) και μετά παραμένει σταθερή, υποδηλώνοντας έτσι, ότι η στοιχειομετρία του συμπλόκου είναι PDGluC:Cu(II)=1:1.

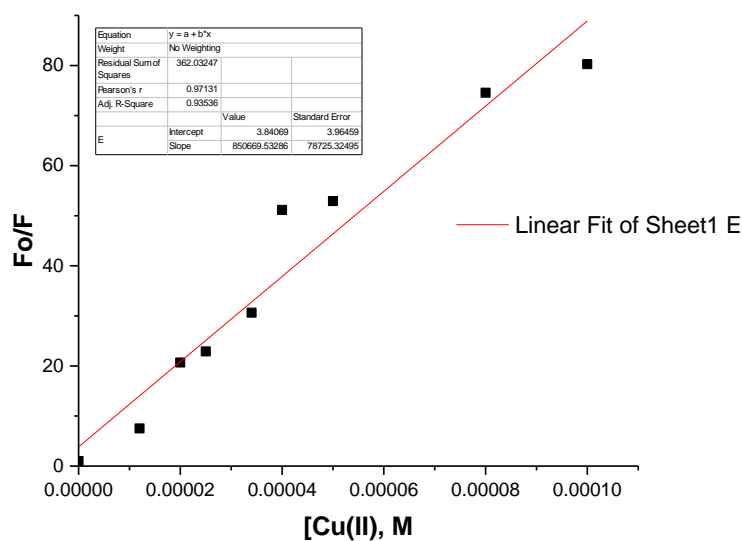
Επιπλέον, από τα φάσματα φθορισμού του Σχήματος 42 είναι δυνατόν να προσδιορισθεί η σταθερά Stern-Volmer (K_{sv}) και η σταθερά K_f χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες σχέσεις [78-80]:

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

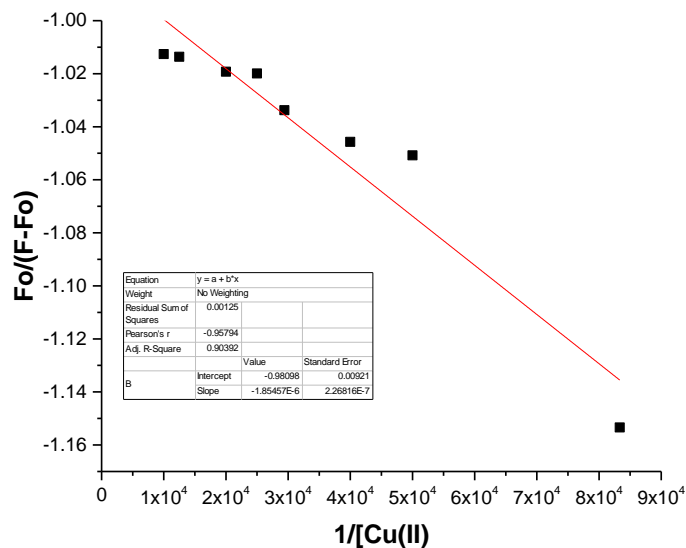
$$\frac{1}{(F - F_0)} = 1/\{K_f (F_{\max} - F_0)[Cu^{2+}]\} + 1/ (F_{\max} - F_0), \text{ Benesi-Hildebrand}$$

Όπου: F_0 : η ένταση του φθορισμού στο διάλυμα μόνο της PDGluC (R=0), F : η ένταση φθορισμού των διαλυμάτων PDGluC-Cu(II) στους διάφορους λόγους R, K_{sv} : η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer, K_f : η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου, Cu(II)-PDGluC, F_{\max} : η ένταση του φθορισμού στο διάλυμα με τον μεγαλύτερο λόγο $R=Cu(II)/PDGluC$. Συνεπώς, κατασκευάζοντας ένα διάγραμμα F_0/F συναρτήσει της [Cu(II)] μπορούμε να προσδιορίσουμε την K_{sv} , η οποία θα ισούται με τη κλίση της ευθείας που θα προκύψει (Εξίσωση Stern-Volmer). Τη σταθερά σχηματισμού του

συμπλόκου, μπορούμε να την υπολογίσουμε μέσω του διαγράμματος $1/(F-F_0)$ συναρτήσει του $1/[Cu^{2+}]$ (Εξίσωση Benesi-Hildebrand).



Σχήμα 44: Διάγραμμα $F_0/F=f([Cu^{2+}])$.

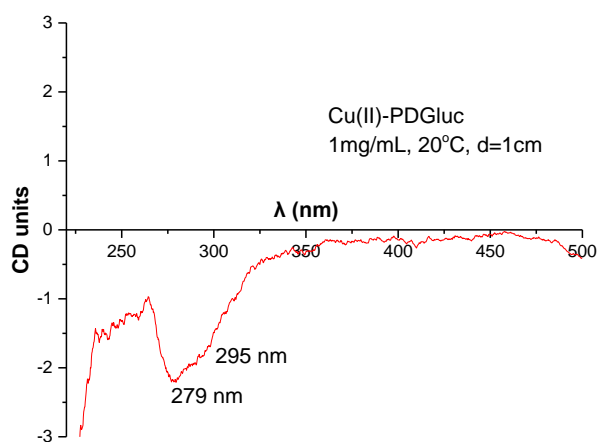


Σχήμα 45: Διάγραμμα $1/(F_0-F)=f(1/[Cu^{2+}])$.

Από το διάγραμμα του Σχήματος 44 προκύπτει ότι $K_{sv}=8,50 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ και από το διάγραμμα του Σχήματος 45 προκύπτει ότι $K_f=5,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Κυκλικός Διχρωσμός (CD)

Για τον χαρακτηρισμό του συμπλόκου Cu-PDGluc λήφθηκε φάσμα κυκλικού διχρωσμού σε διαλύτη μεθανόλη, $b = 1 \text{ cm}$ και $\theta = 25^\circ\text{C}$ και παρουσιάζεται στο Σχήμα 46.

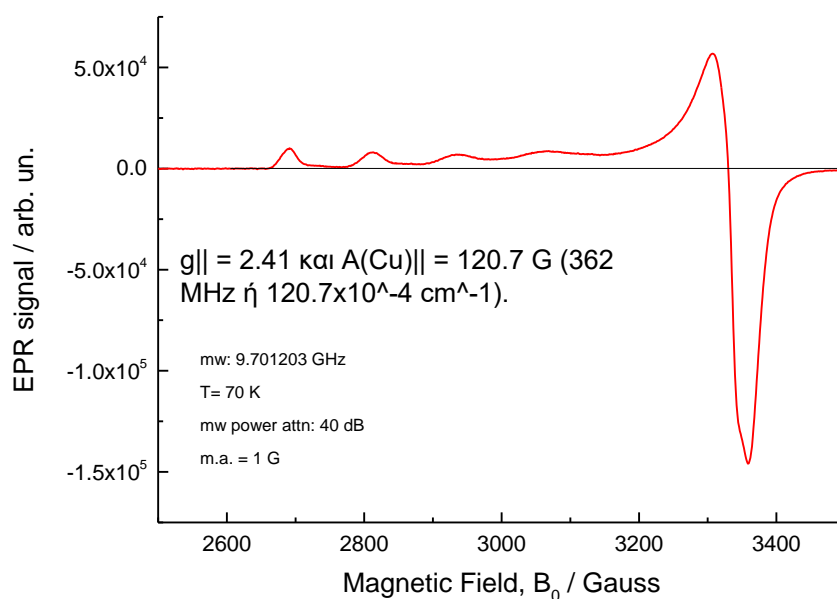


Σχήμα 46: Το φάσμα κυκλικού διχρωσμού του συμπλόκου Cu-PDGluc και του ελεύθερου υποκαταστάτη PDGluc, σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 10^{-4} M , $b=1 \text{ cm}$, $\theta=25^\circ\text{C}$.

Όπως και στην περίπτωση του ελεύθερου υποκαταστάτη, το σύμπλοκο Cu-PDGluc παρουσιάζει διχρωικά σήματα με ελάχιστα στα 279 nm, 295 nm (sh), δηλαδή στα μήκη κύματος που συμπίπτουν με αυτά που συναντώνται στα UV-Vis ηλεκτρονικά φάσματα. Η παρουσία της D-γλυκόζης καθιστά οπτικά ενεργές τις μεταπτώσεις που οφείλονται στην φαινανθρολινική ομάδα του μορίου (vicinal effect).

Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR)

Στο Σχήμα 47 παρουσιάζεται το φάσμα EPR διαλύματος του συμπλόκου Cu-PDGluc, σε διαλύτη νερό-γλυκερίνη 1:1, X band, σε 70K και συχνότητα mw 9,701203 GHz.



Σχήμα 47: Φάσμα X-band EPR

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

$$E=h\nu=g\mu_B B \rightarrow g = \frac{h\nu}{\mu_B B}, G=(g_{//}-2)/(g_{\perp}-2) \text{ (εξίσωση Hathaway)}$$

$$f = \frac{g_{//}}{A_{//}}$$

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

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

Όπου: h: η σταθερά Planck και ίση με $6,62606957 \cdot 10^{-34}$ J·s, ν: η συχνότητα του πεδίου (s^{-1}) και ίση με $9,701203 \cdot 10^9$ s^{-1} , μ_B : η μαγνητόνη Bohr και ίση με $9,27400968 \cdot 10^{-24}$ J·T⁻¹, B: η ένταση του μαγνητικού πεδίου σε Tesla, $k_{//}$, k_{\perp} : παράμετροι τροχιακής μείωσης (orbital reduction factors), E_{d-d} : η ενέργεια της d-d μετάπτωσης στο σύμπλοκο, λ_0 : η σταθερά σύζευξης spin-orbit ενός ηλεκτρονίου για το ελεύθερο ιόν και ίση με 828 cm^{-1} , α^2 , β^2 , γ^2 : παράμετροι που σχετίζονται με την ομοιοπολικότητα του εντός επιπέδου σ-δεσμού, και του εντός και εκτός επιπέδου π-δεσμού, αντίστοιχα.

Από την ανάλυση του φάσματος EPR και με τη χρήση των παραπάνω εξισώσεων προέκυψαν τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα EPR.

$g_{//}$	g_{\perp}	$A_{//}\cdot 10^4(\text{cm}^{-1})$	G	$f(\text{cm})$	$k_{//}$	k_{\perp}	α^2	β^2	γ^2
2,4075	2,081	141	5	200	0,903	0,796	0,917	0,985	0.868

Από ένα φάσμα EPR μπορούμε να βγάλουμε πολλά συμπεράσματα για την δομή του υπό μελέτη συμπλόκου. Όπως γίνεται αντιληπτό και από τον Πίνακα 17, το g_{\perp} έχει τιμή κοντά στο 2, με το $g_{//} > g_{\perp}$. Επειδή το $g_{//} > g_{\perp} > 2,0023$ συμπεραίνουμε ότι το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο του Cu(II) είναι εντοπισμένο στο τροχιακό $d_{x^2-y^2}$. Επιπλέον, επειδή το $g_{//} > 2,3$ συμπεραίνουμε ότι ο δεσμός μετάλλου-υποκαταστάτη έχει περισσότερο ιοντικό χαρακτήρα. Τόσο η τιμή του $g_{//}$ όσο και του $A_{//}$ παραπέμπουν σε σύμπλοκα του τύπου $[\text{CuO}_4]$, αν και η τιμή $A_{//} = 140 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ υπονοεί παρουσία αζώτου. Σύμφωνα όμως και με τις άλλες μεθόδους χαρακτηρισμού (φασματοσκοπίες IR και UV) είναι φανερό πως το μεταλλικό κέντρο συμπλέκεται και μέσω του ή των αζώτων του φαινανθρολινικού δακτυλίου, καθώς υπάρχουν οι αντίστοιχες μετατοπίσεις στις ταινίες του φάσματος IR του συμπλόκου, αλλά και στο φάσμα ορατού-υπερώδους του συμπλόκου, παρατηρούμε πως υπάρχουν μεταβολές στην απορρόφηση του υποκαταστάτη όταν αυτός συμπλέκεται με το μέταλλο. Βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι μια χαρακτηριστική ιδιότητα υποκαταστατών συμπλόκων του Cu(II) με μεγάλη στερεοχημική παρεμπόδιση είναι να προκαλούν τετραεδρική παραμόρφωση του τετραγωνικού επιπέδου των οκταεδρικών ή τετραγωνικών συμπλόκων του Cu(II). Μια τέτοια τετραεδρική παραμόρφωση του επιπέδου οδηγεί σε μειωμένη τιμή του $A_{//}$ και αυξημένη τιμή του $g_{//}$ σε σχέση με την αναμενόμενη. Επιπροσθέτως, επειδή ο παράγοντας $G > 4$, συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει κάποια διαμοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταλλικών κέντρων λόγω πιθανής συσσωμάτωσης ως αποτέλεσμα της επίπεδης τετραγωνικής γεωμετρίας που υιοθετούν. Τιμές του f 110-120 είναι τυπικές για επίπεδα σύμπλοκα, ενώ 130-150 είναι χαρακτηριστικές ελαφράς έως μέτριας παραμόρφωσης του επιπέδου. Τιμές όμως του f στην κλίμακα 180-250 είναι ενδεικτικές σημαντικής παραμόρφωσης. Η τιμή του παράγοντα f υπολογίστηκε στα 200 cm, γεγονός που μας οδηγεί και πάλι στο συμπέρασμα ότι η γεωμετρία του συμπλόκου είναι τετραεδρικά παραμορφωμένη επίπεδη τετραγωνική.

