



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου του Ru(II) με το παράγωγο της 1,10-φαινανθρολίνης, 2,9-δι(αμινομέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνη (PDAM), από το πρόδρομο $cis\text{-Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$. Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με CT-DNA και την πρωτεΐνη BSA. In vitro αξιολόγηση της βιολογικής δράσης του συμπλόκου.

Μαγιάκος Αλέξανδρος

Χημικός

Αθήνα 2020



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

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

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου του Ru(II) με το παράγωγο της 1,10-φαινανθρολίνης, 2,9-δι(αμινομέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνη (PDAM), από το πρόδρομο $cis\text{-Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$. Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με CT-DNA και την πρωτεΐνη BSA. In vitro αξιολόγηση της βιολογικής δράσης του συμπλόκου.

Μαγιάκος Αλέξανδρος

Χημικός

Αθήνα 2020

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκου του Ru(II) με το παράγωγο της 1,10-φαινανθρολίνης, 2,9-δι(αμινομέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνη (PDAM), από το πρόδρομο $\text{cis-Ru(DMSO)}_4\text{Cl}_2$. Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με CT-DNA και την πρωτεΐνη BSA. In vitro αξιολόγηση της βιολογικής δράσης του συμπλόκου.

ΜΑΓΙΑΚΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

A.M.: 181808

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Κωνσταντίνος Μεθενίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κωνσταντίνος Μεθενίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Χριστίνα - Άννα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Ευθυμιάδου Ελένη, Επικ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 13/07/2020

Περίληψη

Η παρούσα εργασία έχει θέμα τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό συμπλόκου του ρουθηνίου (II) με παράγωγο της 1,10-φαινανθρολίνης (cisRu-PDAM), από το πρόδρομο σύμπλοκο cis-Ru(DMSO)₄Cl₂. Κατόπιν, μελετάται η αλληλεπίδραση του cisRu-PDAM με CT-DNA και την πρωτεΐνη BSA (Bovine Serum Albumin), καθώς και διερευνάται η in vitro βιολογική του δράση, ως πιθανού νέου αντικαρκινικού φαρμάκου. Η επιλογή του υποκαταστάτη βασίστηκε στην αλληλεπίδραση της 1,10-φαινανθρολίνης και διαφόρων παραγώγων της με DNA και πρωτεΐνες των οργανισμών, όπου παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα βιολογική δραστηριότητα ως πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες, προκαλώντας απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα και θάνατο σε ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς ή ιούς. Η συμπλοκοποίησή τους μάλιστα, με στοιχεία μεταπτώσεως είναι πολυπληθής και ενισχύει αυτήν τους την δράση, ενώ η χρήση κινητικώς αδρανών συμπλοκών έχει ενδιαφέρον λόγω των πολύ καλά χαρακτηρισμένων δομών τους και των χαρακτηριστικών τους (φασματοσκοπικών, φωτοχημικών και ηλεκτροχημικών), που επιτρέπουν την λεπτομερή και άμεση μελέτη της αλληλεπίδρασης τους με βιολογικά συστήματα. Η δομή του υποκαταστάτη και η επιτυχής σύμπλεξη του Ru(II) με αυτόν, επιβεβαιώθηκε από τον χαρακτηρισμό τόσο του υποκαταστάτη, όσο και του συμπλόκου με χρήση αρκετών φασματοσκοπικών τεχνικών (IR, Φθορισμομετρία, NMR, MS, UV-Vis και CD). Σημαντική παρατήρηση είναι η εκλεκτικότητα στη σύνθεση του εναντιομερούς (Λ)-cisRu-PDAM. Σε συνέχεια της μελέτης, πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του cisRu-PDAM με CT-DNA και την BSA και του προδρόμου cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ με CT-DNA, με τη χρήση κυκλικού διχρωϊσμού (CD), φασματοσκοπίας UV-Vis, φθορισμομετρίας και την υδροδυναμική μέθοδο της ιξωδομετρίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το σύμπλοκο cisRu-PDAM που αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA με περισσότερο από έναν τρόπους, οι οποίοι εξαρτώνται από το λόγο $R = [\text{cisRu-PDAM}]/[\text{DNA}]$. Συγκεκριμένα, για $R < 2$ προτείνεται κλασική παρεμβολή με ταυτόχρονη μετατροπή της B δομής του DNA σε A, ενώ για $R > 2$ το σύμπλοκο στοιβάζεται εξωτερικά του DNA με τρόπο που του προκαλεί κάμψη. Κατόπιν, το σύμπλοκο δεσμεύεται στην πρωτεΐνη BSA στο σημείο Sudlow I τόσο ισχυρά, ώστε να είναι εφικτή η μεταφορά του στο αίμα. Η βιολογική αξιολόγηση της PDAM, του συμπλόκου cisRu-PDAM και του προδρόμου με την τεχνική MTT, εναντίον καρκινικών σειρών MCF-7 και PC-3, αποκάλυψαν αυξημένη κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου συγκριτικά με το πρόδρομο και την PDAM, ανάλογη του cis-platin.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοανόργανη Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: 1,10-φαινανθρολίνη, ρουθηνιο(II), DNA, BSA (λευκωματίνη ορού), αντικαρκινική δράση

Abstract

The aim of the present thesis is the synthesis and characterization of Ru(II) complex with derivative of 1,10-phenanthroline (PDAM) from the precursor cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ and study of its biological activity as potential new anticancer drug. The corresponding Ru(II) complex (cisRu-PDAM) was successfully synthesized and fully characterized by various spectroscopic techniques (IR, Fluorescence, NMR, UV-Vis, CD), showing selectivity in producing the enantiomer (Λ)-cisRu-PDAM. The selection of the ligand was made due to the interaction of 1,10-phenanthroline and its derivatives with DNA and proteins, showing significant biological activity as potential therapeutic agents by causing apoptosis to tumour cells and death to microorganisms and viruses. In addition, their complexation with transition metals is numerous and enhance their activity, whereas the development of labile complexes is of quite interest because of their well-known structures and characteristics (spectral, photochemical and electrochemical), which allow us the direct and detailed study of their interaction with biological systems. Hence, the interaction of cisRu-PDAM with CT-DNA and protein BSA (bovine serum albumin) was studied with the techniques of Circular Dichroism (CD), UV-Vis, Fluorescence and the hydrodynamic method of Viscometry. The data confirm the strong interaction of cisRu-PDAM with DNA, which appears to bind with more than one ways to it. The ways of interaction depend on the ratio $R = [\text{cisRu-PDAM}]/[\text{DNA}]$. Thus, at $R < 2$ classical intercalation is proposed by simultaneous conformational change of DNA from B to A structure. At values of $R > 0,2$ the complex binds to DNA in a way that bends its double strand. In the matter of BSA-complex interaction, binding in Sudlow site I was determined. The results show that the strength of binding, makes BSA a perfect carrier for the complex. Finally, in vitro exploration of biological activity of PDAM, the precursor and cisRu-PDAM against MCF-7 and PC-3 cancer cells with MTT assay, reveal stronger cytotoxic activity of the complex comparing to the free ligand and the precursor, quite similar to cis-platin.

SUBJECT AREA: Bioinorganic chemistry

KEYWORDS: 1,10- phenanthroline, ruthenium (II), DNA, BSA (Serum Albumin), anticancer activity

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μεθενίτη, για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας, για όλα όσα μου έμαθε αυτό το χρονικό διάστημα και γενικά την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την δρ. Βαρβάρα Μαυροειδή από το Ινστιτούτο Βιοεπισημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, για την πολύτιμη βοήθεια της στην διεξαγωγή των πειραμάτων του κυκλικού διχρωϊσμού και των βιολογικών πειραμάτων, καθώς και την Δρ. Μαρία Πελεκάνου στα εργαστήρια της οποίας έλαβαν χώρα τα παραπάνω πειράματα. Για την πειραματική υποστήριξη θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω την Δρ. Εσθήρ Σακκή για τη λήψη των φασμάτων MS. Ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας για την αρμονική συμβίωση που είχαμε, καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που αναπτύχθηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων μου και ιδιαίτερα στους συνεργάτες μου Γιώργο Μήλιωση, Ραφαηλία Παππά, Γιώργο Πετράκη και Τιμόθεο Κωνσταντόπουλο για την βοήθεια, τη συμπαράσταση και την άψογη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό χρονικό διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω, με όλη μου την αγάπη, τους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη τους και σε αυτήν την περίοδο της ζωής μου.

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1^ο : Η 1,10- Φαινανθρολίνη, τα παράγωγά της και η βιολογική τους ενεργότητα.....	3
1.1 1,10-Φαινανθρολίνη.....	3
1.2 Παράγωγα της 1,10-φαινανθρολίνης και η χημεία τους	5
1.3 Βιολογική ενεργότητα 1,10-φαινανθρολίνης και παραγώγων της	8
Κεφάλαιο 2^ο : Το Ρουθίνιο (Ru) και οι σύμπλοκες ενώσεις του στην ιατρική.....	13
2.1 Ρουθίνιο.....	13
2.2 Η Βιοχημεία του ρουθηνίου(II) και η βιολογική σημασία του	16
2.3 Μεταλλικά σύμπλοκα στην ιατρική.....	17
2.3.1 Σύμπλοκα του ρουθηνίου με βιολογική ενεργότητα	18
2.4 Σύμπλοκο Ru(II)-φαινανθρολίνης	25
Κεφάλαιο 3^ο : DNA και αλληλεπίδρασή του με μικρά μόρια.....	26
3.1 DNA.....	26
3.2 Η δομή του και οι πιθανές διαμορφώσεις του	27
3.3 Τρόποι αλληλεπίδρασης του DNA με μικρά μόρια.....	32
3.3.1 Θέσεις δέσμησης του Ru(II) στο DNA	41
Κεφάλαιο 4^ο : Πρωτεΐνες - Η κατηγορία των αλβουμινών και η αλληλεπίδραση των ανθρώπινων και βοδινών λευκωματίνων ορού (serum albumins) με μικρά μόρια.....	42
4.1 Αλβουμίνες	42
4.2 Δομή των HSA και BSA.....	44
4.3 Θέσεις δέσμησης και τρόποι αλληλεπίδρασης μικρών μορίων με τις HSA και BSA	51
4.3.1 Μεταλλικά σύμπλοκα και ιόντα	60
Κεφάλαιο 5^ο : Φυσικοχημικές μέθοδοι-τεχνικές και οι βασικές αρχές τους	63
5.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).....	63
5.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	63
5.3 Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)	65
5.3.1 T _m ανάλυση (Θερμική μετουσίωση του DNA)	66
5.4 Ιξωδομετρία	67

