



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων
[Re(CO)₃Cl(dppz-3,6-COOH)] και [Re(CO)₃Cl(dppz-3,6-COONa)].
Μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με το DNA.**

**ΚΟΝΙΣΤΗ ΓΕΩΡΓΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων
[Re(CO)₃Cl(dppz-3,6-COOH)] και [Re(CO)₃Cl(dppz-3,6-COONa)].
Μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με το DNA.

ΚΟΝΙΣΤΗ ΓΕΩΡΓΙΑ

A.M.: 81506

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Χ.Α. Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χ.Α. Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Κ. Μεθενίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ε. Ευθυμιάδου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

25/06/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία, παρουσιάζεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός δύο νέων συμπλόκων του Re(I) των $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COOH})]$ και $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COONa})]$, όπου το dpprz είναι η διπύριδο[3,2-a:2'3'-c]φαιναζίνη. Τα σύμπλοκα αυτά συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές όπως UV-vis φασματοσκοπία απορρόφησης, FT-IR, φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού, φθορισμομετρία και κυκλική βολταμμετρία.

Επιπλέον μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή τους με φυσικό DNA από θύμο αδένα βοοειδούς (C.T.-DNA). Προκειμένου να διαπιστωθεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης των ανωτέρω συμπλόκων με το DNA πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοδότησης με φασματοσκοπία UV-vis και φθορισμού, ιξωδομετρίας, κυκλικού διχρωϊσμού και κυκλικής βολταμμετρίας ενώ υπολογίστηκε η σταθερά σύνδεσής τους με το DNA. Όλα τα πειράματα αλληλεπίδρασης με C.T.-DNA πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl σε pH=7. Τέλος, χρησιμοποιώντας την MTT μέθοδο, μελετήθηκε η φωτο-διασπαστική τους ικανότητα και η αντικαρκινική τους δράση έναντι δυο καρκινικών σειρών ανθρώπινης προέλευσης, μαστού (MCF-7) και γλοιοβλαστώματος (U87MG).

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανόργανη Χημεία, Ανόργανη Βιοχημεία.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Διιμινικά σύμπλοκα του Re(I), σύνδεση με το DNA, Παρεμβολή, κυτταροτοξική δράση.

ABSTRACT

In this thesis, is presented the synthesis of two novel Re(I) complexes, namely, $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$ and $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$, where dppz is bipyrido [3,2-a: 2', 3'-c] phenazine. These complexes have been synthesized and characterized by spectroscopic methods such as UV-visible absorption spectra, FT-IR, Electron Paramagnetic Resonance, Fluorescence and Cyclic Voltammetry.

Furthermore, it was studied their DNA binding (with Calf thymus DNA-C.T.-DNA) properties with a range of techniques such as UV-visible absorption spectra, Viscosity, Fluorescence, Cyclic Dichroism and Cyclic Voltammetry, while was calculated their K_b with DNA. All C.T.-DNA binding experiments were performed in Tris-HCl buffer at pH = 7. Finally, in vitro cytotoxicity studies of the complexes against MCF-7 and U87MG were determined using MTT assay.

SUBJECT AREA: Inorganic Chemistry, Inorganic Biochemistry.

KEYWORDS: Diimine complexes of Re (I), DNA binding, intercalation, cytotoxicity studies.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης διενεργήθηκε στο εργαστήριο της Ανόργανης Χημείας και Τεχνολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη χρονική περίοδο 2015-2018.

Θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Χ.Α. Μητσοπούλου για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου, για την συνεχή υποστήριξή της από την πτυχιακή μου εργασία έως και τώρα. Με βοήθησε σημαντικά στην πορεία όλων αυτών των χρόνων και να μάθω πολλά καινούρια πράγματα.

Ευχαριστώ επίσης, την επίκουρη καθηγήτρια Ελένη Ευθυμιάδου για τα κυτταροτοξικά πειράματα και την βοήθειά της στην κατανόηση του αντικειμένου αυτού, καθώς και την ερευνήτρια Βαρβάρα Μαυροειδή για τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού και την φιλοξενία τους αμφοτέρων στο ίδρυμα Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συναδέλφους μου στην επιστημονική ομάδα της κα Χ.Α. Μητσοπούλου για τη βοήθειά τους και την όμορφη παρέα όλα αυτά τα χρόνια, τους διδάκτορες Αθανάσιο Ζαρκαδούλα και Ευγενία Κουτσούρη, τους υποψηφίους διδάκτορες Ευτυχία Λιώλη, Γιώργο Ιωαννίδη, Μαρία Δρόσου και Φώτη Καμάτσο, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Σοφία Μπαλού και Ειρήνη Δανοπούλου, καθώς και την Μαρία Κουκουβιτάκη.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου για την ηθική και όχι μόνο συμπαράστασή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	17
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA.....	19
1.1 Δομή νουκλεϊκών οξέων	19
1.2 Μοντέλο Watson-Crick.....	22
1.3 Μορφές DNA	24
1.4 Τρόποι σύνδεσης στο DNA.....	25
1.4.1 Ομοιοπολικός δεσμός.....	26
1.4.2 Μη ομοιοπολικός δεσμός.....	27
1.4.2.1 Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.....	28
1.4.2.2 Δεύσμεση στις αύλακες.....	29
1.4.2.3 Αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής (intercalation).....	31
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ ΤΟ DNA.....	33
2.1 Εισαγωγικά	33
2.2 Γενικά στοιχεία για το Ρήνιο.....	35
2.3 Σύμπλοκα του Ρηγίου	37
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ ΡΗΝΙΟΥ (I) ΜΕ α-ΔΙΙΜΙΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ	41
3.1 Εισαγωγή.....	41
3.2 Ενδομοριακή μεταφορά ενέργειας : ισομερείωση του αξονικού υποκαταστάτη	43
3.3 Φωτοφυσικές ιδιότητες συμπλόκων του τύπου <i>fac</i> -Re(CO) ₃ (α-διιμίνη)L ^{0/+}	44
3.4 Υποκαταστάτης <i>dipyrido</i> [3,2- <i>a</i> :2',3'- <i>c</i>]phenazine (<i>dppz</i>).....	48

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ (PDT) .	52
.....	
4.1 Τι είναι η φωτοδυναμική θεραπεία	52
4.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PDT	52
4.3 Μηχανισμός της PDT	53
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	58
5.1 Υλικά.....	58
5.2 Μέθοδοι χαρακτηρισμού συμπλόκων	58
5.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης συμπλόκων με DNA	60
5.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων.....	60
5.3.2 Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν.....	61
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	65
6.1 Σύνθεση του υποκαταστάτη.....	65
6.2 Σύνθεση του συμπλόκου	66
6.3 Μέθοδοι χαρακτηρισμού του συμπλόκου	68
6.3.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) ...	68
6.3.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR).....	70
6.3.3 Φασματοσκοπία UV-Vis	72
6.3.4 Φασματοσκοπία Εκπομπής	75
6.3.5 Κυκλική Βολταμμετρία	76
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 DNA ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	78
7.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου [Re(di-COOH-dppz)(CO ₃)]Cl με το DNA.....	78
7.1.1 Κινητική μελέτη	78
7.1.2 Τιτλοδότηση Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)	79
7.1.3 Κυκλικός Διχρωσμός.....	81

7.1.4	Φθορισμομετρία με EB	82
7.1.5	Ιξωδομετρία	84
7.1.6	Κυκλική Βολταμμετρία.....	86
7.2	Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου [Re(CO) ₃ Cl(dppz-3,6-COONa)] με το DNA.....	87
7.2.1	Κινητική μελέτη	87
7.2.2	Τιτλοδότηση Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)	87
7.2.3	Κυκλικός Διχρωισμός.....	90
7.2.4	Φθορισμομετρία με EB	91
7.2.5	Ιξωδομετρία	93
7.2.6	Κυκλική Βολταμμετρία.....	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ.....		95
8.1	Δοκιμασία ΜΤΤ.....	95
9.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	99
10	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑ.....	101
11.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ– ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	103
12.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	107

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Τα σάκχαρα των νουκλεϊκών οξέων.....	19
Σχήμα 1.2: Κύριες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων.....	20
Σχήμα 1.3: Ο γλυκοζιτικός δεσμός β σε έναν νουκλεοζίτη.....	21
Σχήμα 1.4: Σύνδεση νουκλεοτιδίων μεταξύ τους και με βάσεις.....	21
Σχήμα 1.5: DNA σύμφωνα με το μοντέλο των WATSON-CRICK.....	24
Σχήμα 1.6: Μορφές DNA.....	25
Σχήμα 1.7: Σχηματική απεικόνιση για την πρόκληση απόπτωσης.....	27
Σχήμα 1.8: Απεικόνιση της μικρής και μεγάλης αύλακας του DNA.....	29
Σχήμα 1.9: Δομή Distamycin.	29
Σχήμα 1.10: Δομή Netropsin.....	30
Σχήμα 1.11: Η σύνδεση του Netropsin (ροζ χρώμα) στην μικρή αύλακα του DNA.....	30
Σχήμα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση ενός μορίου DNA με το μόριο-παρεμβολέα το οποίο φαίνεται με μαύρο χρώμα.....	32
Σχήμα 2.1: Δομές μερικών επίπεδων αρωματικών υποκαταστατών συμπλόκων στοιχείων μετάπτωσης που έχουν χρησιμοποιηθεί ως παρεμβολείς στο DNA ³⁴	
Σχήμα 2.2: Δομή του συμπλόκου [Re(bpy)(CO) ₃ (py-spacer-anthracene)] ⁺ .	38
Σχήμα 2.3: Φθορισμός του [Re(bpy)(CO) ₃ (py-spaceranthracene)] ⁺ αυξανόμενου του λόγου [DNA]/[Re].....	38
Σχήμα 2.4: Δομή των συμπλόκων του τύπου [Re(N [^] N)(CO) ₃ (py-R)] ⁺	39
Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων του τύπου fac-Re(CO) ₃ (α-διιμίνη)L ₀ /+. Αυτές οι δομικές μονάδες μπορούν να συνδεθούν με βιομόρια ή να ενσωματωθούν σε μοριακές διατάξεις μέσω του αξονικού υποκαταστάτη L, ή της N [^] N διιμίνης.....	42
Σχήμα 3.2: Ισομερείωση του [Re(t-styrylpyridine)(CO) ₃ (bpy)] ⁺	43

Σχήμα 3.3: Ο χαρακτήρας των διεγερμένων καταστάσεων που συναντώνται στα σύμπλοκα αυτά.....	45
Σχήμα 3.4: Δομή dppz.....	48
Σχήμα 4.1: : Αναπαράσταση των σταδίων της θεραπείας.....	54
Σχήμα 4.2: Αναπαράσταση του μηχανισμού της PDT.....	55
Σχήμα 5.1: Διάγραμμα απορρόφησης διαλύματος DNA	60
Σχήμα 6.1: Αντίδραση παρασκευής του υποκαταστάτη (1ο στάδιο).....	65
Σχήμα 6.2: Αντίδραση παρασκευής του υποκαταστάτη (2ο στάδιο).....	66
Σχήμα 6.3: Αντίδραση παρασκευής του συμπλόκου(1).....	67
Σχήμα 6.4: Αντίδραση παρασκευής του συμπλόκου(2).....	67
Σχήμα 6.5: Φάσμα ελεύθερου di-COOH-dppz.....	68
Σχήμα 6.6: Φάσμα συμπλόκου $[\text{Re}(\text{di-COOH-dppz})(\text{CO})_3]\text{Cl}$	69
Σχήμα 6.7: IR Φάσμα του υποκαταστάτη di-COOH-dppz σε KBr.....	71
Σχήμα 6.8: IR Φάσμα του συμπλόκου σε KBr.....	72
Σχήμα 6.9: Φάσματα UV-Vis του συμπλόκου σε διαλύτες DMSO, MeOH και H_2O σε $t=0$	73
Σχήμα 6.10 : Μελέτη σταθερότητας του συμπλόκου σε DMSO, $C=10^{-4}\text{M}$	74
Σχήμα 6.11: Φάσμα φθορισμού του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$ στα 315 nm.....	75
Σχήμα 6.12: Φάσμα φθορισμού του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$ στα 318 nm.....	75
Σχήμα 6.13: Κυκλικό βολταμμογράφημα του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$ σε DMSO.....	76
Σχήμα 6.14: Κυκλικό βολταμμογράφημα του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$ σε H_2O	77
Σχήμα 7.1: Κινητική μελέτη του συμπλόκου σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.....	78

Σχήμα 7.2: Φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου με αυξανόμενη συγκέντρωση C.T. DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl.	80
Σχήμα 7.3: Καμπύλη μεταβολής του λόγου [DNA]/(εα-εφ) συναρτήση της συγκέντρωσης του DNA.....	80
Σχήμα 7.4: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T. DNA με το $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$	82
Σχήμα 7.5: Απόσβεση του φθορισμού του EB αυξανόμενης της συγκέντρωσης του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$	83
Σχήμα 7.6: Γραφική παράσταση του λόγου I0/I συναρτήση της συγκέντρωσης του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$	84
Σχήμα 7.7: Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$ στο σχετικό ιξώδες του C.T.-DNA.....	85
Σχήμα 7.8: Κυκλικό βολταμμογράφημα του $\text{Re}[(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$ απουσία και παρουσία DNA.....	86
Σχήμα 7.9: Κινητική μελέτη του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$ σε milliQ.....	87
Σχήμα 7.10: Φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$ με αυξανόμενη συγκέντρωση C.T. DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl.....	88
Σχήμα 7.11: Καμπύλη μεταβολής του λόγου [DNA]/(εα-εφ) συναρτήση της συγκέντρωσης του DNA.....	89
Σχήμα 7.12: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού όμως αλληλεπίδρασης C.T.-DNA με του σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$	90
Σχήμα 7.13: Απόσβεση του φθορισμού του EB αυξανόμενης της συγκέντρωσης του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$	91
Σχήμα 7.14: Γραφική παράσταση του λόγου I0/I συναρτήση της συγκέντρωσης του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$	92
Σχήμα 7.15: Μεταβολή του ιξώδους του C.T.DNA αυξανόμενων συγκεντρώσεων του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$	93

Σχήμα 7.16: Κυκλικό βολταμμογράφημα του $\text{Re}[(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$ απουσία και παρουσία DNA.....	94
Σχήμα 8.1: Επίδραση της συγκέντρωσης του υποκαταστάτη και των συμπλόκων στην % βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7. Ο αριθμός μέσα στις μπάρες δείχνει το % ποσοστό των ζωντανών κυττάρων παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων.....	96
Σχήμα 8.2: Επίδραση της συγκέντρωσης του υποκαταστάτη και των συμπλόκων στην % βιωσιμότητα των κυττάρων U87MG. Ο αριθμός μέσα στις μπάρες δείχνει το % ποσοστό των ζωντανών κυττάρων παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων.....	96
Σχήμα 8.3: Κυτταρική ζωτικότητα cis-platin σε κύτταρα MCF-7.....	97
Σχήμα 8.4: Κυτταρική ζωτικότητα cis-platin σε κύτταρα U87-MG.....	98

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1: Σύμπλοκα Μετάλλων με υποκαταστάτες dppz και τρόπος αλληλεπίδρασης τους με το DNA.....	49
Πίνακας 6.1: Συγκριτικός πίνακας χημικών μετατοπίσεων.....	70
Πίνακας 6.2: Δεδομένα φασμάτων απορρόφησης.....	73

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα τελευταία χρόνια έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης που προσδένονται στο DNA και μπορούν να δράσουν ως ανιχνευτές DNA, χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, ακόμα και ως πιθανά αντικαρκινικά φάρμακα. Τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να συνδεθούν τόσο με ομοιοπολική όσο και με μη ομοιοπολική σύνδεση.

Σύμπλοκα με μεταλλικό κέντρο το Ρήνιο και υποκαταστάτη το dppz και παράγωγά του, είναι πολλά υποσχόμενα ως μοριακοί ανιχνευτές DNA λόγω της ισχυρής σύνδεσής τους με αυτό. Οι φωτοφυσικές ιδιότητες που παρουσιάζουν ενισχύουν αυτήν την μελέτη. Επιπλέον, μερικά από αυτά τα σύμπλοκα προκαλούν οξειδωτική διάσπαση του DNA με ακτινοβόληση ορατού φωτός, γεγονός που μας οδηγεί στην πιθανή χρήση τους στην φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου (PDT).

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

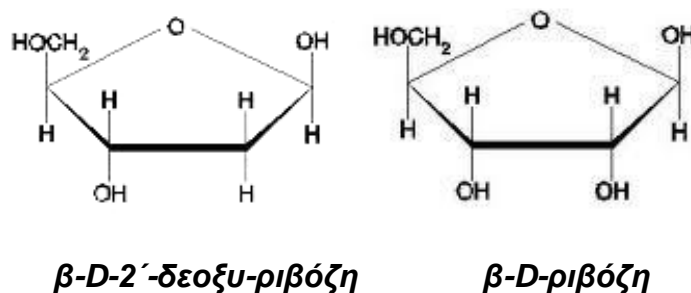
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA

1.1 Δομή νουκλεϊκών οξέων

Τα νουκλεϊκά οξέα, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) είναι τα μόρια φορείς της γενετικής πληροφορίας ενός κυττάρου. Στα μόρια των DNA βρίσκονται κωδικοποιημένες όλες οι πληροφορίες που προσδιορίζουν τη φύση του κυττάρου, ελέγχουν την ανάπτυξη και διαίρεσή του και κατευθύνουν τη βιοσύνθεση των ενζύμων και των άλλων πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του.

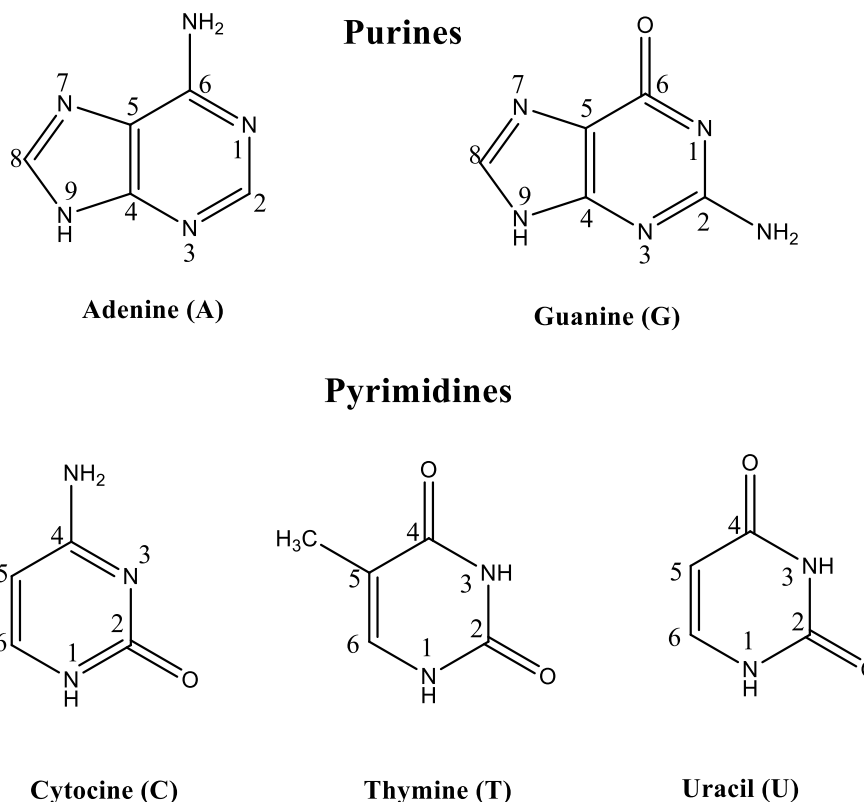
Τα νουκλεϊκά οξέα είναι βιοπολυμερή που απαρτίζονται από νουκλεοτίδια τα οποία ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν μακριές αλυσίδες. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από έναν νουκλεοζίτη συνδεδεμένο με μία φωσφορική ομάδα, ενώ κάθε νουκλεοζίτης αποτελείται από ένα σάκχαρο συνδεδεμένο με μία ετεροκυκλική βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης. Το RNA και το DNA διαφέρουν ως προς το σάκχαρο και μια βάση. Το σάκχαρο στο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ είναι β-D-2'-δεοξυριβόζη ενώ στο ριβονουκλεϊκό οξύ είναι η β-D-ριβόζη.



Σχήμα 1.1: Τα σάκχαρα των νουκλεϊκών οξέων [1].

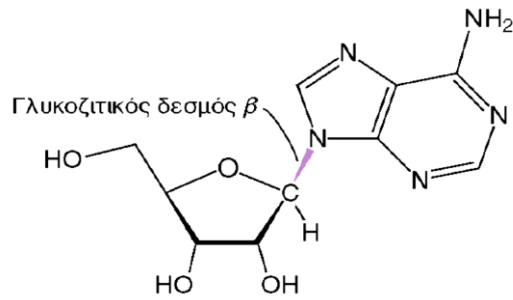
Στα νουκλεοτίδια συμμετέχουν τέσσερις διαφορετικές ετεροκυκλικές βάσεις. Οι δύο βάσεις αδενίνη και γουανίνη είναι υποκατεστημένες πουρίνες, ενώ οι άλλες δύο, η κυτοσίνη και η θυμίνη για το DNA και η κυτοσίνη και ουρακίλη για

το RNA είναι υποκατεστημένες πυριμιδίνες. Οι βάσεις είναι όλες επίπεδες, διαφέρουν όμως μεταξύ τους σε άλλα χαρακτηριστικά.



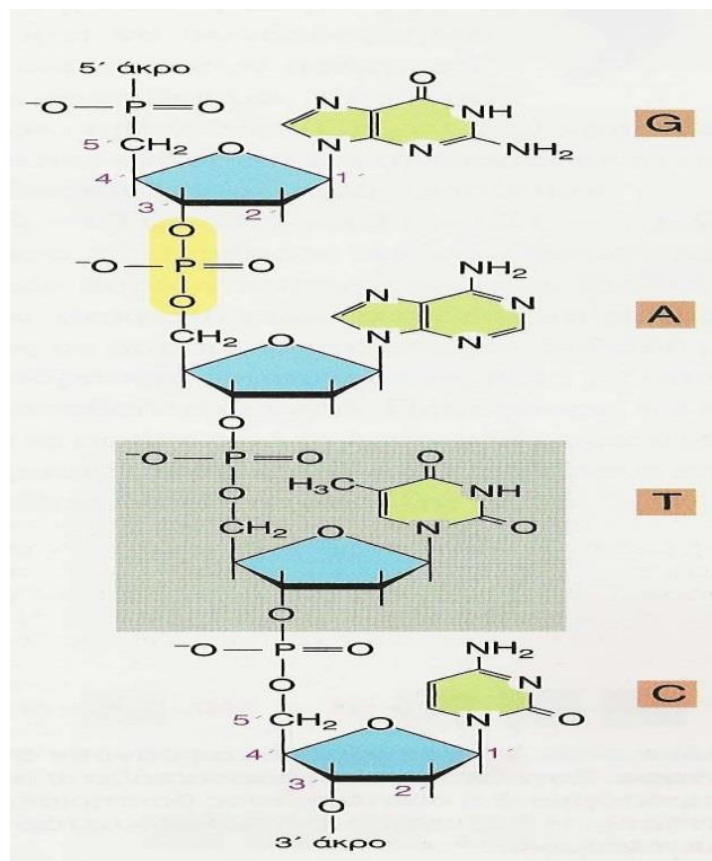
Σχήμα 1.2: Κύριες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων.

Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μία βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο. Οι τέσσερις μονάδες νουκλεοζιτών στο DNA ονομάζονται δεοξαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυκυτιδίνη και θυμιδίνη ενώ στο RNA ονομάζονται αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη. Σε κάθε περίπτωση, το N-9 μιας πουρίνης ή το N-1 μιας πυριμιδίνης συνδέεται στο C-1' του σακχάρου. Όταν η διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού N είναι β, η βάση βρίσκεται επάνω από το επίπεδο του σακχάρου (Σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3: Ο γλυκοζιτικός δεσμός β σε έναν νουκλεοζίτη [1].

Τα νουκλεοτίδια συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός εστερικού φωσφορικού δεσμού ανάμεσα στην 5'-φωσφορική ομάδα του ενός νουκλεοτιδίου και την 3'-υδροξυλική ομάδα του σακχάρου ενός άλλου νουκλεοτιδίου [1-4].



Σχήμα 1.4: Σύνδεση νουκλεοτιδίων μεταξύ τους και με βάσεις [1].

Κάθε φωσφοδιεστερικός δεσμός έχει αρνητικό φορτίο το οποίο απωθεί πυρηνόφιλες ομάδες, όπως το OH^- . Συνεπώς οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί είναι

πολύ λιγότερο ευάλωτοι στην υδρόλυση απ' ό τι άλλοι εστέρες, όπως οι εστέρες του καρβοξυλικού οξέος. Η αντίσταση αυτή είναι κρίσιμη για την διατήρηση της ακεραιότητας των πληροφοριών που αποθηκεύονται στα νουκλεϊκά οξέα. Η απουσία της 2'-υδροξυλικής ομάδας από το DNA ενισχύει ακόμη περισσότερο την αντίσταση του μορίου στην υδρόλυση. Αυτή η μεγαλύτερη σταθερότητα του DNA πιθανώς είναι κι ο λόγος της χρήσης αυτού του συγκεκριμένου νουκλεϊκού οξέος κι όχι του RNA στον ρόλο του κύριου μορίου αποθήκευσης του υλικού της κληρονομικότητας σε όλα τα σημερινά κύτταρα και σε πολλούς ιούς.

Το ένα άκρο του πολυμερούς νουκλεϊκού οξέος έχει μία ελεύθερη υδροξυλομάδα στον C3' (το άκρο 3') ενώ το άλλο άκρο έχει μία ελεύθερη φωσφορική ομάδα στον C5' (το άκρο 5'). Η ακολουθία των νουκλεοτιδίων σε μία αλυσίδα DNA περιγράφεται ξεκινώντας από το άκρο 5' και προσδιορίζοντας τις βάσεις με τη σειρά που απαντούν.

Ένα εντυπωσιακό χαρακτηριστικό των φυσικών μορίων DNA είναι το μήκος τους. Ακόμη και για τον απλούστερο οργανισμό, το μόριο του DNA χρειάζεται πολλά νουκλεοτίδια ώστε να κωδικοποιηθούν οι γενετικές πληροφορίες. Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από 3 δισεκατομμύρια νουκλεοτίδια, χωρισμένα σε 46 μόρια DNA (22 ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων και τα φυλετικά χρωμοσώματα X και Y) διαφορετικών μεγεθών [5].

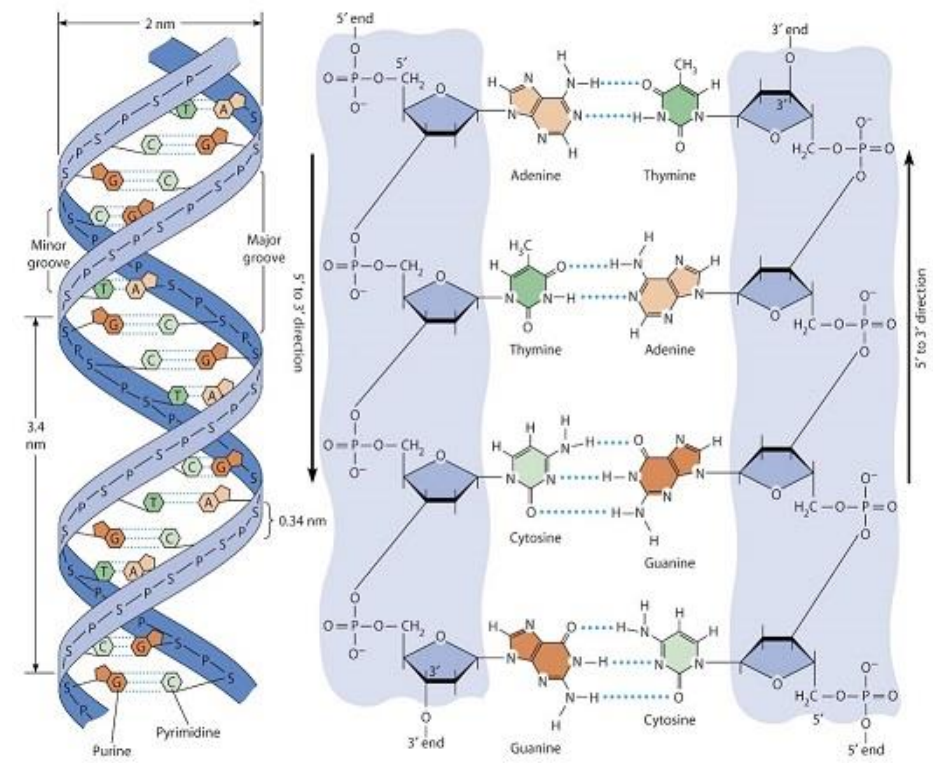
1.2 Μοντέλο Watson-Crick

Ο Wilkins και η Franklin φωτογράφησαν ίνες DNA με την μέθοδο της περίθλασης των ακτίνων X. Τα χαρακτηριστικά των σχημάτων περίθλασης υποδηλώνουν ότι το DNA αποτελείται από δύο αλυσίδες που στρέφονται σε μία κανονική δομή έλικας. Οι Watson και Crick βασιζόμενοι σε αυτά και σε άλλα αποτελέσματα κατέληξαν το 1953 σε ένα δομικό μοντέλο για το DNA, τα κύρια χαρακτηριστικά του οποίου είναι τα εξής:

- Δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες που εκτείνονται προς αντίθετες κατευθύνσεις στρέφονται γύρω από έναν κοινό άξονα, σχηματίζοντας μια δεξιόστροφη διπλή έλικα.

- Τα φωσφορικά και οι δεοξυριβόζες που διαμορφώνουν τον κορμό βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος κι επομένως οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης τοποθετούνται στο εσωτερικό της έλικας.
- Οι βάσεις σχηματίζουν συγκεκριμένα ζεύγη μέσω δεσμών υδρογόνου. Η αδενίνη (A) ζευγαρώνει με την θυμίνη (T) με δύο δεσμούς υδρογόνου, ενώ η γουανίνη (G) ζευγαρώνει με την κυτοσίνη (C) με τρεις δεσμούς υδρογόνου.
- Οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας του DNA δεν είναι ταυτόσημοι αλλά συμπληρωματικοί. Όταν δηλαδή στον έναν κλώνο υπάρχει μία βάση κυτοσίνης στον άλλον κλώνο θα υπάρχει μία βάση γουανίνης και όταν στον έναν κλώνο υπάρχει μία βάση αδενίνης στον άλλον υπάρχει μία βάση θυμίνης.
- Οι βάσεις είναι σχεδόν κάθετες στον άξονα της έλικας και οι γειτονικές βάσεις απέχουν 3,4 Å. Η ελικοειδής δομή επαναλαμβάνεται κάθε 34 Å, άρα υπάρχουν περίπου 10 βάσεις (για την ακρίβεια 10,4 βάσεις) για κάθε στροφή της έλικας.
- Η διάμετρος της έλικας είναι 20 Å περίπου.
- Οι δύο κλώνοι της διπλής έλικας περιελίσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζονται δύο «αύλακες». Η κύρια ή μεγάλη αύλακα έχει πλάτος 12 Å και η δευτερεύουσα ή μικρή αύλακα έχει πλάτος 6 Å.