Τέλος, επειδή όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως οι τιμές των α^2 , β^2 , γ^2 σχετίζονται με την ομοιομορφία των σ -και π -δεσμών, μπορούμε να συμπεράνουμε για τη φύση των δεσμών ότι τόσο οι σ -δεσμοί όσο π -δεσμοί εντός επιπέδου στο σύμπλοκο έχουν περισσότερο ιοντικό απ'ότι ομοιομορφικό χαρακτήρα διότι η τιμή του α^2 και β^2 προσεγγίζουν τη μονάδα. Γενικά, στον καθαρό σ -ομοιομορφικό δεσμό η τιμή της παραμέτρου α^2 είναι μικρότερη του 0,5 ενώ όσο η τιμή αυτή προσεγγίζει την μονάδα τόσο περισσότερο ιοντικό χαρακτήρα έχει ο δεσμός. Κάτι τέτοιο επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι $k_{//} > k_{\perp}$. [81-97]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

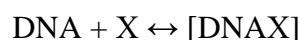
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ PDGlc ΚΑΙ ΤΟΥ συμπλόκου ΜΕ ΤΟ CT-DNA

9.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση της PDGlc και του συμπλόκου

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

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, από τα δεδομένα της φασματοσκοπικής τιτλοδότησης διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης σε PDGlc ή Cu(II)-PDGlc με DNA είναι δυνατό να υπολογισθεί η σταθερά σύνδεσης K_b του συμπλόκου μικρού μοριακού βάρους μορίου, έστω X, με το βιομόριο (DNA). Κατά την αλληλεπίδραση αποκαθίσταται η ισορροπία :

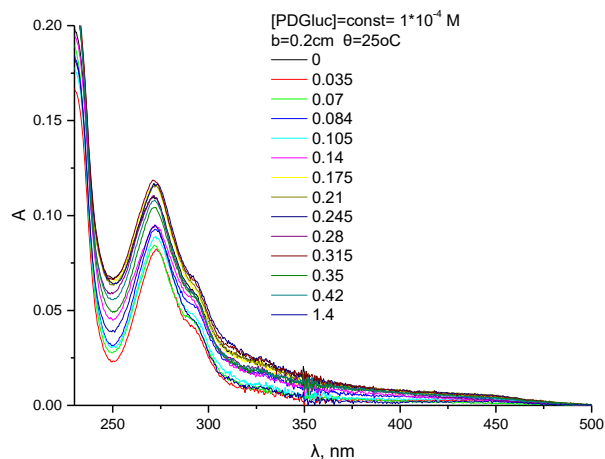


από τη σχέση:

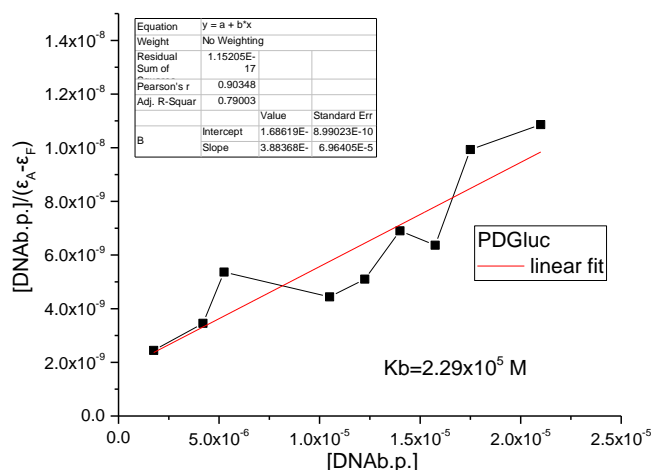
$$\frac{[\text{DNA}_{bp}]}{e_A - e_F} = \frac{[\text{DNA}_{bp}]}{e_B - e_F} + \frac{1}{(e_B - e_F)K_b}$$

Όπου e_F , e_B και e_A είναι οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος του μη δεσμευμένου (ελεύθερου) X, του δεσμευμένου με το DNA και του διαλύματος που περιέχει το μίγμα τους. Από την παραπάνω σχέση παρατηρείται ότι ο λόγος $[\text{DNA}_{bp}]/(e_A - e_F)$ είναι γραμμική συνάρτηση της $[\text{DNA}_{bp}]$ και η σταθερά K_b υπολογίζεται από την αρχή επί της τεταγμένης ($[\text{DNA}_{bp}] = 0$) [67].

Στο Σχήμα 48 παρουσιάζονται οι μεταβολές στις ταινίες απορρόφησης στην περιοχή 200-500 nm για το σύστημα που περιέχει μόνο τον υποκαταστάτη PDGlc και στο Σχήμα 49 η μεταβολή του λόγου $[\text{DNA}_{bp}]/(e_A - e_F)$ ως συνάρτηση της $[\text{DNA}_{bp}]$ για το ίδιο σύστημα.



Σχήμα 48: Το φάσμα UV – Vis της PDGluC στην περιοχή 230-500 nm Scatchard.

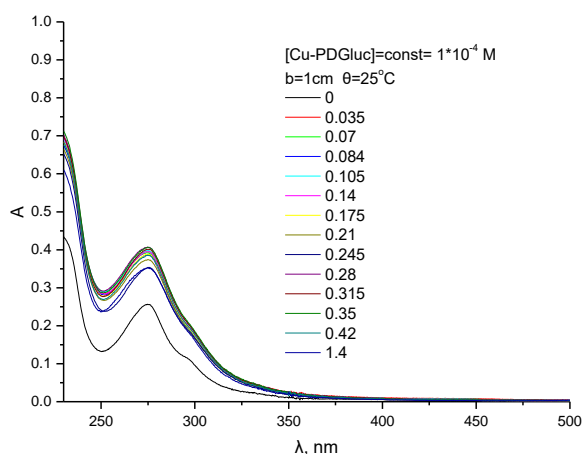


Σχήμα 49: Υπολογισμός της σταθεράς σύνδεσης K_b με εφαρμογή της μεθόδου Scatchard.

Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 49 τα φάσματα δεν παρουσιάζουν ομοιόμορφη μεταβολή συναρτήσει των λόγων, $R = [\text{DNA}]/[\text{PDGluC}]$. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η καμπύλη Scatchard να μην εμφανίζει καθόλου καλή γραμμικότητα ($R^2 = 0,79$). Παρόλα αυτά υπολογίστηκε η $K_b = 2,29 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, χωρίς αυτή η τιμή να είναι ένα ασφαλές αποτέλεσμα.

Αντίθετα οι μεταβολές στην αντίστοιχη περιοχή για το σύστημα που περιέχει το σύμπλοκο (Cu-PDGluC) είναι εντυπωσιακές και ενδεικτικές του τρόπου αλληλεπίδρασης με το DNA.

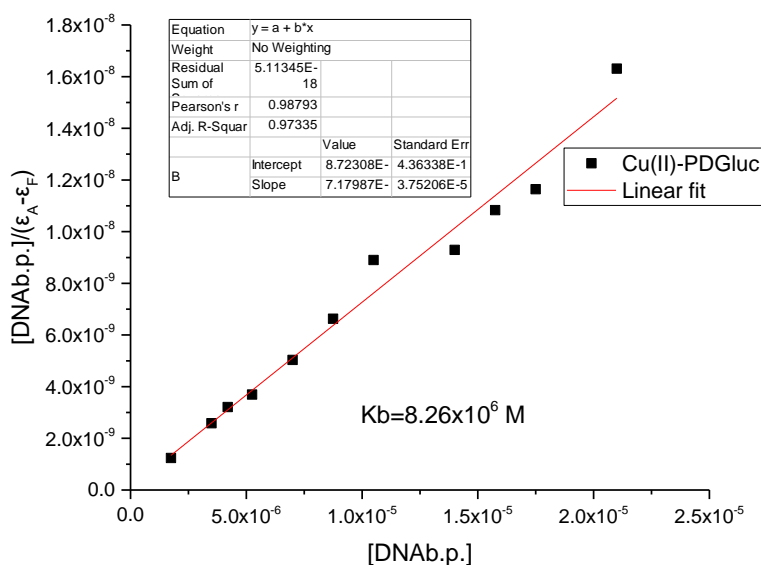
Στο Σχήμα 50 παρουσιάζονται οι μεταβολές των φασμάτων απορρόφησης διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης σε Cu-PDGluc (1×10^{-4} M) αλλά μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης DNA ($0-1,4 \times 10^{-4}$ M). Για να παρατηρηθούν οι αλλαγές αυτές, χρησιμοποιήθηκαν ως baselines διαλύματα DNA ίδιας συγκέντρωσης με τα αντίστοιχα των διαλυμάτων (Cu-PDGluc)-DNA.



Σχήμα 50: Το φάσμα UV – Vis του συμπλόκου στην περιοχή 230-500 nm Scatchard.

Παρατηρούμε ότι, η αλληλεπίδραση του Cu-PDGluc με το DNA δεν προκαλεί σημαντική μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης (275 nm ($R=[DNA]/[Cu-PDGluc]=0$) στα 276 nm ($R=[DNA]/[Cu-PDGluc]=1,4$), δηλαδή βαθυχρωμισμός κατά 1 nm. Ο βαθυχρωμισμός αυτός συνοδεύεται από σύγχρονη αύξηση της απορρόφησης A στο μέγιστο (υποχρωμισμός) κατά 58% για ($r=.14$) και 35% για ($r=1.4$). Η κορυφή στα 227 nm δεν μετατοπίζεται, όμως η απορρόφησης της, A, αυξάνεται κατά 67% για ($r=1.4$) και 43% για ($r=1.4$). Το ίδιο και για τον ώμο στα 294 nm, όπου χωρίς μετατόπιση του μεγίστου συνατάται υπερχρωμισμός 83% για ($r=1.4$) και 58% για ($r=1.4$). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν αλληλεπίδραση του συμπλόκου Cu-PDGluc με το DNA, με τρόπο ώστε να επηρεάζονται οι $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεις του χρωμοφόρου. Στην περίπτωση μας οι πιθανοί τρόποι σύνδεσης, όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, που δικαιολογούν αυτά τα αποτελέσματα είναι η μη κλασσική παρεμβολή ή η σύνδεση μέσω αλάκας (κυρίως μέσω της μικρής αλάκας).

Από τα δεδομένα της φασματοσκοπικής τιτλοδότησης του Σχήματος 50, είναι λοιπόν δυνατό να υπολογισθεί η σταθερά σύνδεσης K_b του συμπλόκου Cu-PDGluc με το DNA. Στο Σχήμα 51 παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου $[DNA_{bp}]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ ως συνάρτηση της $[DNA_{bp}]$ για το σύστημα DNA-(Cu-PDGluc). Όπου ϵ_F , ϵ_B και ϵ_A είναι οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης στα 275 nm του μη δεσμευμένου (ελεύθερου) Cu-PDGluc, του δεσμευμένου με το DNA και του διαλύματος που περιέχει το μίγμα τους.



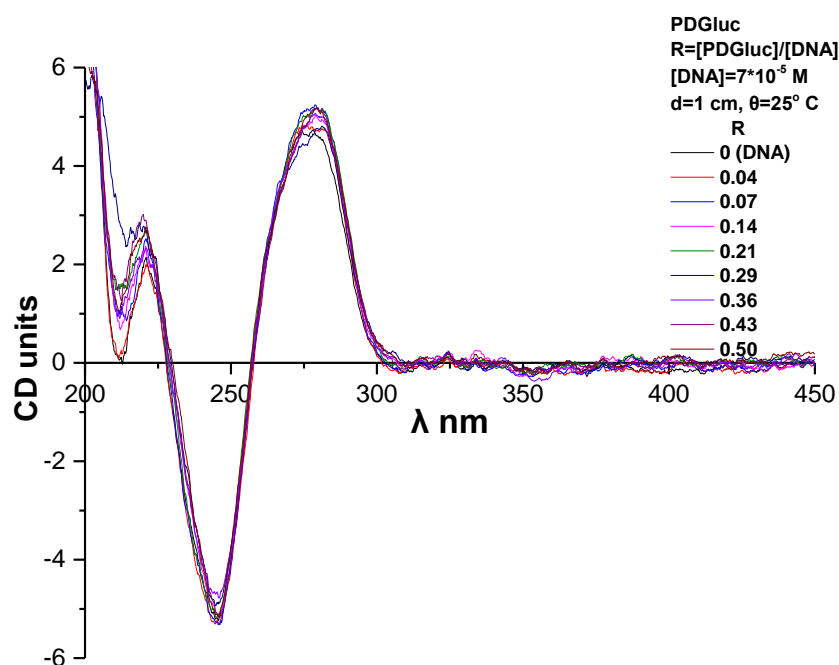
Σχήμα 51: Υπολογισμός της σταθεράς σύνδεσης K_b με εφαρμογή της μεθόδου Scatchard.

Η σταθερά K_b που υπολογίστηκε με τον τρόπο αυτό βρέθηκε ίση με $8,26 \times 10^6$ M. Η μεγάλη τιμή της σταθεράς αυτής είναι ενδεικτικό της ισχυρής σύνδεσης του Cu-PDGluc με το DNA. Η ισχύς της σύνδεσης αυτής επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα των μελετών με κυκλικό διχρωισμό, φθορισμομετρία και ιξωδομετρία που παρατίθενται παρακάτω.