5.5 Φασματομετρία μάζας (MS).....	68
5.6 Φθορισμομετρία (Fluorescence).....	68
5.7 Κυκλικός Διχρωϊσμός (CD)	70
5.8 Μέθοδοι ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης μικρών μορίων με την BSA .	71
Κεφάλαιο 6° : Κύτταρα και in vitro μελέτη	73
6.1 Κύτταρο	73
6.2 Κύτταροκαλλιέργειες και καρκινικά κύτταρα.....	73
6.3 In vitro μελέτη	76
Κεφάλαιο 7° : Αντιδραστήρια-Όργανα-Μικροσκευές-Μεθοδολογία	78
7.1 Αντιδραστήρια	78
7.2 Όργανα - Μικροσκευές	79
7.3 Μεθοδολογία – Παρασκευή διαλυμάτων.....	79
Κεφάλαιο 8° : Σύνθεση και χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη PDAM και του πρόδρομου συμπλόκου cis-Ru(DMSO)₄Cl₂.....	88
8.1 Σύνθεση της PDAM	88
8.2 Χαρακτηρισμός της PDAM	91
8.2.1 Φασματοσκοπία UV-Vis	91
8.2.2 Φθορισμομετρία.....	92
8.2.3 Φασματοσκοπία IR	94
8.2.4 Φασματοσκοπία μάζας (MS)	95
8.3 Σύνθεση του συμπλόκου cis-Ru(DMSO) ₄ Cl ₂	95
8.4 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου cis-Ru(DMSO) ₄ Cl ₂	96
8.4.1 Φασματοσκοπία UV-Vis	96
8.4.2 Φασματοσκοπία IR	97
Κεφάλαιο 9° : Σύνθεση και χαρακτηρισμός του συμπλόκου cisRu-PDAM	99
9.1 Σύνθεση του συμπλόκου cisRu-PDAM.....	99
9.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου cisRu-PDAM	100
9.2.1 Φασματοσκοπία UV-Vis	100
9.2.2 Φθορισμομετρία.....	104
9.2.3 Φασματοσκοπία IR	110
9.2.4 Κυκλικός διχρωϊσμός	111
9.2.5 Φασματοσκοπία NMR	112

Κεφάλαιο 10^ο : Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου cisRu-PDAM με CT-DNA	114
10.1 Φασματοσκοπία UV-Vis	114
10.2 Κυκλικός διχρωϊσμός	117
10.3 Φθορισμομετρία.....	122
10.4 Ιξωδομετρία	128
Κεφάλαιο 11^ο : Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου cisRu-PDAM με την πρωτεΐνη BSA	131
11.1 Φασματοσκοπία UV-Vis	131
11.2 Φθορισμομετρία.....	132
11.3 Κυκλικός διχρωϊσμός.....	137
11.4 Υπολογισμός ενέργειας FRET	138
Κεφάλαιο 12^ο : Μελέτη της κυτταροτοξικότητας του συμπλόκου cisRu-PDAM	140
12.1 In vitro αξιολόγηση	140
12.2 Πειραματική διαδικασία - Υλικά και όργανα	140
12.3 Διατήρηση – Ανάπτυξη κυττάρων.....	141
12.4 Κατάψυξη – Απόψυξη κυττάρων	141
12.5 Μέτρηση κυττάρων	142
12.6 Προσδιορισμός βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT	143
Συμπεράσματα	146
Συντημήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια	149
Παράρτημα	150
Βιβλιογραφία	156

Κατάλογος σχημάτων

- Σχήμα 1.1:** Η δομή της 1,10-Φαινανθρολίνης
- Σχήμα 1.2:** Η Δομή της (**α**) bry και (**β**) try
- Σχήμα 1.3:** Υδρογόνα 1,10-φαινανθρολίνης στο $^1\text{H-NMR}$
- Σχήμα 1.4:** Η δομή της 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης
- Σχήμα 1.5:** Παράγωγα φαινανθρολίνης σαν θεμέλια για την ανάπτυξη επιθυμητών συμπλόκων
- Σχήμα 1.6:** Δομή υποκαταστατών με μακροκυκλικές αμίνες στο μόριό τους, συνδεδεμένες (**α**) με en και (**β**) με phen
- Σχήμα 1.7:** Δομή $[\text{Cu}(\text{ph})(\text{o-phen})\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Σχήμα 1.8:** Δομή της 5-άμινο-1,10-φαινανθρολίνη (5-NH₂-phen)
- Σχήμα 1.9:** Παράγωγα της phen έχουν χρησιμοποιηθεί σαν υποκαταστάτες για τη σύνθεση συμπλόκων του Ru(II)
- Σχήμα 1.10:** Τετραγωνικά διπυριμιδικά σύμπλοκα χαλκού (II) με phen
- Σχήμα 1.11:** **Αριστερά :** Δομή 3,4,7,8-τετραμέθυλο-1,10-φαινανθρολίνη (TMP). **Δεξιά:** Δομή 4,7-διφαινόλο-1,10-φαινανθρολίνη (DIP)
- Σχήμα 1.12:** Schiff βάσεις με αντιβακτηριακή δράση
- Σχήμα 1.13:** Δομή 3-alkyl-Clip-Phen (pentyl για n=5)
- Σχήμα 2.1:** Οκταεδρικά σύμπλοκα του Ru(II) - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{N}_2)]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, $[\text{Ru}(\text{bry})_3]^{2+}$ από αριστερά προς τα δεξιά)
- Σχήμα 2.2:** Υποδοχείς τρανσφερίνης που περιέχει ρουθίνιο σε καρκινικά-υγιή κύτταρα
- Σχήμα 2.3:** Μετατροπή του cisplatin στην ενεργή μορφή του ενδοκυτταρικά
- Σχήμα 2.4:** Σύμπλοκα ρουθηνίου που έχουν βιολογική ενεργότητα
- Σχήμα 2.5:** (**α**) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (**β**) Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής (διεγερση 446 nm) του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ σε ακετονιτρίλιο (κορυφές στα 263 nm, 446 nm για την απορρόφηση και 600 nm για την εκπομπή)
- Σχήμα 3.1:** Δομή του DNA (φαίνονται το σάκχαρο, η βάση και η φωσφορική ομάδα)
- Σχήμα 3.2:** Δεοξυριβόζη
- Σχήμα 3.3:** Πυριμιδίνες και πουρίνες
- Σχήμα 3.4:** Τρισδιάστατες δομές A,B,Z DNA (από αριστερά προς τα δεξιά αντίστοιχα)
- Σχήμα 3.5:** Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το DNA
- Σχήμα 3.6:** Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις
- Σχήμα 3.7:** cis-platin
- Σχήμα 3.8:** Δομή του Rh-PPO
- Σχήμα 3.9:** Δομή TriplatinNC
- Σχήμα 3.10:** Αλληλεπίδραση των triplatin με το DNA

Σχήμα 3.11: Αντικατάσταση δεσμών υδρογόνου από μεταλλικό κέντρο (Δομή Cu^{2+} -hydroxyypyridone ζευγών βάσεων)

Σχήμα 4.1: 20 αμινοξέα που απαντώνται στους περισσότερους οργανισμούς

Σχήμα 4.2: Δομές μια πρωτεΐνης

Σχήμα 4.3: Οι διπλές λούπες στην δομή της HSA

Σχήμα 4.4: Υπομονάδα II της ανασυνδυασμένη HSA (100% όμοια με την φυσική), φαίνονται με κόκκινο οι δισουλφιδικοί δεσμοί και όλες οι έλικες είναι αριθμημένες

Σχήμα 4.5: Έλικες και δομή μιας μονάδας της HSA

Σχήμα 4.6: Κρυσταλλογραφική δομή HSA και ο αριθμός αμινοξέων κάθε υπομονάδας (φαίνονται με διαφορετικό χρώμα η κάθε υπομονάδα, η Cys34 και η αρχή και το τέλος της πρωτεΐνης).

Σχήμα 4.7: Κρυσταλλική δομή BSA και τα Sudlow σημεία I, II (κύρια σημεία πρόσδεσης φαρμάκων)

Σχήμα 4.8: Φάρμακα που δεσμεύονται στα Sudlow σημεία

Σχήμα 4.9: Μετατροπή με σχηματισμό β επιφανειών στη δευτεροταγή δομή της BSA μετά από αλληλεπίδραση στα Sudlow sites I,II

Σχήμα 4.10: Τα σημεία που βρίσκονται οι τρυπτοφάνες στην BSA

Σχήμα 4.11: Τα σημεία δέσμωσης των λιπαρών οξέων στην HSA

Σχήμα 4.12: (a) 5 θέσεις των πρωτεύον και δευτερεύον σημείων δέσμωσης λιπαρών οξέων στην BSA (b) Όλες οι θέσεις στην BSA (φαίνονται με χρώμα)

Σχήμα 4.13: Σημεία αλληλεπίδρασης συμπλόκων ρουθηνίου με την BSA

Σχήμα 5.1: Δονήσεις τάσης (ν) και στρέψης (δ)

Σχήμα 5.2: (α) Αύξηση της έντασης της κορυφής του DNA με την θερμοκρασία (β) Καμπύλη τήξης (melting curve)

Σχήμα 5.3: Ιοντισμός και παραγωγή του μητρικού ιόντος για το μεθάνιο

Σχήμα 5.4: **Αριστερά :** Διέγερση και εκπομπή **Δεξιά :** Οι μηχανισμοί με τους οποίους πραγματοποιείται η φωταύγεια

Σχήμα 5.5: **Αριστερά :** φάσματα CD του A-, B-, Z- DNA (από πάνω προς τα κάτω αντίστοιχα) **Δεξιά :** Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού που δίνει ελλειπτικά πολωμένος φως

Σχήμα 6.1: Δομή ρευστού μωσαϊκού των βιολογικών μεμβρανών

Σχήμα 6.2: (a) Πρωτογενής και δευτερογενής κυτταροκαλλιέργεια υγιών κυττάρων πνευμονίου (επιφάνεια τρυβλίων Petri) (b) Συνεχή ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων πνευμονίου χωρίς αναστολή