Να σημειωθεί ότι η τοποθέτηση των βάσεων της μίας πάνω στην άλλη, συμβάλλει στην σταθεροποίηση της διπλής έλικας κατά δύο τρόπους. Πρώτον, τα γειτονικά ζεύγη βάσεων έλκονται μεταξύ τους λόγω δυνάμεων Van der Waals, και δεύτερον, η δομή της διπλής έλικας σταθεροποιείται από φαινόμενα υδροφοβικότητας [3].



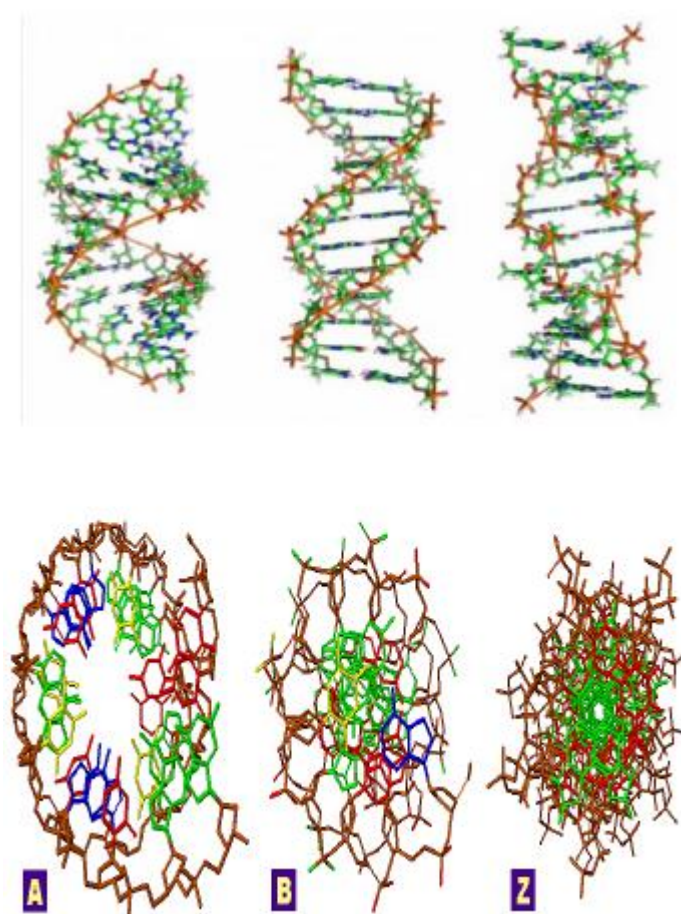
Σχήμα 1.5: DNA σύμφωνα με το μοντέλο των WATSON-CRICK [6].

1.3 Μορφές DNA

Το DNA γνωρίζουμε ότι μπορεί να υπάρχει σε ποικίλες ελικοειδείς μορφές, ως A-DNA, B-DNA (κλασική έλικα Watson-Crick) και ως z-DNA. Το DNA μπορεί να κάμπτεται, να στρέφεται και να ξετυλίγεται. Στα A-DNA, B-DNA και z-DNA, δύο αντιπαράλληλες αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Το z-DNA είναι μία αριστερόστροφη έλικα και μπορεί να σχηματιστεί σε περιοχές DNA στις οποίες πουρίνες εναλλάσσονται με πυριμιδίνες.

Τα A-DNA και B-DNA είναι δεξιόστροφες διπλές έλικες αποτελούμενες από αντιπαράλληλους κλώνους που συγκρατούνται μεταξύ τους με ζεύγη βάσεων Watson-Crick. Στο B-DNA, τα ζεύγη βάσεων είναι σχεδόν κάθετα στον άξονα της έλικας. Αντίθετα, η έλικα του A-DNA είναι ευρύτερη και κοντύτερη από την έλικα του B-DNA, και τα ζεύγη βάσεων της είναι κεκλιμένα κι όχι κάθετα στον άξονα της έλικας. Επίσης, τα φωσφορικά και οι άλλες ομάδες στην έλικα του A-DNA δεσμεύουν λιγότερα μόρια H₂O απ' ό τι στο B-DNA. Επομένως, η

αφυδάτωση ευνοεί τη μορφή A κι άρα η αφυδάτωση επάγει την μετάπτωση από την μορφή B του DNA στην μορφή A. Όσον αφορά στο B-DNA, ένα σημαντικό δομικό χαρακτηριστικό της έλικάς του όπως προαναφέρθηκε είναι η παρουσία της μεγάλης και της μικρής αύλακας, που παρουσιάζουν δυνητικούς δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου, σύμφωνα με την αλληλουχία των βάσεων [7-9].



Σχήμα 1.6: Μορφές DNA [10].

1.4 Τρόποι σύνδεσης στο DNA

Η σύγχρονη μοριακή γενετική δεν θα υπήρχε χωρίς τη βασική γνώση της δομής του DNA. Όλο και περισσότερο αυξανόμενη είναι η ανάγκη να κατανοηθεί η δομή του DNA και οι αλληλεπιδράσεις του με τα φάρμακα. Το DNA δεν

θεωρείται πλέον ως ένα άκαμπτο μόριο αλλά ως ένα εξαιρετικά ελαστικό και προσαρμόσιμο μόριο ικανό να υιοθετήσει πολλές δομικές παραλλαγές, η κάθε μία με μοναδικές και σημαντικές βιολογικές ιδιότητες.

Το κυτταρικό DNA είναι ο βασικός στόχος αρκετών αντικαρκινικών φαρμάκων. Τα φάρμακα αυτά όταν αλληλεπιδράσουν με το DNA, είναι ικανά να παραμορφώσουν τη διπλή έλικα του DNA, να αλκυλιώσουν ή να διασπάσουν μέρος του DNA αναστέλλοντας έτσι την αντιγραφή του, που είναι αναγκαία προϋπόθεση για την κυτταρική διαίρεση.

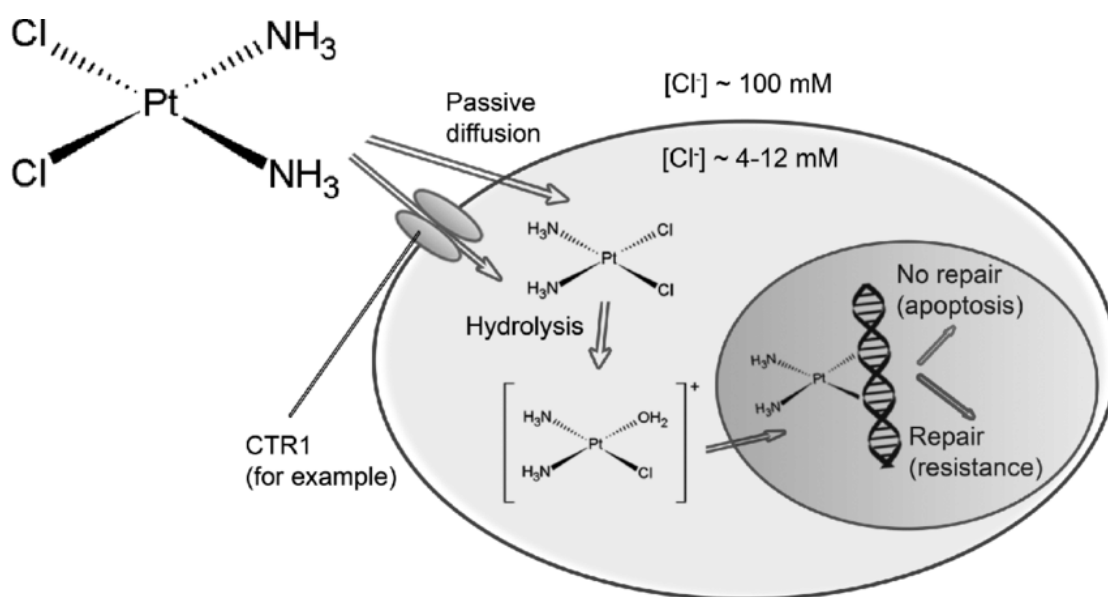
Παλαιότερα η φύση της αλληλεπίδρασης φαρμάκου-DNA είχε διερευνηθεί εκτενώς χρησιμοποιώντας μία ποικιλία φυσικοχημικών και βιοχημικών τεχνικών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτές τις μελέτες έριξαν φως στις βασικές αρχές της σχέσης δομής-δραστηκότητας που είναι αναγκαία για την κατανόηση του μηχανισμού της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου-DNA, και βοήθησαν στον σχεδιασμό νέων φαρμάκων με λιγότερες παρενέργειες. Το φάρμακο αλληλεπιδρά με το DNA με δύο βασικούς τρόπους: [11]

- Με ομοιοπολικό δεσμό
- και
- Με μη ομοιοπολικό δεσμό

1.4.1 Ομοιοπολικός δεσμός

Ένας μεγάλος αριθμός αντικαρκινικών φαρμάκων αναστέλλουν την αντιγραφή και την μεταγραφή του DNA μέσω ομοιοπολικών δεσμών με τις βάσεις του DNA, συνήθως εκλεκτικά. Αυτά τα φάρμακα ονομάζονται και αλκυλιωτικοί παράγοντες καθώς νουκλεοτίδια του DNA αλκυλιώνονται με μόρια φαρμάκου. Αντικαρκινικά φάρμακα που συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA, όπως η Anthramycin, η Topamycin, mitomycin, η aflatoxin B, η karunimycin A3, είναι οργανικά μόρια κατάλληλης δομής που προκαλούν σημαντικές δομικές και βιολογικές αλλαγές στο DNA. Τα μόρια αυτά δημιουργούν ένα ηλεκτρονιόφιλο σύστημα, όπου αλκυλιώνει τα πυρηνόφιλα άτομα N των βάσεων του DNA [12]. Τέτοια φάρμακα συνήθως περιέχουν μεταλλικά κέντρα συμπλοκοποιημένα.

Εκτός από την αλκυλίωση των νουκλεϊκών οξέων, η σύμπλεξη μεταλλικών ιόντων με DNA μπορεί να θεωρηθεί και αυτή μία τροποποίηση. Πολλά από τα μεταλλικά ιόντα των στοιχείων μετάπτωσης έχουν την τάση να συμπλέκονται με τις βάσεις του DNA. Αν και οι θέσεις κάποιων νουκλεοβάσεων δεν είναι προσιτές, λόγω της θέσης τους στην έλικα του Watson-Crick, κάποιες είναι αρκετά διαθέσιμες και λειτουργικές κατά την επίδραση μετάλλων σε αυτές. Σημαντικό παράδειγμα αποτελεί το αντικαρκινικό φάρμακο cis-platin, $cis\text{-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, το οποίο συμπλέκεται με τα N7 δύο γουανινών. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρείται τοπικό ξετύλιγμα της έλικας και λυγίζει η “σπονδυλική” στήλη του DNA γύρω από την περιοχή της μεγάλης αύλακας, χαρακτηριστικά τα οποία συνεισφέρουν στην αντικαρκινική δράση του φαρμάκου [13].



Σχήμα 1.7: Σχηματική απεικόνιση για την πρόκληση απόπτωσης [14].

Ρυθμιστικοί μηχανισμοί ανιχνεύουν την ανωμαλία αυτή στο DNA κι έτσι ξεκινούν μια σειρά διεργασιών για την επιδιόρθωση. Αυτό προκαλεί τελικά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, την λεγόμενη «απόπτωση».

1.4.2 Μη ομοιοπολικός δεσμός

Έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα σχετικά με τη μη ομοιοπολική σύνδεση των ενώσεων με τα νουκλεϊκά οξέα. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις έχει αποδειχθεί ότι

διαταράσσουν τη διαδικασία της αντιγραφής και μεταγραφής του DNA. Συνεπώς, ενώσεις που δεσμεύονται μη ομοιοπολικά με το DNA μπορούν να έχουν εφαρμογές ως αντικαρκινικοί παράγοντες.

Ο τρόπος αλληλεπίδρασης εξαρτάται από τα δομικά χαρακτηριστικά των υποκαταστατών του συμπλόκου, το ίδιο το σύμπλοκο όπως επίσης και από την αλληλουχία του DNA. Ανάλογα με τα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου-φαρμάκου και του DNA, πολλά φάρμακα μπορεί να έχουν περισσότερους από έναν τρόπο αλληλεπίδρασης με το DNA [15].

Οι τρόποι αλληλεπίδρασης μέσω μη ομοιοπολικού δεσμού είναι:

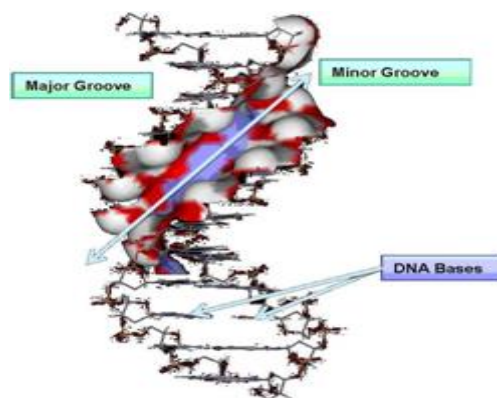
- Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις
- Δέσμευση στις αύλακες
- Μέσω παρεμβολής

1.4.2.1 Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Η σταθεροποίηση των διαμορφώσεων του DNA απαιτεί την αλληλεπίδρασή του με μεταλλοκατιόντα όπως το Na^+ ή το Mg^{2+} από διάλυμα σε μία διαδικασία η οποία ονομάζεται συμπύκνωση μέσω αντισταθμιστικών ιόντων. Αλληλεπιδράσεις των κατιοντικών ενώσεων με το DNA έχει ως αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των φορτίων των ανιοντικών φωσφορικών ομάδων του DNA και την απελευθέρωση των αντισταθμιστικών ιόντων. Η απελευθέρωση αυτή παρέχει μία αύξηση εντροπίας στην ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης των έντονα φορτισμένων μορίων. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται από την συγκέντρωση του διαλύματος και είναι γενικά ασθενείς κάτω από ουδέτερες συνθήκες για μονοκατοντικά μόρια, δίνοντας σχετικά μικρό ποσοστό δέσμευσης στις αύλακες και μικρό ποσοστό παρεμβολής. Κατά κανόνα, μικρά μόρια τα οποία συνδέονται ισχυρά με το DNA, πάντα περιέχουν στη δομή τους μία ομάδα που μπορεί να αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά [16].

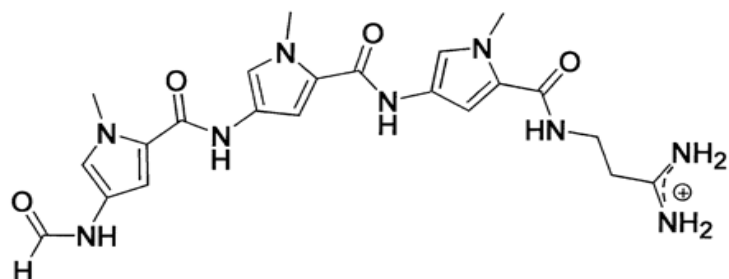
1.4.2.2 Δέσμευση στις αύλακες

Η διαμόρφωση του DNA είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται μεγάλες και μικρές αύλακες, οι οποίες έχουν διαφορετικό πλάτος και διαφορετικό βάθος. Επίσης το ένα άκρο του ζεύγους βάσης εκτίθεται στην μεγάλη αύλακα ενώ το άλλο άκρο ζεύγους βάσης εκτίθεται στην μικρή αύλακα [17].

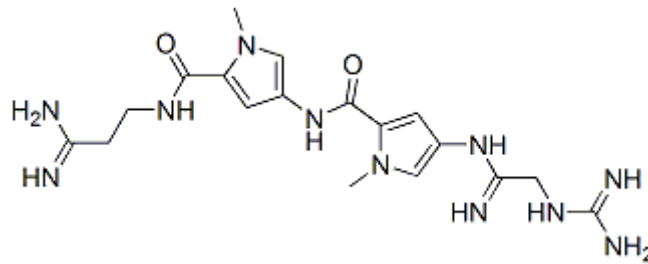


Σχήμα 1.8: Απεικόνιση της μικρής και μεγάλης αύλακας του DNA [18].

Φυσικά αντιβιοτικά όπως η δισταμυκίνη (distamycin) και η νετροψίνη (netropsin) που απομονώθηκαν από το *Streptomyces distallicus* και το *Streptomyces netropsis* αντίστοιχα, είναι μακριά κι εύκαμπτα μόρια που περιέχουν N-μεθυλοπυρρολικούς δακτυλίους, τρεις και δυο αντίστοιχα, οι οποίοι συνδέονται μέσω πεπτιδικού δεσμού με την θετικά φορτισμένη αμιδική ομάδα του DNA.



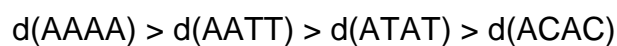
Σχήμα 1.9: Δομή Distamycin.



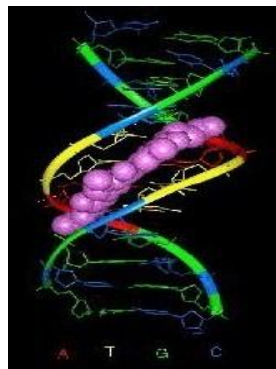
Σχήμα 1.10: Δομή Netropsin.

Αυτά τα φάρμακα μπορούν να συνδεθούν ισχυρά μέσα στην μικρή αύλακα του B-DNA σε περιοχή που είναι πλούσια σε βάσεις αδενίνης και θυμίνης και σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου, ηλεκτροστατικές δυνάμεις και αλληλεπιδράσεις Van der Waals.

Η netropsin για παράδειγμα δεσμεύεται με την πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη περιοχή βάσεων του DNA με την ακόλουθη σειρά προτίμησης:



Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον της έρευνας έχει επικεντρωθεί στην προέλευση αυτής της ειδικής αλληλουχίας και στον σχεδιασμό συνθετικών φαρμάκων που εμφανίζουν προτιμήσεις για άλλες αλληλουχίες. Για τον σκοπό αυτό, έχουν συντεθεί παράγωγα της νετροψίνης και της δισταμυκίνης και έχουν μελετηθεί με πολλές τεχνικές οι προτιμήσεις τους στις αλληλουχίες του DNA [19].



Σχήμα 1.11: Η σύνδεση του Netropsin (ροζ χρώμα) στην μικρή αύλακα του DNA [20].

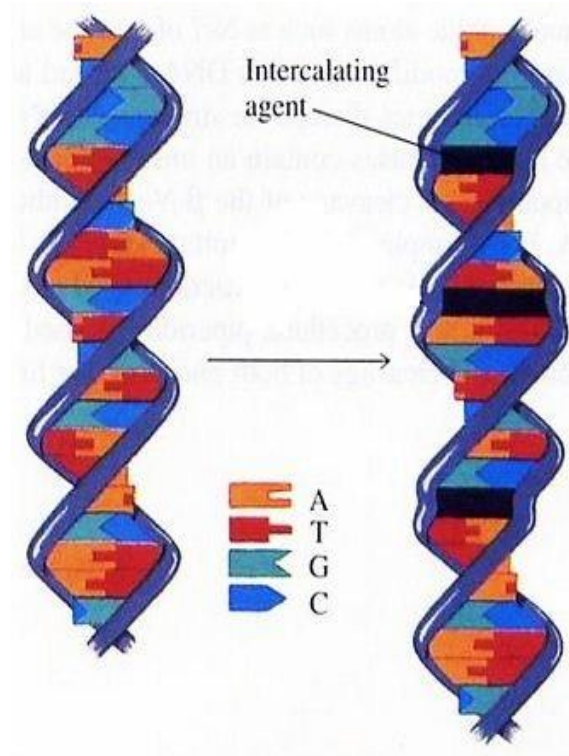
Γενικά, πολυαμίνες που υπό φυσιολογικές συνθήκες έχουν πρωτονιωθεί, αλληλεπιδρούν ισχυρά με το DNA. Μέσω της τεχνικής της περίθλασης ακτίνων Χ, έχει αποδειχθεί ότι η σπερμίνη δεσμεύεται σε όλη την μεγάλη αύλακα της διπλής έλικας του B-DNA, αλληλεπιδρώντας με τις φωσφορικές ομάδες

αντίθετων ελίκων και με μία βάση γουανίνης μέσα στην αύλακα. Αρκετές πολυαμίνες, συμπεριλαμβανομένης και της σπερμίνης δεν είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν σημαντικά με την μικρή αύλακα. Άλλωστε η μεγάλη αύλακα έχει πολλαπλές θέσεις αλληλεπίδρασης, προσφέροντας έτσι συγκριτικά με τη μικρή αύλακα ισχυρότερη σύνδεση με φάρμακα. Η μεγάλη αύλακα είναι εύκολα προσβάσιμη από ογκώδη μόρια. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα περισσότερα αντιβιοτικά και αντικαρκινικά φάρμακα είναι μικρά μόρια, τελικά η μικρή αύλακα είναι η κύρια θέση σύνδεσής τους.

Η δέσμευση στις αύλακες επιτρέπει, αλλά δεν απαιτεί εκτεταμένη αλλαγή στη διαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA. Για παράδειγμα η σπερμίνη μπορεί να προκαλέσει τοπική κάμψη της έλικας του DNA. Άλλο παράδειγμα είναι η cis-platin η οποία όταν συμπλέκεται με το DNA, αποδιοργανώνει την κανονική στοίβαξη των βάσεων σε μία συγκεκριμένη περιοχή κι έτσι προκαλείται μια τοπική στρέβλωση στη δομή του μορίου του DNA γεγονός που οδηγεί στο θάνατο του κυττάρου [21].

1.4.2.3 Αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής (intercalation)

Οι παρεμβολείς είναι μικρά μόρια που περιέχουν μια επίπεδη αρωματική ετεροκυκλική διαμόρφωση (functionality) η οποία μπορεί να προσδεθεί ανάμεσα στα ζεύγη των βάσεων της διπλής έλικας του DNA. Μεγάλη ποικιλία μορίων, όπως το βρωμίδιο του αιθιδίου (ethidium bromide) και άλλα μικρά φάρμακα, όπως η ακτινομυκίνη D και η δαναουμυκίνη, έχει βρεθεί ότι μπορούν να διεισδύσουν ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Όσον αφορά τα μεταλλικά σύμπλοκα, το ρόλο του παρεμβολέα παίζει συνήθως ο υποκαταστάτης του συμπλόκου, που είναι ένας επίπεδος ετεροκυκλικός αρωματικός υποκαταστάτης [22-23].



Σχήμα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση ενός μορίου DNA με το μόριο-παρεμβολέα το οποίο φαίνεται με μαύρο χρώμα [24].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ ΤΟ DNA

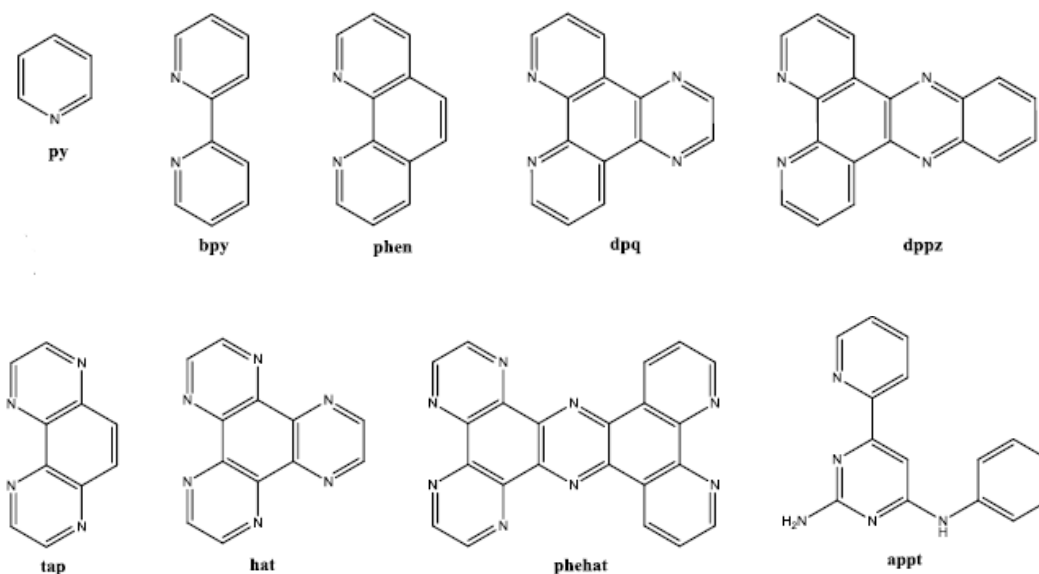
2.1 Εισαγωγικά

Ο σχεδιασμός μικρών μορίων που μπορούν να συνδέονται και να αντιδρούν με το DNA σε ειδικές αλληλουχίες του, γίνεται σημαντικός, καθώς μπορεί να απεικονιστεί σε μοριακό επίπεδο ο τρόπος που εκφράζονται οι γενετικές πληροφορίες. Μια περισσότερο ολοκληρωμένη κατανόηση του τρόπου που στοχοποιούνται οι περιοχές του DNA με εκλεκτικότητα, θα οδηγήσει όχι μόνο σε πρωτότυπα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αλλά και σε μια μεγάλη δυνατότητα για τους χημικούς να συνθέσουν περισσότερο ευαίσθητους διαγνωστικούς παράγοντες.

Τα σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης είναι πολύ χρήσιμα στην προσπάθεια αυτή, όχι μόνο επειδή έχουν καλώς χαρακτηρισμένη γεωμετρία, αλλά έχουν επίσης και σαφείς ηλεκτροχημικές και φωτοφυσικές ιδιότητες, αυξάνοντας έτσι τη λειτουργικότητα των δεσμευτικών παραγόντων. Διαφοροποιώντας το μεταλλικό κέντρο, μπορεί να τροποποιηθεί η γεωμετρία του συμπλόκου (επίπεδη τετραγωνική, τετραεδρική, οκταεδρική), αλλά και οι φωτοφυσικές του ιδιότητες. Επιπλέον, με κατάλληλους χηλικούς υποκαταστάτες μπορούν επίσης να τροποποιηθούν οι φωτοφυσικές ιδιότητες, αλλά και να τροποποιηθεί η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA, εξαιτίας των διαφορετικών τρόπων σύνδεσης. Οι σταθερές σύνδεσης που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης με DNA κυμαίνονται από $1 \cdot 10^3$ έως $1 \cdot 10^7$ M⁻¹. Επίσης, η φύση του υποκαταστάτη έχει σημαντική επίδραση στη θεμελιώδη και διεγερμένη κατάσταση του συμπλόκου [25-26].

Το πρόβλημα της ασθενούς σύνδεσης των συμπλόκων στο DNA αποτελούσε έναν από τους περιοριστικούς παράγοντες που εμπόδισαν την άμεση εφαρμογή τους στα βιολογικά πειράματα. Μια στρατηγική που ακολουθήθηκε, ήταν η παρασκευή συμπλόκων που μπορούν να εισάγουν έναν υποκαταστάτη τους ανάμεσα στο στοίβαγμα των βάσεων της διπλής έλικας του DNA. Αυτή η

προσέγγιση, οδήγησε στη σύνθεση συμπλόκων με εκτεταμένους επίπεδους αρωματικούς υποκαταστάτες, όπως οι: phen, bpy, TAP, HAT, PHEHAT [27-30].



Σχήμα 2.1: Δομές μερικών επίπεδων αρωματικών υποκαταστατών συμπλόκων στοιχείων μετάπτωσης που έχουν χρησιμοποιηθεί ως παρεμβολείς στο DNA.

Οι μοναδικές φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες των συμπλόκων, έχουν προσφέρει μια οδό για την ανάπτυξη μιας μεγάλης τάξης μοριακών ανιχνευτών για τη διερεύνηση και την τροποποίηση της δομής του DNA. Αυτό οφείλεται λόγω της έντονης MLCT φωταύγειας και των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων της διεγερμένης κατάστασης τους. Οι MLCT μεταπτώσεις μπορούν να αξιοποιηθούν προκειμένου να ξεκινήσουν αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου, δεδομένου ότι πολλά σύμπλοκα γίνονται ισχυροί οξειδωτικοί ή αναγωγικοί παράγοντες μετά από οπτική διέγερση. Επίσης, πλήθος ερευνών έχει αναφερθεί και στην ικανότητά τους να εκπέμπουν φωταύγεια μόνο μετά από δέσμευση τους στο DNA, μια ιδιότητα που καλείται επίδραση μοριακού «διακόπτη φωτός» (“light switch” effect) [31].

Μεγάλο μέρος της δουλειάς που έχει γίνει στην ερευνητική αυτή περιοχή, έχει ξεκινήσει από την έρευνα των συμπλόκων του Pt(II) που χρησιμοποιήθηκαν σε μια προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού δράσης του cisplatin και άλλων

χημειοθεραπευτικών φορέων. Εντούτοις, η πρόσφατη εκρηκτική ανάπτυξη οφείλεται στην αναγνώριση ότι πλήθος συμπλόκων του Ru(II), Rh(III), Os(II), Re(I), Cu(I) με πολυπυρηνικούς αρωματικούς υποκαταστάτες αλληλεπιδρούν ισχυρά με το DNA και παρέχουν ένα πλήθος φυσικοχημικών εργαλείων για την ανίχνευση και αλλαγή της δομής των νουκλεϊκών οξέων [32].

2.2. Γενικά στοιχεία για το Ρήνιο

Το χημικό στοιχείο ρήνιο (αγγλικά : rhenium) είναι βαρύ, πολύ δύστηκτο, αργυρόλευκο μέταλλο με ισχυρή μεταλλική λάμψη και με ατομικό αριθμό 75 και σχετική ατομική μάζα 186,207. Το χημικό του σύμβολο είναι "Re" και ανήκει στην ομάδα 7 του περιοδικού πίνακα, στην περίοδο 6 και στο d-block. Η ηλεκτρονιακή του δομή είναι $[Xe]4f^{14}5d^56s^2$. Έχει θερμοκρασία τήξης 3186 °C και θερμοκρασία βρασμού 5596 °C.