9.2 Κυκλικός Διχρωϊσμός

Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, η τεχνική του κυκλικού διχρωισμού είναι ένα μία από τις πλέον ενδεδειγμένες μεθόδους για τη μελέτη της ασυμμετρίας ενός συστήματος. Οι αλληλεπιδράσεις του DNA με ένα άλλο μόριο, οι οποίες είναι δυνατό να επιφέρουν αλλαγές στα δομικά χαρακτηριστικά της έλικας του γίνονται

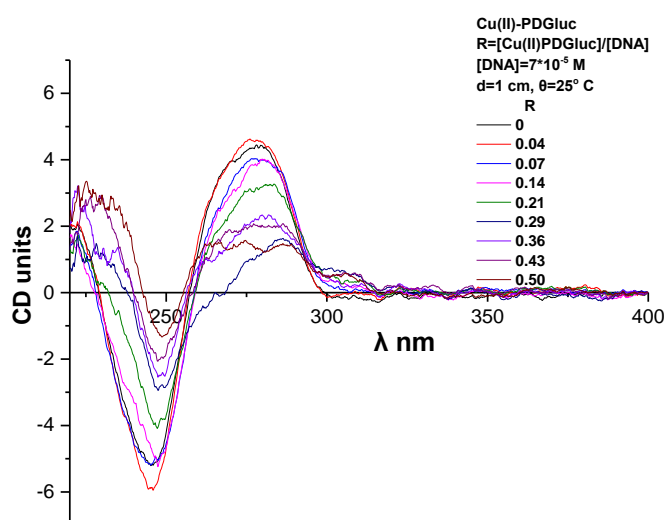
άμεσα αντιληπτές με τη βοήθεια της τεχνικής του κυκλικού διχρωισμού. Είναι επίσης γνωστό ότι η ισχυρή σύνδεση ενός μη χειρόμορφου (μη οπτικά ενεργού) μορίου με ένα χειρόμορφο (οπτικά ενεργό), όπως το DNA, το καθιστά τελικά οπτικά ενεργό και έτσι ανιχνεύσιμο με την τεχνική του κυκλικού διχρωισμού. Παρατηρείται έτσι το φαινόμενο της εξ επαγωγής κυκλικού διχρωισμού (*Induced Circular Dichroism, I.C.D.*). Στα Σχήματα 52 και 53 παρουσιάζονται τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού της PDGluc και του συμπλόκου Cu-PDGluc στην περιοχή 200-400 nm κατά την αλληλεπίδραση με CT DNA. Η ποσότητα του DNA διατηρείται σταθερή και μεταβάλλεται κάθε φορά η ποσότητα των μικρών μορίων.[64]



Σχήμα 52: Φάσμα CD για το DNA-PDGluc.

Στο Σχήμα 52 παρατηρούμε ότι η προσθήκη PDGluc δεν επιφέρει σημαντικές μεταβολές στο φάσμα του DNA ($R=0$). Η μορφή του φάσματος που αντιστοιχεί στο διάλυμα που περιέχει μόνο DNA ($R=0$) είναι χαρακτηριστική της B-μορφής του DNA. Εμφανίζει ελάχιστο στα 245 nm (-6.16 mdeg) και μέγιστο στα 282 nm (+7,58 mdeg). Με αύξηση του λόγου R, δηλαδή αυξάνοντας την ποσότητα του υποκαταστάτη, παρατηρείται μικρή μείωση στις εντάσεις και των δύο κορυφών του

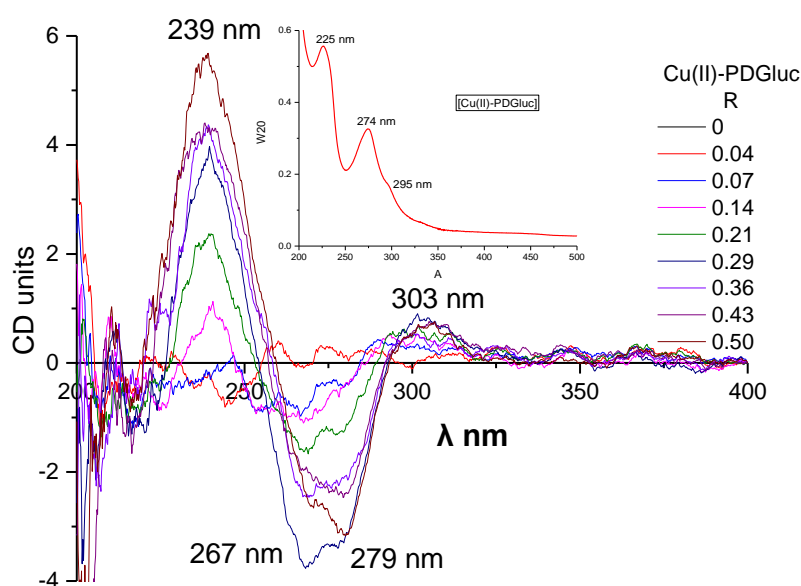
DNA. Επιπλέον η μορφή του διχρωμικού σήματος του DNA δεν μεταβάλλεται, ενώ το μέγιστο και το ελάχιστο παραμένουν στις ίδιες τιμές λ . Η αλληλεπίδραση λοιπόν δεν μεταβάλλει τη B- δομή του DNA. Το αρνητικό Cotton του φάσματος του DNA σχετίζεται με τη ελικότητα της διπλής έλικας του δίκλωνου DNA, ενώ το θετικό με τις αλληλεπιδράσεις των βάσεων (π - π στοιβάγμα των βάσεων του DNA). Αύξηση της τιμής του ελαχίστου (μείωση της έντασης) αποδίδεται σε μείωση της ελικότητας (αποέλιξη), ενώ αντίστοιχα μείωση του μεγίστου σημαίνει ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων του DNA.[65-66].



Σχήμα 53: Φάσμα CD για το σύστημα DNA-(Cu-PDGluc).

Στο Σχήμα 53 παρατηρούμε ότι η προσθήκη του Cu(II)-PDGluc επιφέρει δραματικές μεταβολές στο φάσμα του DNA ($R=0$). Παρατηρούμε μετόπιση του ελαχίστου από τα 245 nm του ελεύθερου DNA στα 249 nm και μείωση της έντασης του ελαχίστου κατά 76%. Συγχρόνως, το μέγιστο στα 278 nm για το ελεύθερο DNA με την προσθήκη Cu-PDGluc μετατοπίζεται προς μεγαλύτερα μήκη κύματος μέχρι τα 286 nm για λόγο ($R=0,5$) και μείωση της έντασης του μεγίστου κατά 68%. Επιπλέον, εμφανίζεται ένα θετικό Cotton στα περίπου 303 nm. Τέτοιες μεταβολές δεν δικαιολογούνται με κάποια μεταβολή της δομής του DNA. Αντίθετα τα φάσματα CD, των διαφόρων διαλυμάτων, θα μπορούσαν να είναι το αποτέλεσμα της συνισταμένης θετικών και αρνητικών φαινομένων Cotton σε αυτή την περιοχή μηκών κύματος.

Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να εξηγηθεί αν στα φαινόμενα Cotton του DNA προστεθούν και τα φαινόμενα Cotton που εμφανίζει το οπτικά ενεργό Cu(II)-PDGluc. Όμως τα φαινόμενα Cotton του συμπλόκου στην περιοχή 200-500 nm για συγκεντρώσεις αντίστοιχες με αυτές των διαφόρων διαλυμάτων είναι πολύ ασθενή. Φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση με το DNA καθιστά τα φαινόμενα αυτά ισχυρά και ανιχνεύσιμα με την φασματοσκοπία CD. Για να διαπιστωθεί αν παρουσιάζονται φαινόμενα Cotton που οφείλονται στο σύμπλοκο, ενεργήσαμε ως εξής: από τα CD φάσματα των διαλυμάτων ($R \neq 0$), CDR, στα οποία η αναλυτική συγκέντρωση του DNA είναι σταθερή ($[DNA] = 7 \times 10^{-5} M$ αφαιρέθηκε το CD φάσμα του καθαρού DNA ($R = 0$), CD DNA. Επιπλέον προς σύγκριση παρατίθεται και το φάσμα του διαλύματος που περιέχει μόνο το σύμπλοκο, σε δεκαπλάσια συγκέντρωση από την μεγαλύτερη συγκέντρωση που συναντάται στα διαλύματα DNA-(Cu(II)-PDGluc). Στο Σχήμα 54 παρουσιάζονται τα $\Delta CD = CDR - CDDNA$ για τους διάφορους λόγους R [64].



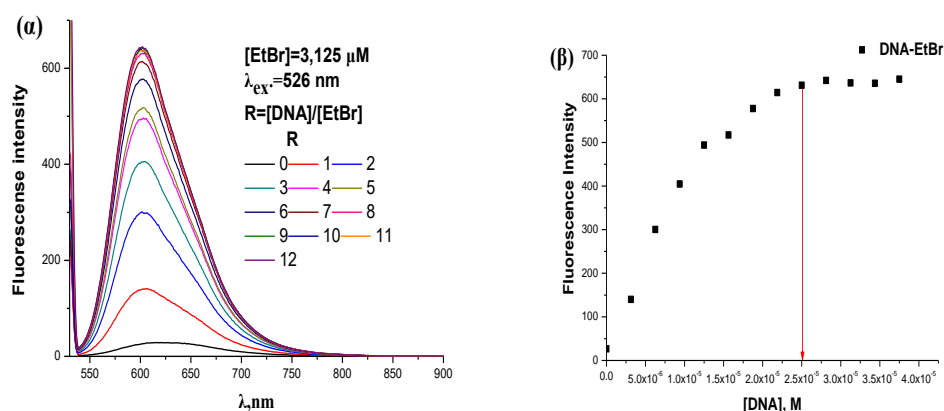
Σχήμα 54: Το φάσμα διαφοράς του κυκλικού διχρωισμού για το Cu(II)- PDGluc.

Παρατηρούμε λοιπόν στο φάσμα διαφοράς, ότι εμφανίζεται ελάχιστο στα 275 nm και μέγιστο στα 230 nm, δηλαδή στα μήκη κύματος που αντιστοιχούν στα μέγιστα των απορροφήσεων στα φάσματα ηλεκτρονικής απορρόφησης της PDGluc. Η οπτική ενεργότητα του συμπλόκου οφείλεται στα ασύμμετρα άτομα άνθρακα που

φέρουν τα σάκχαρα και είναι η συνισταμένη των διαφόρων διαμορφώσεων που αυτά υιοθετούν στο υδατικό διάλυμα. Η αλληλεπίδραση όμως του συμπλόκου Cu(II)-PDGlc με το DNA, γίνεται με συγκεκριμένη διαμόρφωση, με αποτέλεσμα τα ισχυρά διχρωικά σήματα. Αυτό υπονοεί παρεμβολή ή σύνδεση μέσω άλακας και αποκλείει ηλεκτροστατική ή άλλου είδους εξωτερική σύνδεση [65-66].

9.3 Φθορισμομετρία

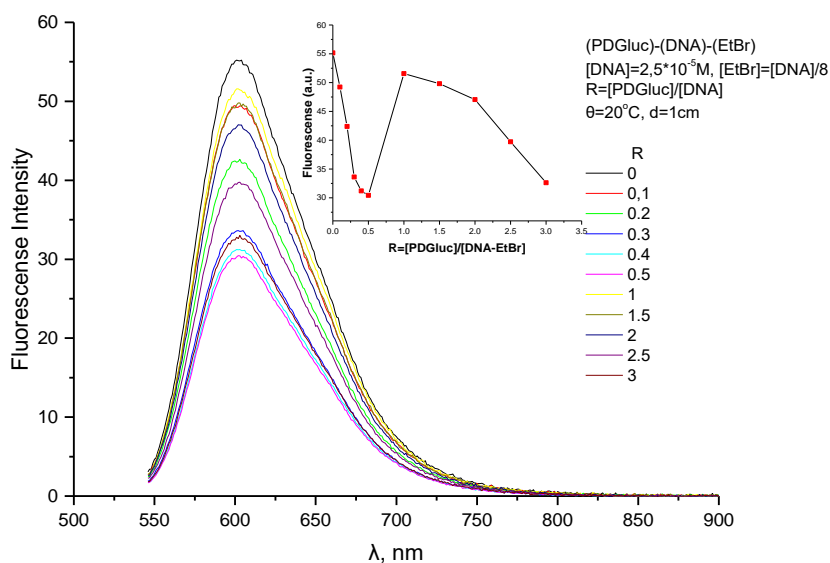
Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το βρωμιούχο αιθίδιο ως ένωση «αναφορά» για να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση των ενώσεών μας με το DNA. Το EtBr είναι ένα επίπεδο μόριο που γενικά δεν φθορίζει έντονα αλλά η ένταση φθορισμού του αυξάνεται όταν αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής. Τα φάσματα φθορισμού παρουσιάζονται στο Σχήμα 55.



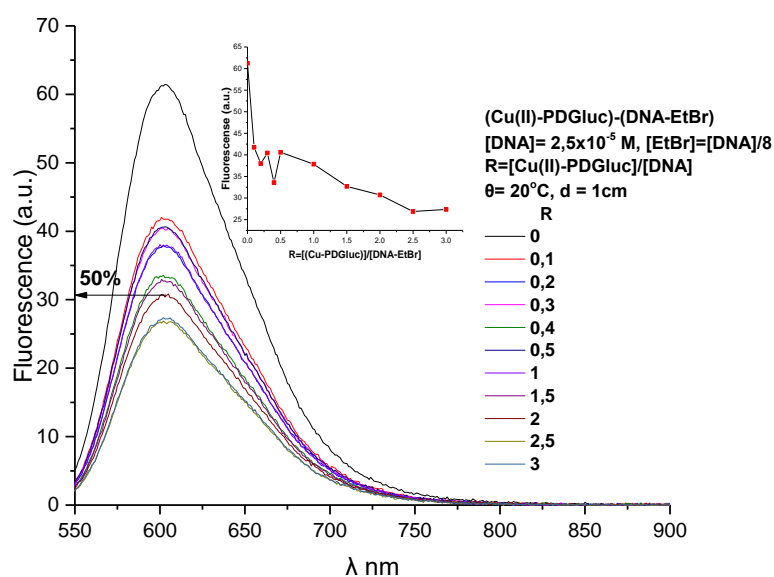
Σχήμα 55: (α) Φάσμα φθορισμού για το DNA-EtBr (β) διάγραμμα της έντασης φθορισμού στα 600 nm συναρτήσεως της [DNA] από δεδομένα του (α), $\lambda_{ex}=526$ nm.