Σχήμα 6.3 : Μετατροπή της MTT σε φορμαζάνη από την ηλεκτρική αφυδρογονάση

Σχήμα 8.1: Συντακτικός τύπος 2,9-(διαμινομέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης (PDAM)

Σχήμα 8.2: Πορεία σύνθεσης της PDAM

Σχήμα 8.3: PDAM στην πρωτονιομένη μορφή της BH_2^{2+}

Σχήμα 8.4: Φάσμα UV-Vis της PDAM σε μεθανόλη

Σχήμα 8.5: Τα φάσματα φθορισμού της PDAM σε μεθανόλη

Σχήμα 8.6: Φάσμα υπερύθρου της PDAM

Σχήμα 8.7: Φάσμα MS για την PDAM σε διαλύτη μεθανόλη

Σχήμα 8.8: Φάσματα UV-Vis του cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ σε DMSO, MeOH, BufferP 0 και 24 ώρες μετά την διάλυσή του

Σχήμα 8.9: Χημική συμπεριφορά του cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ σε υδατικό διάλυμα

Σχήμα 8.10: Φάσμα υπερύθρου του cis-Ru(DMSO)₄Cl₂

Σχήμα 9.1: Πορεία σύνθεσης του συμπλόκου cisRu-PDAM

Σχήμα 9.2: Φάσματα UV-Vis του συμπλόκου cisRu-PDAM σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα

Σχήμα 9.3: Φάσμα UV-Vis στα 300-600 nm με $b = 0,1 \text{ cm}$, $\theta = 25^\circ \text{ C}$ για τα διαλύματα Ru(II)-PDAM $C_{\text{Ru(II)}} = C_{\text{PDAM}} = 10^{-3} \text{ M}$, $V_{\text{Cu(II)}} + V_{\text{PDALC}} = 1 \text{ mL}$. Στο ένθετο η καμπύλη JOB στα 530 nm συναρτήσει του όγκου του διαλύματος του Ru(II)

Σχήμα 9.4: φάσματα UV-Vis διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης [PDAM]= $1,25 \times 10^{-5} \text{ M}$ και μεταβαλλόμενης μετάλλου [Ru(II)]= $0-1,125 \times 10^{-4} \text{ M}$, σε διαλύτη μεθανόλη. Στο ένθετο σχήμα παρουσιάζονται οι απορροφήσεις στην περιοχή 400-600 nm.

Σχήμα 9.5: Φάσματα διέγερσης και εκπομπής του συμπλόκου cisRu-PDAM συγκέντρωσης $1,91 \times 10^{-5} \text{ M}$, σε μεθανόλη (κόκκινο) και ρυθμιστικό διάλυμα (μπλε)

Σχήμα 9.6: Φθορισμομετρική τιτλοδότηση PDAM σε μεθανόλη (εύρος 200-500 nm)

Σχήμα 9.7: Διάγραμμα % μείωσης του φθορισμού και έντασης του φθορισμού συναρτήσει της [Ru(II)]

Σχήμα 9.8: Διάγραμμα $F_0/F = f([Ru(II)])$

Σχήμα 9.9: Διάγραμμα $1/(F_0 - F) = f(1/[Ru(II)])$

Σχήμα 9.10: Φάσμα IR για το σύμπλοκο cisRu-PDAM στην περιοχή $1800-500 \text{ cm}^{-1}$

Σχήμα 9.11: Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού του συμπλόκου cisRu-PDAM στην περιοχή 200-600 nm

Σχήμα 9.12: Φάσμα ¹H-NMR του cisRu-PDAM σε d₆-DMSO

Σχήμα 10.1: Το φάσμα UV – Vis διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης συμπλόκου και μεταβαλλόμενης DNA, στην περιοχή 230-700 nm (Scatchard) (§7.3 (Γ))

Σχήμα 10.2: Υπολογισμός της σταθεράς σύνδεσης *K_b* του συμπλόκου cisRu-PDAM με εφαρμογή της μεθόδου Scatchard

Σχήμα 10.3: Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης διαλύματος DNA(αριστερά) και διαλύματος (cisRu-PDAM)-(DNA) με λόγο 0,238 (δεξιά)

Σχήμα 10.4: Φάσματα CD της σειράς διαλυμάτων (cisRu-PDAM)-DNA (§7.3(Γ))

Σχήμα 10.5: Φάσματα διαφοράς σειράς διαλυμάτων (cisRu-PDAM)-DNA μείον cisRu-PDAM σε μεθανόλη, $1,9 \times 10^{-5}$ M

Σχήμα 10.6: Φάσματα CD σειράς διαλυμάτων με σταθερή συγκέντρωση DNA και μεταβαλλόμενη προδρόμου συμπλόκου, (α) 24h, (β) 0h (§7.3(Γ))

Σχήμα 10.7: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της distamycin A με την μικρή αύλακα ενός ολιγομερούς νουκλεοτιδίου

Σχήμα 10.8: Φάσματα CD σειράς διαλυμάτων DNA-DisA-(cisRu-PDAM) στην περιοχή 200-500 nm (§7.3(Γ))

Σχήμα 10.9: Φάσμα φθορισμού σειράς διαλυμάτων (EtBr-DNA)-(cisRu-PDAM), $\lambda_{ex}=526$ nm (§7.3 (Γ))

Σχήμα 10.10: Διάγραμμα της έντασης του φθορισμού (F/F_0) του συστήματος (EtBr-DNA)-(cisRu-PDAM) συναρτήσει του λόγου R

Σχήμα 10.11: Φάσμα φθορισμού διαλύματος σταθερής συγκέντρωσης [cisRu-PDAM]= $1,25 \times 10^{-5}$ και μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης DNA (R=0-8) (§7.3 (Γ))

Σχήμα 10.12: Διάγραμμα μεταβολής του F_0/F σε συνάρτηση με τη [DNA_{b.p.}] (387 nm)

Σχήμα 10.13: Διάγραμμα μεταβολής του F_0/F σε συνάρτηση με τη [DNA_{b.p.}] για λόγους $0 < R < 4$

Σχήμα 10.14: Διάγραμμα μεταβολής του F_0/F σε συνάρτηση με τη [DNA_{b.p.}] για λόγους $4 < R < 8$

Σχήμα 10.15: Διάγραμμα μεταβολής του $\log[(F_0-F)/F]$ σε συνάρτηση με τον $\log[DNA]$

Σχήμα 10.16: Διάγραμμα ιξωδομετρίας για cisRuPDAM, cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ 0h, 24h και PDAM

Σχήμα 11.1: Φάσματα UV-Vis της σειράς διαλυμάτων BSA-(cisRu-PDAM) (§7.3 (Δ))

Σχήμα 11.2: Διάγραμμα μεταβολής του $1/(A-A_0)$ σε συνάρτηση με το $1/[cisRu-PDAM]$ για τον υπολογισμό της K_b

Σχήμα 11.3: Φάσματα φθορισμού σειράς διαλυμάτων σταθερής BSA συγκέντρωσης $1,3 \times 10^{-6}$ M και μεταβαλλόμενης συμπλόκου cisRu-PDAM (§7.3 (Δ)), $\lambda_{ex}=280$ nm

Σχήμα 11.4: Διάγραμμα μεταβολής του F_0/F σε συνάρτηση με τη [cisRu-PDAM]

Σχήμα 11.5: Διάγραμμα μεταβολής του $\log[(F_0-F)/F]$ σε συνάρτηση με τον $\log[cisRu-PDAM]$

Σχήμα 11.6: Φάσματα φθορισμού σειράς διαλυμάτων (BSA-Phb)-(cisRu-PDAM) (§7.3 (Δ))

Σχήμα 11.7: Φάσματα φθορισμού σειράς διαλυμάτων (BSA-Ib)-(cisRu-PDAM) (§7.3 (Δ))

Σχήμα 11.8: Διαγράμματα F_0/F προς $\log[cisRu-PDAM]$ σειρών (BSA-PhB)-(cisRu-PDAM) και (BSA-Ib)-(cisRu-PDAM)

Σχήμα 11.9: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού BSA και BSA-(cisRu-PDAM) για λόγους $R=0,59$ και $3,9$

Σχήμα 11.10: Αλληλεπικάλυψη μεταξύ του φασματος απορρόφησης του συμπλόκου ($c=2 \times 10^{-6}$ M) και εκπομπής της BSA ($c=2 \times 10^{-6}$ M) με διέγερση στα 280 nm, σε ρυθμιστικό διάλυμα (§7.3 (Δ))

Σχήμα 12.1: Αιματοκυτόμετρο

Σχήμα 12.2: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας των PDAM, cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ και cisRu-PDAM σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού MCF-7

Σχήμα 12.3: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας των PDAM, cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ και cisRu-PDAM σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη PC-3

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Το Ρουθίνιο

Εικόνα 2: Μορφολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7(A) και PC-3(B) σε οπτικό μικροσκόπιο

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Βασικές ιδιότητες ρουθινίου

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές γεωμετρίες συμπλόκων του Ru²⁺

Πίνακας 3: Φαρμακευτικές χρήσεις συμπλόκων ρουθινίου

Πίνακας 4: Σύγκριση δομικών χαρακτηριστικών και παραμέτρων του A,B και Z-DNA

Πίνακας 5: Σύγκριση υγιών με καρκινικά κύτταρα

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης UV-Vis του υποκαταστάτη PDAM σε μεθανόλη

Πίνακας 7: Μήκη κύματος εκπομπής και της αντίστοιχης διέγερσης (σε nm) για την PDAM σε μεθανόλη

Πίνακας 8: Οι χαρακτηριστικές ταινίες του φάσματος IR του υποκαταστάτη PDAM

Πίνακας 9: Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά συμπλόκου cisRu-PDAM σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

Πίνακας 10: Μήκη κύματος εκπομπής και διέγερσης για το cisRu-PDAM σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα

Πίνακας 11: Οι χαρακτηριστικές ταινίες του φάσματος IR του συμπλόκου cisRu-PDAM, σε σχέση με τις αντίστοιχες του υποκαταστάτη PDAM (§8.2.3)

Πίνακας 12: Τιμές IC₅₀ των υπό αξιολόγηση ενώσεων σε κύτταρα MCF-7, PC-3 και η βιβλιογραφική τιμή του cis-platin στις αντίστοιχες σειρές

Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο των Ακαδημαϊκών Ετών 2018-2019 και 2019-2020, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Ανόργανη Χημεία και Εφαρμογές της στη Βιομηχανία” του Χημικού τμήματος του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του κ. Κώνσταντίνου Μεθενίτη, Αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, με συνεξεταστές την κ. Χριστιάνα Μητσοπούλου, καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ και την κ. Ελένη Ευθυμιάδου, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ.