Με μια μέση περιεκτικότητα περίπου 1 ppb (μέρη στο δισεκατομμύριο) στο στερεό φλοιό της γης, το ρήνιο είναι από τα σπανιότερα μέταλλα. Το καθαρό ρήνιο έχει την 3^η μεγαλύτερη θερμοκρασία τήξης, μετά το βολφράμιο και τον άνθρακα και το μεγαλύτερο σημείο βρασμού από όλα τα χημικά στοιχεία. Ανήκει στα λεγόμενα πυρίμαχα μέταλλα μαζί με το μολυβδένιο, το ταντάλιο, το βολφράμιο και το νιόβιο.

Η ανακάλυψή του ανακοινώθηκε το 1925 από στους Γερμανούς χημικούς Βάλτερ Νόντακ, Ίντα Τάκε-Νόντακ και Όττο Μπέργκ και είναι το τελευταίο, με φυσική παρουσία, σταθερό χημικό στοιχείο που ανακαλύφθηκε.

Το ρήνιο δεν υπάρχει ελεύθερο στη φύση. Εμφανίζεται σε μικρές ποσότητες μέσα στο ορυκτό μολυβδαινίτης που αποτελεί και τη μεγαλύτερη εμπορική του πηγή. Η Χιλή, οι Η.Π.Α., και χώρες της Κεντρικής Ασίας (Καζακστάν, Ουζμπεκιστάν) προμηθεύουν τις μεγαλύτερες ποσότητες ρηνίου παγκοσμίως. Είναι γνωστά μόνο δύο πολύ σπάνια ορυκτά του : ο ρηνίτης που περιέχει θείο και ρήνιο και ο ταρκιανίτης που περιέχει πολλά συστατικά. Χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή υπερκραμάτων με το νικέλιο για χρήση σε κινητήρες αεροσκαφών και ως καταλύτης χημικών αντιδράσεων τις περισσότερες φορές ως κράμα με λευκόχρυσο. Εξαιτίας της χαμηλής διαθεσιμότητάς του σε σχέση με τη ζήτηση, το ρήνιο είναι ένα από τα πιο ακριβά βιομηχανικά μέταλλα [33].

Η ανακάλυψή του ανακοινώθηκε το 1925 από στους Γερμανούς χημικούς Βάλτερ Νόντακ, Ίντα Τάκε-Νόντακ και Όττο Μπέργκ και είναι το τελευταίο, με φυσική παρουσία, σταθερό χημικό στοιχείο που ανακαλύφθηκε.

Το ρήνιο δεν υπάρχει ελεύθερο στη φύση. Εμφανίζεται σε μικρές ποσότητες μέσα στο ορυκτό μολυβδαινίτης που αποτελεί και τη μεγαλύτερη εμπορική του πηγή. Η Χιλή, οι Η.Π.Α., και χώρες της Κεντρικής Ασίας (Καζακστάν, Ουζμπεκιστάν) προμηθεύουν τις μεγαλύτερες ποσότητες ρηνίου παγκοσμίως. Είναι γνωστά μόνο δύο πολύ σπάνια ορυκτά του : ο ρηνίτης που περιέχει θείο και ρήνιο και ο ταρκιανίτης που περιέχει πολλά συστατικά. Χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή υπερκραμάτων με το νικέλιο για χρήση σε κινητήρες αεροσκαφών και ως καταλύτης χημικών αντιδράσεων τις περισσότερες φορές ως κράμα με λευκόχρυσο. Εξαιτίας της χαμηλής διαθεσιμότητάς του σε σχέση με τη ζήτηση, το ρήνιο είναι ένα από τα πιο ακριβά βιομηχανικά μέταλλα [34].

Οι χημικές ιδιότητες του ρηνίου και του τεχνητίου μοιάζουν πολύ, ιδιαίτερα στην κατάσταση οξειδωσης +5, ενώ διαφέρουν σημαντικά από εκείνες του μαγγανίου [35] [36]. Έτσι μελετώντας σύμπλοκα του ρηνίου μπορούν να διεξαχθούν συμπεράσματα και για τα αντίστοιχα σύμπλοκα του ραδιενεργού τεχνητίου. Οι δομές γενικά αναλόγων συμπλόκων του τεχνητίου και του ρηνίου αναμένεται να είναι όμοιες καθώς επίσης και οι παράμετροι που αφορούν τους δεσμούς τους. Οι ποιοτικές αυτές ομοιότητες ανάμεσα στα δύο στοιχεία μετάπτωσης προκύπτουν όχι μόνο από τη θέση τους στον περιοδικό πίνακα που είναι γειτονική αλλά και από το φαινόμενο της «λανθανιδικής συστολής» εξαιτίας του οποίου τα στοιχεία της τρίτης σειράς του περιοδικού πίνακα είναι μικρότερα απ' ότι αναμένουμε. Ο ατομικός πυρήνας του ρηνίου είναι 1.373 Å και είναι σχεδόν όμοιος με του τεχνητίου που είναι 1.358 Å. Αποτέλεσμα του φαινομένου αυτού είναι ότι ανάλογα σύμπλοκα του τεχνητίου και του ρηνίου έχουν παρόμοιες φυσικές ιδιότητες όπως στο σχήμα, στο μέγεθος, στη διπολική ροπή, στο τυπικό φορτίο, στη λιποφιλικότητα. Ως προς τις χημικές ιδιότητες αυτές είναι γενικά ανάλογες.

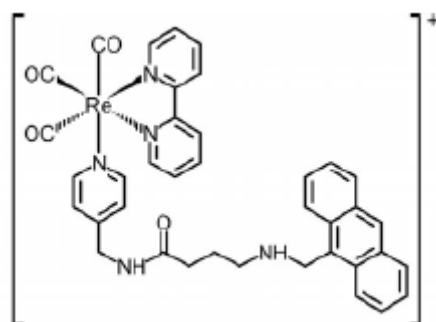
Έχουν αναφερθεί σύμπλοκα του ρηνίου που ανάγονται δυσκολότερα από του τεχνητίου και είναι πιο αδρανή σε αντικατάσταση. Βέβαια το μέγεθος αυτών των χημικών διαφορών δεν είναι εύκολο να προβλεφθεί λόγω της σχετικής έλλειψης δεδομένων για τα στοιχεία αυτής της περιοχής του περιοδικού πίνακα [37].

Ποσοτικά δεδομένα συλλέγονται συνεχώς όσον αφορά στην χημεία του ρηνίου και του τεχνητίου λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν τα δύο αυτά στοιχεία για την πυρηνική ιατρική.

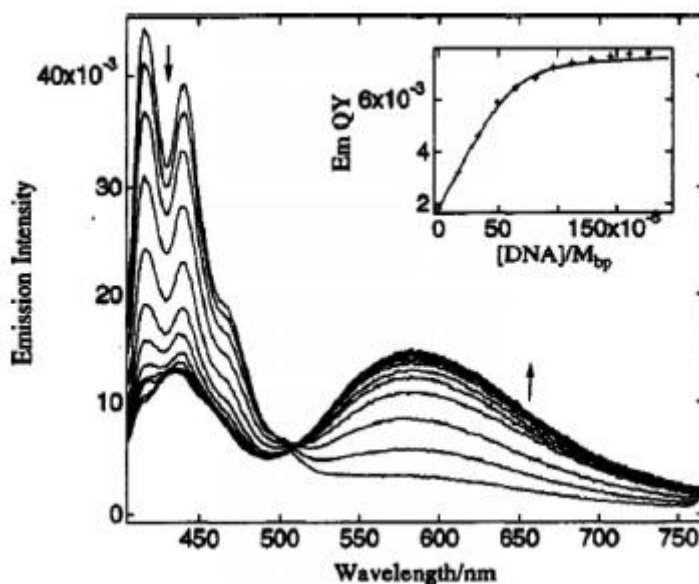
Οι μακροσκοπικές μελέτες της χημείας των διαφόρων συμπλόκων του τεχνητίου γίνονται με τη χρήση του χαμηλής ενέργειας ραδιονουκλιδίου ^{99}Tc το οποίο έχει την ιδιότητα να εκπέμπει ακτινοβολία β και έχει αρκετά μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής ($t_{1/2} = 2.1 \cdot 10^5$ χρόνια) από το πυρηνικά διεγερμένο ^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6.01$ ώρες) και το οποίο εκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία γ . Οι μελέτες πάνω στη χημεία των συμπλόκων του ρηνίου πραγματοποιούνται συχνά ταυτόχρονα με τις μελέτες στη χημεία των αντίστοιχων συμπλόκων του τεχνητίου, κι αυτό διότι το ρήνιο παρέχει την εναλλακτική μη ραδιενεργή λύση σε σχέση με τα ραδιοϊσότοπα του τεχνητίου. Εμείς εργαστήκαμε με το φυσικό μη ραδιενεργό μίγμα των ισοτόπων του ρηνίου: ^{185}Re – ^{187}Re . Μεγάλο ενδιαφέρον για την πυρηνική ιατρική παρουσιάζουν οι ενώσεις του ρηνίου και του τεχνητίου όταν αυτά βρίσκονται στην οξειδωτική κατάσταση +5. Όλα τα σύμπλοκα, τόσο του ρηνίου, όσο και του τεχνητίου στην κατάσταση οξείδωσης V είναι έγχρωμα. Όσον αφορά τις ενώσεις του ρηνίου αυτές έχουν την τάση να μεταπίπτουν πολύ εύκολα στις ενώσεις Re^{IV} και Re^{VII} .

2.3 Σύμπλοκα του Ρηνίου

Οι περισσότερες από τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τρικαρβόνυλο πολυπυριδινικών συμπλόκων του ρηνίου(I) και της διπλής έλικας του DNA, που έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα, είναι παρεμβολικής φύσεως. Τα σύμπλοκα αυτά είτε συνδέονται με ένα επίπεδο αρωματικό μόριο μέσω μιας γέφυρας (spacer), ή συμπλέκονται άμεσα με έναν εκτεταμένο επίπεδο αρωματικό διιμινικό υποκαταστάτη, όπως τον dppz. Στην πρώτη περίπτωση ένα μόριο ανθρακενίου έχει συμπλεχθεί ομοιοπολικά μέσω γέφυρας στο μεταλλικό κέντρο. Το σύμπλοκο δεσμεύεται μέσω παρεμβολής του μορίου αυτού στα ζεύγη βάσεων του DNA, με σταθερά σύνδεσης $4.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία φθορισμού [38].



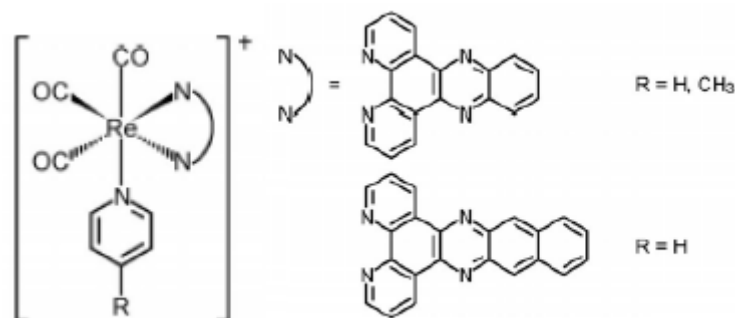
Σχήμα 2.2: Δομή του συμπλόκου $[Re(bpy)(CO)_3(py\text{-}spacer\text{-}anthracene)]^+$



Σχήμα 2.3: Φθορισμός του $[Re(bpy)(CO)_3(py\text{-}spaceranthracene)]^+$ αυξανόμενου του λόγου $[DNA]/[Re]$.

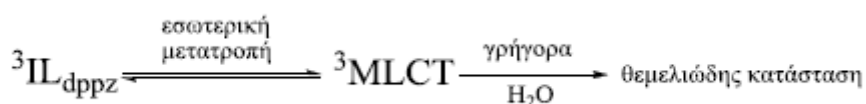
Συμπλέκοντας άμεσα στο $Re(I)$ έναν εκτεταμένο επίπεδο υποκαταστάτη αντί της bpy, μπορεί πλέον αυτός να δράσει ως παρεμβολέας στο DNA. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα $[Re(N^{\wedge}N)(CO)_3(py\text{-}R)]^+$ (όπου $N^{\wedge}N = dpprz, dpprh$, και $R = H, Me$, που λειτουργούν ως παρεμβολείς στο DNA. Μελέτες με φασματοσκοπία εκπομπής δείχνουν ότι τα σύμπλοκα με $dpprz$ και $dpprh$ σε CH_2Cl_2 έχουν μια $^3IL(\pi\text{-}\pi^*)$ κατάσταση. Η παρεμβολή αυτών των συμπλόκων στο CT-DNA αλλά και σε συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια επιφέρει αύξηση της εκπομπής και του χρόνου ζωής της διεγερμένης κατάστασης. Η

συμπεριφορά αυτή επιτρέπει τη χρήση των παραπάνω συμπλόκων ως συστήματα διακόπτη φωτός [39-41].



Σχήμα 2.4: Δομή των συμπλόκων του τύπου $[Re(N^N)(CO)_3(py-R)]^+$

Συγκεκριμένα, η χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση του συμπλόκου $[Re(dppz)(CO)_3(py-Me)]^+$, έχει χαρακτήρα τριπλής ενδομοριακής κατάστασης βασισμένης στον dppz ($^3IL_{dppz}$) και εκδηλώνει φωταύγεια σε διαλύτες MeCN και CH₂Cl₂. Όμως, σε υδατικά διαλύματα, αυτή η κατάσταση βρίσκεται πολύ κοντά ενεργειακά με την τριπλή MLCT κατάσταση, η οποία αποδιεγείρεται θερμικά. Επίσης, έχει βρεθεί ότι σε διαλύτες με μεγάλη πολικότητα, συντελείται εσωτερική μετατροπή από την $^3IL_{dppz}$ στην MLCT κατάσταση. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η 3MLCT κατάσταση έχει πολύ μικρό χρόνο ζωής στο H₂O, εξαιτίας της μεταφοράς πρωτονίου, η χαμηλότερη $^3IL_{dppz}$ διεγερμένη κατάσταση απενεργοποιείται ταχέως. Έτσι, στο H₂O το σύμπλοκο δεν παρουσιάζει φωταύγεια. Αντίθετα, όταν το σύμπλοκο συνδεθεί με το DNA, αυξάνεται η ενέργεια της 3MLCT σε σύγκριση με την $^3IL_{dppz}$ και η εσωτερική μετατροπή επιβραδύνεται, λόγω της μικρότερης επαφής του συμπλόκου με το νερό και του λιγότερο πολικού περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα να εκδηλώνεται τελικά φωταύγεια και μάλιστα, τόσο εντονότερη, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του DNA [38].



Επιπλέον, η επώαση των παραπάνω συμπλόκων με το πλασμίδιο pBR322 οδηγεί σε φωτοδιάσπαση (photocleavage) του βιομορίου μετά από ακτινοβολήση με ορατό φως. Μια σειρά πειραμάτων ηλεκτροφόρησης, απέδειξαν ότι στην περίπτωση του dppz συμπλόκου πραγματοποιείται άμεση

οξείδωση του DNA από το διεγερμένο σύμπλοκο, χωρίς να εμπλέκεται το οξυγόνο στην φωτοκαταλυτική διάσπαση. Αντίθετα, για το σύμπλοκο με dpph βρέθηκε, ότι τα δραστικά είδη που είναι υπεύθυνα για τη διάσπαση του πλασμιδίου είναι οι υπερυπεροξειδικές και οι υδροξυλικές ρίζες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

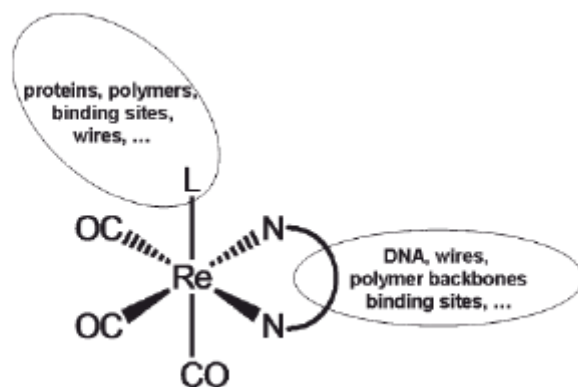
ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ ΡΗΝΙΟΥ (I) ΜΕ α -ΔΙΪΜΙΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ

3.1 Εισαγωγή

Τα τρικαρβονυλικά σύμπλοκα του Re(I) με α -διιμινικούς υποκαταστάτες του τύπου $fac\text{-Re}(\text{CO})_3(\alpha\text{-διιμίνη})\text{L}^{0/+}$, όπου L είναι κάποιος αξονικός υποκαταστάτης ουδέτερος ή φορτισμένος, αποτελούν το επίκεντρο του ενδιαφέροντος για πολλά χρόνια, εξαιτίας κυρίως των μοναδικών φωτοφυσικών και φωτοχημικών ιδιοτήτων τους. Ο υποκαταστάτης L μπορεί να είναι κάποιο αλογονίδιο, ή οργανικός υποκαταστάτης (όπως πυριδίνη), ή ακόμα και μεταλλικό μόριο (όπως Ph_3Sn). Τα σύμπλοκα του Re(I) μπορεί να είναι ουδέτερα ή θετικά φορτισμένα, όταν ο αξονικός υποκαταστάτης L είναι ανιόν ή ουδέτερος, αντίστοιχα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο χαρακτήρας της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης των συμπλόκων του τύπου αυτού μπορεί να μεταβάλλεται από MLCT έως και IL, ανάλογα με το είδος της διιμίνης και του αξονικού υποκαταστάτη L. Για παράδειγμα, στις περιπτώσεις όπου η διιμίνη είναι η bpy ή η phen και ο L είναι κάποιος ηλεκτρονιοδοτικός υποκαταστάτης, η χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση έχει χαρακτήρα MLCT, ενώ για σύμπλοκα όπου ο L είναι ένας εύκολα οξειδούμενος υποκαταστάτης, η LLCT ($\text{L} \rightarrow \pi^*$ διιμίνη) διεγερμένη κατάσταση είναι η χαμηλότερα κείμενη [42-43].

Ο συνδυασμός ποικίλης και ελεγχόμενης φωτοδραστικότητας με τη χημική σταθερότητα και με τη συνθετική ευελιξία των συμπλόκων του τύπου αυτού, κάνουν τα σύμπλοκα αυτά πολύ ελκυστικά ως φωτο-ευαίσθητοποιητές και ανιχνευτές βιομορίων. Μπορούν να προσκολληθούν σε πρωτεΐνες, να ενσωματωθούν σε αγώγιμα πολυμερή, μοριακά καλώδια (molecular wire), σε υγρούς κρυστάλλους, στο DNA, ή να συνδεθούν με ειδικές δεσμευτικές μονάδες υποστρωμάτων, είτε μέσω του αξονικού υποκαταστάτη L, είτε μέσω τροποποίησης της α -διιμίνης.



Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων του τύπου $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})L^{0/+}$. Αυτές οι δομικές μονάδες μπορούν να συνδεθούν με βιομόρια ή να ενσωματωθούν σε μοριακές διατάξεις μέσω του αξονικού υποκαταστάτη L, ή της $N^{\wedge}N$ διιμίνης.

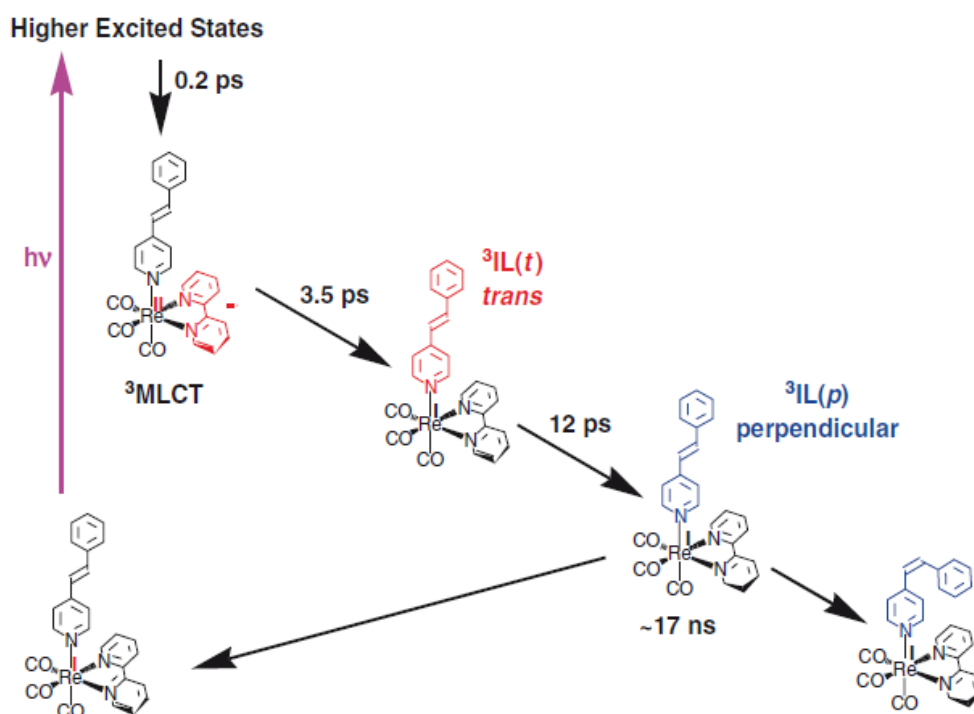
Η δυνατότητα που υπάρχει να τροποποιούνται ελεγχόμενα οι ιδιότητες και ο χαρακτήρας της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης των συμπλόκων αυτών με τη μεταβολή του αξονικού υποκαταστάτη L, αποτελεί το βασικότερο πλεονέκτημα της χρήσης τους ως φωτο-ευαισθητοποιητές. Η ανακάλυψη ότι το σύμπλοκο $Re(CO)_3(bpy)Cl$ μπορεί να δράσει και ως φωτο-ευαισθητοποιητής και ως ένας ομογενής καταλύτης στην αναγωγή του CO_2 , έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας σειράς συμπλόκων του τύπου $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})L^{0/+}$, τα όποια απορροφούν και εκπέμπουν σε σχετικά υψηλές ενέργειες σε σχέση με τα ανάλογα σύμπλοκα του $Ru(II)$ και του $Os(II)$ [44].

Επιπλέον, η cis/trans φωτο-επαγόμενη ισομερίωση των συμπλόκων $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})L^{0/+}$ ως προς τον υποκαταστάτη L ανοίγει το πεδίο για τη χρήση τους ως φωτοδιακόπτες. Το πιο πρόσφατο, όμως, ενδιαφέρον των συμπλόκων αυτών, είναι η εφαρμογή τους ως μοριακοί και βιολογικοί ανιχνευτές και μοριακοί διακόπτες φωτός για το DNA και άλλα βιομόρια, καθώς και ως διαγνωστικά και θεραπευτικά ραδιοφάρμακα [45-46].

3.2 Ενδομοριακή μεταφορά ενέργειας : ισομερείωση του αξονικού υποκαταστάτη.

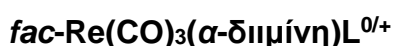
Οι φωτοχημικές αντιδράσεις (συνήθως ισομερειώσεις) του υποκαταστάτη L στα σύμπλοκα του $[\text{Re}(\text{L})(\text{CO})_3(\text{N},\text{N})]^n$ μπορούν να προκληθούν στο near UV (400 nm), από μια χαμηλής δραστηριότητας διεγερμένη κατάσταση συνήθως ππ*^{*}. Για παράδειγμα σύμπλοκα που ο L είναι παράγωγα στυριλοπυριδίνης ή φαιναζοπυριδίνης καταλύουν την *trans*→*cis* φωτοισομερίωση του δεσμού –CH=CH- ή -N=N-, αντίστοιχα [47-48-49].

Αυτές οι αντιδράσεις ακολουθούν τον ίδιο μηχανισμό [48], σύμφωνα με τον οποίο η χαμηλής ενέργειας ¹CT και ¹IL μεταπτώσεις ακολουθούνται από μια ενδοσυστηματική διασταύρωση (ISC) σε fs και μεταπίπτουν σε μια τριπλή ³CT, η οποία αποδιεγείρεται μέσω εσωτερικής μετατροπής σε μια ³IL(L), και παράλληλα γίνεται η ισομερίωση και η επιστροφή στη θεμελιώδη κατάσταση. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ελεύθερος οργανικός υποκαταστάτης L δεν απορροφά σ' αυτό το μήκος κύματος [50].



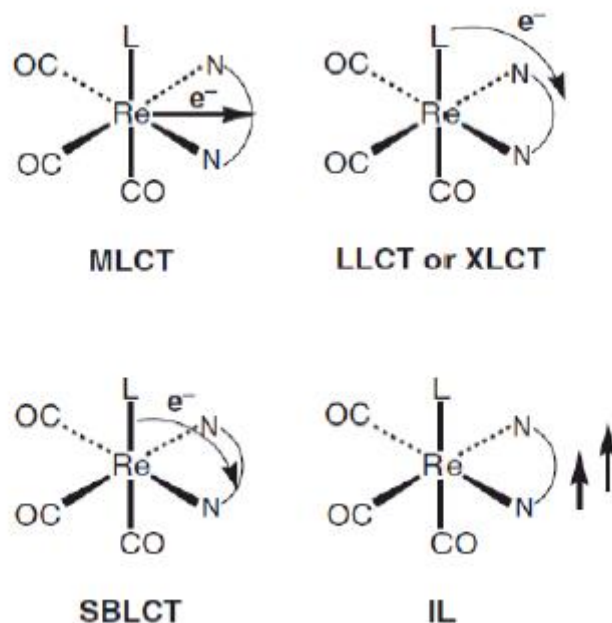
Σχήμα 3.2: Ισομερείωση του $[\text{Re}(t\text{-styrylpyridine})(\text{CO})_3(\text{bpy})]^+$.

3.3 Φωτοφυσικές ιδιότητες συμπλόκων του τύπου



Είναι φανερό ότι οι φωτοχημικές και οι φωτοφυσικές ιδιότητες των $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})L^{0/+}$ εξαρτώνται άμεσα από τη φύση τόσο της διιμίνης, όσο και του αξονικού υποκαταστάτη, καθιστώντας αυτά τα σύμπλοκα πολύ ικανά φωτοδραστικά υλικά που θα μπορούσαν να συμμετέχουν σε διάφορες φωτοπροκαλούμενες διαδικασίες. Στην πλειονότητα των φωτοχημικών διαδικασιών περιλαμβάνεται μεταφορά ηλεκτρονίου, με τις πρώτες μελέτες να δείχνουν ότι η διεγερμένη κατάσταση των συμπλόκων αυτών είναι τόσο ισχυρά αναγωγική όσο και οξειδωτική. Οι διεγερμένες καταστάσεις, των συμπλόκων αυτού του τύπου, έχουν συνήθως αρκετά μεγάλο χρόνο ζωής (ns–μs) και μπορούν να εμπλακούν σε γρήγορες αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου ή ενέργειας, παρόμοιες με εκείνες της γνωστής οικογένειας $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ και παρόμοιων πολυπυριδινικών συμπλόκων.

Η φωτοφυσική συμπεριφορά τους καθορίζεται από το χαρακτήρα της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης. Καταρχήν, η παρουσία μιας ηλεκτρονιακά δεκτικής α -διιμίνης στη σφαίρα ένταξης του συμπλόκου επιτρέπει ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μεταφοράς φορτίου που εστιάζονται στον διϊμινικό υποκαταστάτη, ενώ η προέλευση του διεγερμένου ηλεκτρονίου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του αξονικού υποκαταστάτη. Έχει δειχθεί ότι η συμπεριφορά αυτών των συμπλόκων μπορεί ουσιαστικά να χωριστεί σε τέσσερις κατηγορίες ως προς τη φύση των διεγερμένων καταστάσεων, όπως φαίνονται στο Σχήμα 3.3 [51].



Σχήμα 3.3: Ο χαρακτήρας των διεγερμένων καταστάσεων που συναντώνται στα σύμπλοκα αυτά.

❖ $d\pi(\text{Re}) \rightarrow \pi^*(\alpha\text{-διιμίνη})$ μέταλλο προς υποκαταστάτη μεταφορά φορτίου (MLCT)

Στα περισσότερα σύμπλοκα αυτού του τύπου η χαμηλότερα κείμενη διεγερμένη κατάσταση αποδίδεται ως $d\pi(\text{Re}) \rightarrow \pi^*(\alpha\text{-διιμίνη})$ MLCT. Ο αξονικός υποκαταστάτης L μπορεί να είναι π-δέκτης, π-ουδέτερος, ή πολύ ασθενής π-δότης. Όμως, όσο αυξάνεται η π-δεκτική ικανότητα του L, τόσο μετατοπίζεται η MLCT απορρόφηση και εκπομπή σε υψηλότερες ενέργειες και μεγαλώνει ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης. Η αύξηση της ενέργειας της MLCT κατάστασης μπορεί να ελαχιστοποιήσει την ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στην MLCT και την IL διεγερμένη κατάσταση που βρίσκεται υψηλότερα [43].

❖ **L→ α-διιμίνη υποκαταστάτης προς υποκαταστάτη μεταφορά φορτίου (LLCT)**

Μία διεγερμένη κατάσταση τύπου LLCT (μερικές φορές αναφέρεται σαν XLCT αν ο L είναι κάποιο αλογονίδιο) συμβαίνει σε σύμπλοκα που ο αξονικός υποκαταστάτης φέρει ένα αναγωγικό κομμάτι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})(\text{py-PTZ})]^+$, (όπου $\text{py-PTZ} = 10\text{-(4-πικολυνο)-φαινοθειαζίνη}$). Με διέγερση του συμπλόκου, συμβαίνει πρώτα μία ($\text{Re} \rightarrow \text{bpy}$) MLCT μετάπτωση, ενώ εν συνεχεία παρατηρείται μεταφορά ηλεκτρονίου από το py-PTZ στο Re^{II} . Το μόριο που παράγεται μπορεί να δώσει μία $\text{py-PTZ} \rightarrow \text{bpy}$ LLCT διεγερμένη κατάσταση. Αυτή η LLCT κατάσταση μεταπίπτει στη θεμελιώδη με μια άλλη ενδομοριακή μεταφορά ηλεκτρονίου $\text{bpy}^- \rightarrow \text{py-PTZ}^+$. Η άμεση $\text{py-PTZ} \rightarrow \text{bpy}$ LLCT μετάπτωση είναι εξαιρετικά ασθενής. Να σημειωθεί ότι ο οξειδωμένος L^+ μπορεί να υποστεί χημικές αντιδράσεις, που μπορούν να οδηγήσουν σε συνθετική ή καταλυτική χρήση [52].