Από το παραπάνω διάγραμμα (Σχήμα 55 β) προέκυψε ότι σε αναλογία $[DNA]/[EtBr]=8/1$ το DNA έχει κορεστεί πλήρως με το EtBr [68]. Για τη μελέτη παρασκευάστηκαν διαλύματα ως εξής: Σε διάλυμα DNA προστέθηκε διάλυμα EtBr έτσι ώστε η αναλογία $[DNA]/[EtBr]$ να παραμένει σταθερή και ίση με 8/1. Το διάλυμα DNA-EtBr παρέμεινε για επώαση 1h στους 25°C. Από το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκαν δύο σειρές διαλυμάτων, όπου η τελική συγκέντρωση του DNA ήταν ίση με $2,5 \times 10^{-5}$ M και η τελική συγκέντρωση του EtBr με $3,125 \times 10^{-6}$ M. Στην πρώτη σειρά μεταβαλλόταν η συγκέντρωση της PDGlc και στη δεύτερη του συμπλόκου Cu(II)-PDGlc, έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι

$R=[X]/[DNA-EtBr]$, (X: PDGluc ή Cu(II)-PDGluc). Τα διαλύματα αυτά παρέμειναν για επώαση 24 h στους 25°C, πριν τις μετρήσεις. Στα Σχήματα 56 και 57 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού των συστημάτων (DNA-EtBr)-(PDGluc) και (DNA-EtBr)-(Cu(II)-PDGluc), αντίστοιχα, σε συνάρτηση του λόγου R. Μήκος κύματος διέγερσης $\lambda_{ex}=526\text{ nm}$, μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής $\lambda_{em}=602\text{ nm}$, $\theta=25^\circ\text{C}$, $d=1\text{ cm}$.



Σχήμα 56: Φάσμα φθορισμού DNA-EtBr-PDGluc, $\lambda_{ex}=526\text{ nm}$.



Σχήμα 57: Φάσμα φθορισμού DNA-EtBr- Cu(II)-PDGluc, $\lambda_{ex}=526\text{ nm}$.

Η διαφορετική αλληλεπίδραση της PDGlu_c με το DNA σε σχέση με την αλληλεπίδραση του Cu(II)-PDGlu_c με αυτό, γίνεται αντιληπτή και από τα Σχήματα 56 και 57. Αν εστιάσουμε στον φθορισμό του EtBr που εκπέμπεται στα ~600 nm, διαπιστώνουμε ότι στην περίπτωση που γίνεται προσθήκη διαλύματος της PDGlu_c ο φθορισμός μειώνεται συνεχώς μέχρι το λόγο R=0,5 κατόπιν αυξάνει απότομα μέχρι τον λόγο R= 1 και για λόγους R>1 μειώνεται και πάλι. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι ο υποκαταστάτης PDGul_c, αλληλεπιδρά με το DNA και μάλιστα με περισσότερους από έναν τρόπους. Θα πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι το EtBr φθορίζει μόνο όταν παρεμβληθεί στις βάσεις του DNA, δηλαδή όταν βρεθεί σε υδρόφοβο περιβάλλον και η αύξηση ή μείωση της έντασης του φθορισμού εξαρτάται από το αν αντικαθίσταται από άλλο παρεμβαλλόμενο μόριο, όταν η διαμόρφωση του DNA γίνεται τέτοια ώστε να εκτεθεί σε υδρόφιλο περιβάλλον ή όταν αλληλεπιδρά με ένα μόριο (π.χ., να σχηματίζει σύμπλοκο με το μεταλλικό κέντρο ενός συμπλόκου που αλληλεπιδρά με το DNA). Έτσι για λόγους R<0,5, όπου παρατηρείται μείωση του φθορισμού, η αλληλεπίδραση του PDGul_c πιθανώς να είναι είτε κλασσική παρεμβολή εκτοπίζοντας το EtBr είτε να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υδρόφιλου περιβάλλοντος στην περιοχή που έχει παρεμβληθεί το EtBr. Για λόγους 0,5<R<1 παρατηρείται απότομη αύξηση του φθορισμού φθάνοντας στο επίπεδο φθορισμού R=0. Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι ο φθορισμός στα ~600 nm οφείλεται στο EtBr συμπεράνεται ότι δεν θα πρέπει να έχει εκτοπιστεί το EtBr από το εσωτερικό του DNA και επιπλέον ο νέος τρόπος σύνδεσης να δημιουργεί εκ νέου ένα υδρόφοβο περιβάλλον γύρω από το EtBr. Για λόγους R>1 παρατηρείται και πάλι μείωση του φθορισμού. Στους λόγους αυτούς έχουμε περίσσεια PDGul_c και πιθανώς να εκτοπίζεται το EtBr λόγω παρεμβολής του PDGul_c στις βάσεις του DNA.

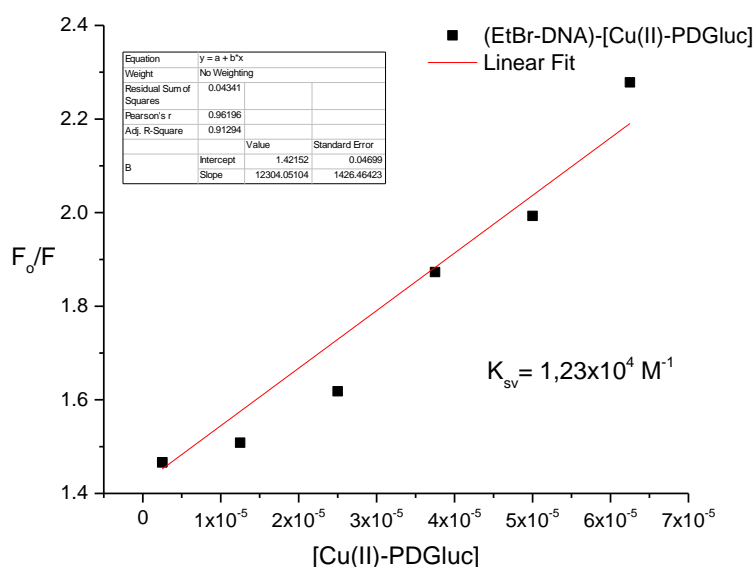
Πιθανώς να είναι είτε κλασσική παρεμβολή εκτοπίζοντας το EtBr, είτε να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υδρόφιλου περιβάλλοντος στην περιοχή που έχει παρεμβληθεί το EtBr. εν έχει $0,2 < R = [\text{Cu(II)-PDGul}_c] / [\text{DNA}] < 3,5$ είναι πιθανή η παρεμβολή ή κάποιος άλλος τρόπος που εκθέτει το EtBr σε υδρόφιλο (πολικό) περιβάλλον [86,87].

Στην περίπτωση της προσθήκης του Cu(II)-PDGlu_c στα διαλύματα (DNA-EtBr) παρατηρείται μια σχεδόν συνεχής μείωση του φθορισμού, υποδεικνύοντας έναν τρόπο σύνδεσης με το DNA, πιθανώς μέσω παρεμβολής όπως συμπεραίνεται και από

τα CD φάσματα. Η απόσβεση είναι δυνατόν να αναλυθεί με βάση την εξίσωση Stern-Volmer:

$$F_0/F = K_{sv}[Q] + 1$$

Όπου F_0 η ένταση εκπομπής απουσία του συμπλόκου, F η ένταση εκπομπής παρουσία του συμπλόκου, K_{sv} η σταθερά απόσβεσης και $[Q]$ η συγκέντρωση του συμπλόκου. Η K_{sv} υπολογίζεται από την κλίση του διαγράμματος της μεταβολής του F_0/F σε συνάρτηση της συγκέντρωσης του συμπλόκου, $[Q]$. (Σχήμα 58).



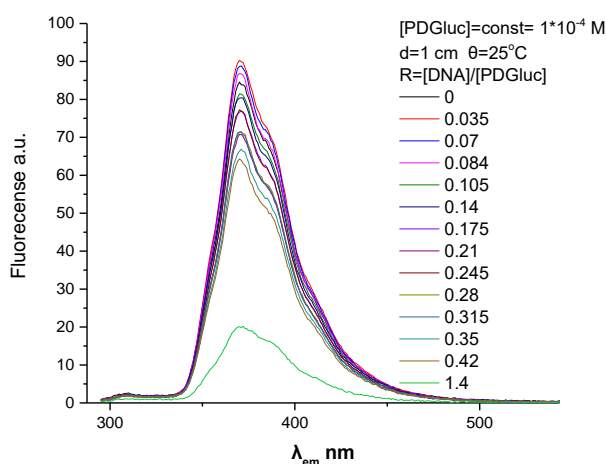
Σχήμα 58: Διάγραμμα Stern-Volmer για το σύστημα EtBr-DNA-[Cu-PDGluc].

Επιπλέον, η φαινόμενη σταθερά σύνδεσης με το DNA K_{app} υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

$$K_{EB}[EB] = K_{app}[Q_{1/2}]$$

Όπου K_{EB} η σταθερά σύνδεσης του EtBr με το DNA (λαμβάνεται ίση με $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), $[EB]$ η συγκέντρωση του EtBr ($3,125 \times 10^{-6} \text{ M}$) και $[Q_{1/2}]$ η συγκέντρωση του συμπλόκου που προκαλεί μείωση του φθορισμού κατά 50% [98-100]. Υπολογίστηκε ότι $K_{app} = 6,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η μεταβολή στο φθορισμό διαλυμάτων PDGluc, σταθερής συγκέντρωσης $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, κατά την προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων DNA. Στο Σχήμα 59 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού των διαφόρων διαλυμάτων μετά από διέγερση σε $\lambda_{ex} = 273 \text{ nm}$.



Σχήμα 59: Φάσμα φθορισμού διαλύματος PDGluc απουσία ($R=0$) και παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων DNA ($R=0.72-14.3$). $[PDGluc]=\text{const}=1 \times 10^{-4}$, $R=[DNA]/[PDGluc]$. Θερμοκρασία 25°C . $\lambda_{\text{exc.}}=273 \text{ nm}$.

Από τη μελέτη των φασμάτων φθορισμού του Σχήματος 59, παρατηρούμε ότι η ένταση φθορισμού του διαλύματος PDGluc μειώνεται όσο αυξάνει η ποσότητα του DNA, χωρίς να παρατηρείται μετατόπιση των μηκών κύματος στο μέγιστο της εκπομπής (370-371 nm). Γνωρίζοντας ότι το DNA δεν δίνει εκπομπή φθορισμού στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, συμπεραίνεται ότι συμβαίνει αλληλεπίδραση και η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί απόσβεση του φθορισμού.

Η προσθήκη του DNA προκαλεί σημαντική μείωση του φθορισμού της PDGluc, περίπου 76% του αρχικού φθορισμού για το λόγο $R=0-1,4$. Η μείωση αυτή υποδεικνύει μεταβολή της πολικότητας του περιβάλλοντος του φθοροφόρου, δηλ. του φαινανθρολινικού δακτυλίου του μορίου της PDGluc. Συνήθως, μια τέτοια μεταβολή σημαίνει αύξηση τη πολικότητας του περιβάλλοντος του μορίου, σε σχέση με αυτήν πριν την αλληλεπίδραση [68].

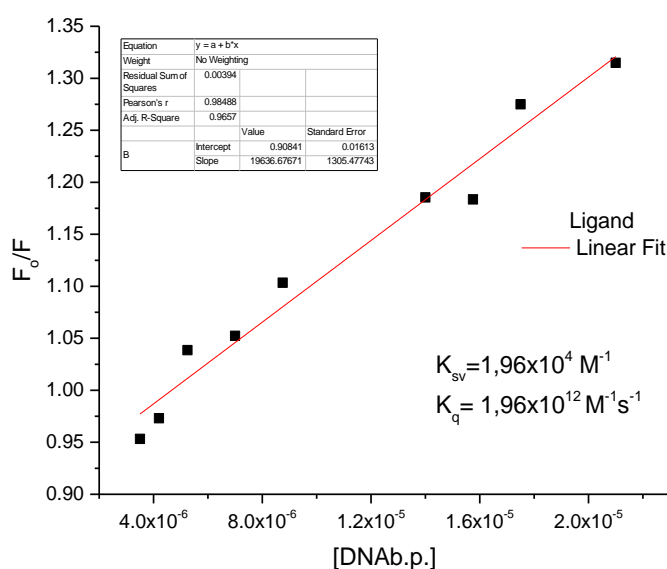
Γενικά, υπάρχουν 3 είδη απόσβεσης του φθορισμού, η στατική (static), η δυναμική (dynamic) και η φαινόμενη (apparent). Ο μηχανισμός απόσβεσης είναι δυνατόν να προβλεφθεί από τα διαγράμματα της εξίσωσης Stern- Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[DNA], \text{ Stern-Volmer}$$

Όπου: F_0 : η ένταση του φθορισμού στο διάλυμα μόνο της PDGluc ($R=0$), F : η ένταση φθορισμού των διαλυμάτων PDGluc-DNA) στους διάφορους λόγους R . K_{sv} : η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer.

Η απόσβεση (quenching) του DNA στο φθορισμό της PDGluc μπορεί να είναι ή στατική ή δυναμική, εξαιτίας της γραμμικής σχέσης του F_0/F συναρτήσει της συγκέντρωσης του $\text{DNA}_{b.p.}$. Στη στατική απόσβεση (static quenching) σχηματίζεται ένα μη φθορίζον σύμπλοκο ανάμεσα στο φθοροφόρο και τον αποσβέστη (quencher). Η αλληλεπίδραση του φθοροφόρου με τον αποσβέστη έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης εκπομπής και το ασύμπλεκτο φθοροφόρο φθορίζει κανονικά. Στην περίπτωση δυναμικής απόσβεσης (dynamic quenching), όλα τα μόρια του φθοροφόρου συγκρούονται με τα μόρια του αποσβέστη κατά τη διάρκεια της διέγερσης. Συνήθως, στη δυναμική απόσβεση το μήκος κύματος του φθοροφόρου στο φάσμα απορρόφησης παραμένει αμετάβλητο[67-70].