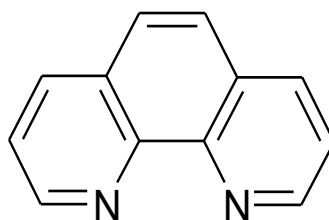
Αντικείμενο της εργασίας αποτελεί η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η βιολογική αξιολόγηση ανόργανων συμπλόκων με πιθανή βιολογική ενεργότητα (αντικαρκινική, αντιβιοτική κ.α.). Συγκεκριμένα, εξετάζονται το σύμπλοκο του Ru^{+2} με το παράγωγο της 1,10-φαινανθρολίνης, 2,9-δι(αμινομέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνη (PDAM), ο υποκαταστάτης PDAM (in vitro αξιολόγηση) και το προσύμπλοκο $cis-Ru(DMSO)_4Cl_2$ από το οποίο συντέθηκε, για λόγους σύγκρισης. Η επιλογή του συγκεκριμένου υποκαταστάτη και του συγκεκριμένου μετάλλου βασίστηκε στις βιολογικές ιδιότητες που έχουν βρεθεί ότι παρουσιάζουν τόσο τα ίδια όσο και οι περισσότερες από τις παράγωγες ενώσεις τους.

Τα πειράματα για την εργασία μου διεξήχθησαν στα εργαστήρια Ανόργανης Χημείας, του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ υπό την επίβλεψη του κ. Μεθενίτη. Τα βιολογικά πειράματα, καθώς και η λήψη των φασμάτων CD, έλαβαν χώρα στο εργαστήριο της Δρ. Μαρία Πελεκάνου, Ερευνήτρια Α΄, στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, υπό την επίβλεψή και με την πολύτιμη βοήθεια της Δρ. Βαρβάρας Μαυροειδή.

Κεφάλαιο 1^ο : Η 1,10- Φαινανθρολίνη, τα παράγωγά της και η βιολογική τους ενεργότητα

1.1 1,10-Φαινανθρολίνη

Η 1,10-Φαινανθρολίνη (phen) είναι μια οργανική ετεροκυκλική ένωση με μοριακό τύπο $C_{12}H_8N_2$ και μοριακό βάρος 180.21 g/mol. Έχει πυκνότητά 1.31 g/cm³, σημείο τήξεως 117 °C και συναντάται με τη μορφή λευκών/υποκίτρινων κρυστάλλων. Είναι διαλυτή σε αρκετούς οργανικούς διαλύτες και σχηματίζει σύμπλοκα με πολλά μεταλλικά ιόντα δρώντας σαν χηλικός υποκαταστάτης μέσω των δύο ατόμων αζώτου (N).^[1]



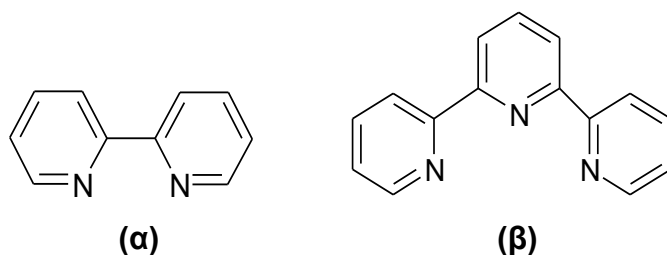
Σχήμα 1.1: Η δομή της 1,10-Φαινανθρολίνης ^[Wikipedia]

Η σύνθεσή της γίνεται συνήθως μέσω αντιδράσεων Skraup, δηλαδή αντίδραση της γλυκερόλης με την ο-φαινυλενοδιαμίνη καταλυόμενη από θειικό οξύ και έναν οξειδωτικό παράγοντα (υδατικό διάλυμα αρσενικού οξέος ή νιτροβενζόλιο). Οι Skraup-Votmann συνέθεσαν το πρώτο παράγωγο 1,10-φαινανθρολίνης το 1883, ενώ η πρώτη σύνθεσή της 1,10-phen έγινε το 1898 από τους Blau-Gerdiessen.^[2]

Η phen είναι ένας κλασικός δισχιδής, χηλικός υποκαταστάτης που συνδέεται με μέταλλα των στοιχείων μεταπτώσεως και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο τόσο στην οργανική όσο και στην ανόργανη χημεία. Σαν υποκαταστάτης παρουσιάζει ομοιότητες με την 2,2'-διπυριδύνη (bpy) με τη διαφορά ότι δεσμεύει τα μεταλλικά ιόντα πιο ισχυρά μέσω των ατόμων N. Το μόριο της αποτελεί ένα άκαμπτο, επίπεδο, ετεροατομικό σύστημα φτωχό σε ηλεκτρόνια, με τα άτομα αζώτου τοποθετημένα έτσι ώστε να ευνοείται η δέσμευση μεταλλικών κατιόντων. Συμπεριφέρεται σαν ασθενής βάση σε υδατικό διάλυμα και η pK_a της ισούται με 4,95. Η βασικότητά της είναι αξιοσημείωτα χαμηλότερη από αυτή των αλειφατικών διαμινών, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα χαρακτηριστικά των ηλεκτρονικά φτωχών ετεροατομικών δακτυλίων και την επακόλουθη χαμηλή σ-δοτική ικανότητα των ατόμων N. Παρόλα αυτά, επιτυγχάνεται και μάλιστα σε αξιοσημείωτο βαθμό η πρόσδεση των μετάλλων. Σε υδατικά διαλύματα ευνοείται ο σχηματισμός οκταεδρικών συμπλόκων τύπου $[M(phen)(H_2O)_4]^{2+}$, $[M(phen)_2(H_2O)_2]^{2+}$ και $[M(phen)_3]^{2+}$ με τα μέταλλα της πρώτης σειράς των στοιχείων μεταπτώσεως. Η σταθερά σχηματισμού (pK_f) των συμπλόκων της μορφής $[M(phen)]^{2+}$ κυμαίνεται από 4,13 για το $[Mn(phen)]^{2+}$ έως και 9,25 για το $[Cu(phen)]^{2+}$. Η σταθερότητα αυτών των

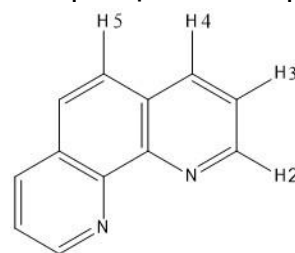
συμπλόκων είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή των αντίστοιχων συμπλόκων της αιθυλενοδιαμίνης (en). Στα σύμπλοκα με τη phen, η συνεισφορά της εντροπίας είναι μεγαλύτερη κυρίως λόγω της υδροφοβικής της φύσης και της επακόλουθης μεγάλης επιδιαιλύτωσης των μεταλλικών ιόντων κατά το σχηματισμό συμπλόκων. Ταυτόχρονα η χαμηλή σ-δοτικότητα των ατόμων N αντισταθμίζεται από την π-δεκτικότητα της phen. Μόνο το σύμπλοκο $[Fe(phen)_3]^{2+}$ παρουσιάζει συνεισφορά ενθαλπίας μεγαλύτερη από το $[Fe(en)_3]^{2+}$ εξαιτίας του σχηματισμού σταθερού συμπλόκου χαμηλού σπιν d^6 ηλεκτρονιακής διαμόρφωσης.^[1, 3]

Αν κάνουμε μια σύγκριση με την 2,2' διπυριδίνη (bpy) και την 2,2'-6,6' τριπυριδίνη (tpy), η φαινανθρολίνη διαθέτει τα δύο άτομα N δότες που είναι αντικριστά και στραμμένα προς το εσωτερικό του μορίου κάτι που ευνοεί την ισχυρή δέσμευση των μετάλλων. Αντίθετα στις bpy και tpy, παρόμοια διάταξη των ατόμων N διαταράσσεται από την ελεύθερη περιστροφή γύρω από το δεσμούς που συνδέουν τους ετεροκυκλικούς αρωματικούς εξαμελείς δακτυλίους.



Σχήμα 1.2: Η Δομή της (α) bpy και (β) tpy ^[Wikipedia]

Αναφορικά σε κάποια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, η phen σε υδατικά διαλύματα στο φάσμα UV-Vis εμφανίζει απορροφήσεις στα 229 και 265 nm. Η τελευταία αποδίδεται σε μια $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάπτωση στη χαμηλότερη απλή διεγερμένη κατάσταση. Μετά από διέγερση στα 307 nm φθορίζει, εκπέμποντας στα 380 nm λόγω αποδιέγερσης της $^1\pi \rightarrow \pi^*$ κατάστασης. Η έλλειψη π ηλεκτρονίων στις phen, bpy και tpy τις καθιστά καλούς π δέκτες και σταθεροποιούνται καλύτερα με μεταλλικά ιόντα σε χαμηλές οξειδωτικές καταστάσεις. Εξαιτίας της παρουσίας των χαμηλής ενέργειας π^* τροχιακών του υποκαταστάτη, τα σύμπλοκα εμφανίζουν ισχυρές MLCT ταινίες μετάπτωσης στο UV-Vis. Στο NMR πρωτονίου (διαλύτης D_2O , σε σχέση με TMF σε $CDCl_3$) βλέπουμε την σειρά μετατοπίσεων $H(2) > H(4) > H(5) > H(3)$ από 7-9 ppm μετατόπισης για τα υδρογόνα (σχ.1.3), τελείως διαφορετική σειρά από την συμπλοκοποιημένη φαινανθρολίνη με μέταλλο, κάτι που θα δούμε και στο επόμενο κεφάλαιο για το $[Ru(phen)_3]^{2+}$. Οι κορυφές είναι τέσσερις λόγω χημικής ισοδυναμίας.