Στις MLCT μεταπτώσεις συζητήσαμε την επίδραση των ισχυρά π-δεκτικών αξονικών υποκαταστατών. Όμως, οι π-δοτικοί υποκαταστάτες επηρεάζουν τη φύση των διεγερμένων καταστάσεων. Έτσι, η αύξηση της π-δοτικής ικανότητας ενός αξονικού υποκαταστάτη μας επιτρέπει τη ρύθμιση της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης από MLCT σε LLCT, μέσω της μίξης των κατειλημμένων dπ τροχιακών του μετάλλου και των ρπ τροχιακών του αξονικού υποκαταστάτη. Αυτό παρατηρείται άμεσα στα σύμπλοκα όπου ο αξονικός υποκαταστάτης είναι κάποιο αλογονίδιο. Συγκεκριμένα, για τα σύμπλοκα *fac-Re(CO)₃(α-διιμίνη)Cl* τα HOMO τροχιακά έχουν κυρίως dπ χαρακτήρα μετάλλου, κάτι που οδηγεί σε μία $\text{Re} \rightarrow \pi^*(\alpha\text{-διιμίνη})$ MLCT μετάπτωση, ενώ για τα αντίστοιχα ιώδο-σύμπλοκα τα HOMO τροχιακά έχουν κυρίως χαρακτήρα ρπ, που οδηγεί σε μία $\text{L} \rightarrow \pi^*(\alpha\text{-διιμίνη})$ LLCT μετάπτωση [53].

❖ **Μετάπτωση από το Re(I)-L σ-δεσμικό τροχιακό προς το αντιδεσμικό σπ* της α-διιμίνης (SBLCT)**

Σύμπλοκα με αξονικούς υποκαταστάτες που έχουν ένα υψηλά κείμενο ενεργειακό τροχιακό, όπως είναι τα αλκυλικά, τα βενζυλικά, ή τα μεταλλικά τμήματα σχηματίζουν ομοιοπολικούς σ-δεσμούς M-L. Το αντίστοιχο κατειλημμένο σ-δεσμικό τροχιακό συχνά βρίσκεται ενεργειακά υψηλότερα από

τα dπ τροχιακά του μετάλλου και ως εκ τούτου οδηγεί σε μια $\sigma \rightarrow \pi^*$ χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση. Αυτός ο τύπος μετάπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετική φωτοχημική δραστικότητα, εξαιτίας της ομόλυσης του δεσμού M-L, παράγοντας ρίζα L.

❖ Ενδομοριακές π-π* μεταπτώσεις στο εσωτερικό της α-διιμίνης (IL)

Όπως είδαμε, όλες οι παραπάνω μεταπτώσεις αφορούν τη διέγερση στο π^* τροχιακό της διιμίνης. Επομένως, δομικές διαφοροποιήσεις στον υποκαταστάτη της α-διιμίνης θα μας επιτρέψουν τη ρύθμιση των ιδιοτήτων των διεγερμένων καταστάσεων.

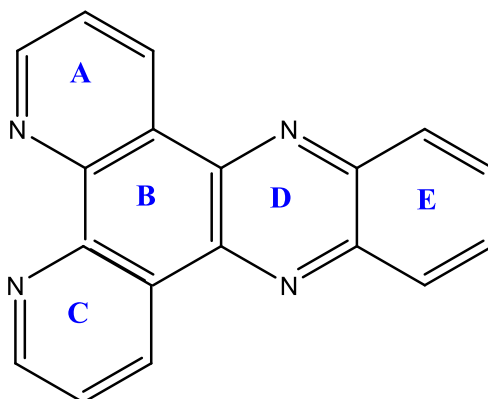
Τα σύμπλοκα του τύπου $[\text{Re}(\alpha\text{-διιμίνη})(\text{CO})_3\text{Cl}]$ (όπου α-διιμίνη = phen, bry) είναι γνωστό ότι κατέχουν μια MLCT ως τη χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση. Όμως, η ένταξη ενός εκτεταμένου και απεντοπισμένου π αρωματικού συστήματος, όπως ο dprz, έχει ως αποτέλεσμα περισσότερο πολύπλοκες και πολλαπλές διεγερμένες καταστάσεις, και η απόδοση της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης αυτών των συμπλόκων είναι λιγότερο ξεκάθαρη. Αυτές οι καταστάσεις μπορούν να θεωρηθούν ότι είναι: IL($\pi \rightarrow \pi^*$), φαινανθρολινικού χαρακτήρα MLCT [MLCT(phen)] και φαιναζινικού χαρακτήρα MLCT [MLCT(rhz)]. Οι δύο MLCT δείχνουν να έχουν τελείως διαφορετικές κβαντικές αποδόσεις εκπομπής. Η MLCT(phen) εκπέμπει φωταύγεια (emissive MLCT), ενώ η MLCT(rhz) όχι, για το λόγο αυτό καλείται «σκοτεινή» κατάσταση (dark state) [54].

Η φύση της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης των συμπλόκων με τέτοιους υποκαταστάτες (όπως ο dprz) θα καθοριστεί από τις σχετικές ενέργειες των καταστάσεων μεταφοράς φορτίου και των IL καταστάσεων, οι οποίες εξαρτώνται, όχι μόνο από τη διιμίνη, αλλά και από τον αξονικό υποκαταστάτη ή ακόμα και από το διαλύτη ή τη θερμοκρασία. Γενικά, ο IL χαρακτήρας της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης ενισχύεται παρουσία ασθενών σ-δοτικών και ισχυρών π-δεκτικών αξονικών υποκαταστατών, όπως οι φωσφίνες, τα νιτρίλια ή τα ισονιτρίλια, τα οποία μετατοπίζουν τις καταστάσεις μεταφοράς φορτίου σε υψηλότερη ενέργεια. Όμως, σύμπλοκα με π-ουδέτερους ή π-

δοτικούς αξονικούς υποκαταστάτες μπορεί να έχουν περισσότερο αμφιλεγόμενη φωτοφυσική συμπεριφορά [55].

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

Ο υποκαταστάτης dppz αποτελείται από πέντε αρωματικούς δακτυλίους (Σχήμα: 3.4). Η ηλεκτρονιακή δομή του dppz έχει δύο χαμηλά μη συμπληρωμένα μοριακά τροχιακά με ξεχωριστές χωρικές κατανομές, ένα που ονομάζεται $b_1(\psi)$, επεκτείνεται σ' όλο τον ABC δακτύλιο και συχνά αναφέρεται ως $\pi^*(phen)$ μοριακό τροχιακό. Έχει σημαντικό εύρος στο χηλικό άτομο του αζώτου αλλά σχεδόν κανένα στα άζωτα της φαιναζίνης. Η δεύτερη που ονομάζεται $b_1(\rho hz)$ επεκτείνεται σ' όλο το δακτύλιο BDE με σημαντικό εύρος στα άτομα του αζώτου της φαιναζίνης αλλά σε κανένα από τα χηλικά άτομα του αζώτου.

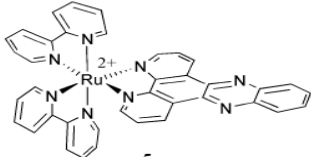
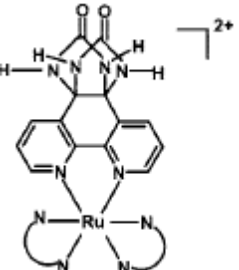
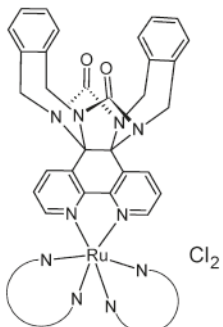


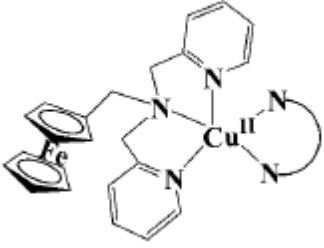
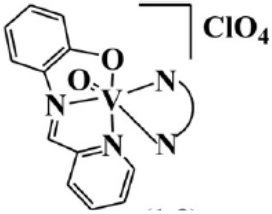
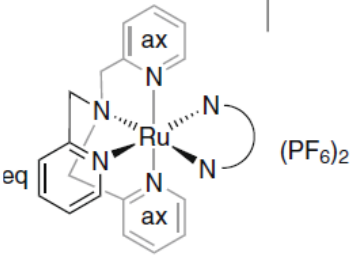
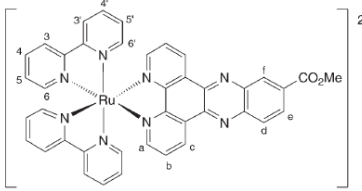
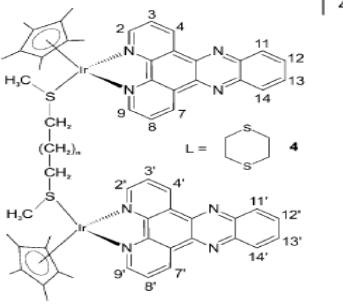
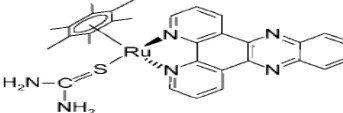
Σχήμα 3.4: Δομή Dppz.

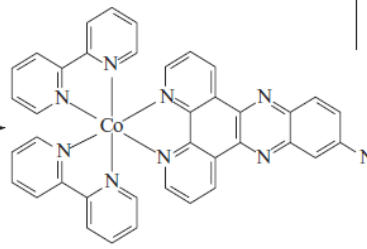
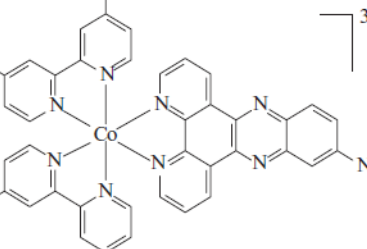
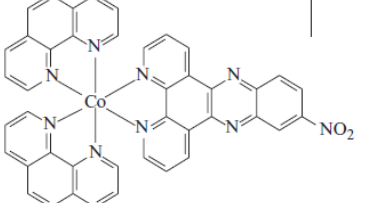
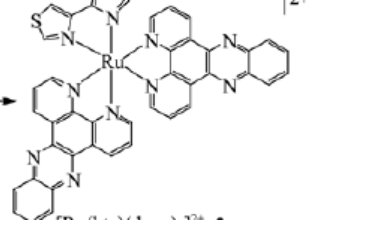
Σύμπλοκα με υποκαταστάτες dppz μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις εκπομπής ηλεκτροφωταύγειας σε οργανικές συσκευές εκπομπής φωτός και ως υποστρώματα για τη σύνθεση πολυμερών [56]. Ο υποκαταστάτης αυτός έχει τέτοια δομή που επιτρέπει τη σύνδεση του συμπλόκου στο DNA μέσω παρεμβολής, επιτρέποντας έτσι στη διεγερμένη κατάσταση του συμπλόκου να επιδείξει το φαινόμενο του μοριακού διακόπτη φωτός 'light switch effect'. Αυτό διασφαλίζει μια πιο ξεκάθαρη φωτοφυσική συμπεριφορά του συμπλόκου, καθώς δεν υπάρχουν και άλλες MLCT διεγερμένες καταστάσεις σε κοντινά ενεργειακά επίπεδα μεταξύ τους. Τα περισσότερα από αυτά τα σύμπλοκα είναι πολλά υποσχόμενα για την θεραπεία καρκινικών όγκων και χρησιμοποιούνται

ως φάρμακα στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ορισμένα σύμπλοκα μετάλλων με υποκαταστάτες dppz.

Πίνακας: 3.1 Σύμπλοκα Μετάλλων με υποκαταστάτες dppz και τρόπος αλληλεπίδρασης τους με το DNA.

Σύμπλοκο	Δομή	Τρόπος αλληλεπίδρασης	Αναφορά
$[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$		Παρεμβολή	57
$[Ru(dppz)_2(BPG)]Cl_2 \cdot 4H_2O$		Παρεμβολή	58
$[Ru(dppz)_2(bxbg)]Cl_2$		Παρεμβολή	59

$[\text{Cu}(\text{FcCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{Py})_2(\text{dppz}))]$ $(\text{ClO}_4)_2$		Παρεμβολή	60
$[\text{VO}(\text{L})(\text{dppz})](\text{ClO}_4)$		Παρεμβολή	61
$[(\text{tpa})\text{Ru}(\text{dpq})](\text{PF}_6)_2$		Παρεμβολή	62
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz}-11\text{-CO}_2\text{Me})]^{2+}$		Παρεμβολή	63
$[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{Ir}(\text{dppz})\}_2]$ $(\mu\text{-L})(\text{CF}_3\text{SO}_3)_4$		Παρεμβολή	64
$[(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{dppz})\text{-}$ $\{(\text{NH}_2)_2\text{CS}\}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$		Παρεμβολή	65

$[\text{Co}(\text{bpy})_2(7\text{-NO}_2\text{-dppz})]^{3+}$		Παρεμβολή	66
$[\text{Co}(\text{dmb})_2(7\text{-NO}_2\text{-dppz})]^{3+}$		Παρεμβολή	67
$[\text{Co}(\text{phen})_2(7\text{-NO}_2\text{-dppz})]^{3+}$		Παρεμβολή	67
$[\text{Ru}(\text{btz})(\text{dppz})_2](\text{ClO}_4)_2$		Παρεμβολή	67

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ (PDT)

4.1 Τι είναι η φωτοδυναμική θεραπεία

Η μεγάλη αύξηση των περιστατικών καρκίνων όσο περνούν τα χρόνια έχει οδηγήσει στην ανάγκη για νέες πιο αποτελεσματικές θεραπείες. Παρ' όλο που υπάρχουν αξιόπιστες θεραπείες για τον καρκίνο, η έλλειψη εκλεκτικότητας έχει στρέψει την έρευνα σε εναλλακτικές θεραπείες πιο στοχευμένες. Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια από αυτές η οποία βασίζεται στον αποτελεσματικό συνδυασμό τριών μη-τοξικών συστατικών: του φωτός, του οξυγόνου και ενός φαρμάκου-φωτοευαισθητοποιητή [68].

Η ικανότητα του φαρμάκου να καταλαμβάνει τα καρκινικά κύτταρα και να γίνεται δραστικό μόνο μετά από έκθεση του φωτός καθορισμένης συχνότητας, δίνει στην θεραπεία αυτή, το πλεονέκτημα της αποφυγής βλαβών των υγιών κυττάρων, που είναι και το ζητούμενο οποιασδήποτε θεραπείας [69-70].

4.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PDT

Οι έρευνες έχουν δείξει ότι με τη φωτοδυναμική θεραπεία μπορούμε να έχουμε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση μ' ένα χειρουργείο ή με τις ακτινοβολίες, ανάλογα με το είδος του καρκίνου. Η PDT όμως, συγκρινόμενη με άλλες θεραπείες έχει κάποια βασικά πλεονεκτήματα, όπως:

- Δεν έχει μακροχρόνιες παρενέργειες.
- Δεν είναι επεμβατική σε σχέση με ένα χειρουργείο.
- Συνήθως παίρνει λίγο χρόνο και δεν χρειάζεται νοσηλεία.
- Μπορεί να στοχεύσει με μεγάλη ακρίβεια.
- Σε αντίθεση με τις ακτινοβολίες, μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές στο ίδιο σημείο αν χρειαστεί.
- Μετά την επούλωση της πληγής δεν υπάρχουν σημάδια.
- Κοστίζει πολύ λιγότερο από τις άλλες θεραπείες.

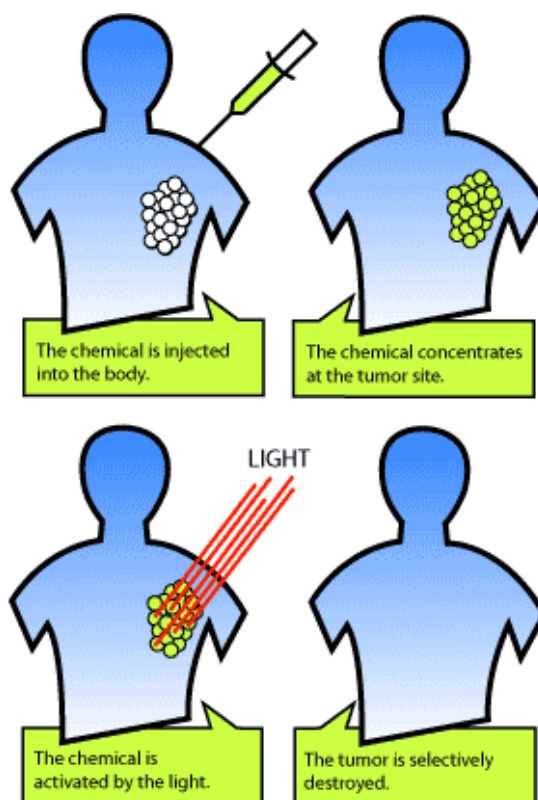
Υπάρχουν όμως και κάποιοι περιορισμοί:

- Η PDT θεραπεύει μόνο περιοχές που μπορεί να φτάσει το φως. Αυτό σημαίνει ότι αφορά προβλήματα του δέρματος ή κάτω από αυτό ή στην επιφάνεια των οργάνων όπου μπορεί να φτάσει η πηγή του φωτός. Επειδή, η ορατή ακτινοβολία δεν μπορεί να φτάσει σε βάθος σε όλους τους ιστούς, η PDT δεν είναι αποτελεσματική σε μεγάλες καρκινικές περιοχές που είναι βαθιά μέσα στο δέρμα ή σε άλλα όργανα.
- Η PDT δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καρκίνους που έχουν εξαπλωθεί σε πολλά σημεία.
- Λόγω των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται, οι ασθενείς έχουν μεγάλη ευαισθησία στο φως, γι' αυτό πρέπει να πάρουν προφυλάξεις και να προστατευτούν.

Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι η PDT εφαρμόζεται σε ασθενείς με συγκεκριμένους τύπους καρκίνου όπως του δέρματος, του οισοφάγου, της ουροδόχου κύστεως, ώστε να τους βοηθήσει να ζήσουν περισσότερο και να βελτιώσουν την ποιότητα της ζωής τους. Συγκεκριμένα, Μολονότι δεν προκαλεί σοβαρές παρενέργειες, δεν είναι ευρέως διαδεδομένη θεραπεία του καρκίνου αλλά την εφαρμόζουν μόνο σε κάποια κέντρα θεραπείας της Ευρώπης και της Αμερικής, ενώ παράλληλα συνεχίζονται οι κλινικές δοκιμές [71-72].

4.3 Μηχανισμός της PDT

Ο μηχανισμός της δράσης του φαρμάκου περιλαμβάνει την πρόσληψη του φαρμάκου από τον ασθενή, συνήθως ενδοφλέβια. Ο ευαισθητοποιητής απορροφάται απ' όλα τα κύτταρα του σώματος αλλά παραμένει περισσότερο χρόνο στα καρκινικά. Έπειτα κατά την ακτινοβολήση το φάρμακο προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο είτε καταστρέφοντας τα κύτταρα είτε μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 4.1).

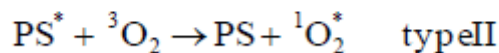
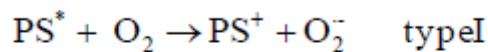


Σχήμα 4.1: Αναπαράσταση των σταδίων της θεραπείας [73].

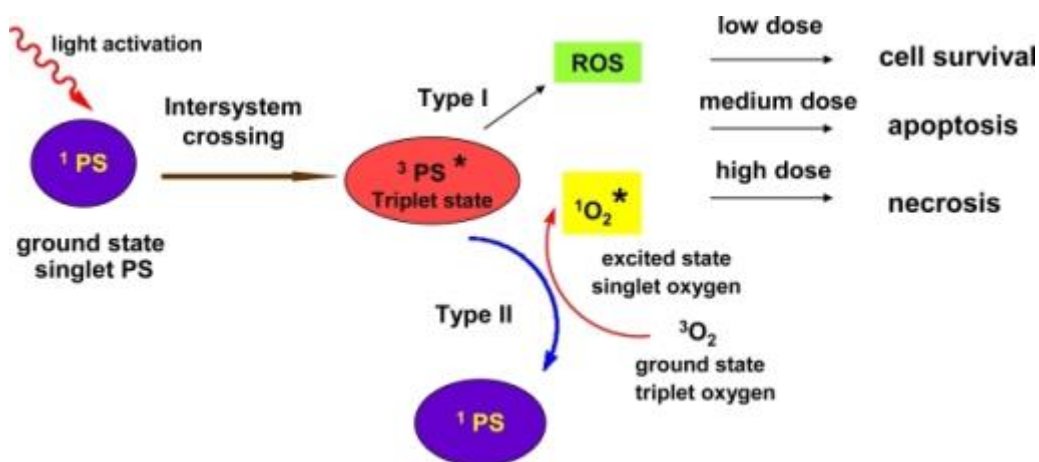
Το φως, συγκεκριμένου μήκους κύματος, διεγείρει τον ευαισθητοποιητή από την θεμελιώδη κατάσταση σε μια απλή διεγερμένη κατάσταση. Τα μόρια θα μεταπέσουν σε χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της κατάστασης αυτής μέσω δονητικής αποδιέγερσης (VR). Από την S_1 το σύστημα επιστρέφει στη θεμελιώδη κατάσταση (S_0) με εκπομπή ακτινοβολίας (φθορισμός). Κάποια μόρια, όμως, μέσω ενδοσυστηματικής διασταύρωσης (intersystem crossing – ISC) μπορούν να μεταπέσουν σε μια τριπλή κατάσταση (T_1) όπου για να επιστρέψουν στην θεμελιώδη κατάσταση υπάρχουν δυο μονοπάτια.

- Τύπος 1: μεταφορά ηλεκτρονίου (του φωτοευαισθητοποιητή) στο μοριακό οξυγόνο το οποίο ανάγεται σε υπεροξειδικά ανιόντα ή σε άλλες συγγενείς ρίζες που προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο.
- Τύπος 2: μεταφορά ενέργειας από την τριπλή κατάσταση του φαρμάκου στο μοριακό οξυγόνο, παράγοντας μονήρες οξυγόνο, όπου έχει βραχύβιο χρόνο ζωής αλλά είναι εξαιρετικά δραστικό [74-76].

Παρακάτω δίδονται οι εξισώσεις:



[77]



Σχήμα 4.2: Αναπαράσταση του μηχανισμού της PDT [78].

Με βάση τα παραπάνω η φωτοχημική αντίδραση τύπου I είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο οξυγόνο ή άλλα γειτονικά μόρια, προς σχηματισμό ριζικών ανιόντων. Οι ρίζες αυτές μπορούν να αντιδράσουν με το μοριακό οξυγόνο (3O_2) και να παράγουν ROS (reactive oxygen species). Τέτοιου τύπου αντιδράσεις οδηγούν στον σχηματισμό ανιόντων υπεροξειδίου (O_2^-) ή ριζών αυτού ($O_2^{\cdot-}$) μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου του φωτοευαισθητοποιητή στο (3O_2). Τα ανιόντα αυτά δεν είναι πολύ δραστήρια εντός βιολογικών συστημάτων, αλλά μπορούν να αντιδρούν προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 , το οποίο διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες και προκαλεί καταστροφές κυτταρικών συμπλεγμάτων [75] [79].

Η μεταφορά ενέργειας και όχι ηλεκτρονίου στο 3O_2 αποτελεί την αντίδραση τύπου II. Στον τύπο II συμβαίνει η απευθείας αντίδραση της διεγερμένης τριπλής κατάστασης του φωτοευαισθητοποιητή με τη θεμελιώδη κατάσταση

του μοριακού οξυγόνου προς singlet oxygen, το οποίο εμπλέκεται στον κυτταρικό τραυματισμό και στη συνέχεια στον κυτταρικό θάνατο.

Στο σημείο αυτό, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η τύπου II αντίδραση φαίνεται να υπερισχύει της I όσον αφορά την κυτταρική καταστροφή, το οποίο προκύπτει από την αμεσότητα τη αλληλεπίδρασης του ακτινοβολημένου φωτοευαίσθητοποιητή και του μοριακού οξυγόνου, όπως περιγράψαμε παραπάνω [79,80].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

5.1 Υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich και Alfa Aesar. Το ρήνιο αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich ως πεντακαρβόνυλο χλωρορήνιο (I) $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$. Οι διαλύτες ήταν pro analysis και αγοράστηκαν από τις εταιρείες Merck και Carlo Erba, και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Για τα πειράματα αλληλεπίδρασης με το DNA χρησιμοποιήθηκε φυσικό DNA από θυμό αδένα βοοειδούς (calf thymus DNA, CT-DNA) που αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich ως μετά νατρίου άλας. Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε το tris-[hydroxymethyl]-aminomethane free base (Tris Base) και το αντίστοιχο υδροχλωρικό άλας (Tris-HCl) αγοράστηκαν από την εταιρεία Alfa Aesar. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν σε νερό milli Q, από την συσκευή milli-Q του εργαστηρίου της Χημείας Περιβάλλοντος.

5.2 Μέθοδοι χαρακτηρισμού συμπλόκων

Φασματοσκοπία Ορατού-Υπεριώδους (UV-vis)

Τα φάσματα απορρόφησης ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Cary 300E (Varian) συνδεδεμένο με Η/Υ σε κυψελίδες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1.000cm.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Τα φάσματα ^1H -NMR ελήφθησαν σε Varian Unity NMR 300MHz με σωληνάκια NMR 5mm, με δευτεριωμένους διαλύτες σε θερμοκρασία δωματίου.

Φασματοσκοπία Υπερύθρου IR

Τα IR φάσματα ελήφθησαν σε στερεά κατάσταση σε δισκία KBr σε φασματοφωτόμετρο υπερύθρου IRAffinity-1 Shimadzu, στην περιοχή από 4000 έως 400cm⁻¹.

Φασματοσκοπία Εκπομπής

Τα φάσματα εκπομπής ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu Spectrofluorophotometer RF-5301PC με κυψελίδες τετραπλής διαδρομής 1cm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Κυκλική Βολταμετρία (CV)

Τα κυκλικά βολταμμογραφήματα ελήφθησαν με ποτενσιοστάτη τύπου AFCBP1 από την Pine Instrument Company. Συγκεκριμένα τα δείγματα ήταν σε συγκέντρωση 10⁻³-10⁻⁴ M σε DMSO και milliQ, με φέροντα ηλεκτρολύτη (nBu₄N)PF₆. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε Ag/AgCl, ως ηλεκτρόδιο εργασίας υαλώδους άνθρακα και ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο σύρμα λευκόχρυσου. Όλα τα δυναμικά διορθώθηκαν ως προς φερροκένιο (Fc⁺/Fc) στα οργανικά και ως προς K₂[Fe(CN)₆] στα υδατικά διαλύματα.

5.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης συμπλόκων με DNA

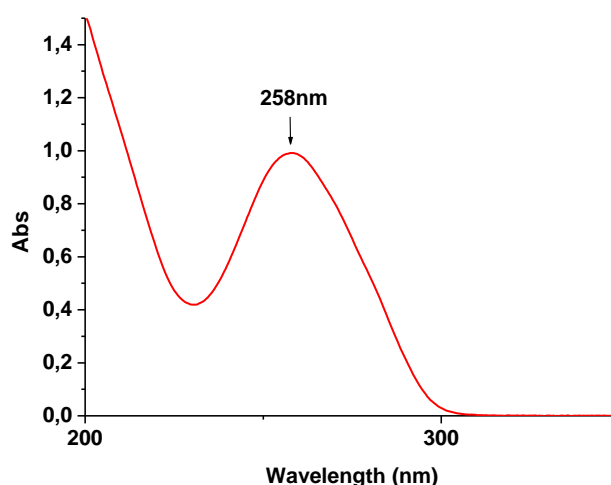
5.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (5mM) με NaCl (50mM), pH=7.0

Ζυγίστηκαν 0.394g Tris-HCl ($M_r=157.60$) και 1.461g NaCl και διαλύθηκαν σε 400mL H_2O . Τέλος, το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη στάγδην διαλύματος NaOH 1M στο 7.0 και συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 500 mL.

Παρασκευή διαλύματος C.T.-DNA

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα DNA, με διάλυση 5mg φυσικών ινών DNA από θύμο αδένος βοοειδούς (C.T.-DNA) σε 5ml NaCl (πάντα αναλογία 1:1) και αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 ώρες, στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος DNA που προέκυψε μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης, από τη σχέση Lambert-Beer $A=\epsilon \cdot b \cdot c$. Γνωρίζοντας το συντελεστή μοριακής απορρόφησης της κορυφής στα 258 nm που είναι $6600 M^{-1} cm^{-1}$, η συγκέντρωση ήταν της τάξης των $10^{-3} M$. Η παραμονή του πυκνού διαλύματος στο ψυγείο δεν θα πρέπει να ξεπεράσει τις 4-5 ημέρες και σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να επανελέγχεται με φασματοσκοπία UV- vis.



Σχήμα 5.1: Διάγραμμα απορρόφησης διαλύματος DNA.

5.3.2 Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν

Τιτλοδότηση UV-vis

Για την τιτλοδότηση παρασκευάστηκε μια σειρά από διαλύματα τα οποία είχαν σταθερή συγκέντρωση συμπλόκου με διαφορετική συγκέντρωση DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα, όπου μετρήθηκε η απορρόφησή τους. Οι λόγοι $R=[DNA]/[complex]$ που μετρήθηκαν ήταν $R=0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15$. Τα φάσματα ελήφθησαν στην περιοχή 200-800 nm, με κυψελίδα οπτικής διαδρομής $d=1\text{ cm}$, σε θερμοκρασία 25°C .

Τα πειραματικά δεδομένα από την τιτλοδότηση UV-vis προσαρμόζονται στην εξίσωση 5.1, προκειμένου να υπολογιστεί η σταθερά σύνδεσης K_b .

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{k_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (5.1)$$

Όπου:

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

ϵ_a : συντελεστής μοριακής απορρόφησης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος του κάθε διαλύματος (υπολογίζεται ως $A_{obs}/[complex]$),

ϵ_b : συντελεστής μοριακής απορρόφησης του δεσμευμένου με το DNA συμπλόκου,

ϵ_f : συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ελεύθερου (μη δεσμευμένου) συμπλόκου.

Με την βοήθεια της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων υπολογίζεται η σταθερά σύνδεσης K_b από τον λόγο της κλίσης προς την τομή, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα OriginPro 9.

Ιξωδομετρία

Οι αλλαγές στη δομή του DNA που προκαλούνται όταν αυτό συνδέεται με άλλα μόρια ή ιόντα, αποτελούν ισχυρή απόδειξη όχι μόνο της ύπαρξης αλληλεπίδρασης, αλλά και του είδους της. Η Ιξωδομετρία είναι η κατεξοχήν υδροδυναμική μέθοδος για την διερεύνηση αυτών των αλληλεπιδράσεων, επειδή είναι πολύ ευαίσθητη στις μεταβολές της δομής και του μήκους των αλυσίδων των μακρομορίων, π.χ. DNA. Είναι δυνατόν με τις μετρήσεις του ιξώδους να προσδιοριστεί το είδος της αλληλεπίδρασης αν είναι δηλαδή παρεμβολή, δέσμευση στην μικρή ή στην μεγάλη αύλακα κ.α.