Στο Σχήμα 60 που ακολουθεί παρουσιάζεται το διάγραμμα της μεταβολής του λόγου (F_0/F) σε συνάρτηση της $[\text{DNA}]$. Μέτρηση φθορισμού στα 371 nm.



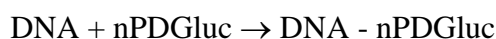
Σχήμα 60: Διάγραμμα μεταβολής του F_0/F σε συνάρτηση με τη $[\text{DNA}]$.

$[\text{PDGluc}] = \text{const} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$. $[\text{DNA}] = 0 - 1,43 \times 10^{-3} \text{ M}$. Θερμοκρασία 25°C .

Από το διάγραμμα του Σχήματος 60 υπολογίζεται η σταθερά απόσβεσης $K_{sv} = 1,96 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. Η σταθερά απόσβεσης k_q υπολογίστηκε της τάξης $10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, μεγαλύτερη από τη μέγιστη αναμενόμενη τιμή της σταθεράς για μηχανισμό δυναμικής απόσβεσης ($10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) σε υδατικά διαλύματα, υπονοώντας μηχανισμό στατικής αποδιέγερσης. Πάντως για να διακρίνουμε με βεβαιότητα το είδος του μηχανισμού απόσβεσης, δυναμικό ή στατικό, θα πρέπει να γίνει μελέτη σε διάφορες

θερμοκρασίες. Η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer στην περίπτωση της δυναμικής απόσβεσης αυξάνει με τη θερμοκρασία, ενώ στην στατική μειώνεται.

Τα αποτελέσματα της φθορισμομετρικής απόσβεσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της σταθεράς σύνδεσης (K_f) και του αριθμού των θέσεων σύνδεσης (n) της PDGluC με το DNA, της ισορροπίας:

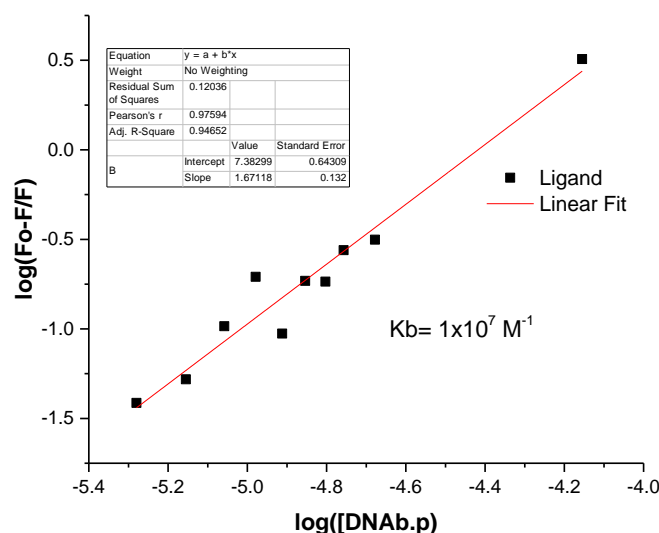


και σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\log[(F_0-F)/F] = \log K_f + n \log[\text{DNA}]$$

Όπου: F_0 : η ένταση του φθορισμού στο διάλυμα μόνο της PDGluC ($R=0$), F : η ένταση φθορισμού των διαλυμάτων PDGluC-DNA στους διάφορους λόγους.

Οι τιμές των (K_f) και (n) προσδιορίζονται από το διάγραμμα της μεταβολής του $\log[(F_0-F)/F]$ σε συνάρτηση με τον $\log[\text{DNA}]$ (Σχήμα 61)[70-71].



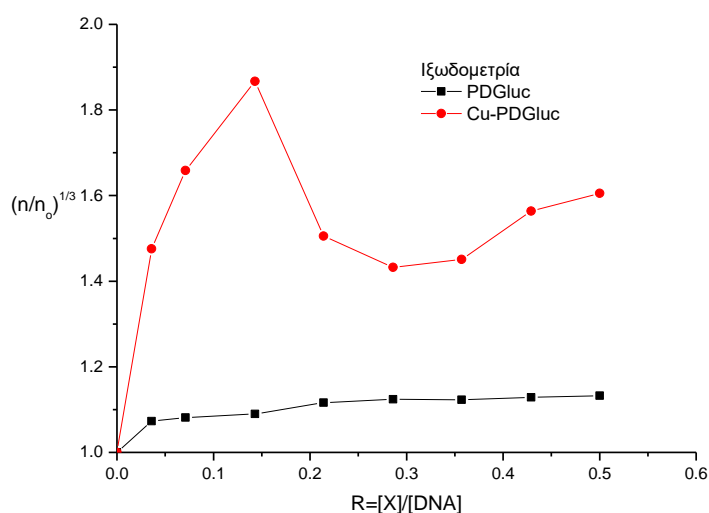
Σχήμα 61: Διάγραμμα μεταβολής του $\log[(F_0-F)/F]$ σε συνάρτηση με τον $\log[\text{DNA}]$.

Από το διάγραμμα προκύπτει ότι $K_f = 1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ και $n=1,7$, δηλαδή ισχυρή σύνδεση και περισσότερες από μία (δύο) θέσεις σύνδεσης με το DNA.

Από την αντίστοιχη μελέτη της μεταβολής στο φθορισμό διαλυμάτων Cu(II)-PDGluC, σταθερής συγκέντρωσης $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, κατά την προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων DNA δεν ήταν δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα, διότι τόσο το διάλυμα απουσία όσο και αυτά παρουσία του DNA φθορίζουν ελάχιστα.

9.4 Ίξωδομετρία

Άλλη μια τεχνική που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεών μας (PDGluc και Cu-PDGluc) με το DNA είναι η Ίξωδομετρία. Το Ίξωδες και για τα 2 υπό μελέτη συστήματα (DNA-PDGluc και DNA-complex) παρουσιάζεται στο Σχήμα 62.



Σχήμα 62: Διάγραμμα Ίξωδομετρίας για τη σειρά DNA-PDGluc.

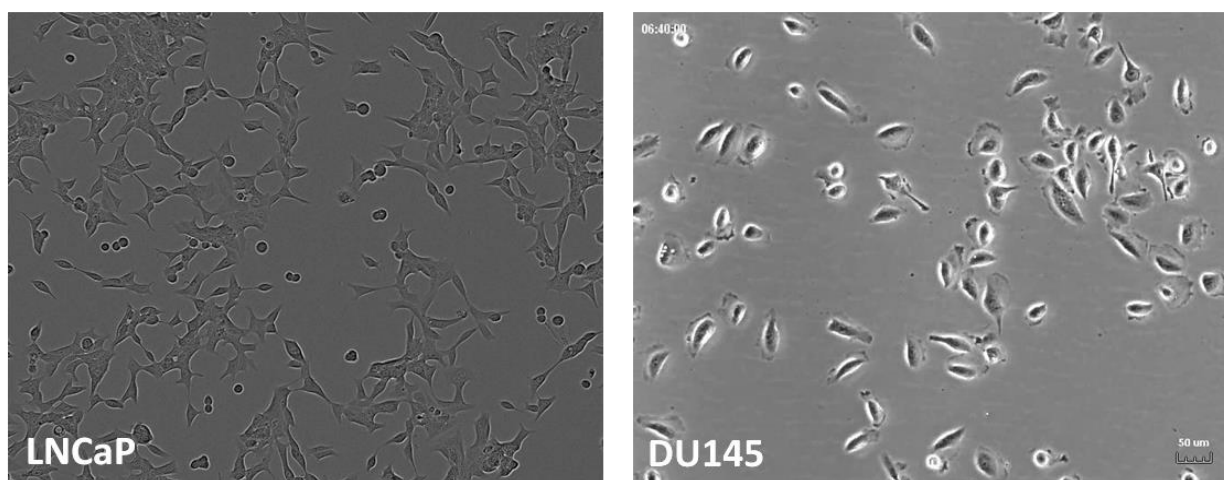
Από το Σχήμα 62 παρατηρείται σταδιακή και μικρή αύξηση του Ίξωδους του DNA κατά την προσθήκη διαλύματος της PDGluc για λόγους $R = [PDGluc]/[DNA]$ από 0 έως και 0,5. Η αύξηση αυτή του Ίξωδους υποδηλώνει την αύξηση του περιμετρικού μήκους του DNA κατά την αλληλεπίδραση της PDGluc με αυτό. Γενικά, η αύξηση του Ίξωδους του DNA είναι ενδεικτική για αλληλεπίδραση μικρών μορίων με το DNA μέσω παρεμβολής ή συναρμογής στις αύλακες. Τελείως διαφορετική είναι η μεταβολή που προκαλείται από την αλληλεπίδραση του Cu(II)-PDGluc. Η μεγάλη αύξηση είναι ισχυρή ένδειξη της αλληλεπίδρασης με παρεμβολή. Η μείωση του Ίξωδους για τους λόγους 0,143 – 0,357 πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το Cu(II)-PDGluc προκαλεί κάμψη του DNA κατά την αλληλεπίδρασή του με αυτό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ PDG_{luc} και του Cu(II)-PDG_{luc} ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ LNCaP ΚΑΙ DU145

In vitro πειράματα/μελέτες. Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

Εκτός από τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό της PDG_{luc} και του Cu(II)-PDG_{luc}, διερευνήθηκε και η κυτταροτοξικότητά τους στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP (ορμονοεξαρτώμενη) και DU145 (μη-ορμονοεξαρτώμενη) από την κυτταρική τράπεζα του ερευνητικού κέντρου Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Ερευνών, Ενέργειας και Ασφάλειας, από την Ερευνήτρια Β', κ. Μαρία Παραβατού και τη Δρ. Βαρβάρα Μαυροειδή με τη δοκιμασία MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium). Στο Σχήμα 63 παρουσιάζονται οι μορφολογικές διαφορές στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP (ορμονοεξαρτώμενη) και DU145 (μη-ορμονοεξαρτώμενη) σε οπτικό μικροσκόπιο



Σχήμα 63: Μορφολογικές διαφορές που παρατηρούνται στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP (ορμονοεξαρτώμενη) και DU145 (μη-ορμονοεξαρτώμενη) σε οπτικό μικροσκόπιο.

10.1 Αρχή μεθόδου

Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών. Τα κύτταρα των περισσότερων κυτταρικών σειρών προσκολλώνται στον πυθμένα της φιάλης σχηματίζοντας το μονοκυτταρικό ταπήτιο. Η προσκόλληση οφείλεται στην

έκκριση διάφορων, από τα κύτταρα, ινωδών πρωτεϊνών και συστατικών προσκόλλησης, όπως η λαμινίνη, η φιμπρονεκτίνη και το κολλαγόνο. Μετά το πέρας της διαδικασίας προσκόλλησης, τα κύτταρα λαμβάνουν χαρακτηριστική μορφολογία (ινοβλαστών, επιθηλιακών κυττάρων κλπ). Η ανάπτυξη της καλλιέργειας *in vitro* πραγματοποιείται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό το οποίο περιέχει ανόργανα άλατα, αμινοξέα, βιταμίνες και άλλα συστατικά, είναι εμπλουτισμένο με βόειο ορό ενώ έχει σταθερό pH (συνήθως μεταξύ 7,2 – 7,4) και θερμοκρασία (περίπου 37 °C για κύτταρα θηλαστικών) ενώ η ατμόσφαιρα του χώρου καλλιέργειας περιέχει σταθερό ποσοστό οξυγόνου (συνήθως 95%) και διοξειδίου του άνθρακα (συνήθως 5%).

Ο ορός περιέχει πλήθος αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι δρουν διεγερτικά (ως μιτογόνα) και ωθούν τα κύτταρα σε διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις. Η απενεργοποίηση του ορού με επώαση επί 30 min στους 56 °C, πριν τη χρήση του, είναι απαραίτητη για την καταστροφή του θερμοευαίσθητου συστήματος του συμπληρώματος, το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα σε καλλιέργεια. Τα αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη) προστίθενται στο θρεπτικό υλικό με σκοπό να αποφευχθεί η επιμόλυνση της καλλιέργειας από βακτήρια ή άλλους μικροοργανισμούς.

Για τις ανακαλλιέργειες των κυττάρων εφαρμόζεται η τεχνική της θρυψινοποίησης, που επιτυγχάνεται με την έκθεση των κυττάρων στο πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη, η οποία πέπτει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-επιφάνειας φιάλης. Το ένζυμο αυτό έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα μετά την απομάκρυνση των ιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} , τα οποία χρειάζονται οι ιντεγκρίνες για να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες για την κυτταρική προσκόλληση. Η απομάκρυνση αυτών των κατιόντων γίνεται με τη βοήθεια της χηλικής ένωσης EDTA.

10.2 Πειραματική διαδικασία - Υλικά και όργανα

Η *in vitro* βιολογική αξιολόγηση των ενώσεων έγινε με έλεγχο της κυτταροτοξικότητας στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP (ορμονοεξαρτώμενη) και DU145 (μη-ορμονοεξαρτώμενη).

Οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε D-MEM θρεπτικό μέσο ανάπτυξης συμπληρωμένο με 10% FBS, 100 U/ml πενικιλίνης, 100 µg/mL στρεπτομυκίνης και 2 mM γλουταμίνη. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες και αναπτύχθηκαν στους

37 °C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5 % CO₂. Τα υποσυρρέοντα κύτταρα αποκολλήθηκαν με 0,05 % θρυψίνη-EDTA. Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώνονται σε κλίβανο αποστείρωσης πριν την χρήση τους και τα πειράματα έλαβαν χώρα μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής με βάση το πρωτόκολλο αποφυγής μόλυνσεων.