Σχήμα 1.3: Υδρογόνα 1,10-φαινανθρολίνης στο 1H -NMR ^[7]

Εκτός της ενδιαφέρουσας χημείας συντονισμού της, το μόριο της phen παρουσιάζει ιδιαίτερο χημικό ενδιαφέρον λόγω της πλούσιας βιολογική της δράσης (λόγω της παρουσίας του φαινολικού δακτυλίου, δομικού στοιχείου σε πολλά βιολογικά μόρια). Είναι ως εκ τούτου, μια ένωση που συναντάται σε φυσικά βιολογικά προϊόντα, όπως σε στερόλες, ορμόνες φύλου, καρδιακούς γλυκοζίτες, χολικά οξέα και αλκαλοειδή μορφίνης. Τα χαρακτηριστικά αυτά κάνουν την ίδια και τα παράγωγά της να παίρνουν μέρος σε πολλές διεργασίες με μεταλλικά σύμπλοκα ή μη και οι ενώσεις της να βρίσκουν εφαρμογή ως καταλύτες, σταθεροποιητές νανοσωματιδίων και σε τεχνολογικές και ιατρικές εφαρμογές, όπως είναι ως ηλεκτροφθοριστές, οργανικές συσκευές εκπομπής φωτός, οργανικούς ημιαγωγούς και προφανώς ως χημικές νουκλεάσες και θεραπευτικούς παράγοντες (αλληλεπίδραση με DNA). Η ίδια χρησιμοποιείται επίσης σαν δείκτης για αντιδραστήρια αλκυλολιθίου, όπως τα αντιδραστήρια Grignard. Τα αντιδραστήρια αυτά, σχηματίζουν έντονα χρωματισμένα παράγωγα παρουσία της phen.^[1, 3-9]

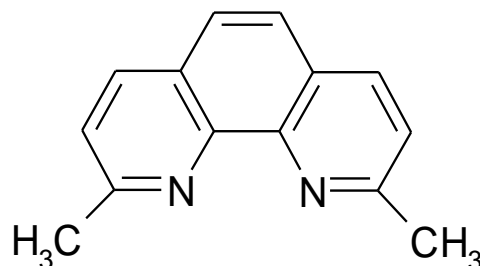
Τέλος, παράγωγα που από μόνα τους έχουν μελετηθεί διεξοδικά για την ιδιαίτερη βιολογική τους δράση είναι η 2,9,-διμεθυλο-1,10-φαινανθρολίνη (νεοκουπρίνη), η 3,4,7,8-τετραμέθυλο-1,10-φαινανθρολίνη (TMP), η 4,7-διφαινύλο-1,10-φαινανθρολίνη (DIP) και πολλά άλλα, οι ιδιότητες και η βιολογική δράση των οποίων θα αναλυθεί διεξοδικότερα και στη συνέχεια.^[1]

1.2 Παράγωγα της 1,10-φαινανθρολίνης και η χημεία τους

Τα τελευταία χρόνια ακολουθούνται αποτελεσματικές πορείες σύνθεσης παραγώγων της phen ώστε να ενεργοποιείται ο πυρήνας της χημικώς, σε διάφορες θέσεις των δακτυλίων. Η κατευθυνόμενη σύνθεση παραγώγων με δομικές αλλαγές στις θέσεις 2 και 9 αποτελεί μία από τις προτιμώμενες οδούς. Αντίθετα, συμμετρική υποκατάσταση στις θέσεις 3,8-, 4,7- και 5,6- είναι λιγότερο κοινή και τα παράγωγα που προκύπτουν λιγότερο λειτουργικά στην εφαρμογή τους. Ακόμα, η σύνθεση τέτοιων παραγώγων είναι δυσκολότερη αν και έχουν μελετηθεί διάφορα αυτού του τύπου με καλή αντιβακτηριακή/αντιική δράση, όπως κάποια πυρρολο-υποκατεστημένα.

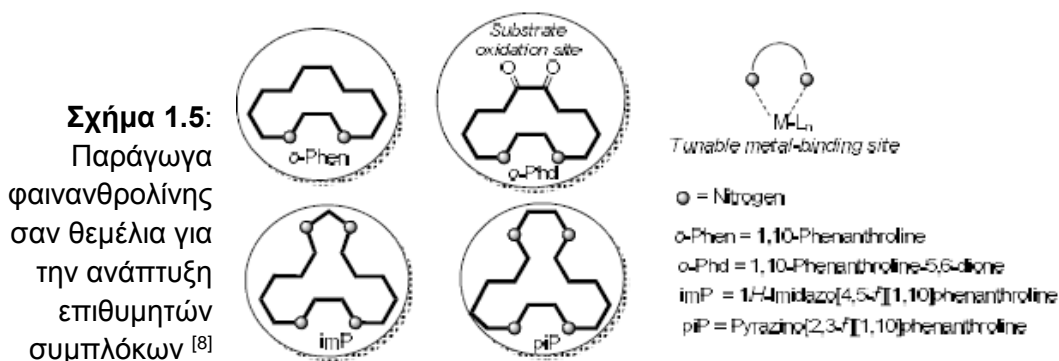
Η συνηθέστερη πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση 2-μόνο ή 2,9-διυποκατεστημένων παραγώγων είναι η 2,9-διμέθυλο, 1,10-φαινανθρολίνη ή αλλιώς νεοκουπρίνη. Η 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνη ή νεοκουπροΐνη είναι ένα ετεροαρωματικό παράγωγο της φαινανθρολίνης που όπως και αυτή, μπορεί να δράσει ως συμπλεκτικός παράγοντας. Είναι ένα ανοιχτόχρωμο κίτρινο στερεό με σημείο τήξεως 162-164 °C, μετρίως διαλυτό στο νερό και πλήρως διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες όπως η ακετόνη, η αιθανόλη, το βενζόλιο και διάφορους αιθέρες. Αυτή μέσω καλά προσδιορισμένων διαδικασιών μετατρέπεται εύκολα σε χρήσιμα συνθετικά για την ανάπτυξη πολυσχιδών και μακροκυκλικών υποκαταστατών που έχουν ενσωματωμένη την ομάδα της phen, ή αποτελούν και τα ίδια πολυδοντικούς υποκαταστάτες.

Για παράδειγμα ο υποκαταστάτης 1,10-φαινανθρολίνη-2,9-δικορβοξυλικό οξύ, στην αποπρωτονιωμένη του μορφή συνδέεται πολύ ισχυρά με μεγάλα μεταλλικά ιόντα σε υψηλές οξειδωτικές βαθμίδες μέσω των τεσσάρων ατόμων δοτών του, σε αντίθεση με τα μικρότερα μεταλλικά ιόντα. Η έντονη κορυφή στα 247 nm σε υδατικά διαλύματα, υποδηλώνει αν το μεταλλικό κέντρο έχει συνδεθεί ή όχι και με τα τέσσερα άτομα δότες του υποκαταστάτη. Τα σύμπλοκα της νεοκουπρίνης που έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί περισσότερο είναι αυτά με τον Cu(I) και Cu(II). Με μέταλλα όπως τα Pt(II), Au(III) και Pd(II) σχηματίζει επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα.^[3, 10]

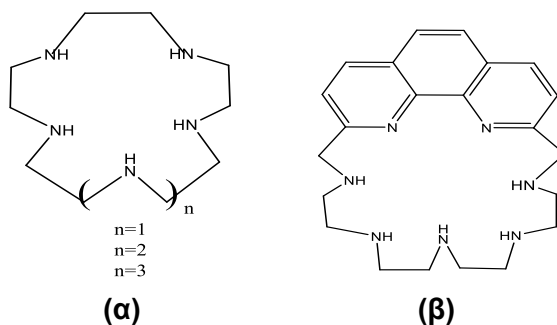


Σχήμα 1.4: Η δομή της 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης ^[Wikipedia]

Κατόπιν, μεγάλος είναι ο αριθμός συμπλόκων φαινανθρολίνης που χρησιμοποιούνται σαν αισθητήρες φθορισμού (π.χ. $[(phen)_2Ru(tpphz)Ru(phen)_2]^{4+}$ (tpphz = tetrapyridophenazine) για την ανίχνευση μεταλλικών ιόντων. Η σχέση τους με τα μεταλλικά ιόντα είναι εξαιρετική, ενώ οι γνωστοί τρόποι υποκατάστασης σε συγκεκριμένες θέσης του δακτυλίου από πλήθος ενώσεων, μαζί με τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του, μας δίνουν την δυνατότητα ανάπτυξης συγκεκριμένων παραγώγων με ρύθμιση της βιολογικής τους ενεργότητας αλλά και των φωτοφυσικών τους χαρακτηριστικών. Για παράδειγμα, η συμπύκνωση Friedländer έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές για τη σύνθεση συμμετρικών γεφυρωτικών, καθώς και μη συμμετρικών τριδοντικών υποκαταστατών παραγώγων της phen. Τέτοιοι υποκαταστάτες επιτρέπουν τη σύνθεση μόνο- και δι-πυρηνικών συμπλόκων (κυρίως Ru^{2+}), των οποίων οι φωτοχημικές και ηλεκτροχημικές ιδιότητες εξαρτώνται από την απόσταση των δύο μεταλλικών κέντρων. Αυτό καθορίζεται από το μέγεθος, το σχήμα και την ιδιότητα δέσμησης του κεντρικού υποκαταστάτη.^[3, 8, 11]



Επίσης, έχουν συντεθεί παράγωγα της phen με μακροκυκλικές πολυαμίνες. Ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις έδειξαν ότι σε υδατικά διαλύματα τα μόνο- μεταλλικά σύμπλοκα των Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} και Zn^{2+} με υποκαταστάτες μακροκυκλικές πολυαμίνες είναι λιγότερο σταθερά από τα σύμπλοκα που έχουν υποκαταστάτες αλειφατικές μακροκυκλικές ομάδες ίδιων ατόμων δοτών (N), αλλά με το τμήμα της phen να αντικαθίσταται από ένα τμήμα en. Αυτό συμβαίνει γιατί ο μεγάλος και άκαμπτος ετεροαρωματικός σκελετός της phen δεν επιτρέπει τη βέλτιστη διάταξη των ατόμων δοτών γύρω από τα μεταλλικά κέντρα.^[3]