Οι μετρήσεις του ιξώδους πραγματοποιήθηκαν σε θερμοστατούμενο ιξωδόμετρο SI Analytics στους 25 °C. Τα διαλύματα παρασκευάζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη τεχνική.

Το σχετικό ιξώδες υπολογίζεται από τη σχέση: $n=(t-t_0)/t_0$,

όπου t ο χρόνος ροής του κάθε διαλύματος και t_0 ο χρόνος ροής του διαλύτη σε sec. Η αύξηση του μήκους της έλικας του DNA υπολογίστηκε από τα πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τη προσεγγιστική σχέση:

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

όπου L , L_0 : το πειραματικό μήκος του DNA, παρουσία και απουσία συμπλόκου, αντίστοιχα.

n , n_0 : τα σχετικά ιξώδη (για τις συγκεντρώσεις του πειράματος θεωρούνται κατά προσέγγιση ίσα με το ανηγμένο ιξώδες) παρουσία και απουσία συμπλόκου, αντίστοιχα.

t , t_{DNA} και t_0 : οι χρόνοι ροής των διαλυμάτων DNA παρουσία του συμπλόκου, του διαλύματος DNA απουσία του συμπλόκου και του διαλύτη (ρυθμιστικό διάλυμα), αντίστοιχα.

Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού (CD)

Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού ελήφθησαν σε διχρωγράφο Jasco J-815 CD συνδεδεμένο με Η/Υ (στο ινστιτούτο βιολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος) στην περιοχή 200-400nm με βήμα 0.2nm και ροή N₂ υπό πίεση 10barr. Τα διαλύματα του DNA προετοιμάστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που αναφέρεται παραπάνω, με συγκέντρωση ως προς DNA ίση με 5·10⁻⁵ M, ίδιες αναλογίες R και συνολικό όγκο διαλυμάτων 3 mL. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα και ο οργανικός διαλύτης ή το H₂O. Τα διαλύματα αφέθηκαν προς επώαση 24 ώρες και μετρήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 25 °C.

Φθορισμομετρία με EB

Ο φθορισμός χρησιμοποιείται με σκοπό τη μεταβολή της έντασης φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου-EB, ενός χρωμοφόρου μορίου που συνδέεται ισχυρά στο DNA. Ο φθορισμός του αυξάνεται παρουσία DNA λόγω της ισχυρής του παρεμβολής ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων. Πειραματικά, η ένταση του φθορισμού του EB μειώνεται όταν ένα δεύτερο μόριο δρα ανταγωνιστικά με το αιθίδιο, κυρίως μέσω παρεμβολής. Η σταθερά απόσβεσης K_{sv} υπολογίζεται από την σχέση της εξίσωσης Stern-Volmer:

$$(I/I_0) = 1 + K_{sv}[Q]$$

Όπου,

I₀: η ένταση του φθορισμού απουσία συμπλόκου,

I: η ένταση του φθορισμού παρουσία συμπλόκου,

K_{sv}: η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer και

Q: η συγκέντρωση του συμπλόκου σε κάθε λόγο.

Τα φάσματα φθορισμού ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu Spectrofluorophotometer RF-5301PC με κυψελίδες τετραπλής διαδρομής 1.000 cm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Κυκλική Βολταμμετρία

Οι μετρήσεις της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA στα πειράματα της κυκλικής βολταμμετρίας, πραγματοποιήθηκαν στον ίδιο ποτενσιοστάτη όπως αναφέρεται παραπάνω χρησιμοποιώντας τα ίδια ηλεκτρόδια. Ο φέρων ηλεκτρολύτης του ρυθμιστικού διαλύματος ήταν το NaCl.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

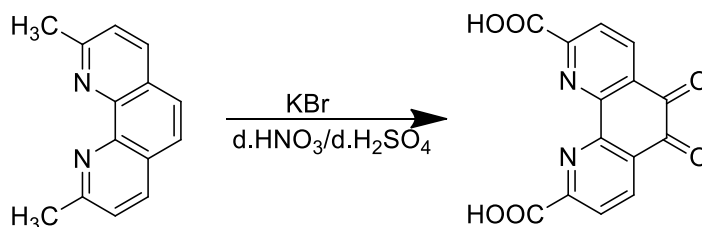
6.1 Σύνθεση του υποκαταστάτη

Για τη σύνθεση του επιθυμητού υποκαταστάτη di-COOH-dppz (διπύριδο[3,2-α:2',3'-c]φαιναζινο-3,6-δικαρβοξυλικό οξύ) συντέθηκε πρώτα μια ενδιάμεση διόνη (5,6-διοξο-1,10-φαινανθρολίνη-2,9-δικαρβοξυλικό οξύ). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η 1.10 νεοκουπρούνη.

Πιο αναλυτικά, σε γουδί αναμείχθηκε 500 mg (2.30 mmol) νεοκουπρούνης και 410 mg (3.45 mmol) βρωμιούχου καλίου, μέχρι να γίνει ομοιογενές το στερεό. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκαν 2.5 mL π. HNO₃ και 5 mL π. H₂SO₄ και το μίγμα ψύχθηκε. Σε σφαιρική φιάλη των 50mL προστέθηκε μαγνητικός αναδευτήρας και το προς αντίδραση στερεό. Κατόπιν προστέθηκαν στάγδην τα οξέα. Στη σφαιρική φιάλη εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και αφήνεται σε ελαιόλουτρο υπό βρασμό και ανάδευση για 3 ώρες. Το μίγμα διηθήθηκε υπό κενό και παραλήφθηκε ένα μπεζ στερεό. Θεωρούμε ότι η αντίδραση έγινε ποσοτικώς.

Η ένωση χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία ¹H-NMR και ταυτίστηκε με τη βιβλιογραφία ώστε να ακολουθήσει το τελικό στάδιο της σύνθεσης του υποκαταστάτη [81].

Πορεία αντίδρασης:

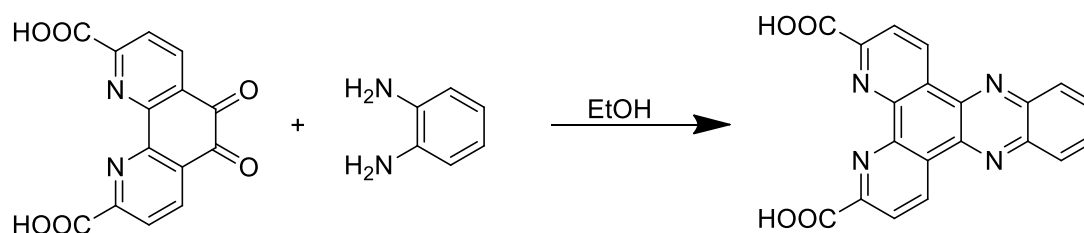


Σχήμα 6.1: Αντίδραση παρασκευής του υποκαταστάτη (1ο στάδιο).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του επιθυμητού υποκαταστάτη. Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστέθηκαν 394.88 mg (1.333 mmol) διόνης και 27 mL αιθανόλης. Σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 144.3 mg (1.334 mmol) ο-φαινυλενοδιαμίνης με 27mL αιθανόλης. Έπειτα προστέθηκαν στη σφαιρική η αμίνη και εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας. Στα πρώτα 10 λεπτά περίπου σχηματίστηκε αρκετό ίζημα και η ανάδευση έγινε δυσκολότερη, γι' αυτό προστέθηκαν άλλα 14 mL αιθανόλης. Ο βρασμός υπό ανάδευση συνεχίστηκε για 24 ώρες. Το τελικό χρώμα του στερεού ήταν μπεζ και του διηθήματος πορτοκαλί. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε διήθηση από ηθμό Buchner όπου εκεί παρέμεινε το στερεό και αφέθηκε για μία ακόμη ημέρα ώστε να ολοκληρωθεί η ξήρανσή του. Ο χαρακτηρισμός της ένωσης πραγματοποιήθηκε με χρήση φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ και φασματοσκοπίας IR [82].

❖ Απόδοση 80,4% (396,6mg)

Πορεία αντίδρασης:



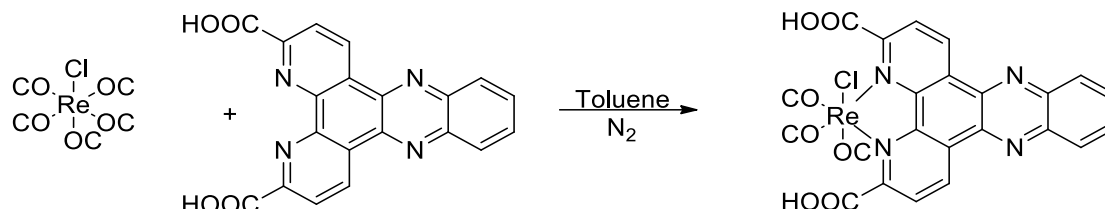
Σχήμα 6.2: Αντίδραση σύνθεσης του υποκαταστάτη (2ο στάδιο).

6.2 Σύνθεση των συμπλόκων

Για τη σύνθεση του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{di-COOH-dppz})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ (**1**) χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό αντιδραστήριο το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$. Πιο συγκεκριμένα σε σφαιρική φιάλη των 200 mL τοποθετήθηκαν 90 mL απαερωμένο τολουόλιο, $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ 97.65 mg (0.27 mmol) και 100 mg (0.27 mmol) di-COOH-dppz. Εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και αφήνεται το μείγμα υπό βρασμό για 24 ώρες. Στα πρώτα 10 λεπτά το διάλυμα χρωματίστηκε καφέ. Το χρώμα του στερεού που παραλήφθηκε μετά από τη διήθηση με Buchner ήταν πράσινο. Με φασματοσκοπία NMR διαπιστώθηκε ότι το στερεό αυτό δεν ήταν καθαρό. Για τον καθαρισμό προτιμήθηκε ανακρυστάλλωση με μεθανόλη.

❖ Απόδοση 90,5% (165,16 mg)

Πορεία αντίδρασης:

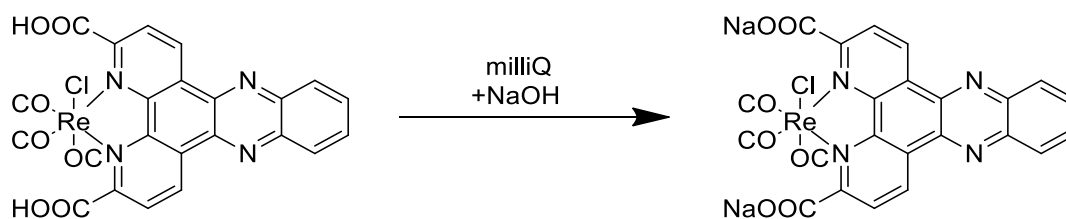


Σχήμα 6.3: Αντίδραση παρασκευής του συμπλόκου (1).

ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Για την παρασκευή του συγκεκριμένου συμπλόκου αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 το σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$ και ο υποκαταστάτης di-COOH-dppz. Επιπλέον είναι σημαντικό η αντίδραση να πραγματοποιηθεί απουσία οξειδάνου γιατί υπάρχει κίνδυνος να οξειδωθεί το μέταλλο. Το τελικό σύμπλοκο που προκύπτει διαθέτει οκταεδρική γεωμετρία και είναι χαμηλού spin.

Για τη σύνθεση του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$ (2) χρησιμοποιήθηκε το σύμπλοκο (1) και H_2O ελαφρώς βασικό. Συγκεκριμένα, αποτελεί την συζυγή βάση του αρχικού ασθενούς οξέος.



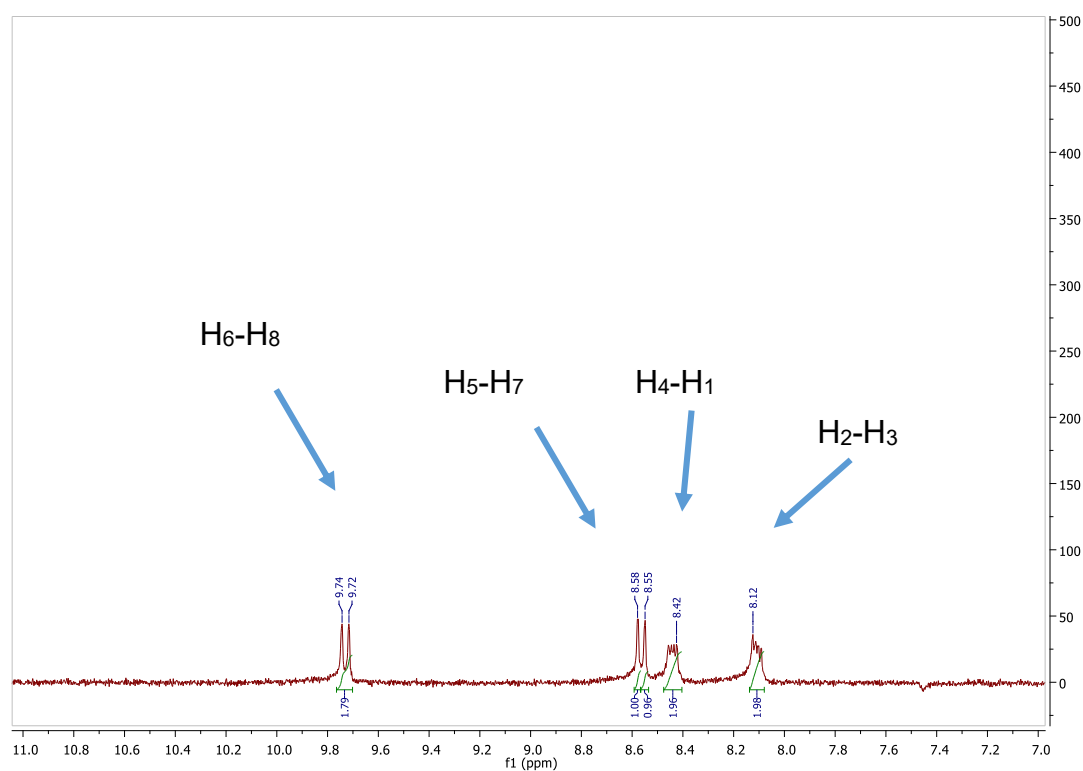
Σχήμα 6.4: Αντίδραση παρασκευής του συμπλόκου (2).

6.3 Μέθοδοι χαρακτηρισμού των συμπλόκων

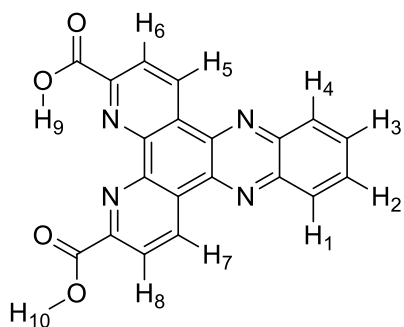
Το σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COOH})]$ χαρακτηρίστηκε πλήρως με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, IR, UV-vis, φθορισμό και κυκλική βολταμμετρία, ενώ το $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COONa})]$, καθώς παρελήφθει μόνο σε υδατικό διάλυμα, μελετήθηκε με UV-vis, φθορισμό και κυκλική βολταμμετρία.

6.3.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

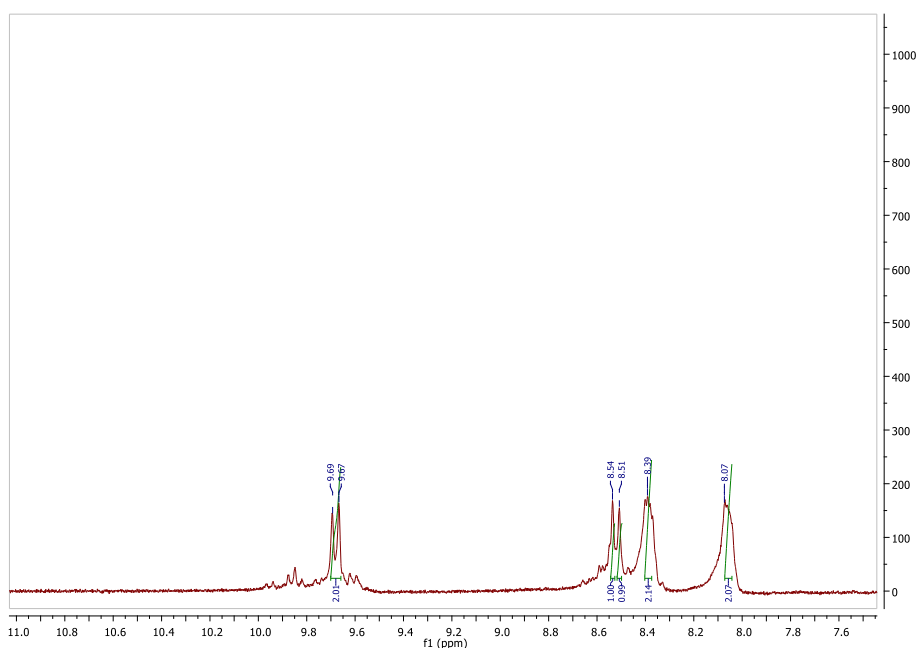
Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ελήφθη σε φασματοφωτόμετρο NMR της Varian 300MHz σε σωληνάκια NMR διαμέτρου 5mm.



Σχήμα 6.5: Φάσμα ελεύθερου di-COOH-dpprz.



Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO) για το ελεύθερο dppz εμφανίζει μια πολλαπλή κορυφή χημικής μετατόπισης 8.12 ppm, η οποία οφείλεται στα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου H_2 και H_3 τα οποία εμφανίζονται σε χαμηλότερα ppm σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Ακολουθούν τα πρωτόνια στα 8.42 ppm με μια κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια των H_1 και H_4 . Στα 8.55 και 8.58 ppm υπάρχει μια διπλή (d) που αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια H_5 και H_7 ενώ τα πρωτόνια H_6 και H_8 εμφανίζονται στα 9.72 και 9.74 ppm μέσω μιας διπλής (d).



Σχήμα 6.6: Φάσμα συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$.

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO), για το σύμπλοκο του ρηνίου με το dppz βρίσκεται σε πλήρη αντιστοιχία με αυτό του ελεύθερου dppz. Πιο συγκεκριμένα στα 8,02 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που οφείλεται στα απομακρυσμένα πρωτόνια H_2 και H_3 . Το σήμα στα 8.39 ppm που είναι μια τετραπλή(dd) κορυφή, αντιστοιχεί στα πρωτόνια H_1 και H_4 . Η διπλή (d) κορυφή

στα 8.51 και 8.54 ppm αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια H₅ και H₇. Τα πρωτόνια H₆ και H₈ εμφανίζονται στα 9.67 και 9.69 ppm μέσω μιας διπλής κορυφής(d) και είναι αυτά στα υψηλότερα ppm [83].

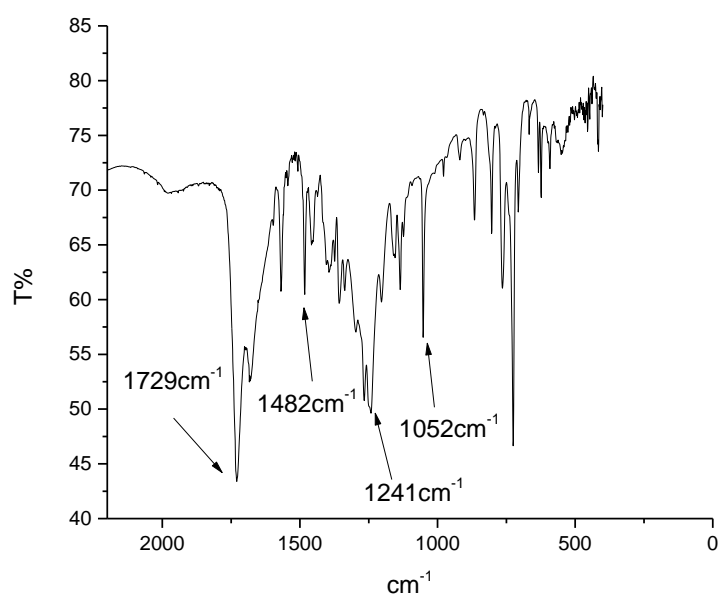
Πίνακας 6.1: Συγκριτικός πίνακας χημικών μετατοπίσεων

δ(ppm)		
Πρωτόνιο	Ελεύθερο dppz	[Re(di-COOH-dppz)(CO) ₃]Cl
H ₂ &H ₃	8.12	8.02
H ₁ &H ₄	8.42	8.39
H ₅ &H ₇	8.55-8.58	8.51-8.54
H ₆ &H ₈	9.72-9.74	9.67-9.69

6.3.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

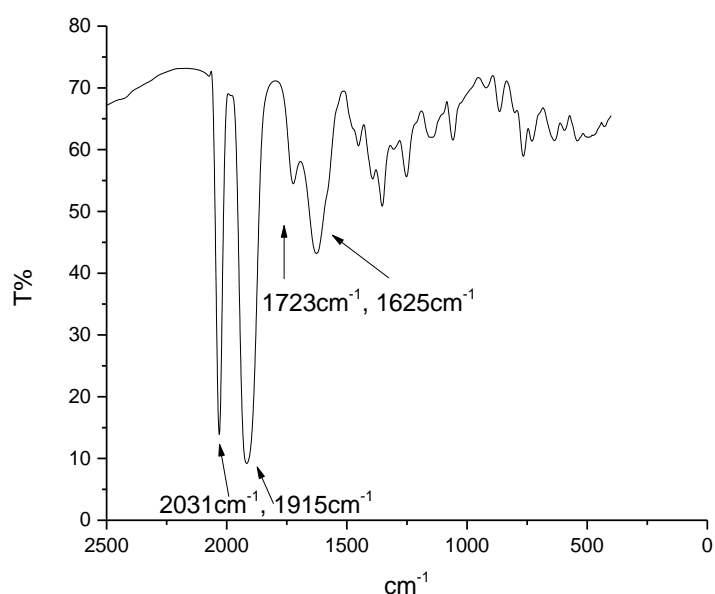
Τα φάσματα υπερύθρου ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο IRAffinity-1 Shimadzu σε περιοχή από 4000 έως 400 cm⁻¹ με δισκία KBr.

Στα σχήματα 6.7 και 6.8 παρατίθενται τα φάσματα IR του υποκαταστάτη και του συμπλόκου σε δισκίο KBr. Παρότι τα φάσματα είναι αρκετά πολύπλοκα υπάρχουν κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές που μας βοηθούν στην ταυτοποίηση τους. Πιο συγκεκριμένα στο σχήμα 6.7, αναγνωρίζουμε τις κορυφές δόνησης τάσης του C=O της καρβοξυλομάδας στα 1729 cm⁻¹ και στα 1678 cm⁻¹. Αντίστοιχα στα 1482 cm⁻¹, στα 1241 cm⁻¹ και στα 1052 cm⁻¹ εμφανίζονται οι κορυφές δόνησης του C-O.



Σχήμα 6.7: IR Φάσμα του υποκαταστάτη di-COOH-dpprz σε KBr.

Η συμπλοκοποίηση του υποκαταστάτη με το μεταλλικό κέντρο επιφέρει κάποιες μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη. Η χαρακτηριστική κορυφή τάσης του C=O του καρβοξυλικού οξέος στα 1729 cm^{-1} και 1678 cm^{-1} του ελεύθερου di-COOH-dpprz έχει πλέον μετατοπιστεί στα 1723 cm^{-1} και στα 1625 cm^{-1} υποδεικνύοντας τη σύμπλεξη του υποκαταστάτη στο μέταλλο. Οι κορυφές δόνησης του C=O εμφανίζονται στα 1354 cm^{-1} στα 1252 cm^{-1} και στα 1058 cm^{-1} . Επιπλέον εκτός των κορυφών του di-COOH-dpprz εμφανίζονται και ισχυρές κορυφές δόνησης τάσης των CO του τμήματος $\text{Re}(\text{CO})_3$. Η εντός επιπέδου συμμετρική δόνηση τάσης εμφανίζεται στα 2031 cm^{-1} , ενώ η εκτός επιπέδου συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση των ισημερινών CO, έχουν συγχωνευτεί και φαίνονται σαν μια στα 1915 cm^{-1} [84].



Σχήμα 6.8: IR Φάσμα του συμπλόκου σε KBr.

6.3.3 Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα απορρόφησης ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Cary 300E (Varian) συνδεδεμένο με Η/Υ σε κυψελίδες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1.000 cm.

Στο σχήμα 6.9 φαίνεται το φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαφορετικούς διαλύτες. Στα φάσματα όπου διαλύτης είναι το DMSO διακρίνονται 3 κύριες κορυφές εκ των οποίων οι 2 χαμηλής ενέργειας στα ~370 nm είναι ευρείες και χαμηλής έντασης, και η τρίτη υψηλής ενέργειας στα ~290 nm που είναι στενότερη και πιο έντονη. Με την αλλαγή πολικότητας του διαλύτη σε MeOH παρατηρούνται αλλαγές όχι μόνο στην ένταση και στη θέση των κορυφών αλλά και στην ύπαρξη ενός ώμου στα ~300 nm τόσο στο UV όσο και στο ορατό.

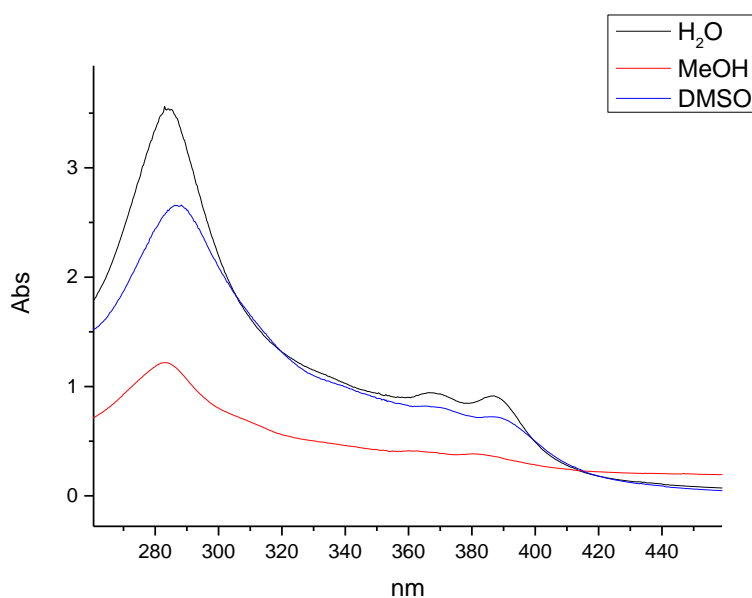
Οι κορυφές στα υψηλότερα μήκη κύματος αποδίδονται σε MLCT (metal to ligand charge transfer) που σημαίνει ότι η μεταφορά του φορτίου γίνεται από το υψηλότερης ενέργειας κατειλημμένο μοριακό τροχιακό (HOMO) στο χαμηλότερης ενέργειας π* κενό μοριακό τροχιακό (LUMO). Πιο συγκεκριμένα

σε διαλύτη DMSO οι MLCT εμφανίζονται στα 366 nm και στα 388 nm, ενώ σε MeOH στα 359 nm και 379 nm αντίστοιχα.

Στις υψηλότερης ενέργειας κορυφές του UV η απορρόφηση αποδίδεται σε μεταπτώση π-π* του di-COOH-dpprz υποκαταστάτη ενώ στη MeOH εμφανίζεται στα 301 nm ένας ώμος. Αντίστοιχα, στο H₂O οι MLCT εμφανίζονται στα 366 nm και 387 nm ενώ η π-π* στα 284 nm.

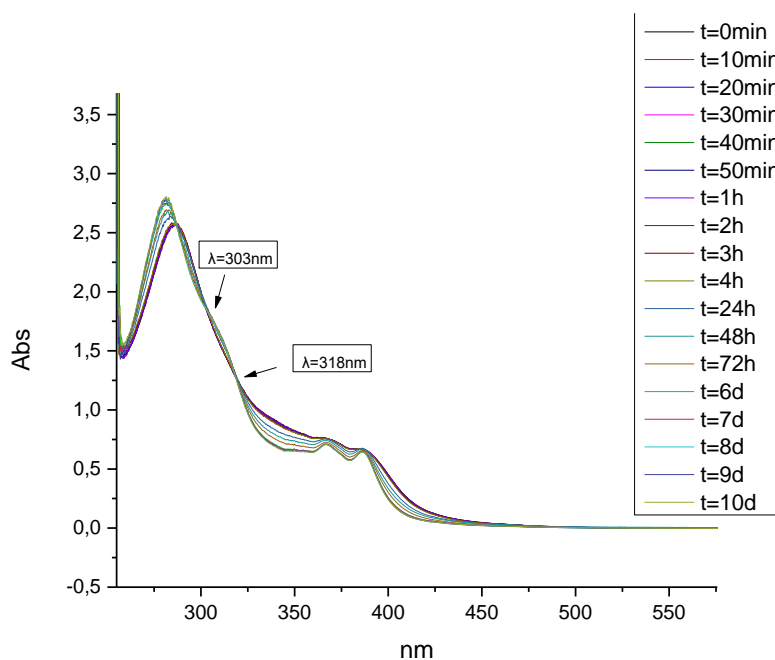
Πίνακας 6.2: Δεδομένα φασμάτων απορρόφησης

Διαλύτες	$\lambda_{\max}/\text{nm}(\epsilon \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	
	MLCT	π-π*
DMSO	366, 388	286
MeOH	359, 379	280, 301
H ₂ O	366, 387	284



Σχήμα 6.9: Φάσματα UV-vis του συμπλόκου σε διαλύτες DMSO, MeOH και H₂O, σε t=0.

Επίσης, μελετήθηκε η σταθερότητα του συμπλόκου (1) σε διάφορες χρονικές στιγμές από $t=0$ έως και 10 ημέρες, σε διαλύτη DMSO. Αυτό που διαπιστώθηκε είναι ότι υπάρχουν δυο ισοσβεστικά σημεία στα 303 και 318 nm, ενδεικτικό της ύπαρξης ισορροπίας μεταξύ δυο ειδών στο διάλυμα. Πιθανόν να οφείλεται σε αντικατάσταση του αζονικού ανιόντος χλωρίου με μόριο διαλύτη. Παρατηρούμε, όμως ότι μετά τις έξι ημέρες το φάσμα UV-Vis παραμένει αμετάβλητο, γι' αυτό το λόγο όλα τα πειράματα με το DNA έγιναν αφού στοκάρουμε το διάλυμα του συμπλόκου έξι ημέρες.