- Τα αποστειρωμένα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες, όπως φιάλες 25 cm² ή 75 cm², τρυβλία, πλάκες πολλαπλών φρεατίων, κωνικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης, σιφόνια μιας χρήσεως και κρυοφιαλίδια (cryotubes) ήταν της εταιρείας Greiner.
- Επωαστικός κλίβανος κυττάρων,FORMA
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow), ELMED
- Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης, Zeiss
- Επιτραπέζια Φυγόκεντρος Labofuge 400R (Heraus Instruments)
- Αιματοκυττόμετρο Bright-Line Hematocytometer (Hausser Scientific Horsham, PA)

10.3 Διατήρηση – Ανάπτυξη κυττάρων

Στην παρούσα εργασία, όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο (σε θερμοκρασία 37 °C και περιεκτικότητα 5% σε CO₂) ενώ η ανάπτυξή τους ελέγχεται στο μικροσκόπιο. Για τη διατήρηση της καλλιέργειας, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φιάλες καλλιέργειας των 75 cm² ή 25 cm² μέχρι ποσοστού κάλυψης της επιφάνειάς τους περίπου 80%, οπότε ανακαλλιεργούνται με θρυψινοποίηση. Αναλυτικότερα, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τη φιάλη, τα κύτταρα υφίστανται πλύση με διάλυμα θρυψίνης/EDTA και στη συνέχεια επωάζονται με το ίδιο διάλυμα για 3-5 min στους 37 °C, ώστε να επιτραπεί η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου. Η απενεργοποίηση της θρυψίνης γίνεται με προσθήκη θρεπτικού υλικού που περιέχει 10% ορό, οι πρωτεΐνες του οποίου απενεργοποιούν το ένζυμο. Τέλος, το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στις 1200 rpm για 10 min και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα μεταφέρονται σε κατάλληλη αραιώση/συγκέντρωση σε νέες φιάλες καλλιέργειας.

10.4 Κατάψυξη – Απόψυξη κυττάρων

Για την κατάψυξη των κυττάρων, το ίζημα μετά την θρυψινοποίηση επαναιωρείται σε διάλυμα 90% ορού-10% DMSO και κατανέμεται σε κρυοφιαλίδια. Παρουσία του DMSO αποφεύγεται η διάλυση της κυτταρικής μεμβράνης που επέρχεται από την αύξηση του κυτταρικού όγκου κατά τον σχηματισμό των παγοκρυστάλλων κατά την κυτταρική ψύξη. Η ψύξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά με διαδοχική τοποθέτηση των φιαλιδίων με τα κύτταρα για 30 λεπτά στους 4 °C, 1 h στους -20 °C, 16-20 h στους -80 °C και τελικά μεταφορά σε ειδικές φιάλες αζώτου (-196°C). Κατά την απόψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα αποψύχονται ταχύτατα με τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C, φυγοκεντρώνονται στις 1200 rpm για 10 min και εν συνεχεία το ίζημα των κυττάρων επανεωρείται προσεκτικά σε πλήρες θρεπτικό υλικό και μεταφέρεται σε νέες φλάσκες καλλιέργειας.[73]

10.5 Μέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έγινε με τη χρήση αιματοκυττομέτρου (πλάκα Neubauer). Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες. Η κάθε επιφάνεια αποτελείται από εννέα μεγάλα τετράγωνα σε μορφή πλέγματος. Κάθε ένα από τα τέσσερα τετράγωνα στις γωνίες χωρίζεται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα. Κάθε μεγάλο τετράγωνο έχει επιφάνεια 1mm².

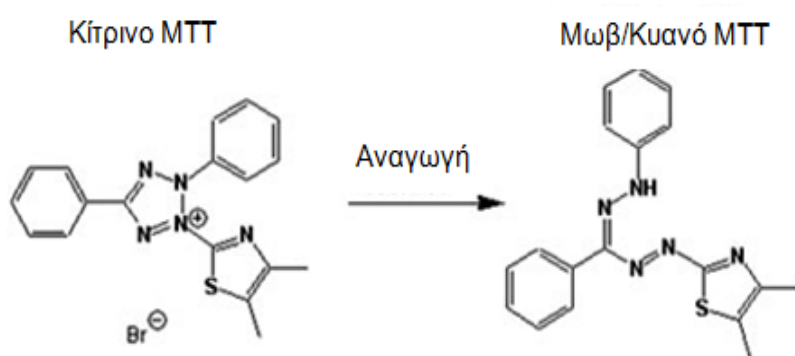
Τοποθετείται μία καλυπτρίδα στο αιματοκυτταρόμετρο και με πιπέττα Pasteur τοποθετούνται 10 μL από το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας, έτσι ώστε να καλυφθεί η κατάλληλα επεξεργασμένη επιφάνεια λόγω του τριχοειδούς φαινομένου. Τα κύτταρα που βρίσκονται στα τέσσερα ακριανά μεγάλα τετράγωνα διαμερίσματα του αιματοκυτταρομέτρου μετρώνται στο οπτικό μικροσκόπιο. Ο αριθμός των κυττάρων ανά mL αρχικού εναιωρήματος ισούται με τον μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων στα τέσσερα διαμερίσματα του αιματοκυτταρομέτρου επί 104.[72]

10.6 Προσδιορισμός βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT

Αρχή μεθόδου

Η εργαστηριακή μέθοδος MTT αποτελεί μια χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στην ικανότητα μιτοχονδριακών αφυδρογονασών των ζώντων κυττάρων να

διασπών τον τετραζολικό δακτύλιο του ασθενώς κίτρινου άλατος MTT, με αποτέλεσμα το σχηματισμό κυανών κρυστάλλων ενός παραγώγου φορμαζάνης (Σχήμα 64). Σε αντίθεση με το MTT, οι κρύσταλλοι του παραγώγου φορμαζάνης δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά. Με την προσθήκη ενός παράγοντα διαλυτοποίησης (π.χ. DMSO), οι σχηματισθέντες κρύσταλλοι διαλύονται και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, ο δε αριθμός τους είναι ανάλογος του αριθμού των ζώντων κυττάρων. Η ποσοτικοποίηση του έγχρωμου (κυανού) διαλύματος γίνεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 590 nm σε μετρητή πλακιδίων.

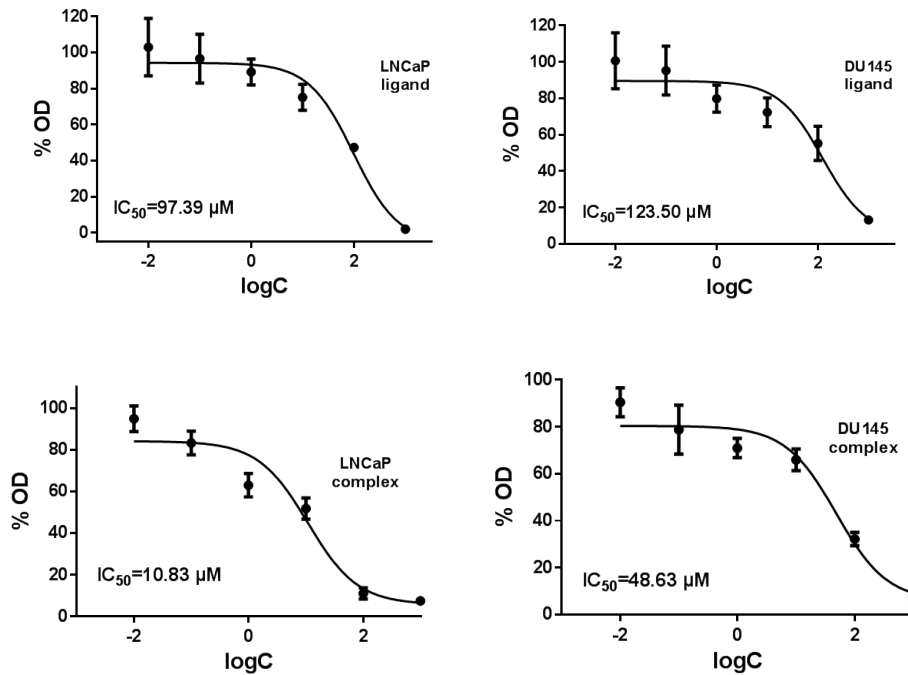


Σχήμα 64: Η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίζεται από τη μέτρηση των επιπέδων του αναχθέντος MTT από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζώντων κυττάρων και εμφανίζεται ως αλλαγή χρώματος από ασθενώς κίτρινο σε έντονο κυανό.

Η παρατηρούμενη αντίδραση αναγωγής λαμβάνει χώρα μόνο όταν τα αναγωγικά ένζυμα είναι ενεργά, κατά συνέπεια αυτή η αλλαγή χρώματος αποτελεί μέτρο προσδιορισμού των ζώντων κυττάρων. Συγκρίνοντας το ποσό του παραγόμενου κυανού παραγώγου φορμαζάνης σε κύτταρα καλλιεργημένα παρουσία και απουσία του προς μελέτη παράγοντα, ελέγχεται η πιθανή τοξικότητά του ή και η ευεργετική δράση του στην βιωσιμότητα των κυττάρων.[72][73]

Αποτελέσματα

Οι καμπύλες που προέκυψαν και για τα δύο διαφορετικά συστήματα, PDGluC και Cu(II)-PDGluC φαίνονται στο Σχήμα 65.



Σχήμα 65: Οι τιμές IC₅₀ για την PDGluC και Cu(II)-PDGluC σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP (ορμονοεξαρτώμενη) και DU145 (μη-ορμονοεξαρτώμενη).

Αρχικά θα πρέπει να επισημάνουμε ότι η μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC₅₀) είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Αυτό το ποσοτικό μέτρο υποδεικνύει πόσο ένα συγκεκριμένο φάρμακο ή άλλη ουσία (αναστολέας) είναι αναγκαίο για να αναστείλλει κατά το ήμισυ μια δεδομένη βιολογική διαδικασία (ή συστατικό μιας διαδικασίας, δηλαδή ένα ένζυμο, κύτταρο, υποδοχέα κυττάρου ή μικροοργανισμό). Οι τιμές τυπικά εκφράζονται ως γραμμομοριακή συγκέντρωση.[101-102]

Με βάση τα αποτελέσματα (Πίνακας 18) παρατηρούμε ότι στην ορμονοεξαρτώμενη κυτταρική σειρά LNCaP παρατηρείται μεγαλύτερη ευαισθησία (δηλ. τοξικότητα) τόσο του υποκαταστάτη όσο και του συμπλόκου, ενώ στη μη-ορμονοεξαρτώμενη κυτταρική σειρά DU145 οι ληφθείσες τιμές IC₅₀ είναι αισθητά μεγαλύτερες, γεγονός που υποδεικνύει σαφή εκλεκτικότητα των υπό μελέτη ενώσεων στα ανδρογόνο-εξαρτώμενα LNCaP κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα το σύμπλοκο Cu(II)-PDGluC εμφανίζει εξαιρετικά αποτελέσματα στην κυτταρική σειρά LNCaP που

προσεγγίζουν τις αντίστοιχες συμπλόκων με αποδεδειγμένες αντικαρκινικές ιδιότητες όπως το Cisplatin (Πίνακας 19). [101-102]

Πίνακας 18: Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας (IC₅₀)

	LNCaP	DU145
Ligand	97.39 ± 11.18	123.50 ± 16.15
Complex	10.83 ± 1.13	48.63 ± 5.28

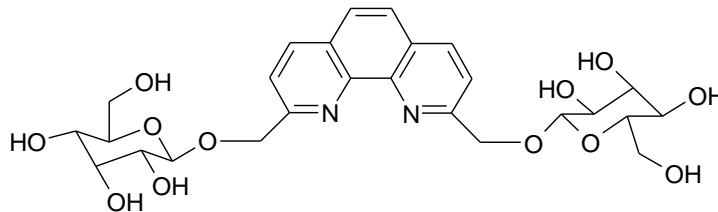
Πίνακας 19: Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας (IC₅₀) συμπλόκων Pt με αποδεδειγμένες αντικαρκινικές ιδιότητες.

	LNCaP
Cisplatin	12.42 ± 1.17
Carboplatin	67.50 ± 2.28
Oxaliplatin	13.59 ± 0.93

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του παραγώγου της 1,10-φαιναθρολίνης, (PDGluc), η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου του Cu(II) με την PDGluc (το Cu(II)- PDGluc), η αλληλεπίδραση των PDGluc και Cu(II)-PDGluc με CT-DNA, καθώς και η διερεύνηση της κυτταροτοξικότητάς τους στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP (ορμονοεξαρτώμενη) και DU145 (μη-ορμονοεξαρτώμενη). Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τις παραπάνω μελέτες ήταν οι φασματοσκοπίες UV-Vis, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR (H-H cosy και HSQC), EPR, κυκλικός διχρωσμός CD, φθορισμομετρία, και η ιξωδομετρία. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε συνδυασμό με τις πληροφορίες από την βιβλιογραφία προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Το προϊόν χαρακτηρίστηκε με τις μεθόδους UV-Vis, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR (H-H cosy και HSQC), βρέθηκε να έχει δομή:



2. Με βάση τη δομή του υποκαταστάτη και τα πειραματικά δεδομένα βρέθηκε η στοιχειομετρία του προϊόντος σύμπλεξης της PDGluc μέσω της αλληλεπίδρασης των ιόντων Cu(II) με την PDGluc και προτείνεται ο σχηματισμός ενός συμπλόκου στοιχειομετρίας Cu(II):PDGluc=1:1. Χαρακτηρίστηκε με UV-Vis, IR, EPR και φθορισμομετρία. Η δομή που προτείνεται βάση των πειραματικών δεδομένων και της βιβλιογραφίας είναι ένα επίπεδο τετραγωνικό σύμπλοκο που παρουσιάζει μια σημαντική τετραεδρική παραμόρφωση του τετραγωνικού επιπέδου.