Σχήμα 1.6: Δομή υποκαταστατών με μακροκυκλικές αμίνες στο μόριό τους, συνδεδεμένες **(α)** με en και **(β)** με phen ^[12]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη ενός νέου παραγώγου της 1,10-φαινανθρολίνης, η 2,9- δι(υδροξυμεθυλ)-1,10-φαινανθρολίνη. Ο σκελετός του μορίου αυτού είναι αρκετά άκαμπτος. Οι πενταμελείς χηλικοί δακτύλιοι που σχηματίζονται κατά τη σύμπλεξη με μέταλλα αλλά και τα άτομα οξυγόνου των υδροξυμεθυλομάδων που δρουν σαν ουδέτεροι δότες αυξάνουν την εκλεκτικότητα και σταθερότητα του μορίου αυτού προσδεδεμένο με μεγάλα μεταλλικά ιόντα. Ο σχεδιασμός του μορίου έγινε ώστε να συμπλοκοποιείτε με μεγάλα μέταλλα και έδειξε συγκριτικά με την 1,10-φαινανθρολίνη, μεγάλη αύξηση στη σταθερά σχηματισμού συμπλόκων μεγάλων μεταλλικών ιόντων (περίπου 1 Å) ενώ παρατηρήθηκε μικρή μείωση για μικρά μεταλλικά ιόντα. Αυτό γιατί, οι υδροξυμεθυλομάδες του νέου παραγώγου είναι σκληρές βάσεις (κατά Pearson) και το άζωτο του δακτυλίου πυριδίνης θεωρείται ενδιάμεσης σκληρότητας βάση, επομένως αναμένεται να σχηματίσει ισχυρότερα σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα τα οποία είναι μεταξύ ενδιάμεσων και σκληρών οξέων. Τα μόνα μικρά μεταλλικά ιόντα που μπορούν να σχηματίσουν ισχυρά σύμπλοκα με τον υποκαταστάτη αυτόν είναι τα Ni(II) , Cu(II) , Zn(II) , Zr(IV) και Co(II) , όπου μόνο το Zr(IV) ανήκει στα σκληρά οξέα, με όλα τα άλλα να είναι ενδιάμεσα.^[13]

Η χημεία και το πλήθος των παραγώγων φαινανθρολίνης είναι προφανές πως είναι ατελείωτο, πόσο μάλλον οι εφαρμογές του καθενός παραγώγου. Γι' αυτό είναι μάταιο να εμβαθύνουμε άλλο σε αυτό το κομμάτι, αν και επισημάνθηκαν κάποια πράγματα για την χημεία τους. Συνεπώς, στη συνέχεια θα γίνει μια παρουσίαση διαφόρων παραγώγων που παρουσιάζουν σημαντική βιολογική ενεργότητα.

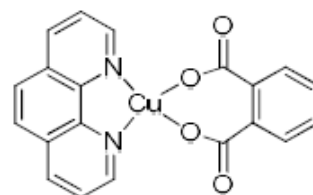
1.3 Βιολογική ενεργότητα 1,10-φαινανθρολίνης και παραγώγων της

Η 1,10-φαινανθρολίνη και τα διάφορα παράγωγά της φαίνεται να παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα βιολογική δραστηριότητα. Κυρίως σύμπλοκα αυτών των ενώσεων με διάφορα μέταλλα μελετώνται ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Γενικότερα, οργανικές ενώσεις που περιέχουν στο μόριο τους επίπεδο, αρωματικό τμήμα, αποτελούμενο πολλές φορές από πολλούς δακτυλίους, όπως οι ανθρακυκλίνες, οι φαινανθρολίνες, οι φαινανθριδίνες και οι ακριδίνες για λόγους που θα δούμε στο αντίστοιχο κεφάλαιο, ανήκουν στους κλασικούς ή μη παρεμβολείς του DNA (αλληλεπίδρασεις π-π). Η παρεμβολή μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της διπλής έλικας με αποτέλεσμα τέτοιες ενώσεις να αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες προκαλώντας απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα και θάνατο σε ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς ή ιούς.^[14]

Κατόπιν, η υδροφοβικότητα της φαινανθρολίνης και το θετικό φορτίο των συμπλόκων της είναι ιδανικά στοιχεία για την αλληλεπίδραση με πρωτείνες μεταφορείς, όπως οι λευκωματίνες ορού (αλβουμίνες). Η αλληλεπίδραση αυτή σταθεροποιείται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Πολλά φάρμακα με αυτή την δράση αναφέρονται στην βιβλιογραφία και για κάποια θα μιλήσουμε στο 4^ο κεφάλαιο.^[15-17]

Η ενσωμάτωση μετάλλων των στοιχείων μετάπτωσης σε ενώσεις όπως η 1,10-φαινανθρολίνη, η διπυριδο [3,2-a:2',3'-c] φαιναζίνη, (dppz), η πυριδίνη και η 2,2',2''-τετραπυριδίνη (terpy), πέραν του ότι προσδίδουν κατιονικό φορτίο στις ενώσεις αυτές, προσδίδουν και νέες επιθυμητές ιδιότητες όπως ο μαγνητισμός, η φωταύγεια καθώς και οξειδοαναγωγικές ιδιότητες και σε πολλές περιπτώσεις αυξάνουν την δράση του φαρμάκου, κάνοντάς το αποτελεσματικότερο. Έτσι, αλλαγές όχι μόνο στον υποκαταστάτη, αλλά και στις ομάδες που προσδένονται σε αυτόν (π.χ. μέταλλα) ή στο περιβάλλον του συμπλόκου, αλλάζουν τον τρόπο σύνδεσης με το DNA, τον τρόπο δράσης ενός πιθανού νέου φαρμάκου και την κυτταροτοξικότητά του.^[18, 19]

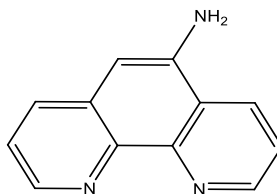
Μεγάλος αριθμός συμπλόκων με φαινανθρολικά παράγωγα σχεδιάζονται για χημικές νουκλεάσες που διασπούν την αλυσίδα του DNA (κεφ.3). Τέτοια παραδείγματα αφορούν κυρίως σύμπλοκα ή νανοσωματίδια φαινανθρολίνης με Cu(II). Με πρώτο το $[Cu(phen)_2]^{2+}$ (σχ. 3.12) γίνεται μεγάλη έρευνα για ανάπτυξη αποτελεσματικότερων χημικών νουκλεασών. Ο Kellert ανέπτυξε το επίπεδο τετραγωνικό σύμπλοκο $[Cu(ph)(o-ph)] \cdot 2H_2O$ (ph=ophthalate) που έχει την δυνατότητα να διασπά το DNA δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες και παρουσιάζει ισχυρή αντικαρκινική δράση ακόμα και σε κύτταρα ανθεκτικά στο cis-platin.^[8]



Σχήμα 1.7: Δομή $[Cu(ph)(o-ph)] \cdot 2H_2O$ ^[8]

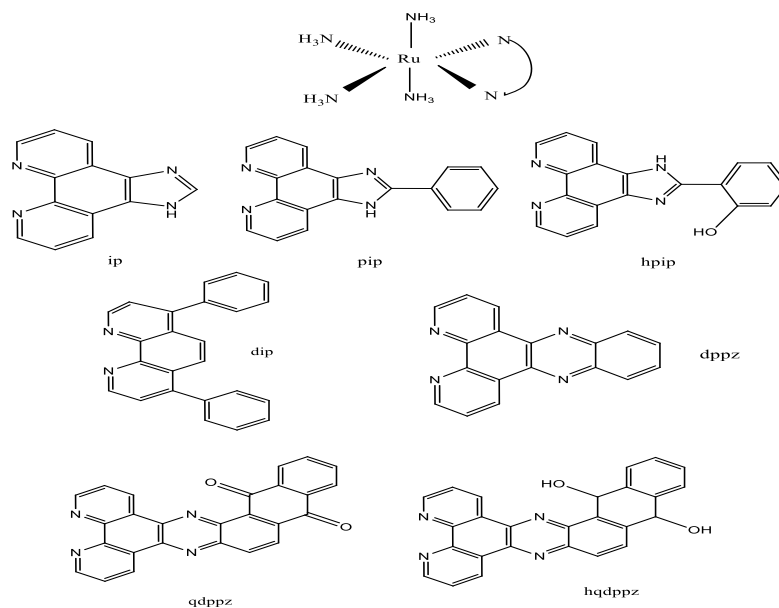
Σύμπλοκα του τύπου $[M(\text{phen})(\text{tu}^*)_2]^{2+}$ ($M = \text{Pd(II)}, \text{Pt(II)}$ και $\text{tu} = \text{θειουρία}$) είναι πολλά υποσχόμενα για το σχεδιασμό νέων αντικαρκινικών μεταλλικών ενώσεων που δρουν μέσω παρεμβολής στο γενετικό υλικό. Τέτοιου τύπου υποκαταστάτες αντικαθίστανται πιο αργά και προτιμώνται προκειμένου να αποφευχθούν ανταγωνιστικές ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με τα βιομόρια, ενώ το περιβάλλον των υποκαταστατών ενισχύει την κυτταροτοξικότητα.^[20]

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται σύμπλοκα μετάλλων μεταπτώσεως με υποκαταστάτες αμινο-παράγωγα της 1,10-φαινανθρολίνης. Πρόσφατα συντέθηκε ένα τέτοιου τύπου σύμπλοκο του Pd(II) , με την 5-αμινο-1,10-φαινανθρολίνη το οποίο σε αντίθεση με το αντίστοιχο σύμπλοκο της μη υποκατεστημένης φαινανθρολίνης παρουσίασε ισχυρή αντικαρκινική δραστηριότητα. Μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία της αμινομάδας στην 5' θέση των αρωματικών δακτυλίων, η οποία είναι δότης ηλεκτρονίων, αυξάνει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα των δακτυλίων και κατ' επέκταση ευνοείται ο σχηματισμός συμπλόκου με το Pd(II) (d^8 σύστημα). Αυτό το σύμπλοκο παράτεινε το χρόνο ζωής των πειραματόζων με διάφορους καρκίνους κατά 1.65 φορές.^[21]