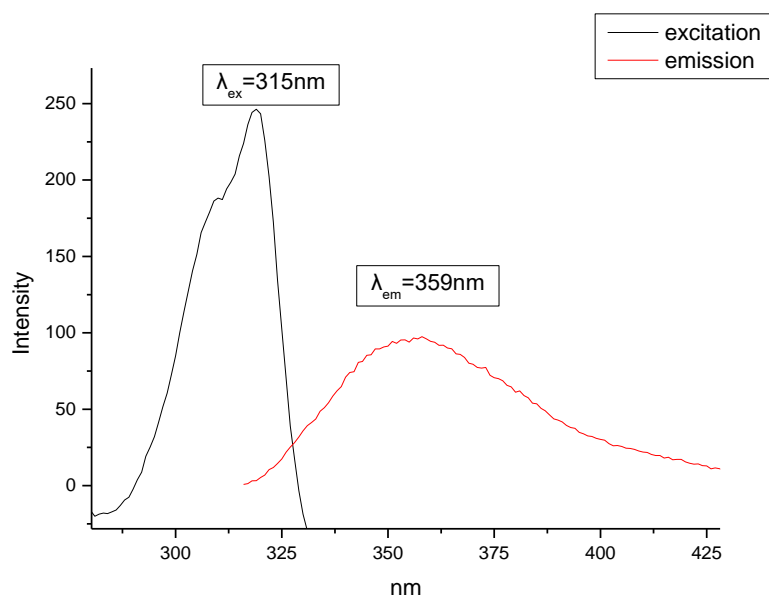


Σχήμα 6.10: Μελέτη σταθερότητας του συμπλόκου σε DMSO, $C=10^{-4}M$.

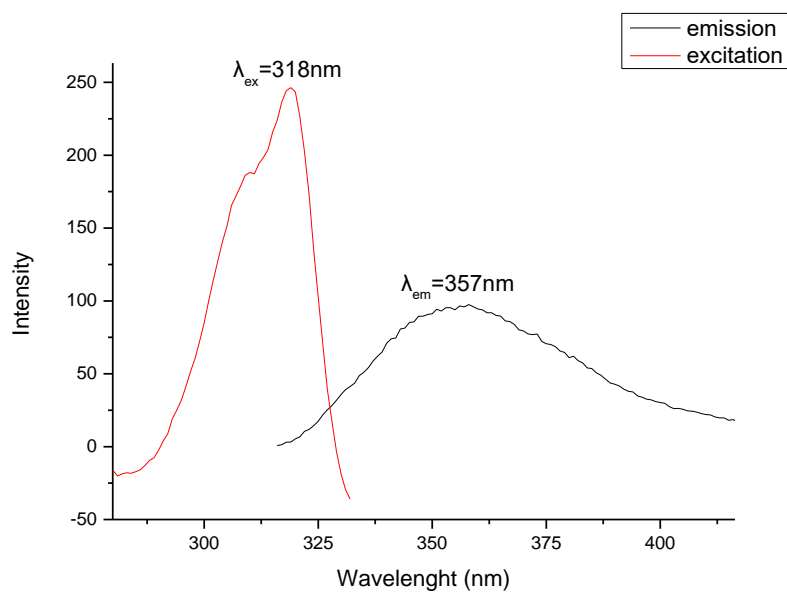
6.3.4 Φασματοσκοπία Εκπομπής

Το φάσμα φθορισμού του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COOH})]$ ελήφθη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη DMSO, ενώ για το $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COONa})]$ σε H_2O .

Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα του φθορισμού.



Σχήμα 6.11: Φάσμα φθορισμού του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COOH})]$ στα 315 nm.

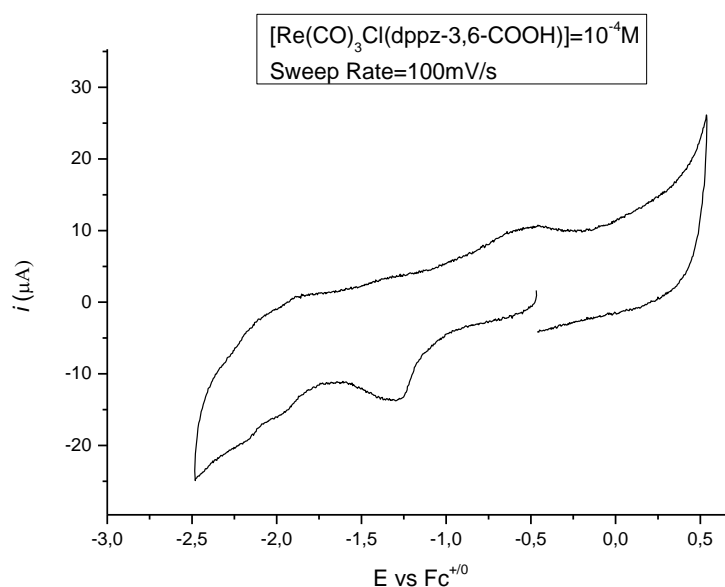


Σχήμα 6.12: Φάσμα φθορισμού του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COONa})]$ στα 318 nm.

6.3.5 Κυκλική Βολταμμετρία

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$ μελετήθηκε με κυκλική βολταμμετρία σε DMSO με ηλεκτρόδιο εργασίας υαλώδη άνθρακα και ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl. Η συγκέντρωση του συμπλόκου ήταν 10^{-4}M ενώ ως φέροντας ηλεκτρολύτης ήταν το $(\text{nBu}_4\text{N})\text{PF}_6$ με συγκέντρωση 10^{-2}M . Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το φερροκένιο και ως προς αυτό έγιναν όλες οι διορθώσεις ($E^0=466\text{ mV}$).

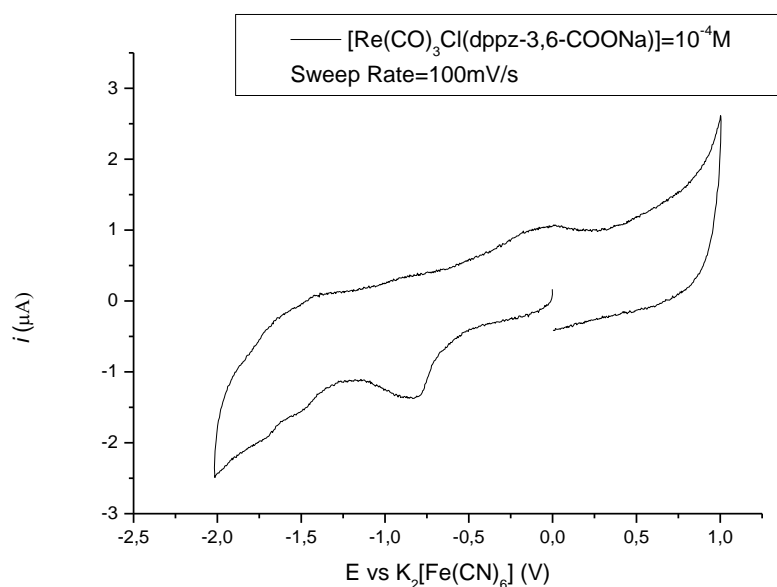
Στο σχήμα 6.13 παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$, το οποίο λήφθηκε με ταχύτητα σάρωσης στα 100 mV/s . Παρατηρούμε μια ημιαντιστρεπτή αναγωγή ενός καθοδικού κύματος στα -1.286 V και μετά ενός ανοδικού κύματος στα $-0,503\text{ V}$ με $\Delta E=-0.783\text{ V}$, και οφείλεται στην πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου από τον συμπλεγμένο υποκαταστάτη. Είναι ημιαντιστρεπτή, πιθανόν γιατί το DMSO είναι συμπλεκτικός διαλύτης και επηρεάζει την δομή του συμπλόκου. Με την αναγωγή αποσυμπλέκεται το Cl^- και συμπλέκεται ένα μόριο του διαλύτη [85] [86].



Σχήμα 6.13: Κυκλικό βολταμμογράφημα του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$ σε DMSO.

Αντίστοιχα, για το $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$ μελετήθηκε η κυκλική βολταμμετρία σε H_2O με ηλεκτρόδιο εργασίας υαλώδη άνθρακα και ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl . Η συγκέντρωση του συμπλόκου ήταν 10^{-4} M ενώ ως φέροντας ηλεκτρολύτης ήταν το NaCl με συγκέντρωση 10^{-2} M. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το $\text{K}_2[\text{Fe}(\text{CN})_4]$ και ως προς αυτό έγιναν όλες οι διορθώσεις ($E^0=0.198$ V).

Στο σχήμα 6.14 παρουσιάζεται το βολταμμογράφημα του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$, το οποίο λήφθηκε με ταχύτητα σάρωσης τα 100mV/s . Και σε αυτό το βολταμμογράφημα παρατηρούμε μια ημιαντιστρεπτή αναγωγή ενός καθοδικού κύματος στα -0.834 V και ενός ανοδικού κύματος στα -0.032 V, με $\Delta E=-0.802$ V.



Σχήμα 6.14: Κυκλικό βολταμμογράφημα του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$ σε H_2O .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ DNA

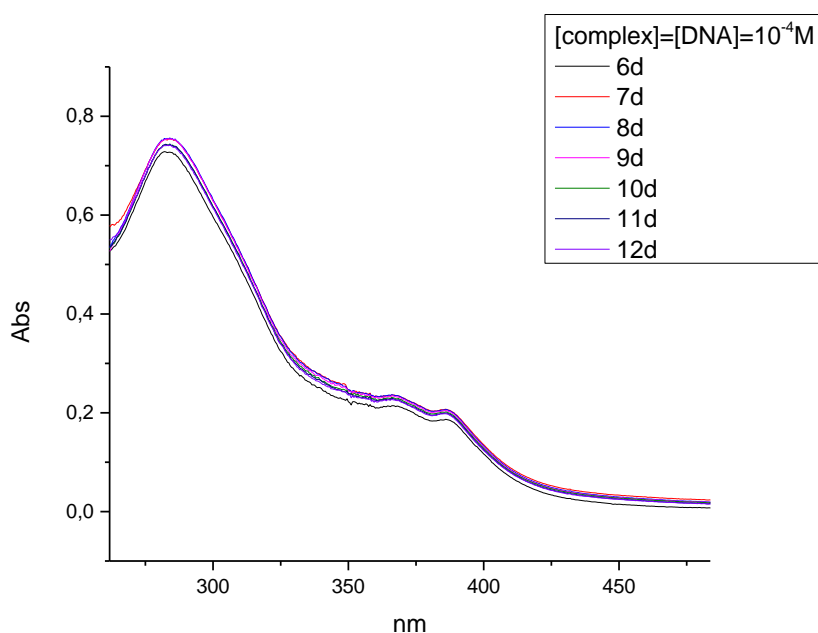
Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση C.T.-DNA (Calf Thymus DNA) και με τεχνικές όπως τιτλοδότηση UV-Vis, ιξωδομετρία, φθορισμομετρία και κυκλικός διχρωϊσμός.

7.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου

[Re(di-COOH-dppz)(CO)₃]Cl με C.T.-DNA.

7.1.1 Φασματοσκοπική μελέτη σταθερότητας

Από την φασματοσκοπική μελέτη του συμπλόκου παρουσία DNA παρατηρείται ότι ελάχιστες μεταβολές συμβαίνουν στα μέγιστα του μήκους κύματος της απορρόφησης. Συγκεκριμένα από τις 24 ώρες έως και τις 72 ώρες στους 25°C, δεν παρατηρείται αλλαγή.



Σχήμα 7.1: Κινητική μελέτη του συμπλόκου σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.

Βάση του πειράματος σταθερότητας, παρατηρούμε ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA δεν φέρει καμία αλλαγή στο φάσμα UV-vis, όλα τα

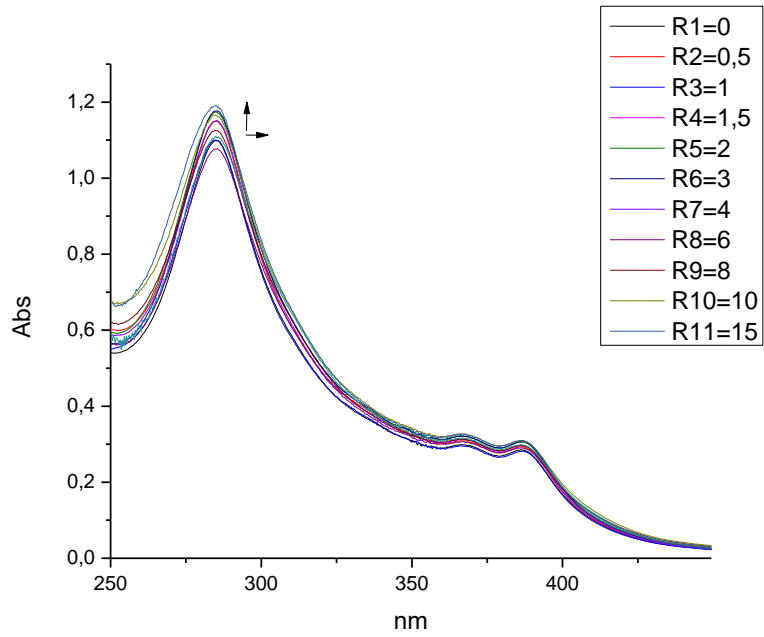
πειράματα διεξάγονται μετά από 24ωρη επώαση του $[\text{Re}(\text{di-COOH-dpprz})(\text{CO}_3)]\text{Cl}$ με το DNA.

7.1.2 Τιτλοδότηση Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)

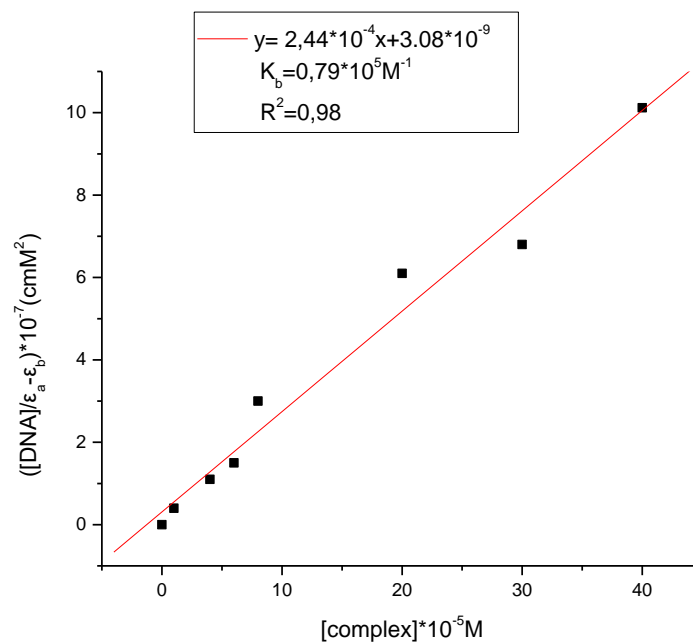
Η αλληλεπίδραση του DNA με μικρά μόρια μπορεί να μελετηθεί με τιτλοδότηση UV-vis, καθώς οποιαδήποτε μεταβολή στην απορρόφηση και στο μέγιστο μήκος κύματος αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης. Σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής προκαλούν μείωση της απορρόφησης (υποχρωμία) και η μετατόπιση της θέσης του λ_{max} προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (βαθυχρωμία) προκαλεί σταθεροποίηση της διπλής έλικας. Αντιθέτως, αύξηση της απορρόφησης και μετατόπιση προς μικρότερα μήκη κύματος (υψιχρωμία) αποτελούν ένδειξη αλληλεπίδρασης εξωτερικής φύσεως. Επίσης, είμαστε σε θέση να υπολογίσουμε τη σταθερά σύνδεσης K_b του μορίου με το DNA.

Στο σχήμα 7.2 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου απουσία και παρουσία DNA, κρατώντας πάντα σταθερή τη συγκέντρωση του συμπλόκου $2 \cdot 10^{-5}$ M. Αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης της IL στα 285 nm έως και 10% με ταυτόχρονη μετατόπιση της απορρόφησης προς την ερυθρή περιοχή κατά 2 nm. Ο συνδυασμός αυτός δείχνει μια τάση παρεμβολής του συμπλόκου στα ζεύγη βάσεων.

Ο υπολογισμός της σταθεράς σύνδεσης συμπλόκου-DNA επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας την σχέση (5.1) στα 285 nm. Το διάγραμμα της μεταβολής του λόγου $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ συναρτήσει της συγκέντρωσης $[\text{DNA}]$ δίνεται στο Σχήμα 7.3. Μελετώντας της αλλαγές της IL απορρόφησης, η σταθερά σύνδεσης K_b υπολογίστηκε ίση με $0,79 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.



Σχήμα 7.2: Φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου με αυξανόμενη συγκέντρωση C.T. DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl.

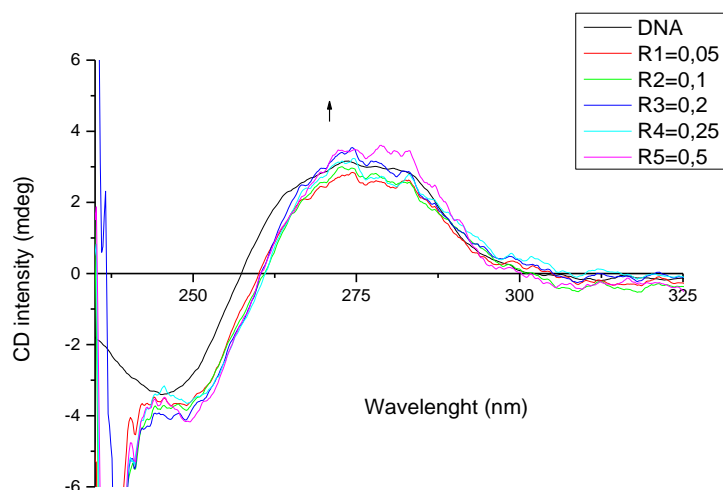


Σχήμα 7.3: Καμπύλη μεταβολής του λόγου $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_b)$ συναρτήσει της συγκέντρωσης του DNA.

7.1.3 Κυκλικός Διχρωσμός

Το A-DNA εμφανίζει μέγιστο στα 270 nm, ελάχιστο στα 210 nm και μηδέν στα 300 nm και πάνω. Το B-DNA εμφανίζει ένα «συντηρητικό» φάσμα πάνω από τα 220 nm με δύο περίπου ίσης έντασης κορυφές μια θετική στα 275 nm και μια αρνητική στα 245 nm με σημείο αλλαγής στα 260 nm. Η ένταση του μεγίστου στο B-DNA είναι περίπου η μισή απ' ό,τι στο A-DNA. Φυσικά το ακριβές σχήμα και η ένταση των φασματικών ταινιών εξαρτώνται από την πολυνουκλεοτιδική ακολουθία, το βασικό μοντέλο όμως παραμένει το ίδιο. Στο Z-DNA εμφανίζει και αυτό ένα συντηρητικό φάσμα πάνω από τα 240 nm με δύο περίπου ίσης έντασης κορυφές μία θετική στα 260 nm και μία αρνητική στα 290 nm. Η σχεδόν ανάστροφη μορφή του φάσματος CD του Z-DNA σε σχέση με το B-DNA αποτέλεσαν και την πρώτη ένδειξη ύπαρξης αριστερόστροφης έλικας. Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού μπορεί λοιπόν να χρησιμεύσει για την ανίχνευση των διαφόρων διαμορφώσεων της διπλής έλικας σ' ένα διάλυμα και τις μεταπτώσεις που πιθανώς συμβαίνουν από την μια μορφή στην άλλη [72].

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το σύμπλοκο αλλάζει την B-δομή του DNA πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού. Παρασκευάστηκαν λόγοι $R=0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5$ όπου $R=[\text{complex-Re}]/[\text{DNA}]$ διατηρώντας αυτήν τη φορά, σταθερή την συγκέντρωση του DNA και επωάστηκαν στους 25°C για 24 ώρες.



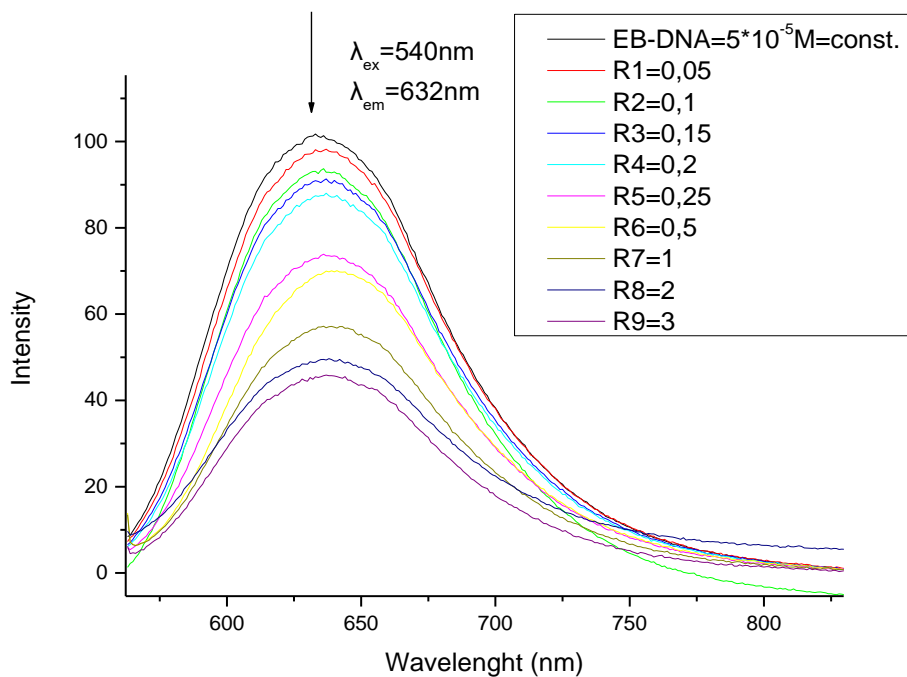
Σχήμα 7.4: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T. DNA με το $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$.

Στο σχήμα 7.4 παρουσιάζεται το φάσμα κυκλικού διχρωισμού του DNA αυξανόμενης της συγκέντρωσης του συμπλόκου. Γενικά δεν παρατηρείται καμία σημαντική αλλαγή ούτε στην ελλειπτικότητα, αλλά ούτε και μέγιστα μήκη κύματος των κορυφών. Γίνεται εύκολα σαφές ότι η B-διαμόρφωση του DNA δεν αλλάζει παρουσία του συμπλόκου, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες.

7.1.4 Φθορισμομετρία με EB

Μια ακόμα φθομετρική τεχνική για την μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA είναι ο φθορισμός παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου.

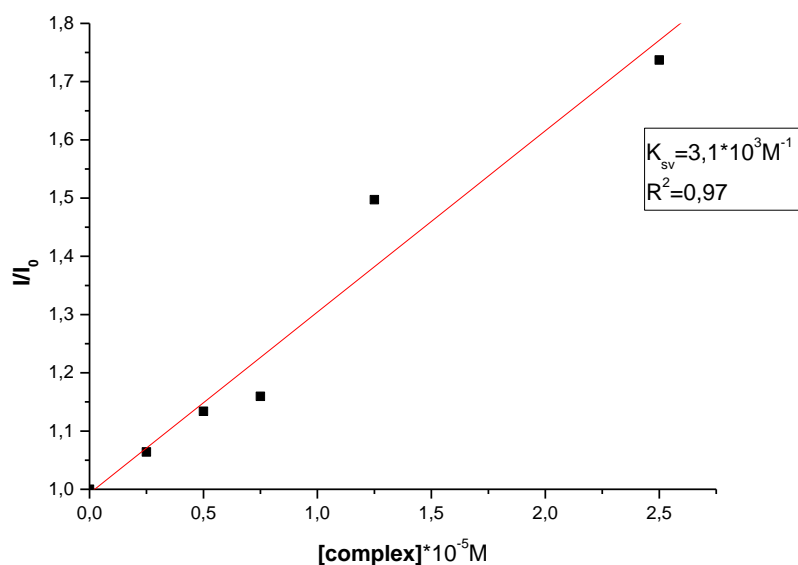
Η ικανότητα του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$ να παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA διαπιστώθηκε με τη μελέτη της ανταγωνιστικής του δράσης ως προς το EB με τη βοήθεια της φθορισμομετρίας. Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, αλληλεπίδραση του DNA με το σύμπλοκο στις αναλογίες $R = 0,05, 0,1, 0,2, 0,25, 0,5, 1, 2, 3$, μετά από επώαση του για 24 ώρες στους 25°C .



Σχήμα 7.5: Απόσβεση του φθορισμού του EB αυξανόμενης της συγκέντρωσης του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$.

Από το παραπάνω φάσμα διαπιστώνεται η ανταγωνιστική δράση του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$ με το βρωμιούχο αιθίδιο καθώς μειώνεται σημαντικά η ένταση του φθορισμού του κατά 55%, όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του.

Η σταθερά απόσβεσης υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση Stern-Volmer και είναι ίση με $K_{sv}=3,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ [87].

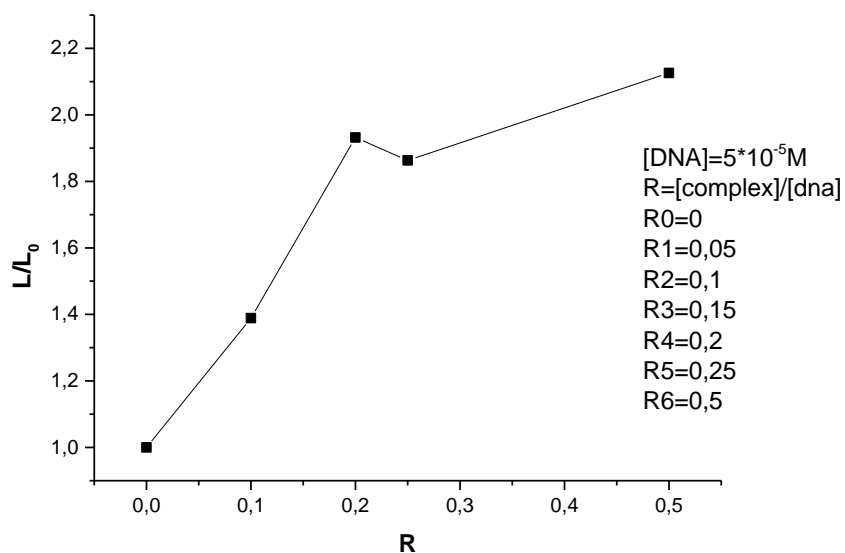


Σχήμα 7.6: Γραφική παράσταση του λόγου I_0/I συναρτήσει της συγκέντρωσης του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$.

7.1.5 Ιξωδομετρία

Οι οπτικές φωτοφυσικές μελέτες παρέχουν χρήσιμες, αλλά όχι επαρκείς ενδείξεις για να επαληθεύσουμε τον τρόπο σύνδεσης του DNA με χημικές ενώσεις. Η κατεξοχήν υδροδυναμική μέθοδος για τη διερεύνηση αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι η ιξωδομετρία, εξαιτίας του γεγονότος ότι είναι πολύ ευαίσθητη στη μεταβολή της δομής και του μήκους των αλυσίδων του μακρομορίου και θεωρείται η πλέον αδιάσειστη απόδειξη, όχι μόνο της ύπαρξης αλληλεπίδρασης, αλλά και του είδους της. Είναι δυνατόν, μάλιστα, με μετρήσεις του ιξώδους να διαγνωστεί το είδος της αλληλεπίδρασης, όπως π.χ. παρεμβολή (intercalation), δέσμευση στις αύλακες κ.α. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι κλασσικά μόρια παρεμβολείς, όπως το βρωμίδιο του αιθιδίου, αυξάνουν το μήκος της έλικας, αφού τα ζεύγη βάσεων διαχωρίζονται για να φιλοξενηθεί το μόριο παρεμβολέας, με συνέπεια να αυξάνεται το ιξώδες του διαλύματος του DNA. Αντίθετα, υπό τις ίδιες συνθήκες, μόρια που δεσμεύονται αποκλειστικά στις αύλακες του DNA προκαλούν κάμψη ή/και περιστροφή της

έλικας του DNA, μειώνοντας το δραστικό μήκος της και κατά συνέπεια και το ιξώδες του μορίου. Οι μετρήσεις τους ιξώδους πραγματοποιήθηκαν σε θερμοστατούμενο ιξωδόμετρο στους $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, αυξάνοντας την ποσότητα του συμπλόκου και κρατώντας σταθερή αυτή του DNA. Τα τελικά διαλύματα είχαν συγκέντρωση ως προς DNA ίση με $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ και με προσθήκη, κάθε φορά ανάλογης ποσότητας διαλύματος συμπλόκου, σχηματίστηκαν διαλύματα των επιθυμητών λόγων $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$ τα οποία επωάστηκαν για 24 ώρες στους 25°C .



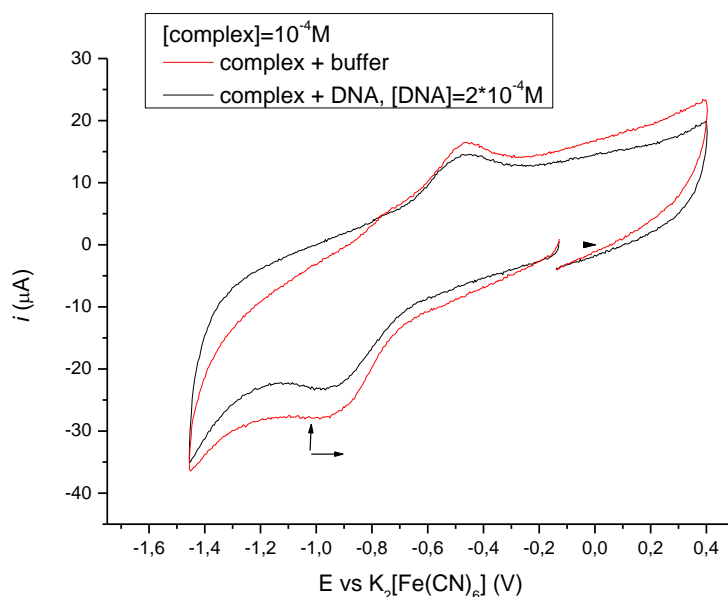
Σχήμα 7.7: Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COOH})]$ στο σχετικό ιξώδες του C.T.-DNA.

Από το σχήμα 7.7 είναι εμφανής η αύξηση του σχετικού ιξώδους του DNA από 1 σε 2,1 και μάλιστα είναι σταδιακή. Η αύξηση αυτή είναι της ίδιας έκτασης με αυτή του κλασικού παρεμβολέα βρωμιδίου του αιθιδίου, γεγονός που υποδηλώνει την κλασική παρεμβολή του συμπλόκου στα ζεύγη βάσεων.

7.1.6 Κυκλική Βολταμμετρία

Η μελέτη της κυκλικής βολταμμετρίας για την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ενός συμπλόκου με το DNA είναι μια επιπλέον μέθοδος που μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες. Μελετώντας τις διαφορές στα δυναμικά απουσία και παρουσία DNA καταλήγουμε σε ασφαλή συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, σε μια παρεμβολική αλληλεπίδραση θα πρέπει ένα τουλάχιστον δυναμικό να μετατοπιστεί προς θετικότερα δυναμικά, αντίθετα κατά τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις οι μετατοπίσεις πραγματοποιούνται προς αρνητικότερα δυναμικά [88].