3. Τα είδη της αλληλεπίδρασης εξαρτώνται από το λόγο $R=[\text{drug}]/[\text{DNA}]$ όπου $[\text{drug}]$: [PDGluc] και [Cu(II)-PDGluc] σε κάθε περίπτωση. Ο υποκαταστάτης PDGluc αλληλεπιδρά με το CT-DNA με περισσότερους από έναν τρόπους. Η PDGluc προκαλεί μικρή αύξηση του ιξώδους, μια μικρή αποέλιξη της έλικας του DNA και μια ταυτόχρονη εξασθένιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βάσεων για μικρούς

λόγους. Αρχικά λοιπόν η πιθανότερη αλληλεπίδραση είναι σύνδεση μέσω αύλακας του DNA. Για μεγαλύτερους λόγους όμως, λαμβάνοντας υπόψη κυρίως την μείωση στο φάσμα του φθορισμού DNA-EtBr-PDGluC για τους λόγους αυτούς, προτείνεται κάποιο είδος παρεμβολής της PDGluC με το μόριο του DNA. Στο σύμπλοκο Cu(II)-PDGluC, αντίθετα, μέσω των πειραματικών δεδομένων φαίνεται να επικρατεί μόνο η παρεμβολή κλασσική ή μη κλασσική. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την υψηλή τιμή της $K_b = 8,26 \times 10^6$ M, καθώς και από την μεγάλη αύξηση των τιμών του ιξώδους.

4. Τόσο η ελεύθερη PDGluC, όσο και το σύμπλοκο Cu(II)-PDGluC παρουσίασαν μια σημαντική εκλεκτικότητα ανάμεσα στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη LNCaP (ορμονοεξαρτώμενη) και DU145 (μη-ορμονοεξαρτώμενη), παρουσιάζοντας σαφώς καλύτερα αποτελέσματα στην πρώτη. Πιο συγκεκριμένα, η κυτταροτοξικότητα που καταγράφηκε για το σύμπλοκο Cu(II)-PDGluC στην κυτταρική σειρά LNCaP παρουσιάζει εξαιρετικά αποτελέσματα που προσεγγίζουν τις αντίστοιχες συμπλόκων με αποδεδειγμένες αντικαρκινικές ιδιότητες, όπως το Cisplatin.

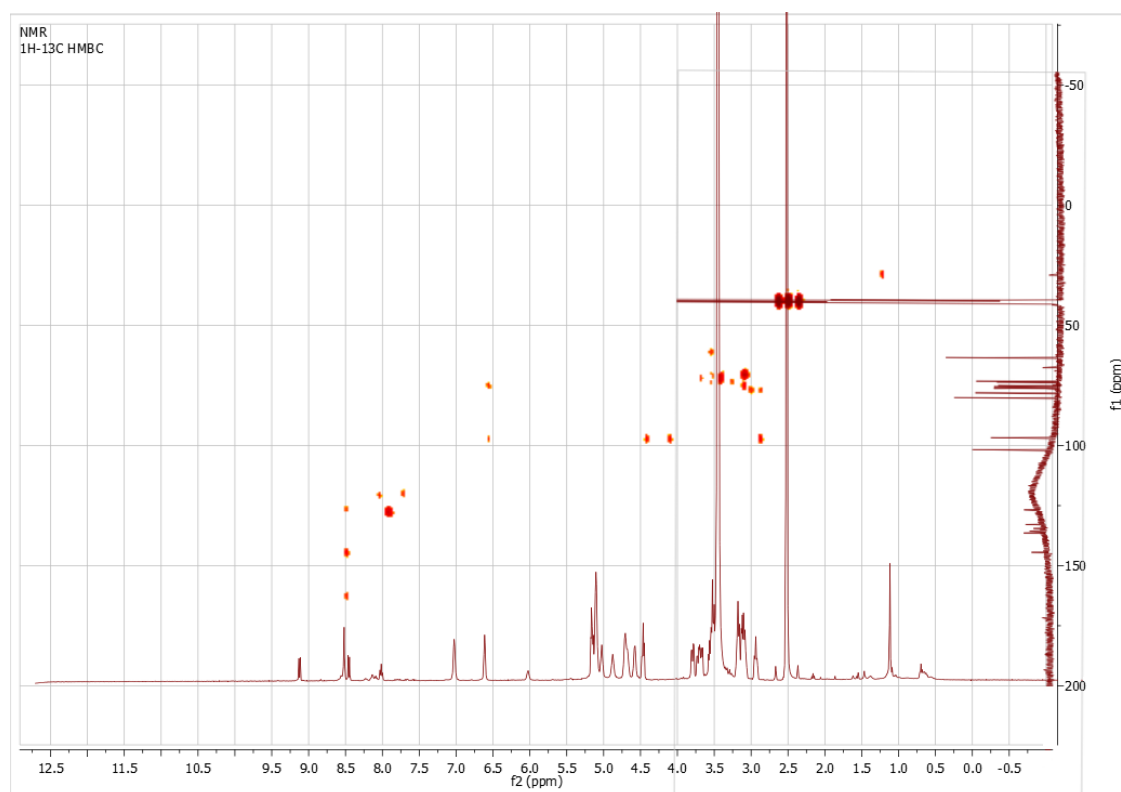
Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια
Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

CD	CircularDichroism
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
UV-Vis	UltraViolet-Visible
IR	Infrared
HSQC	HeteronuclearSingleQuantumCorrelation
HMQC	HeteronuclearMultipleQuantumCorrelation
HMBC	HeteronuclearMultipleBondCorrelation
DNA	DeoxyRibonucleic Acid
A-T	Adenine-Thymine
G-C	Guanine-Cytocine
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMF	Dimethylformamide
THF	Tetrahydrofurane
KBr	Kaliumbromid
CT-DNA	CalfThymous-DeoxyRibonucleicAcid
EtBr	Ethidium Bromide
PBS	Phosphate Buffered Saline
FBS	Fetal Bovine Serum
PDALD	1,10-Phenanthroline-2,9-dicarboxaldehyde
PDALC	2,9-Bis(hydroxymethyl)-1, 10-phenanthroline
BzPDGluc	Benzoylated 2,9-δις-[(2R, 3S, 4R, 5R) -2,3,4,5,6- πενταϋδροξυεξανάλη]-1,10- phenanthroline
PDGluc	2,9-δις-[(2R, 3S, 4R, 5R) -2,3,4,5,6- πενταϋδροξυεξανάλη]-1,10- phenanthroline

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Για τον χαρακτηρισμό του μορίου του υποκαταστάτη (PDGluc), εκτός από φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, COSY και $^{13}\text{C-NMR}$, εφαρμόστηκε και η φασματοσκοπική μέθοδος HMBC.

Το φάσμα της παραπάνω μεθόδου παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Με βάση το παραπάνω φάσμα επιβεβαιώνεται η δομή του μορίου του υποκαταστάτη όπως προτείνεται και από τις φασματοσκοπίες $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$ και COSY.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. C.R. Luman, F. N. Castellano, Phenanthroline Ligands, *Comprehensive Coordination Chemistry II*, vol. 1, 2003, pp. 25-39.
2. A. Bencini, V. Lippolis, 1, 10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes, *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 254, 2010, pp. 2096–2180.
3. B.G. Que, K.M. Downey, A.G. So, *Biochemistry* 19, 1980, 5987
4. T.W. Hambley, *Inorg. Chem.* 37, 1998, 3767–3774.
5. H.B. Gray, Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21st century, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100(7), 2003, pp. 3563-3568.
6. M.J. Abrams, B.A. Murrer, Metal compounds in therapy and diagnosis, *Sci*, vol. 261(5122), 1993, pp. 725-730.
7. S. Rafique, A. Nasim, H. Akbar, A. Athar, Transition metal complexes as potential therapeutic agents, *Biotechnol Mol Biol Rev*, vol. 5, 2010, pp. 38-45.
8. S.P. Waseem A. Wani, S. Shreaz, S. Gómez-Ruiz, Nanostructured materials functionalized with metal complexes: In search of alternatives for administering anticancer metallodrugs, *Coord Chem Rev*, vol. 312, 2016, pp. 67-98.
9. T.W. Hambley, Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities, *Dalton Trans*, vol. 43, 2007, pp. 4929-4937.
10. S.Ahmad, S. Ali, A. R. Al-Arfaj, Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents, *Polyhedron*, vol. 25, 2006, pp. 1633–1645.
11. E. Dellera, G. Sandri, S. Rossi, F. Ferrari, C. Del Fante, C. Perotti, P. Grisoli, and C. Caramella, Development of chitosan oleate ionic micelles loaded with silver sulfadiazine to be associated with platelet lysate for application in wound healing, *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 88, 2014, pp. 643-650.
12. P. Caravan, T.J. McMurry, R.B. Lauffer, Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications, *Chem Rev*, vol. 99, 1999, pp. 2293-2352.
13. E.J. Rummeny, J.C. Kurdziel, G. Nilsen, B. Op de Beeck, B. Lundby, MnDPDP for MR imaging of the liver. Results of an independent image evaluation of the European phase III studies, *Acta Radiologica*, vol. 38, 1997, pp. 638-642.
14. C. Avendano, and J. C. Menendez, Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, in *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 2015, pp. 133–195.

15. B.J. Marshall and J.R. Warren, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet*, vol. 1(8390), 1984, pp. 1311-1315.
16. P. Sadler, H. Sun, Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth, *Coord Chem Rev*, vol. 185-186, 1999, pp. 689–709.
17. Z. Li, Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography, *Adv Drug Deliver Rev*, 2010. 62: p. 1031–1051.
18. D. Josephs, J. Spicer, and M. O'Doherty, Molecular imaging in clinical trials, *Targ Oncol*, vol. 4, 2009, pp. 151–168.
19. A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, vol. 61(2), 2011, pp. 69-90.
20. I. Kostova, Ruthenium Complexes as Anticancer Agents, *Curr Med Chem*, vol. 13, 2006, pp. 1085-1107.
21. R. Hernandez, J. Mendez, J. Lamboy, M. Torres, F.R. Roman, and E. Melendez, Titanium(IV) complexes: cytotoxicity and cellular uptake of titanium(IV) complexes on caco-2 cell line, *Toxicol In Vitro*, 2010. 24(1): p. 178-183.
22. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001
23. Medici, M. Peana, V.M. Nurchi, J.I. Lachowicz, G. Crisponi, M.A. Zoroddu, Noble metals in medicine: Latest advances, *Coordination Chemistry Reviews*, 2014, pp. 1-5.
24. D.B. Werz, P.H. Seeberger, Carbohydrates as the Next Frontier in Pharmaceutical Research, *Chem. Eur. J.*, 11, 2005, pp. 3194-3206
25. P. Tomsik, T. Soukup, E. Cermakova, S. Micuda, M. Niang, L. Sucha, M. Rezacova, L-rhamnose and L-fucose suppress cancer growth in mice, *Cent. Eur. J. Biol.*, 6(1), 2011, pp. 1-9.
26. G. Cevc, and U. Vierl, Nanotechnology and the transdermal route A state of the art review and critical appraisal, *J Controlled Release*, vol. 41, 2010, pp. 277–299.
27. W. E. Bawarski, D. J. Bharali, S. A. Mousa, Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine*, vol. 4, 2008, pp. 273-282.
28. L.J. Shen and F.L. Wu, Nanomedicines in renal transplant rejection--focus on sirolimus, *Int J Nanomedicine*, vol. 2(1), 2007, pp. 25-32.

29. L. Messori, Cisplatin binding to proteins: A structural perspective, *Coord Chem Rev*, vol. 315, 2016, pp. 67–89.
30. F. A. Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillo, M. Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*. 1988, Wiley-Interscience, New York. p. 1001.
31. A.E. N.N. Greenwood, *Chemistry of the Elements*. 1998, Elsevier Ltd. p. 1144.
32. I. Solomon, Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.*, 1996. 96: p. 2563.
33. J.A. Smith, F.R. Keene, F. Li, J.G. Collins, Noncovalent DNA Binding of Metal Complexes, *Comprehensive Inorganic Chemistry II*, 3.24, 2013, pp. 709-720.
34. P. Reichard, From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases, *Science*, 260, 1993, pp. 1773.
35. R.R. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry, A New Introduction to Molecular Structure and Function*, Second Edition, 2012, Elsevier, Amsterdam
36. K.J. Davis, Binding interactions between nickel Schiff base complexes and quadruplex DNA, pp.1, 2015 University of Wollongong, Australia
37. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2001
38. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G.D. Strahan, *Drug-DNA Interactions*, Wiley Pub, pp.9-22.
39. A. Paul, S. Bhattacharya, *Chemistry and Biology of DNA-binding small molecule*. Vol.102, NO.2, 2012, pp.213-214
40. H. Baruah, C. G. Barry and U. Bierbach, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004, 4, pp. 1537–1549
41. M. V. Keck and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, pp. 3386–3390
42. W. J. Sundquist, D. P. Bancroft, L. Chassot and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, pp. 8559–8560
43. S. Komeda, T. Moulai, M. Chikuma, A. Odani, R. Kipping, N.P. Farrell, L.D. Williams, The Phosphate Clamp: a small and independent motif for nucleic acid backbone recognition, *Nucleic Acid Research*, 2011, Vol. 39, No.1, pp. 325-336,
44. A. Chouai, S.E. Wicke, C. Turro, J. Basca, K.R. Dunbar, D. Wang, R.P. Thummel, Ruthenium(II) Complexes of 1,12-Diazaperylene and their Interactions with DNA, *Inorg. Chem.*, 44, 2005, pp. 5996-6003.
45. L. Stryer, *Biochemistry*, 4th ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1995,

ch.4&31.