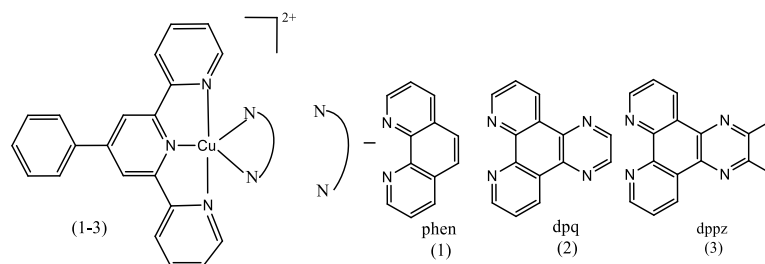
Σχήμα 1.8: Δομή της 5-άμινο-1,10-φαινανθρολίνης (5- NH_2 -phen)^[22]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα ιμιδαζολοπαράγωγα φαινανθρολίνης. Έχει συντεθεί σειρά συμπλόκων του Ru(II) γενικού τύπου $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{2+}$ (σχ. 1.9). Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων αυτών με το DNA και κατ' επέκταση η βιολογική ενεργότητα, είναι ισχυρή με αυτή των hrip και hqdpprz να είναι σημαντικότερη. Αυτό γιατί, ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου που σχηματίζεται στα hrip και hqdpprz (σχ. 1.9) σύμπλοκα αυξάνει την επιφάνεια των παρεμβαλλόμενων διιμινών και ενισχύει τη συγγένεια πρόσδεσης με το DNA, ενώ τα αμμωνιακά σημεία των υποκαταστατών πιθανώς να εμπλέκονται σε σχηματισμό δεσμού υδρογόνου με τις εσωτερικές νουκλεοβάσεις ευνοώντας κατ' αυτόν τον τρόπο την παρεμβολή των εκτεταμένων αρωματικών υποκαταστατών. Όλα τα παρακάτω σύμπλοκα αλλάζουν την δομή του DNA και μελέτες σε πλαδισμιακό DNA έχουν δείξει ότι μπορούν να το διασπούν (από υπερελικωμένη σε χαλαρή μορφή). Επίσης, το $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{ip})]^{2+}$ προκαλεί αλλαγή της έλικας από B προς A δομή, ενώ το $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{qdpprz})]^{2+}$ από B σε Z δομή.^[23]



Σχήμα 1.9: Παράγωγα της phen έχουν χρησιμοποιηθεί σαν υποκαταστάτες για τη σύνθεση συμπλόκων του Ru(II) [21]

Αντίστοιχα έχουν συντεθεί νέα τριμερή σύμπλοκα Cu(II) με υποκαταστάτες παράγωγα της 1,10-φαινανθρολίνης, τα οποία έχουν τετραγωνική-πυραμιδική γεωμετρία (σχ.1.10). Τα σύμπλοκα αυτά βρέθηκε να είναι σταθερά στη στερεή τους κατάσταση, σε μορφή διαλυμάτων φαίνεται να προσδένονται ισχυρά με το DNA μέσω παρεμβολής, ενώ προκαλούν φωτοεπαγόμενη διάσπαση του DNA σε ορατό φως (κόκκινο). Μελέτες έδειξαν πως αυτό επιτυγχάνεται μέσω σχηματισμού ριζών υδροξυλίου. Ακόμα, το σύμπλοκο $[Ru(phen)_2(mitatp)]^{2+}$ ($mitatp = 5\text{-methoxy-isatino}[1,2\text{-}b]-1,4,8,9\text{-tetraazatriphenylene}$) ανήκει στη παραπάνω κατηγορία και καταστρέφει το DNA ορατό φως παράγοντας 1O_2 . Επομένως, είναι προφανής η σημασία των παραγώγων φαινανθρολινών στη φωτοδυναμική θεραπεία.[8, 24]



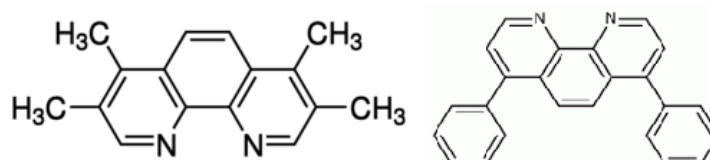
Σχήμα 1.10: Τετραγωνικά διπυριμιδικά σύμπλοκα χαλκού (II) με phen [22]

Κατόπιν, εκμεταλλεόμενοι τα φωτοφυσικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων μετάλλων με παράγωγα phen, είναι έντονο το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων βιομακρομορίων, όπως το DNA για την εύκολη μελέτη των τροποποιήσεών τους σε περίπτωση διαφόρων ασθενειών. Έχουν αναπτυχθεί σύμπλοκα ρηνίου και ρουθηνίου για αυτό το σκοπό. Ένα

παράδειγμα αποτελεί το $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{mbpibH}_2)]^{2+}$ $\text{mbpibH}_2 = 1,3\text{-bis}([1,10]\text{phenanthroline}[5,6\text{-d}]\text{imidazol-2-yl})\text{benzene}$.^[8]

Πρόσφατες μελέτες έφεραν στο φως σύμπλοκα του Ni(II) με 5-υποκατεστημένες (προτίμηση σε μικρά αρωματικά μόρια για καλύτερη πρόσδεση στις πλευρικές αλυσίδες του DNA) 1,10- φανανθρολίνες που σταθεροποιούν τις G4–τελομερικές δευτεροταγείς δομές του DNA, κάτι που βέβαια εξαρτάται και από την αλληλουχία των πλευρικών αλυσίδων. Τα περισσότερα από αυτά τα σύμπλοκα παρεμποδίζουν τη δράση της ανθρώπινης τελομεράσης και μάλιστα σε εύρος χαμηλών συγκεντρώσεων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως γρήγοροι ανιχνευτές για G4 περιοχές στις πλευρικές αλυσίδες. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και μονο- ή δι- πυρηνικά σύμπλοκα ρουθηνίου, όπως τα $[(\text{phen})_2\text{Ru}(\text{trphz})\text{Ru}(\text{phen})_2]^{4+}$ ($\text{trphz} = \text{tetrapyrrophenazine}$) και $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{L}](\text{ClO}_4)_2$ ($\text{L}=1,10\text{-phenanthroline-selenazole}$) με πολύ καλή κυτταροτοξική δράση.^[8, 25]

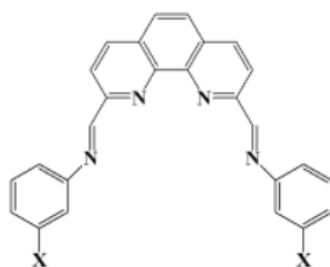
Τα προαναφερθέντα παράγωγα TMP και DIP έχουν δείξει σημαντική αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων (π.χ. *Staphylococcus aureus*) με το DIP να καταστρέφει την ακεραιότητα της μεμβράνης των κυττάρων. Η συμπλοκοποίησή τους με Cu(II) αύξησε την κυτταροτοξική τους δράση που ξεπέρασε και αντιβιοτικά, όπως η αμφικιλίνη. Τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν με το DNA με παρεμβολή (TMP) κι συναρμογή στην αύλακα (DIP). Επιπροσθέτως, σύμπλοκα του TMP καθώς και του 5,6-διμεθυλοφαινανθρολίνης αλληλεπιδρούν με το DNA λόγω υψηλής υδροφοβικότητας και οδηγούν καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση με δράση σε κάποια κύτταρα, που φτάνει το cis platin (MCF-7).^[20, 26]



Σχήμα 1.11: Αριστερά : Δομή 3,4,7,8-τετραμέθυλο-1,10-φαινανθρολίνη (TMP).
Δεξιά : Δομή 4,7-διφαινύλο-1,10-φαινανθρολίνη (DIP) ^[Wikipedia]

Ενδιαφέρον βιολογική δράση έχουν και κάποια παράγωγά της phen που δεν είναι ενωμένα με κάποιο μέταλλο. Μια σημαντική κατηγορία είναι τα N-1,10 αλκυλιωμένα παράγωγα, όπως η προαναφερθείσα νεοκουπρίνη. Άλατα βρωμίου αυτή της κατηγορίας παραγώγων έχουν μελετηθεί με Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια, δείχνοντας εξέχουσα κατασταλτική δράση που αυξάνεται όταν οι αλκυλικές αλυσίδες είναι μακρύτερες. Κατόπιν, Schiff βάσεις της 1,10-διμεθυλο-φαινανθρολίνης (νεοκουπρίνη) αλδεύδης που ενώνεται με δότες αζώτου στα αλδεϋδικά σημεία και περιέχουν βενζολικούς δακτυλίους με διάφορες λειτουργικές ομάδες, έχουν δείξει πιθανή αντιβακτηριακή δράση, αναλόγως την λειτουργική ομάδα X(σχήμα 1.12). Η νεοκουπρίνη σε σύμπλοκα με ιόντα Cu(II) και σαλικυλικά οξέα έχει δείξει κυτταροτοξική δράση με διπλό

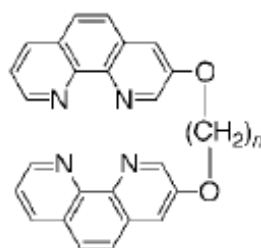
μηχανισμό ως ενδοπαρεμβολές, αλλά και ως χημική νουκλεάση λόγω του σαλικυλικού οξέος.



Σχήμα 1.12: Schiff βάσεις με αντιβακτηριακή δράση ^[27]

Επίσης, παράγωγα της πυρρολο[2,1-c][4,7]φαινανθρολίνης που ανήκουν στην κατηγορία αναλόγων με ομάδες στις θέσεις 4,7 του δακτυλίου της φαινανθρολίνης έχουν δείξει αντιβακτηριακή δράση (εναντίον μυκοβακτηρίων φυματίωσης) και πιθανή αντικαρκινική εναντίον διαφόρων σειρών.^[27-30]

Μια χαρακτηριστική ομάδα παραγώγων ακόμα με ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον, είναι τα λεγόμενα clip-phen παράγωγα, όπου δύο μόρια φαινανθρολίνης ενώνονται μεταξύ τους με ποίκιλες αλυσίδες στους άνθρακες C2 ή C3. Η βιολογική τους δράση ποικίλει σύμφωνα με την φύση, το μήκος αλλά και την υδροφοβικότητα της αλυσίδας που συνδέει τα δύο μόρια φαινανθρολίνης. Την πιο σημαντική κυτταροτοξική δράση εναντίον καρκινικών κυττάρων έδειξε το παράγωγο 3-pentyl-Clip-Phen, ενώ η συμπλοκοποίηση των παραπάνω ενώσεων με Cu(II) δεν βελτιώνει την κυτταροτοξική τους δράση.^[31]



Σχήμα 1.13: Δομή 3-alkyl-Clip-Phen (pentyl για n=5) ^[29]

Όπως γίνεται φανερό, σύμπλοκα της φαινανθρολίνης και παραγώγων της με μέταλλα των στοιχείων μεταπτώσεως λόγω της πληθώρας της βιολογικής τους δράσης ανοίγουν νέους θεραπευτικούς ορίζοντες για διάφορες ασθένειες, όπως ο καρκίνος. Η κατάλληλη επιλογή του μετάλλου επηρεάζει τη δραστηριότητα αυτή. Τέλος, η δυνατότητα σχεδιασμού αυτών των μορίων με τόσο κατάλληλη επιλογή του υποκαταστάτη όσο και των προσδεδωμένων σε αυτόν ομάδων καθορίζουν τον τρόπο αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το γενετικό υλικό και κατάλληλες πρωτεΐνες, προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό κάθε φορά αποτέλεσμα.^[11, 26]