Στο Σχήμα 7.8 φαίνονται τα κυκλικά βολταμμογραφήματα του συμπλόκου απουσία και παρουσία DNA σε 1:3 DMSO/tris-HCl ρυθμιστικό διάλυμα. Η ένταση του ρεύματος στα -0.965V εμφανίζει μείωση ενώ το δυναμικό μετατοπίζεται προς θετικότερα δυναμικά κατά 37mV . Τα δεδομένα αυτά έχουν σε πλήρη συμφωνία με όλα τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα υποδεικνύοντας την παρεμβολική φύση της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου.



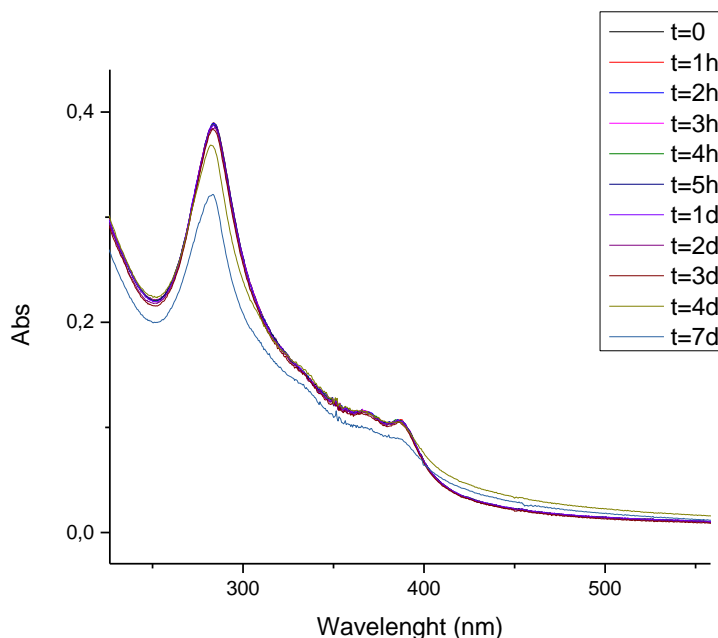
Σχήμα 7.8: Κυκλικό βολταμμογράφημα του $\text{Re}[(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz}-3,6\text{-COOH})]$ απουσία και παρουσία DNA.

7.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου

[Re(CO)₃Cl(dppz-3,6-COONa)] με το DNA.

7.2.1 Φασματοσκοπική μελέτη σταθερότητας

Από την μελέτη του συμπλόκου παρουσία C.T.-DNA με φασματοσκοπία απορρόφησης UV-vis παρατηρείται ότι η τιμή των μεγίστων της απορρόφησης παραμένει σχεδόν αμετάβλητη, με ελάχιστη μείωση μετά τις 4 ημέρες, γεγονός που δεν επηρεάζει τα πειράματά μας που πραγματοποιήθηκαν με το DNA τα οποία διαρκούν 24 ώρες στους 25°C.

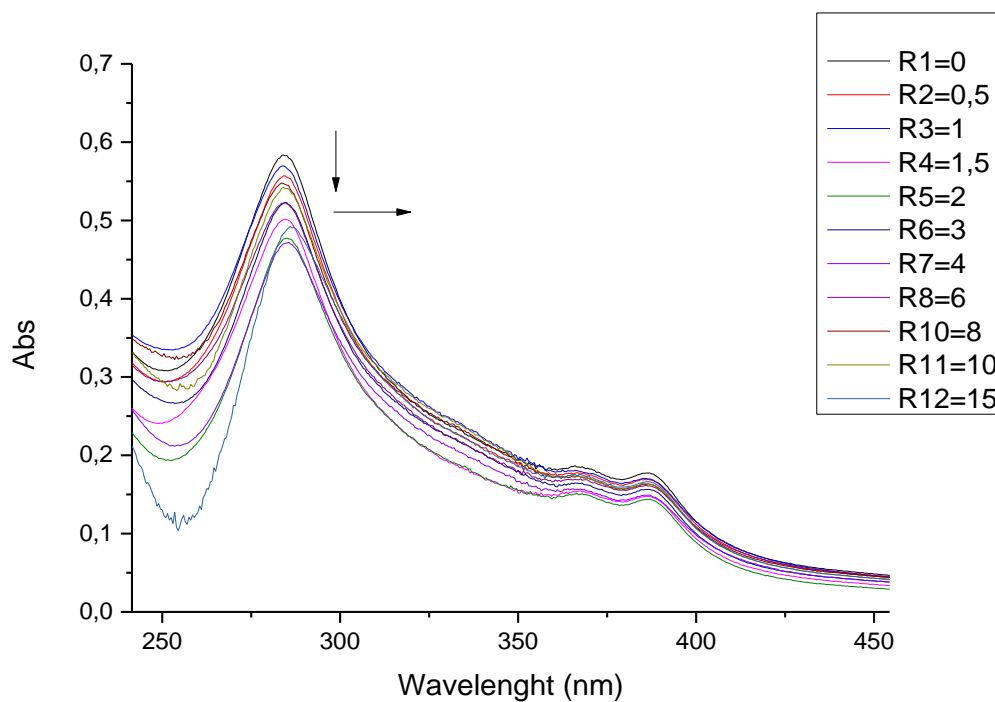


Σχήμα 7.9: Κινητική μελέτη του συμπλόκου [Re(CO)₃Cl(dppz-3,6-COONa)] σε H₂O.

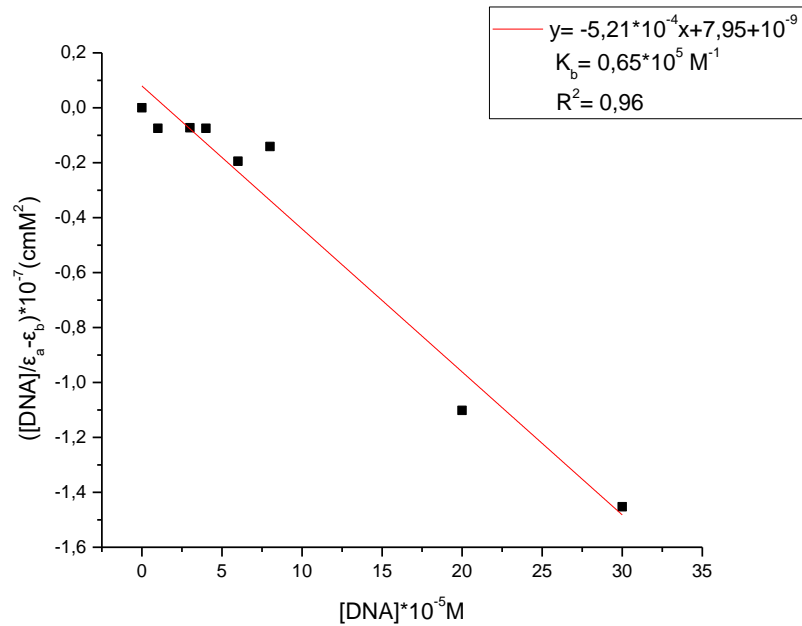
7.2.2 Τιτλοδότηση ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Στο σχήμα 7.10 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου απουσία και παρουσία C.T. DNA, κρατώντας πάντα σταθερή τη συγκέντρωση του συμπλόκου $2 \cdot 10^{-5}$ M. Αυξανόμενη η συγκέντρωση του DNA παρατηρείται μείωση της απορρόφησης της IL στα 284 nm έως και 20% με ταυτόχρονη μετατόπιση της απορρόφησης προς το ερυθρό κατά 2nm. Ο συνδυασμός αυτός δείχνει μια τάση παρεμβολής του συμπλόκου στα ζεύγη βάσεων.

Ο υπολογισμός της σταθεράς σύνδεσης συμπλόκου-DNA επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας την σχέση (6.1) στα 284 nm. Το διάγραμμα της μεταβολής του λόγου $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ συναρτήσει της συγκέντρωσης $[DNA]$ δίνεται στο Σχήμα 7.9. Μελετώντας της αλλαγές της IL απορρόφησης, η σταθερά σύνδεσης K_b βρέθηκε ίση με $0,65 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.



Σχήμα 7.10: Φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$ με αυξανόμενη συγκέντρωση C.T. DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl.

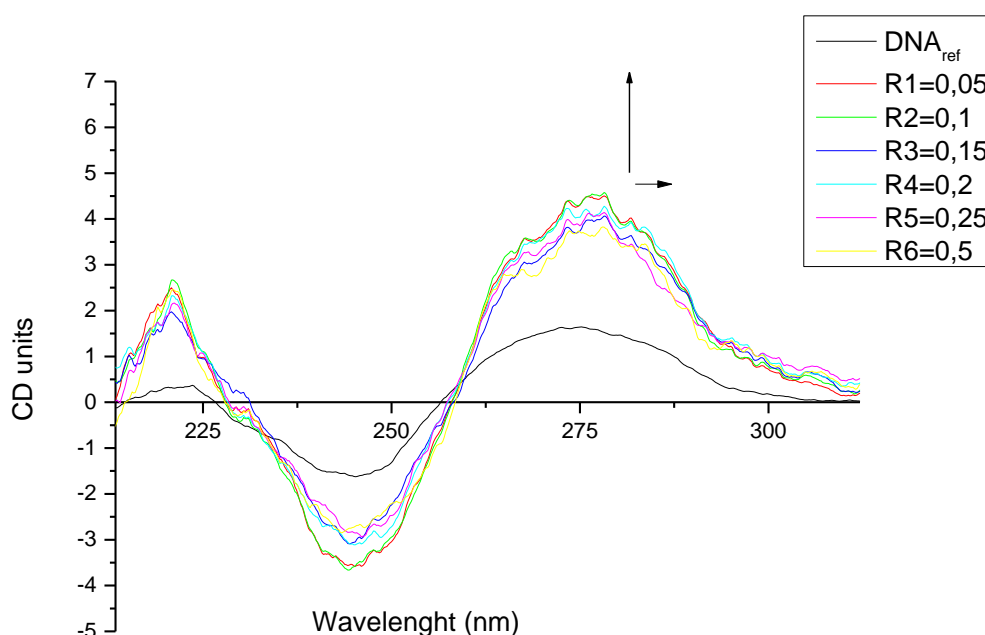


Σχήμα 7.11: Καμπύλη μεταβολής του λόγου $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_b)$ συναρτήση της συγκέντρωσης του DNA.

Από την βιβλιογραφία διαπιστώνουμε ότι η σταθερά σύνδεσης είναι μια τάξη μεγέθους μικρότερη από αντίστοιχα παρεμβολικά σύμπλοκα του $Re(I)dprrz$ [89]. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στην υποκατάσταση της 3 και 6 θέσης του $dprrz$ υποκαταστάση, γεγονός που σημαίνει ότι η στερεοχημική παρεμπόδιση των καρβοξυλομάδων μειώνει την δεσμευτική ισχύ του συμπλόκου στο DNA [84].

7.2.3 Κυκλικός Διχρωσμός

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το σύμπλοκο αλλάζει την Β-δομή του DNA πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικού διχρωσμού. Παρασκευάστηκαν λόγοι $R=0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5$ όπου $R=[\text{complex-Re}]/[\text{DNA}]$ διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση του DNA και αυξάνοντας την συγκέντρωση του συμπλόκου, τα οποία επωάστηκαν 24 ώρες στους 25°C .



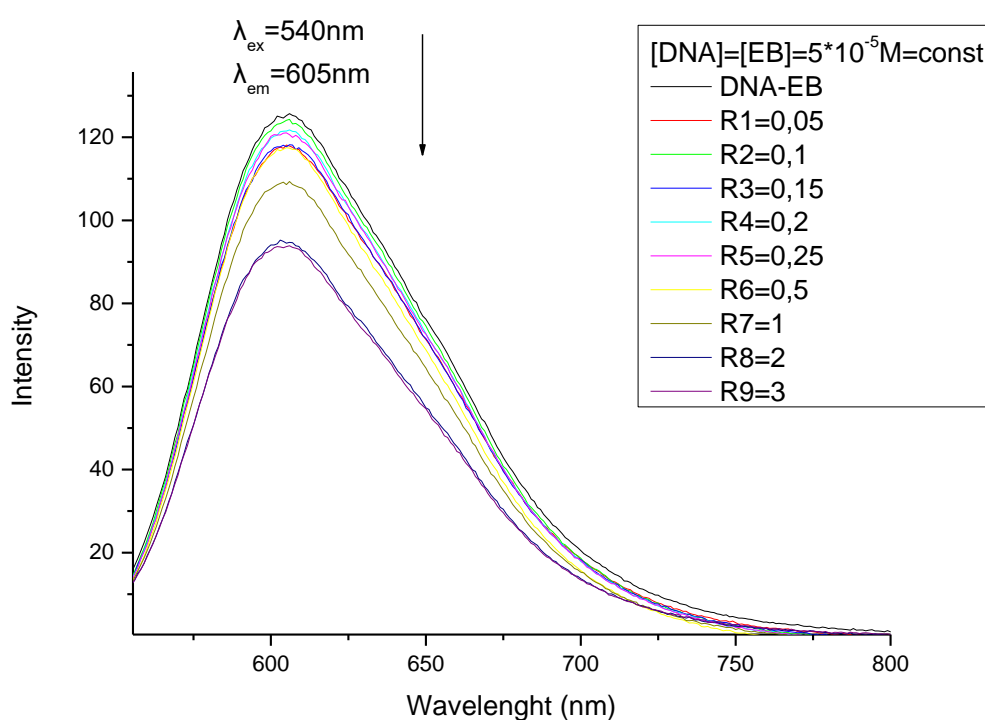
Σχήμα 7.12: Φάσμα κυκλικού διχρωσμού όμως αλληλεπίδρασης C.T.-DNA με του σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$.

Από το παραπάνω σχήμα φαίνεται ότι επιφέρει σημαντικές αλλαγές το σύμπλοκο στο DNA αυξανόμενης όμως συγκέντρωσής του, κυρίως στην ένταση και όχι τόσο στο μήκος κύματος των κορυφών. Βέβαια, παρατηρούμε ότι δεν επιφέρει αλλαγές στην Β-δομή του DNA. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA χωρίς να προκαλεί όμως κάποια αλλαγή στη διαμόρφωση του, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην παρεμβολική δράση του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$.

7.2.4 Φθορισμομετρία με EB

Μια ακόμα φωτομετρική τεχνική για την μελέτη αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA είναι μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου.

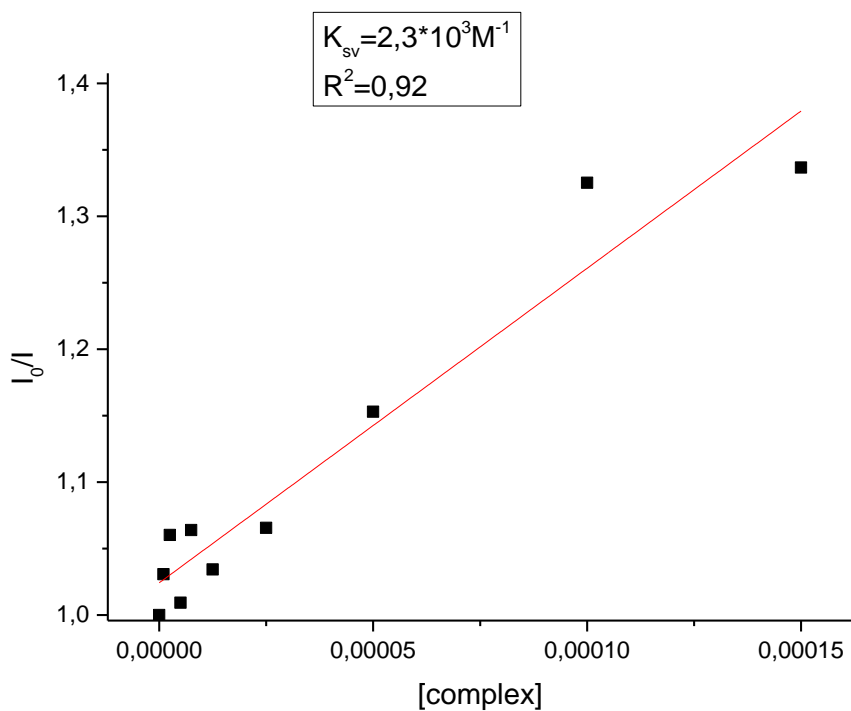
Η ικανότητα του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COONa})]$ να παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA διαπιστώθηκε με τη μελέτη της ανταγωνιστικής του δράσης ως προς το EB με τη βοήθεια της φθορισμομετρίας.



Σχήμα 7.13: Απόσβεση του φθορισμού του EB αυξανόμενης της συγκέντρωσης του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COONa})]$.

Από το παραπάνω φάσμα διαπιστώνεται η ανταγωνιστική δράση του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dpprz-3,6-COONa})]$ με το βρωμιούχο αιθίδιο καθώς μειώνεται η ένταση του φθορισμού του κατά 40% καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή του.

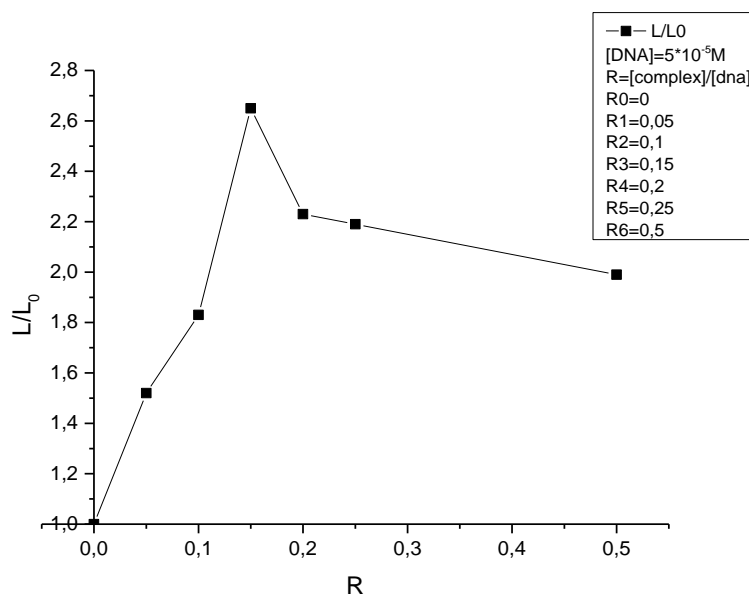
Η σταθερά απόσβεσης υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση Stern-Volmer και είναι ίση με $K_{sv}=2,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Πρέπει να αναφερθούμε στο ότι η ένωση δεν διεγείρεται αλλά και δεν φθορίζει στην ίδια περιοχή με το EB.



Σχήμα 7.14: Γραφική παράσταση του λόγου I_0/I συναρτήσει της συγκέντρωσης του $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$.

7.2.5 Ιξωδομετρία

Μια ακόμα σημαντική μέθοδος για την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης με το DNA είναι η ιξωδομετρία, καθώς είναι ευαίσθητη στην μεταβολή της δομής και του μήκους των αλυσίδων του νουκλεϊκού οξέος. Με τις μετρήσεις και με βάση την εξίσωση $n = \frac{t-t_0}{t_0}$, έχουμε τα ακόλουθα αποτελέσματα:



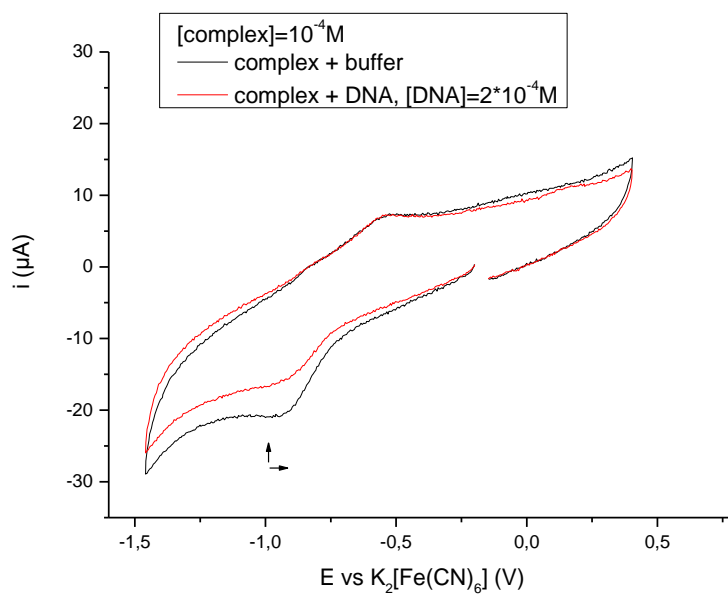
Σχήμα 7.15: Μεταβολή του ιξώδους του C.T.DNA αυξανόμενων συγκεντρώσεων του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$.

Από το παραπάνω σχήμα είναι εμφανής η αύξηση του ιξώδους του DNA από 1 έως και 2,65 για λόγους $R < 0,15$ ενώ στη συνέχεια υπάρχει μια μικρή μείωση για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, πιθανόν λόγω στερεοχημικής παρεμππόδισης του υποκαταστάτη. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν στην παρεμβολή του συμπλόκου στα ζεύγη βάσεων.

7.2.6 Κυκλική βολταμμετρία

Μια τελευταία τεχνική είναι αυτή της κυκλικής βολταμμετρίας και όπως ήταν αναμενόμενο παρατηρήθηκε μεταβολή 29 mV προς θετικότερα δυναμικά στο

καθοδικό κύμα της ημιαντιστρεπτής αντίδρασης, γεγονός που ενισχύει την αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής του συμπλόκου με το DNA.



Σχήμα 7.16: Κυκλικό βολταμμογράφημα του $\text{Re}[(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$ απουσία και παρουσία DNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

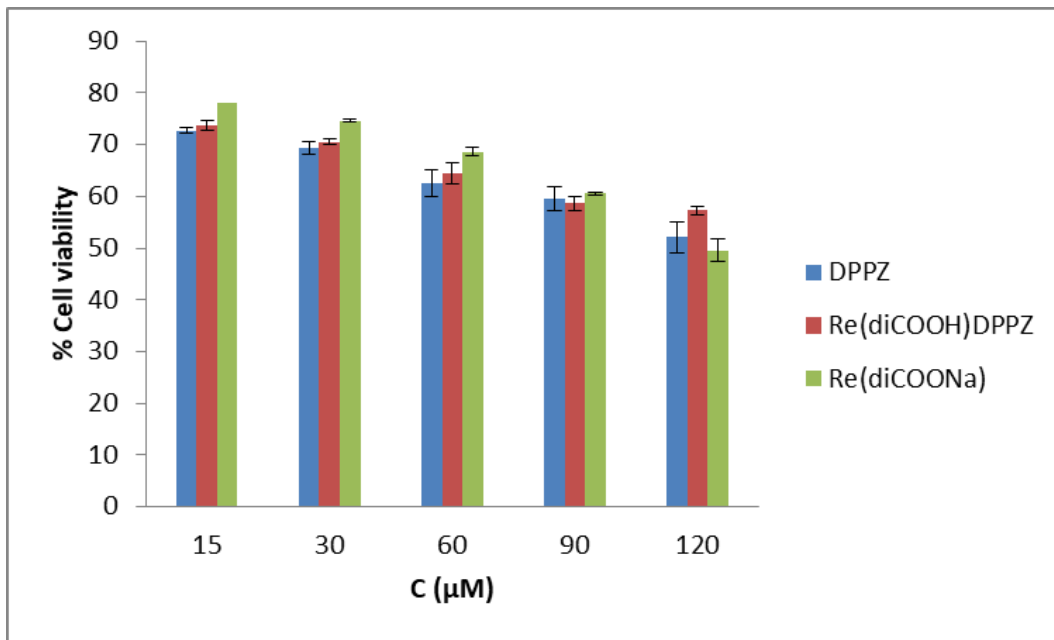
8.1 Μελέτη MTT

Η μελέτη MTT χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων έπειτα από 24 ώρες επώασης τους με τα σύμπλοκα του ρηνίου (I) καθώς και με τον αρχικό υποκαταστάτη.

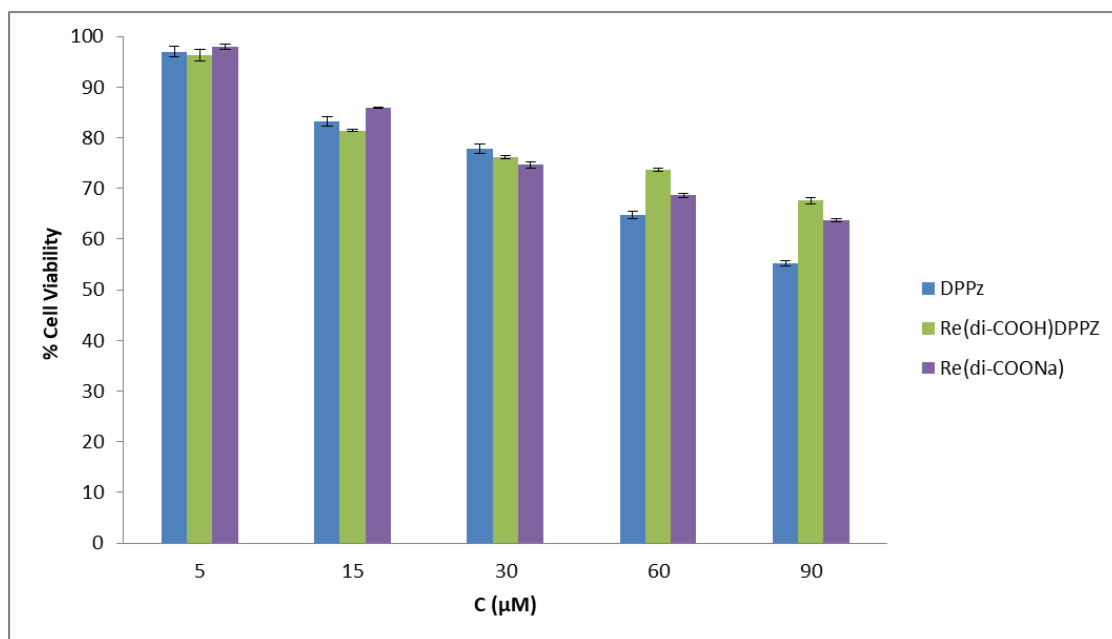
Αρχικά $8 \cdot 10^3$ κύτταρα διασπείρονται σε πλάκα 96 φρεατίων και υποβάλλονται σε επεξεργασία για 24 ώρες με 15, 30, 60, 90, 120 μM της κάθε ένωσης. Ακολουθεί η επώασή τους σε θερμοκρασία 37°C παρουσία CO_2 5% 95% υγρασία για 24 ώρες ώστε τα κύτταρα να βρεθούν σε λογαριθμική φάση. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα MTT σε τελική συγκέντρωση $100\mu\text{M}$ και τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 4 ώρες. Οι κρύσταλλοι της φορμαζάνης διαλύτοποιήθηκαν σε DMSO. Η απορρόφηση των διαλυμάτων από κάθε φρεάτιο μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο UV σε μήκος κύματος 540 nm (ή αναγράφεται με μήκος κύματος αναφοράς 620 nm). Τα κυτταροτοξικά πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές [90-93].

Οι δυο σύμπλοκες ενώσεις του Ρηνίου και ο αρχικός υποκαταστάτης ελέγχθηκαν για την *in vitro* ικανότητα τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών MCF-7 και U87MG συγκρινόμενα με το *cis-platin*. Παρακάτω παρατίθενται οι αντίστοιχοι πίνακες που εμφανίζουν την κυτταρική αναστολή.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό ζωτικότητας (%) των κυττάρων μετά από επώαση με σύμπλοκες ενώσεις προς τα κύτταρα αναφοράς όπως φαίνονται στα επόμενα γραφήματα.



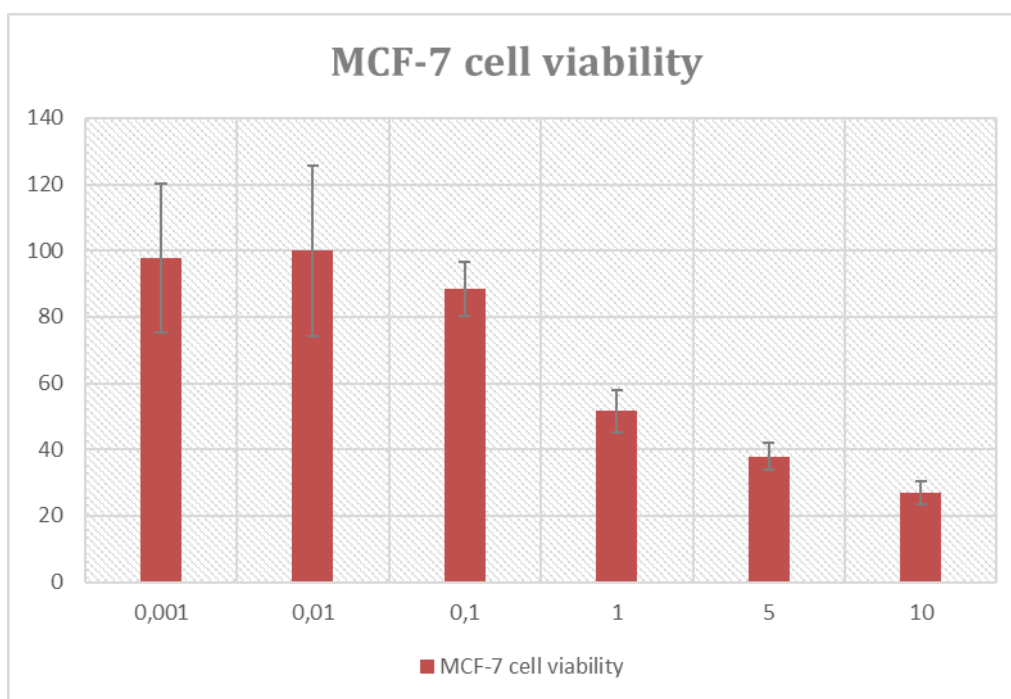
Σχήμα 8.1: Επίδραση της συγκέντρωσης του υποκαταστάτη και των συμπλόκων στην % βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7. Ο αριθμός μέσα στις μπάρες δείχνει το % ποσοστό των ζωντανών κυττάρων παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων.