- 46.** P.A. Stuzhin, S.I. Vagin, M. Hanack, *Inorg. Chem.* 37, 1998, pp.2655
- 47.** A. Antipas, J.W. Buchler, M. Gouterman, P.D. Smith, Structures and spectroscopic properties of nonperipherally and peripherally substituted metal-free phthalocyanines: A substitution effect study based on density functional theory calculations. *J. Am. Chem. Soc.*
- 48.** N.R. Angel, R.M. Khatib, J. Jenkins, M. Smith, J.M. Rubalcava, B. Le, D. Lussier, Z. Chen, F.S. Thama, E.H. Wilson, J.F. Eichler, Copper (II) complexes possessing alkyl-substituted polypyridyl ligands: Structural characterization and in vitro antitumor activity, *J. of Inorg. Biochem.* 166, 12–25, 2017
- 49.** K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry Sixth Edition*, John Wiley & Sons, Inc, 2009
- 50.** Αναλυτική χημεία, διαφάνειες-παραδόσεις αναλυτικής χημείας UV-VIS, 2011
- 51.** Jonh McMurry, Οργανική, τόμος 1, κεφάλαιο 12, ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ
- 52.** Κ. Μεθενίτης, Σημειώσεις μαθήματος «Ειδικά Κεφάλαια Ανόργανης Χημείας», Μέταλλα στην Ιατρική, 2017
- 53.** PerkinElmer Ltd. *An Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. Printed in the United Kingdom, 2000
- 54.** Duskova, K., Sierra, S., Arias-Pérez, M-S., Gude, L., Human telomeric G-quadruplex dna interactions of n-phenanthroline glycosylamine copper(ii) complexes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2015)
- 55.** Editor Tim Storr. *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., 2014, 145-168.
- 56.** Raymond Thomas Gephart, III, The highly preorganized ligand 2,9-bis(hydroxymethyl)-1,10-phenanthroline, and its complexation properties with metal ions. PhD Thesis, Dep. of Chemistry Univ. of North Carolina Wilmington, 2006.
- 57.** Katerina Duskova, Sara Sierra, María-Selma Arias-Pérez, Lourdes Gude Human telomeric G-quadruplex DNA interactions of N-phenanthroline glycosylamine copper(II) complexes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24 (2016) 33–41.

58. S. Kashanian, M. Khodaei, F. Kheiridoosh, In vitro DNA binding studies of Aspartame, an artificial sweetener, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 120 (2013) 104–110.
59. S. Wanninger, V. Lorenz, A. Subhan, F. T. Edelmann, Metal complexes of curcumin – synthetic strategies, structures and medicinal applications, *Chem. Soc. Rev.*, 2015.
60. Samira Shabaan, Bahram Letafat, Nasim Esmati, Abbas Shafiee and Alireza Foroumadi, Synthesis and Characterization of 1,10-Phenanthroline-2,9-dicarbaldehyde-*bis*-(thiosemicarbazone), 2012.
61. B. Koning, J.W. de Boer, A. Meetsma, and R.M. Kellogg, Synthesis and complexation characteristics of phenanthroline and bipyridine diols, 2004, 189-205.
62. Pulimamidi Rabindra Reddy, Suryam Rajeshwar, Battu Satyanarayana, Synthesis, characterization of new copper (ii) Schiff base and 1,10 phenanthroline complexes and study of their bioproperties, 2016, 217–224.
63. Sona Niroomand, Mozghan Khorasani-Motlagh, Meissam Noroozifar, Asieh Moodi, Spectroscopic studies on the binding of holmium-1,10-phenanthroline complex with DNA, 2012, 132–139.
64. M.B. Lyles, I.L. Cameron, Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine and with double stranded DNA, *Biophys. Chem.*, 96, 2002, pp 53-76.
65. Z. Xi, F. Liu, Y. Zhou, W. Chen Cu(I)/L (L=pyridine-functionalized 1,3-diketones) catalyzed C-N coupling reactions of aryl halides with NH-containing heterocycles, *Tetrahedron*, 64, 2008, pp.4254-4259.
66. Vi. P. Boricha, S. Patra, S. Parihar, Y. S. Chouhan, P. Paul, Luminescent metalloreceptors with pendant macrocyclic ionophores with NS2O3 donor sites: Synthesis, characterization and ion-binding property, *Polyhedron*, 43, (2012), 104–113.
67. Raj Pal Sharma, Anju Saini, Paloth Venugopalan, Sadhika Khullar, Sanjay Mandal, Synthesis, characterization, crystal structure and BSA binding studies of two novel copper(II) complexes: [trans-Cu(en)₂(H₂O)₂](p-methoxycinnamate)₂ and [trans-Cu(en)₂(H₂O)₂](p-nitrocinnamate)₂·2H₂O, 2013, 34–43.
68. Romana Smolková, Vladimír Zelenák, Róbert Gyepes, Danica Sabolová, Natália Imrichová, Daniela Hudecová, Lukáš Smolko, Synthesis, characterization, DNA

binding, topoisomerase I inhibition and antimicrobial activity of four novel zinc(II) fenamates, 2018, 230–238.

69. M. Sunita, B. Anupama, B. Ushaiah, C. Gyana Kumari Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage studies of mixed-ligand copper (II) complexes 2017) 10, S3367–S3374.

70. P. Sathyadevi, P. Krishnamoorthy, M. Alagesan, K. Thanigaimani, P. Thomas Muthiah, N. Dharmaraj, Synthesis, crystal structure, electrochemistry and studies on protein binding, antioxidant and biocidal activities of Ni(II) and Co(II) hydrazone complexes, 2012, 294–306.

71. Masoumeh Ashrafi Khajeh, Gholamreza Dehghan, Siavoush Dastmalchi, Masoomeh Shaghghi, Mehrdad Iranshahi Spectroscopic profiling and computational study of the binding of tschimagine: A natural monoterpene derivative, with calf thymus DNA, 2018, 384–392.

72. N. Shahabadi, L. Nemati, DNA Interaction Studies of a Platinum(II) Complex Containing L-Histine and 1,10-Phenanthroline Ligands DNA and cells biology, 2012, pp. 589-596.

73. N. Shahabadi, S. Kashanian, F. Darabi, In vitro study of DNA interaction with a water-soluble dinitrogen Schiffbase, DNA Cell Biol, 2009, pp 1-8.

74. T. Ghosh, S. Das, S. Pal, Bis(2-(1H-imidazol-2-yl)-pyridine)copper(II): Effects of counteranions on the molecular and supramolecular structures, Polyhedron, 29, 2010, pp.3074–3080.

75. Z. Xi, F. Liu, Y. Zhou, W. Chen CuI/L (L=pyridine-functionalized 1,3-diketones) catalyzed C-N coupling reactions of aryl halides with NH-containing heterocycles, Tetrahedron, 64, 2008, pp.4254-4259.

76. A. Kufelnicki, M. Woźniczka, L. Chęcińska, M. Miernicka, E. Budzisz, Synthesis and structure of novel copper (II) complexes with pyrazole derived ligands and metal–ligand interaction in solution, Polyhedron, 26, 2007, pp.2589–2596.

77. E. Budzisz, M. Miernicka, I.-P. Lorenz, P. Mayer, U. Krajewska, M. Rozalski, Synthesis and X-ray structure of platinum (II), palladium (II) and copper (II) complexes with pyridine–pyrazole ligands: Influence of ligands’ structure on cytotoxic activity, Polyhedron, 28, 2009, pp.637–645.

78. D. Forcha, K. J. Brown, Z. Assefa, Luminescence, absorption, and Stern–Volmer studies of cerium chloride and nitrate compounds in acidic and neutral aqueous, and

non-aqueous solutions, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 103, 2013, pp. 90-95.

79. J.S. Kadadevarmath, G.H. Malimath, R.M. Melavanki, N.R. Patil, Static and dynamic model fluorescence quenching of laser dye by carbon tetrachloride in binary mixtures, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 117, 2014, pp. 630–634.

80. B. Naik, L.R. Naik, J.S. Kadadevarmath, H. Pal, V. Jayathirtha Rao, Fluorescence quenching of anthrylvinyl acetate by carbon tetrachloride, *J. of Photochem. and Photobiol. A: Chem.*, 214, 2010, pp. 145–151

81. Douglas X. West Yonghong Yang, Tracey L. Klein and Karen I. Goldberg. Binuclear Copper(ii) Complexes of 2-hydroxyacetophenone 4n-substituted Thiosemicarbazones, Instituto de Quimica, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, 1994, pp 1681, 1693, 1995.

82. Subrata Lahiry and Paramjit Singh Jaiswal, Covalence Reduction Factors of Four-Coordinated Pseudo-Tetrahedral Paramagnetic Compounds in D_{2d} Symmetry, Department of Chemistry, University of Delhi, 1981, pp. 585-593.

83. Fang Liu, Kelley A. Meadows, and David R. McMillin, DNA-Binding Studies of Cu(bcp)²⁺ and Cu(dmp)²⁺: DNA Elongation without Intercalation of Cu(bcp)²⁺ , *J. Am. Chem. SOC.* 1993,115, 6699-6704.

84. Isabel Correia, Sladjana Borovica, Isabel Cavacoa , Cristina P. Matosa, Somnath Roy , Hugo M. Santose,f, Luz Fernandese,f, José L. Capeloe,f, Lena Ruiz-Azuarag, João Costa Pessoa, Evaluation of the binding of four anti-tumor Casiopeínas to human serum albumin, *Journal of Inorganic Biochemistry* 175 (2017) 284–297.

85. Gabriel S. Vignoli Muniz, Jimmy Lloncop Incio, Odivaldo C. Alves, Klaus Krambrock, Letícia R. Teixeira, Sonia R.W. Louro Fluorescence and electron paramagnetic resonance studies of norfloxacin and N-donor mixed-ligand ternary copper(II) complexes: Stability and interaction with SDS micelles *Spectrochimica, Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 189 (2018) 133–138.

86. Andrea Erxleben Interactions of copper complexes with nucleic acids, *Coordination Chemistry Reviews* 360 (2018) 92–121.

87. O. Cozar, I. Bratu, L. Szabo, I.B. Cozar, V. Chis, L. David, IR and ESR study of copper(II) complexes with ¹⁵N-labelled lysine and ornithine, *Journal of Molecular Structure* 993 (2011) 397–403.

- 88.** American Chemical Society, Luminescence Studies of Copper Phenanthrolines in Aqueous Media: Colloids and DNA Complexes, *Inorg. Chem.* 1988, 27, 4082-4084.
- 89.** Yuanxing Fang, Yiwen Ma, Meifang Zheng, Pengju Yang, Abdullah M. Asiri, Xinchun Wang Metal–organic frameworks for solar energy conversion by photoredox catalysis, *Coordination Chemistry Reviews* (2017).
- 90.** Rohith P. John, A. Sreekanth, V. Rajakannan, T.A. Ajith, M.R. Prathapachandra Kurup New copper(II) complexes of 2-hydroxyacetophenone N(4)-substituted thiosemicarbazones and polypyridyl co-ligands: structural, electrochemical and antimicrobial studies, *Polyhedron* 23 (2004) 2549–2559.
- 91.** Ramasamy Tamilarasan and David R. McMillin, Photophysical Studies of Copper Phenanthrolines Bound to DNA, *Inorg. Chem.* 1990, 29, 2798-2802.
- 92.** Sethuraman Mahadevan and Mallayan Palaniandavar, Spectral and Electrochemical Behavior of Copper(II)-Phenanthrolines Bound to Calf Thymus DNA. [(5,6-dimethyl-OP)₂Cu]²⁺ (5,6-dimethyl-OP = 5,6 Dimethyl-1,10-phenanthroline) Induces a Conformational Transition from B to Z DNA, *Inorg. Chem.* 1998, 37, 3927-3934.
- 93.** Leji Latheef, Maliyeckal R. Prathapachandra Kurup, Spectral and structural studies of copper(II) complexes of thiosemicarbazones derived from salicylaldehyde and containing ring incorporated at N(4)-position, *Spectrochimica Acta Part A*, 70, (2008) 86–93.
- 94.** Sethuraman Mahadevan and Mallayan Palaniandavar, Spectroscopic and Voltammetric Studies on Copper Complexes of 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolines Bound to Calf Thymus DNA, *Inorg. Chem.* 1998, 37, 693-700.
- 95.** Ch. Rama Krishna, Ch. Venkata Reddy, U.S. Udayachandran Thampy, A.V. Chandrasekha, Y.P. Reddy, P. Sambasiva Rao, R.V.S.S.N. Ravikumar Synthesis and spectroscopic characterization of Cu(II) containing chlorocadmiumphosphate Cd(HPO₄)Cl·[H₃N(CH₂)₆NH₃]_{0.5} crystals, *Spectrochimica Acta Part A* 85 (2012) 160–164.
- 96.** J. J. Salxmann and H. H. Schmltdtke, The Magnetic Properties of Transition Metal Pseudohalide Complexes, The Significance of the Orbital Reduction Factor k, 1968.
- 97.** Rajeev C. Chikate, Avadhoot R. Belapure, Subhash B. Padhye, Douglas X. West, Transition metal quinone–thiosemicarbazone complexes 1: Evaluation of EPR

covalency parameters and redox properties of pseudo-square-planar copper(II)-naphthoquinone thiosemicarbazones, *Polyhedron* 24 (2005) 889–899.

98. B. Lyles, I.L. Cameron, Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA, *Biophys. Chem.*, 96, 2002, pp. 53–76.

99. J. Zhu, L. Chen, Y. Dong, J. Li, X. Liu, Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-Hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe, *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 124, 2014, pp. 78–83.

100. G. Zhang, X. Hu, P. Fu, Spectroscopic studies on the interaction between carbaryl and calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a fluorescence probe, *J. of Photochem. and Photobiol. B: Biology*, 108, 2012, pp. 53–61.

101. Hong Chen¹, Feihong Chen¹, Weiwei Hu, Shaohua Gou. Effective platinum(IV) prodrugs conjugated with lonidamine as a functional group working on the mitochondria, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 180 (2018) 119–128.

102. Yong-Bao Wei, Qiong Guo, Yun-Liang Gao, Bin Yan, Zhao Wang, Jin-Rui Yang and Wei Liu. Repression of metadherin inhibits biological behavior of prostate cancer cells and enhances their sensitivity to cisplatin, *Molecular Medicine Reports* 12: 226-232, 2015