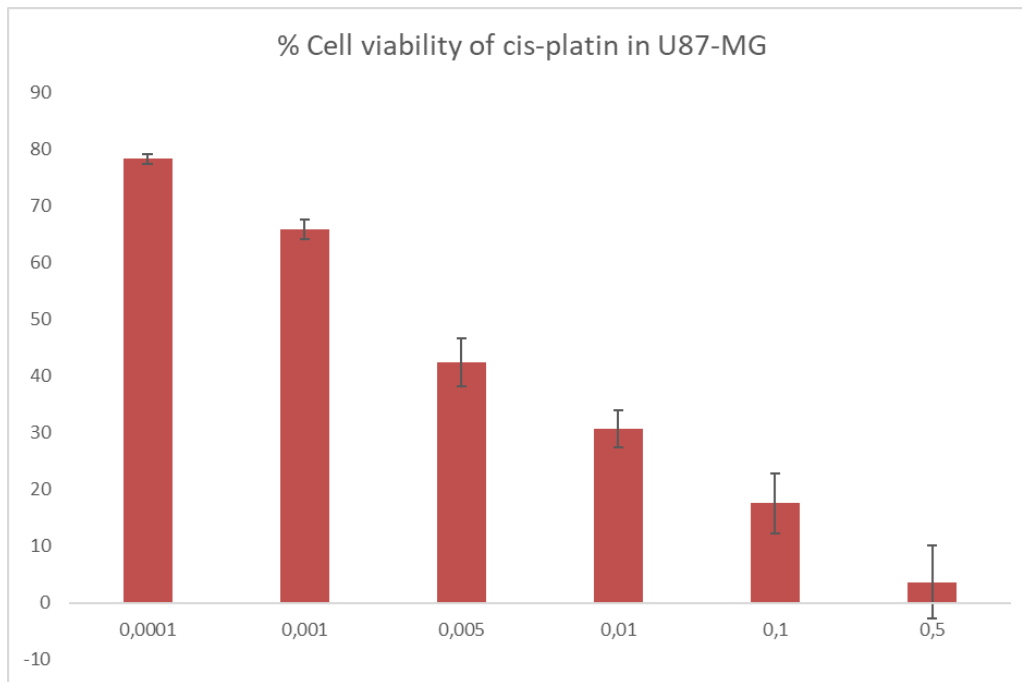
Σχήμα 8.2: Επίδραση της συγκέντρωσης του υποκαταστάτη και των συμπλόκων στην % βιωσιμότητα των κυττάρων U87MG. Ο αριθμός μέσα στις μπάρες δείχνει το % ποσοστό των ζωντανών κυττάρων παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων.

Από τα πειράματα κυτταροτοξικότητας παρατηρείται μειωμένη κυτταροτοξικότητα και στις δυο καρκινικές σειρές, συγκρινόμενη με το αντίστοιχο cis-platin. Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα το IC50 στα MCF-7 είναι 1.2 μ M.

Συγκεκριμένα και στις 2 καρκινικές σειρές και για τις 3 ενώσεις, παρατηρούμε την μικρότερη βιωσιμότητα στην μεγαλύτερή τους συγκέντρωση. Στην σειρά MCF-7 η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι της τάξης του 60% για C=120 μ M ενώ στην U-87MG είναι στο 70% για 90 μ M. Δηλαδή η τοξικότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωσή τους. Βέβαια, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν μικρή κυτταροτοξικότητα συγκρινόμενα με το cis-platin.



Σχήμα 8.3: Κυτταρική ζωτικότητα cis-platin σε κυτταρα MCF-7.



Σχήμα 8.4: Κυτταρική ζωτικότητα cis-platin σε κύτταρα U87-MG.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο τη σύνθεση νέων συμπλόκων ενώσεων και τη μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με το DNA, σε μια προσπάθεια εύρεσης νέων πιθανών χημειοθεραπευτικών παραγόντων, αλλά και αποτελεσματικών φωτοευαισθητοποιητών στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Με αυτόν τον σκοπό πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός 2 νέων συμπλόκων του Re(I) με τον υποκαταστάτη dppz-carboxylic acid $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COOH})]$ και το αντίστοιχο μετά-νατρίου άλας $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$.

Τα πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα σύμπλοκα αυτά συνδέονται με το DNA μέσω παρεμβολής. Οι πειραματικές τεχνικές συνηγορούν στο ότι τα σύμπλοκα συνδέονται ισχυρά με το DNA με σταθερές σύνδεσης ίσες με $0,8 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$ και $0,65 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$ αντίστοιχα, χωρίς όμως να μεταβάλλουν την Β-δομή του DNA από τα πειράματα του κυκλικού διχρωσμού παρ' όλο που ενισχύει σημαντικά την έντασή του κυρίως το $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{dppz-3,6-COONa})]$.

Τα πειράματα της ιξωδομετρίας και της φθορισμομετρίας με το EB επιβεβαιώνουν τον ισχυρισμό για σύνδεση μέσω παρεμβολής κυρίως για μικρότερες συγκεντρώσεις του συμπλόκου, ενώ σε μεγαλύτερους λόγους πιθανόν να συνυπάρχει ένα είδος μη κλασικής παρεμβολής. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί εξαιτίας της παρουσίας των 2 καρβοξυλομάδων στην 3 και 6 θέση του dppz προκαλώντας στερεοχημική παρεμπόδιση, κυρίως σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μειώνοντας έτσι την παρεμβολή στις βάσεις. Επίσης η κυκλική βολταμμετρία ενισχύει τους ισχυρισμούς μας καθώς τα δυναμικά μετατοπίζονται προς θετικότερες τιμές.

Από τη μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των δυο ενώσεων με τη δοκιμασία MTT, στις καρκινικές σειρές MCF-7 και U87MG παρατηρήθηκε ότι την μέγιστη τοξικότητα (βιωσιμότητα ~70%) επιτυγχάνεται στην μέγιστη συγκέντρωση των συμπλόκων.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
pyridyl quinoxaline	2-(2'-πυριδυλ-κινόξαλίνη)
UV-Vis φασματοσκοπία	Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους
Fourier transform infrared spectroscopy	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
Calf thymus DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ από θύμο αδένα βοοειδούς
Deoxyribose	Δεοξυριβόζη
Deoxyribose Phosphate	5-φωσφορική δεοξυριβόζη
Purines	Πουρίνες
Pyrimidines	Πυριμιδίνες
Adenine	Αδενίνη
Guanine	Γουανίνη
Cytosine	Κυτοσίνη
Thymine	Θυμίνη
Uracil	Ουρακίλη
Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
Major groove	Μεγάλη αύλακα
Minor groove	Μικρή αύλακα

intercalation	Παρεμβολή
Groove binding	Συναρμογή στις αύλακες
External binding	Εξωτερική συναρμογή
Red shift	Βαθυχρωμικό φαινόμενο (απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος)
trans	Γεωμετρία ισομερών ενώσεων που δηλώνει την ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων σε αντίθετες πλευρές του μορίου
Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
Photodynamic Therapy	Φωτοδυναμική θεραπεία
Singlet oxygen	Μονήρες οξυγόνο
Ground state	Θεμελιώδης κατάσταση
Intersystem crossing	Ενδοσυστηματική διασταύρωση
<i>In vitro</i>	Δοκιμασία σε δοκιμαστικό σωλήνα

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

dppz	Dipyrido[3,2-a:2'3'-c]phenazine
pq	pyridyl quinoxaline
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
CD	Circular Dichroism
DNA	Deoxyribonucleic acid
C.T.-DNA	Calf thymus DNA
DMSO	dimethylsulfoxide
λ	Μήκος κύματος
nm	Nanometers
A	Adenine
G	Gouanine
C	Cytosine
T	Thymine
RNA	Ribonucleic acid
A-, B-, Z-,	Διαφορετικές διαμορφώσεις της διπλής έλικας του DNA
Na ⁺	Κατιόν νατρίου
cisplatin	Cis-diamminedichloroplatinum (II)
Pt	Platinum (Λευκόχρυσος)
Ru	Ruthenium (Πουθήνιο)

mol	Mole
M	Molarity
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
Netropsin	N-{5-[(3-Amino-3-iminopropyl)carbamoyl]-1-methyl-1H-pyrrol-3-yl}-4-[(N-carbamimidoylglycyl)amino]-1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxamide
Distamycin	N-{5-[(5-[(3Z)-3-Amino-3-iminopropyl]carbamoyl)-1-methyl-1H-pyrrol-3-yl]carbamoyl]-1-methyl-1H-pyrrol-3-yl}-4-formamido-1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxamide
Mithramycin	(2S)-[(2R,3S)-7-[[2,6-Dideoxy-3-O-(2,6-dideoxy-β-D-arabino-hexopyranosyl)-β-D-arabino-hexopyranosyl]oxy]-3-[[2,6-dideoxy-3-C-methyl-β-D-ribo-hexopyranosyl-(1->3)-2,6-dideoxy-β-D-lyxo-hexopyranosyl-(1->3)-2,6-dideoxy-β-D-arabino-hexopyranosyl]oxy]-5,10-dihydroxy-6-methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-2-anthracenyl](methoxy)acetic acid
Anthracyclines	(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dione
[Ru(bpy)3] ⁺²	Tris(bipyridine)ruthenium (II)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Cu	Copper (Χαλκός)
Fe	Iron (Σίδηρος)
Rh	Rhodium (Ρόδιο)
Ti	Titanium (Τιτάνιο)

Mn	Manganese (Μαγγάνιο)
g	Gram
mg	Milligram
°C	Celsius
bpy	2,2-bispyridine
phen	1,10-phenanthroline
ROS	Reactive Oxygen Species
RNS	Reactive Nitrogen Species
ILCT	Intra ligand Charge Transfer
LMCT	Ligand to Metal Charge Transfer
MLCT	Metal to Ligand Charge Transfer
PDT	Photodynamic Therapy
S	Spin
T	Triplet state
ISC	Intersystem crossing
3O ₂	Molecular oxygen
O ₂ ⁻ , O ₂ ^{·-}	Oxygen radicals
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
ε	Συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας
mL	Millilitre
NaCl	Χλωριούχο νάτριο

NaOH	Υδροξύλιο του νατρίου
MeOH	Μεθανόλη
KBr	Βρωμιούχο κάλιο
em	emission
ex	excitation

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Βιοχημεία, 7thEd., Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2014.
2. Κ.Α. Δημόπουλος, Σ. Αντωνοπούλου, Βασική Βιοχημεία, 2nd Ed., Αθήνα, 2009.
3. J. D. Watson, F. H. C. Crick., A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, 171, 1953, 737–738.
4. R. Dahm, Friedrich Miescher and the discovery of DNA, *Dev. Biol.*, 278, 2005, 274–288.
5. John McMurry, Οργανική Χημεία, Τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2008.
6. M. Jaseem, Is DNA made up of two polymers structures or one? M.S. Molecular Biology and & Cell Biology, Madurai Karamaj University, Tamil Nadu, India, 2014.
7. E. Palecek, Local Supercoil-Stabilized DNA Structures, *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, 26, 1991, 151-226.
8. S. Arnott, The geometry of nucleic acids, *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, 21, 1970, 265-319.
9. S. Arnott, D. W. L. Hukins, Refinement of the Structure of B-DNA and Implications for the Analysis of X-ray Diffraction Data from Fibers of Biopolymers, *J. Mol. Biol.*, 81, 1973, 93-105.
10. Κ.Μεθενίτης, Φυσικές μέθοδοι προσδιορισμού της δομής του DNA, σημειώσεις από τα Ειδικά Κεφάλαια Ανόργανης, 2012.
11. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra, John Wiley & Sons, New Jersey, 2008.
12. L. Streckowski, B. Wilson, Non-covalent chemical/DNA interaction: Mechanisms and Consequences, Elsevier, 2007.

13. Y. Jung, S. J. Lippard, Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage, *Chem. Rev.*, 107 (5), 2006, 1387-1403.
14. R. J. Browning, P. J. T. Reardon, M. Parhizkar, R. B. Pedley, M. Edirisinghe, J. C. Knowles, E. Stride, E. Drug delivery strategies for platinum-based chemotherapy. *ACS nano*, 11(9), 2017, 8560-8578.
15. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry, *J. Photoch. Photobio.*, 124, 2013, 1–19.
16. G. S. Manning, The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides, *Q. Rev. Biophys. II*, 11, 1978, 179-246.
17. R. Palchaudhuri, P. J. Hergenrother, DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action, *Curr. Opin. Biotech.*, 18, 2007, 497–503.
18. S. G. KR, B. B. Mathew, C. N. Sudhamani, H. B. Naik, Mechanism of DNA binding and cleavage. *Biomedicine*, 2(1), 2014, 1-9.
19. R. M. Wartell, J. E. Larsos, R. D. Wells, Netropsin a specific probe for A-T regions of duplex deoxyribonucleic acid, *J. Biol. Chem.*, 249 (21), 1974, 6719-6731.
20. N. J. Turro, J. K. Barton, D. A. ToMALIA, Molecular recognition and chemistry in restricted reaction spaces. Photophysics and photoinduced electron transfer on the surfaces of micelles, dendrimers, and DNA. *Accounts of chemical research*, 24(11), 1991, 332-340.
21. K. Wozniak, J. Blasiak: Review: Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts, *Acta Biochimica Polonica* 49(3), 2002, 583-596.
22. G. R. Pack, G. Loew, Origins of the specificity in the intercalation of ethidium into nucleic acids, *Biochim. Biophys. Acta*, 519, 1978, 163-172.
23. H. K. Liu, P. J. Sadler, Metal Complexes as DNA Intercalators, *Accounts Chem. Res.*, 44 (5), 2011, 349–359.

24. D. Řeha, M. Kabelác, F. Ryjáček, J. Šponer, J. E. Šponer, M. Elstner, & P. Hobza, Intercalators. 1. Nature of stacking interactions between intercalators (ethidium, daunomycin, ellipticine, and 4',6-diaminide-2-phenylindole) and DNA base pairs. Ab initio quantum chemical, density functional theory, and empirical potential study. *Journal of the American Chemical Society*, 124(13), 2002, 3366-3376.
25. K. E. Erkkila, D. T. Odem, J. K. Barton, Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA, *Chem. Rev.*, 99, 1999, 2777-2796.
26. C. Metcalfe, J. A. Thomas. Kinetically inert transition metal complexes that reversibly bind to DNA, *Chem. Soc. Rev.*, 32, 2003, 215-224.
27. J. K. Barton, E. D. Olmon, P. A. Sontz, Metal complexes for DNA-mediated charge transport, *Coord. Chem. Rev.*, 255, 2011, 619-634.
28. J. C. Genereux, J. K. Barton, Mechanisms for DNA Charge Transport, *Chem. Rev.*, 110, 2010, 1642–1662.
29. A. W. McKinley, P. Lincoln, E. M. Tuite, Environmental effects on the photophysics of transition metal complexes with dipyrido[2,3-a:3',2'-c]phenazine (dppz) and related ligands, *Coord. Chem. Rev.*, 255, 2011, 2676-2692.
30. J. A. Smith, M. W. George, J. M. Kelly, Transient spectroscopy of dipyridophenazine metal complexes which undergo photo-induced electron transfer with DNA, *Coord. Chem. Rev.*, 255, 2011, 2666-2675.
31. K. K.-W. Lo, K. Y. Zhang, S. P. Y. Li, Recent Exploitation of Luminescent Rhenium(I) Tricarbonyl Polypyridine Complexes as Biomolecular and Cellular Probes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2011, 3551–3568.
32. M. Howe-Grant, K. C. Wu, W. R. Bauer, S. J. Lippard, Binding of Platinum and Palladium Metallointercalation Reagents and Antitumor Drugs to Closed and Open DNAs, *Biochemistry*, 15, 1976, 4339-4346.
33. <https://en.wikipedia.org/wiki/Rhenium>
34. Γ. Πνευματικάκης, Μαθήματα Χημείας Στοιχείων Μεταπτώσεως, Οργανισμός Εκδόσεων Διδακτικών Βιβλίων, Αθήνα, Ελλάδα, 1987.

35. R. A. Bell, B. E. McCarry, and J. F. Valliant. The synthesis, NMR spectroscopy, and X-ray structure of a new rhenium N₂S₂ chelate complex, *Inorganic chemistry*, 37.14, 1998, 3517-3520.
36. M. Glaser, Structural characterisation and bioconjugation of an active ester containing oxorhenium (V) complex incorporating a thioether donor. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 18, 1998, 3087-3092.
37. N. B. Thornton, K. S. Schanze, A Chromophore-Quencher-Based Luminescence Probe for DNA, *Inorg. Chem.*, 32, 1993, 4994-4995.
38. H. D. Stoeffler, N. B. Thornton, S. L. Temkin, K. S. Schanze, Unusual Photophysics of a Rhenium(I) Dipyridophenazine Complex in Homogenous Solution and Bound to DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 1995, 7119–7128.
39. V. W. W. Yam, K. K. W. Lo, K. K. Cheung, R. Y. C. Kong, Synthesis, Photophysical Properties and DNA Binding Studies of Novel Luminescent Rhenium(I) Complexes. X-Ray Crystal Structure of [Re(dppn)(CO)₃(py)](OTf), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 1191–1193.
40. V. W. W. Yam, K. K. W. Lo, K. K. Cheung, R. Y. C. Kong, Deoxyribonucleic acid binding and photocleavage studies of rhenium(I) dipyridophenazine complexes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1997, 2067–2072.
41. D. J. Stufkens, A. Vlček Jr, Ligand-dependent excited state behaviour of Re(I) and Ru(II) carbonyl–diimine complexes, *Coord. Chem. Rev.*, 177, 1998, 127-179.
42. K. S. Schanze, D. B. MacQueen, T. A. Perkins, L. A. Cabana, Studies of intramolecular electron and energy transfer using the fac-(diimine)Re(I)(CO)₃ chromophore, *Coord. Chem. Rev.*, 122, 1993, 63-89.
43. A. Vlček Jr, M. Busby, Ultrafast ligand-to-ligand electron and energy transfer in the complexes fac-[ReI(L)(CO)₃(bpy)]ⁿ⁺, *Coord. Chem. Rev.*, 250, 2006, 1755–1762.

44. V. W. W. Yam, V. C. Y. Lau, L. X. Wu, Synthesis, photophysical, photochemical and electrochemical properties of rhenium(I) diimine complexes with photoisomerizable pyridyl-azo, -ethenyl or -ethyl ligands, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1998, 1461-1468.
45. J. R. Dilworth, S. J. Parrott, The biomedical chemistry of technetium and rhenium, *Chem. Soc. Rev.*, 27, 1998, 43-55.
46. S. S. Jurisson, J. D. Lydon, Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals, *Chem. Rev.*, 99, 1999, 2205-2218.
47. M. Busby, F. Hartl, P. Matousek, M. Towrie, A. Vlček Jr, Ultrafast Excited State Dynamics Controlling Photochemical Isomerization of N-Methyl-4-[trans-2-(4-pyridyl) ethenyl] pyridinium Coordinated to a {Re(Cl)(CO)₃(2, 2'-bipyridine)} Chromophore. *Chemistry-A European Journal* 14.23, 2008, 6912-6923.
48. M. Busby, P. Matousek, M. Towrie, A. Vlček, Ultrafast Excited-State Dynamics Preceding a Ligand Trans– Cis Isomerization of fac-[Re(Cl)(CO)₃(t-4-styrylpyridine)₂] and fac-[Re(t-4-styrylpyridine)(CO)₃(2, 2'-bipyridine)]⁺. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(13), 2005, 3000-3008.
49. M. Busby, P. Matousek, M. Towrie, A. Vlček Jr, Ultrafast excited-state dynamics of photoisomerizing complexes fac-[Re(Cl)(CO)₃(papy)₂] and fac-[Re(papy)(CO)₃(bpy)]⁺ (papy=trans-4-phenylazopyridine). *Inorganica chimica acta*, 360(3), 2007, 885-896.
50. B. D. Rossenaar, D. J. Stufkens, and A. Vlček. Halide-dependent change of the lowest-excited-state character from MLCT to XLCT for the complexes Re (X)(CO)₃(α-diimine) (x= Cl, Br, I; α-diimine= bpy, ipr-pyca, ipr-dab) studied by resonance raman, time-resolved absorption, and emission spectroscopy. *Inorganic Chemistry* 35.10, 1996, 2902-2909.
51. A. Vlček Jr, Ultrafast Excited-State Processes in Re(I) Carbonyl-Diimine Complexes: From Excitation to Photochemistry, *Top Organomet Chem*, 29, 2010, 73–114.

52. P. Chen, T. D. Westmoreland, E. Danielson, K. S. Schanze, D. Anthon, P. E. Neveux Jr, T. J. Meyer, Intramolecular electron transfer in the reductive chromophore-quencher complex [(bpy)Re(CO)₃(py-PTZ)]⁺, *Inorg. Chem.*, 26, 1987, 1116-1126.
53. D. J. Stufkens, Spectroscopy, photophysics and photochemistry of zerovalent transition metal α -diimine complexes, *Coord. Chem. Rev.*, 104, 1990, 39-112.
54. J. Dyer, W. J. Blau, C. G. Coates, C. M. Creely, J. D. Gavey, M. W. George, D. C. Grills, S. Hudson, J. M. Kelly, P. Matousek, J. J. McGarvey, J. McMaster, A. W. Parker, M. Towrie, J. A. Weinstein, The photophysics of fac-[Re(CO)₃(dppz)(py)]⁺ in CH₃CN: a comparative picosecond flash photolysis, transient infrared, transient resonance Raman and density functional theoretical study, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2, 2003, 542-554.
55. M. K. Kuimova, W. Z. Alsindi, A. J. Blake, E. S. Davies, D. J. Lampus, P. Matousek, J. McMaster, A. W. Parker, M. Towrie, X. Z. Sun, C. Wilson, M. W. George, Probing the Solvent Dependent Photophysics of fac-[Re(CO)₃(dppz-X₂)Cl](dppz-X₂=11,12-X₂-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine), X=CH₃, H, F, Cl, CF₃), *Inorg. Chem.*, 47, 2008, 9857-9869.
56. R. Horvath, K. C. Gordon. Excited state vibrational spectroscopy of metal complexes of dipyrido [3, 2-a: 2', 3'-c] phenazine. *Inorganica Chimica Acta*, 374.1, 2011, 10-18.
57. C. Metcalfe, J. A. Thomas. Kinetically inert transition metal complexes that reversibly bind to DNA. *Chemical Society Reviews*, 32.4, 2003, 215-224.
58. A. Barve, A. Kumbhar, M. Bhat, B. Joshi, R. Butcher, U. Sonawane, R. Joshi. Mixed-ligand copper (II) maltolate complexes: synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, and cytotoxicity. *Inorganic chemistry*, 48(19), 2009, 9120-9132.
59. S. S. Bhat, A. S. Kumbhar, P. Lonneck, and E. Hey-Hawkins, Self-Association of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes and Their Interactions with Calf Thymus DNA, *Inorg. Chem.* 49, 2010, 4843–4853.

60. B. Maity, M. Roy, S. Saha, and A. R. Chakravarty, Photoinduced DNA and Protein Cleavage Activity of Ferrocene-Conjugated Ternary Copper(II) Complexes, *Organometallics* 28, 2009, 1495–1505.
61. P. Prasad, P. K. Sasmal, I. Khan, P. Kondaiah, A. R. Chakravarty, Schiff base oxovanadium(IV) complexes of phenanthroline bases showing DNA photocleavage activity at near-IR light and photocytotoxicity, *Inorganica Chimica Acta*, 2011, 372, 79–87
62. S. S. née Kraft, C. Bischof, A. Loos, S. Braun, N. Jafarova, U. Schatzschneider, A [4+2] mixed ligand approach to ruthenium DNA metallointercalators $[Ru(tpa)(N-N)](PF_6)_2$ using a tris(2-pyridylmethyl)amine (tpa) capping ligand, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 2009, 1126–1134.
63. L. Tan, F. Wang, H. Chaoc, S. Zhanga, J. Feia, and L-N. Jic, DNA Interactions of the Functionalized (Mixed Polypyridine) ruthenium(II) Complex Bis(2,2'-bipyridine-kN1,kN1')(methyl dipyrido[3,2-a :2',3'-c]phenazine-11-carboxylate-kN4,kN5)ruthenium(2p) ($[Ru(bpy)_2(dppz-11-CO_2Me)]^{2+}$), *Helvetica Chimica Acta*, Vol. 91, 2008.
64. M. Kokoschka, J-A. Bangert, R. Stoll, and W. S. Sheldrick, Sequence-Selective Organoiridium DNA Bis-Intercalators with Flexible Dithiaalkane Linker Chains, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2010, 1507–1515.
65. S. Schäfer, I. Ott, R. Gust, and W. S. Sheldrick, Influence of the Polypyridyl (pp) Ligand Size on the DNA Binding Properties, Cytotoxicity and Cellular Uptake of Organoruthenium(II) Complexes of the Type $[(\eta^6-C_6Me_6)Ru(L)(pp)]^{n+}$ [L = Cl, n = 1; L = (NH₂)₂CS, n = 2], *Eur. J. Inorg. Chem.* 2007, 3034–3046.
66. K. L. Reddy, Y. H Kumar Reddy, K. Ashwini Kumar, S. Vidhisha & S. Satyanarayana, Synthesis, Characterization, DNABinding, and DNA-Photocleavage Properties of $[Co(bpy)_2(7-NO_2-dppz)]^{3+}$, $[Co(dmb)_2(7-NO_2-dppz)]^{3+}$, and $[Co(phen)_2(7-NO_2-dppz)]^{3+}$ Complexes: (7-Nitro-dppz = 7-Nitro dipyrido[3,2-a:2'-3'-c]phenazine; bpy = 2,2'-bipyridine; dmb = 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine; phen = 1,10-phenanthroline) and their Toxicity on Different Microorganisms, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 28, 2009, 204–219.

67. YU HuiJuan, H. ShuMei, K. JunFeng, LI LvYing, JIA HaiNa, C. Hui & JI LiangNian, Synthesis, DNA-binding and photocleavage studies of ruthenium complexes $[\text{Ru}(\text{btz})_3]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{btz})(\text{dppz})_2]^{2+}$, *Sci China Ser B-Chem*, Sep. vol. 52, no. 9, 2009, 1504-1511.
68. D. E. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 3, 2003, 380-387.
69. A. P. Castano, T. N. Demidova, M. R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 1, 2004, 279-293.
70. DE. Dolmans, D. Fukumura, RK. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 3, 2003, 380–387.
71. Z. Smetana, E. Ben-Hur, E. Mendelson, S. Salzberg, P. Wagner, and Z. Malik, Herpes simplex virus proteins are damaged following photodynamic inactivation with phthalocyanines, *J. Photochem. Photobiol. B*, 44 (1), 1998, 77-83.
72. S. Pervaiz, M. Olivo, Art and science of photodynamic therapy, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 33, 2006, 551–556.
73. <https://dramaiah.weebly.com/development-of-sensitizers-for-photodynamic-therapy.html>
74. WM. Sharman, CM. Allen, JE. van Lier, Role of activated oxygen species in photodynamic therapy, *Methods Enzymol.*, 319, 2000, 376–400.
75. B. Halliwell, Oxygen radicals a commonsense look at their nature and medical importance, *Med. Bio.*, 62, 1984, 71-77.
76. B. Halliwell, Manganese ions, oxidation reactions and the superoxide radical, *Neurotoxicology*, 5, 1984, 113-117.
77. CS. Foote, Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.*, 54, 1991, 659.
78. A. Karioti, A. R. Bilia, Hypericins as potential leads for new therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 11(2), 2010, 562-594.

79. WM. Sharman, CM Allen, JE van Lier, Role of activated oxygen species in photodynamic therapy, *Methods Enzymol.*, 319, 2000, 376–400
80. F. Wilkinson, W. P. Helman, and A. B. Ross, Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 22 (1), 1993, 113–262.
81. K. Gislason, S.T. Sigurdsson. Synthesis of a 5'-6-Locked, 1, 10-Phenanthroline-Containing Nucleoside and Its Incorporation into DNA. *European Journal of Organic Chemistry*, 24, 2010, 4713-4718.
82. K. Butsch, R. Gust, A. Klein, I. Ott, M. Romanski. Tuning the electronic properties of dppz-ligands and their palladium (II) complexes. *Dalton Transactions*, 39(18), 2010, 4331-4340.
83. E. Βερώνη, Σύνθεση, χαρακτηρισμός και μελέτη α-διϊμινικών συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης, Διδακτορική διατριβή, Αθήνα, 2006.
84. M. Καπλάνης, Χρήση συμπλόκων ενώσεων ως μοριακών διακοπών και ανιχνευτών στο DNA, Αθήνα, 2014.
85. E. Koutsouri, A. Zarkadoulas, C. Makedonas, C. Koumbounis, P. Paraskevoudou, C. A. Mitsopoulou. Combining photosensitizers: The case of $[\text{Cl}_2\text{Pt}(\text{bpym})\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}]$ and its dithiolate analogs. *Polyhedron*, 52, 2013, 234-245.
86. C. Kefalidi, E. Koutsouri, L. Marchiò, A. Zarkadoulas, S. Efstathiadou, C. A. Mitsopoulou. Synthesis, characterization and crystal structure of rhenium (I) tricarbonyl diimine complexes coupled with their efficiency in producing hydrogen in a photocatalytic system. *Polyhedron*, 110, 2016, 157-164.
87. G. Balakrishnan, T. Rajendran, K. Murugan, M. S. Kumar, V. K. Sivasubramanian, M. Ganesan, S Rajagopal. Interaction of rhenium (I) complex carrying long alkyl chain with Calf Thymus DNA: Cytotoxic and cell imaging studies. *Inorganica Chimica Acta*, 434, 2015, 51-59.

88. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 124, 2013, 1-19.
89. F. L. Thorp-Greenwood, M. P. Coogan, L. Mishra, N. Kumari, G. Rai, S. Saripella. The importance of cellular localisation of probes: synthesis, photophysical properties, DNA interactions and cellular imaging properties of rhenium dppz complexes with known cellular localisation vectors. *New Journal of Chemistry*, 36(1), 2012, 64-72.
90. E. K. Efthimiadou, C. Tapeinos, A. Chatzipavlidis, N. Boukos, E. Fragogeorgi, L. Palamaris, G. Kordas, Dynamic in vivo imaging of dual-triggered microspheres for sustained release applications: synthesis, characterization and cytotoxicity study. *International journal of pharmaceutics*, 461(1), 2014, 54-63.
91. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1–2), 1983, 55–63.
92. T. Karampelas, O. Argyros, N. Sayyad, K. Spyridaki, C. Pappas, K. Morgan, D. Fokas. GnRH-Gemcitabine conjugates for the treatment of androgen-independent prostate cancer: pharmacokinetic enhancements combined with targeted drug delivery. *Bioconjugate chemistry*, 25(4), 2014, 813-823.
93. E. K. Efthimiadou, E. Fragogeorgi, L. Palamaris, T. Karampelas, P. Lelovas, G. Loudos, G. Kordas. Versatile quarto stimuli nanostructure based on Trojan Horse approach for cancer therapy: Synthesis, characterization, in vitro and in vivo studies. *Materials Science and Engineering: C*, 79, 2017, 605-612.