Κεφάλαιο 2° : Το Ρουθίνιο (Ru) και οι σύμπλοκες ενώσεις του στην ιατρική

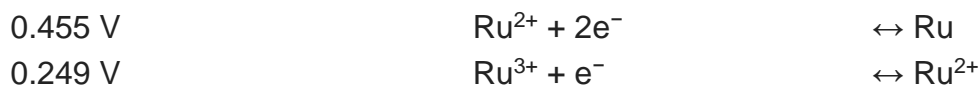
2.1 Ρουθίνιο

Το ρουθίνιο (Ru) είναι το χημικό στοιχείο με ατομικό αριθμό 44 και ατομικό βάρος 101,07 g/mol. Ανακαλύφθηκε από τον Claus το 1844. Είναι μαζί με το σίδηρο και το όσμιο μέλη της 8ης/VIIIB ομάδας του Περιοδικού Πίνακα και ανήκει μαζί με το παλλάδιο, το ρόδιο, το όσμιο, το ιρίδιο και τον λευκόχρυσο στα λεγόμενα μέταλλα της ομάδας του λευκόχρυσου. Σε μηδενική οξειδωτική κατάσταση έχει ηλεκτρονική δομή $[Kr]4d^75s^1$. Εμφανίζει όλες τις δυνατές θετικές οξειδωτικές καταστάσεις από 0 έως +8 με πιο συνήθεις τις +2, +3, +4 και σπανιότερα δε, την κατάσταση οξείδωσης -2. Είναι χημικά αδρανές στοιχείο και οι ενώσεις των μετάλλων του ή το ίδιο χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως καταλύτες σε μεγάλης σπουδαιότητας βιομηχανικές παρασκευές.^[32, 33]

Στα υλικά που περιέχουν ρουθίνιο, βρίσκεται σε μεταλλική μορφή Ru(s) ή σαν θειούχο Ru(IV)S₂. Το μεταλλικό Ru είναι στερεό σε συνήθεις συνθήκες με πυκνότητα 12.45 g/cm³ και έχει σημείο τήξης 2334 °C. Είναι πολύ σκληρό ασημόγκριζο αδρανές μέταλλο με αστραφτερή επιφάνεια και παρουσιάζει τέσσερις κρυσταλλικές διαμορφώσεις. Συγκεκριμένα, είναι το 4ο σκληρότερο όλων των χημικών στοιχείων (μετά τα Os, Ir, Re) με βαθμό Mohs 6,5. Γενικά, κρυσταλλώνεται κυρίως στο εξαγωνικό σύστημα (hcp) και γίνεται υπεραγώγιμο στους -272,66 °C. Δεν χάνει την λάμψη του σε θερμοκρασία δωματίου γιατί δεν είναι δραστικό, αλλά δείχνει παραμαγνητική συμπεριφορά διότι έχει μονήρη ηλεκτρόνια τα οποία συμπεριφέρονται ως στοιχειώδεις μαγνήτες και έλκονται από μαγνητικά πεδία.

Στη μεταλλική μορφή παθητικοποιείται από ένα λεπτό στρώμα μη πτητικού RuO₂ (γι' αυτό και δεν ξεθωριάζει σε συνήθεις συνθήκες), ενώ αντιδρά περαιτέρω με το οξυγόνο στους 800 °C και οξειδώνεται σχηματίζοντας το διοξείδιο. Το ίδιο συμβαίνει και με τα αλογόνα σε υψηλή θερμοκρασία, δίνοντας αλογονίδια με το χλώριο και το φθόριο.

Κατόπιν, δεν διαλύεται σε οξέα ή σε μίγμα οξέων, ενώ έχει ελαφρά βασικές ιδιότητες και αντιδρά σε βασικά διαλύματα δίνοντας RuO₄²⁻ (ruthenate ion). Αυτό φαίνεται και από τα δυναμικά αναγωγής σε όξινες συνθήκες.



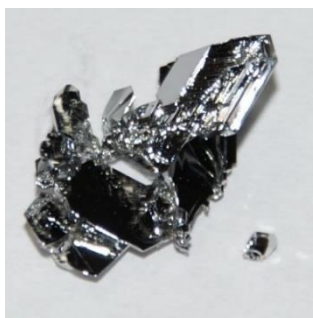
Το RuO₄²⁻ σε θερμοκρασία κάτω των 100 °C ανάγεται σε διοξείδιο.

Πίνακας 1: Βασικές ιδιότητες ρουθηνίου^[32, 34, 35]

Κατηγορία	Ρουθίνιο
-----------	----------

Ομάδα, περίοδος, τομέας	8 ,5, d
Ατομική ακτίνα pm	134
Κυριότεροι αριθμοί οξειδωσης	+2, +3, +4
Πυκνότητα (g/cm ³)	12.45
Ενέργειες ιονισμού (KJ/mol)	1η: 710,2 2η: 1620 3η: 2747
Σημείο Τήξης (°C)	2334
Σημείο Ζέσης (°C)	4150
Θερμική αγωγιμότητα (W/m·°C) – 27 °C	148
Ηλεκτρική αντίσταση (nΩ·m) - 0°C)	71
Ηλεκτραρνητικότητα	2.2

Στη φύση βρίσκεται σε ορυκτά μαζί με άλλα μέταλλα ομάδας λευκοχρύσου ή νικελίου-κοβαλτίου και αποτελεί το 74^ο σε αφθονία χημικό στοιχείο στο φλοιό τη Γης. Είναι το έκτο σπανιότερο μέταλλο στην επιφάνεια της Γης σε ποσότητα 0,0004 ppm του φλοιού της και λαμβάνεται από ορυκτά λευκοχρύσου. Τέτοια είναι το οσμιρίδιο, ο λαουρίτης (RuS₂), ο ρουαρσίτης, ο ρουθεναρσενίτης και το ορυκτό του ρουθηνίου (φυσική μορφή ρουθηνίου) που είναι πιο σπάνιο και πολλές φορές αντικαθίσταται σε κάποια σημεία από το ιρίδιο. Υπάρχει ακόμα στον πεντλανδίτη, τον πυροξενίτη και το rutheniridosmine. Σε κάποια ορυκτά βρίσκεται σαν κράμα Os-Ir-Ru. Η παραγωγή του ανέρχεται σε 12 τόνους τον χρόνο από τα παραπάνω ορυκτά και ως παραπροϊόν κατεργασίας ορυκτών νικελίου και κοβαλτίου. Παρουσιάζει πάνω από 40 ισότοπα από τα οποία μόνο 7 είναι σταθερά.^[34-48]



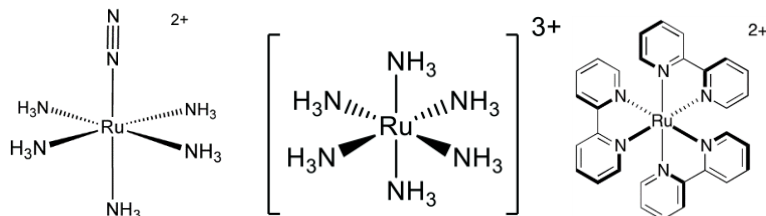
Εικόνα 1: Το Ρουθήνιο [<https://www.indiamart.com/proddetail/ruthenium-metal-8712237862.html>]

Το ρουθίνιο σχηματίζει πλήθος δυαδικών ενώσεων όπως π.χ. οξειδία, σουλφίδια, αλογονίδια κ.α. καθώς επίσης και σύμπλοκα σε διάφορες οξειδωτικές καταστάσεις. Τα περισσότερα σύμπλοκα, ειδικά αυτά με υποκαταστάτες δότες N ή αλογονοϊόντα, είναι διαλυτά στο νερό. Οι μηχανισμοί στις αντιδράσεις των συμπλόκων αυτών παρουσιάζουν ενδιαφέρον εξ' αιτίας του *trans* φαινομένου που εμφανίζεται, καθώς επίσης και της ασυνήθιστης ταχύτητας μεταφοράς ηλεκτρονίου. Χαρακτηριστική τάξη συμπλόκων είναι αυτά που σχηματίζονται με υποκαταστάτες π-οξέα. Υποκατεστημένα πολυπυρηνικά καρβονύλια είναι γνωστά για το ρουθίνιο, αν και τα σύμπλοκα με το NO είναι τα πλέον χαρακτηριστικά. Μία τάξη συμπλόκων που έχει ιδιαίτερος μελετηθεί είναι τα σύμπλοκα με τριαλκυλο- και τριαρυλοφωσφίνες και φωσφίτες. Γενικά, στα σύμπλοκα του ρουθινίου γίνεται αξιοσημείωτη έρευνα τα τελευταία χρόνια με ανάπτυξη συμπλόκων του που έχουν εφαρμογές στην ιατρική, την κατάλυση, την βιολογία, τις νανοεπιστήμες, τα οξειδοαναγωγικά ή φωτοδραστικά υλικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά βοηθούνται γιατί το ρουθίνιο υφίσταται σε πολλές οξειδωτικές καταστάσεις.^[32]

Η σταθερότερη κατάσταση οξειδωσης για το ρουθίνιο είναι η +3. Το ρουθίνιο (III) σχηματίζει οκταεδρικά και χαμηλού spin σύμπλοκα με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Όπως έγινε ήδη κατανοητό και παραπάνω το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ ανιχνεύεται σε υδατικό διάλυμα αλλά ανάγεται εύκολα στο σύμπλοκο του Ru(II) με το νερό, σύμφωνα με την αντίδραση $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+} + e^- \rightarrow [\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ $E_0 = + 0,23 \text{ V}$. Σχηματίζει αλογονο-υδατικά σύμπλοκα και αμιγή αλογονικά με χλώριο και βρώμιο. Ακόμα, έχει ιδιαίτερη προτίμηση στο άζωτο σχηματίζοντας σύμπλοκα με NH_3 , διπυριδίνη και φαινανθρολίνη.

Η κατάσταση οξειδώσεως II είναι αρκετά γνωστή για το ρουθίνιο στις ενώσεις του. Το ρουθίνιο (II) έχει επίσης ιδιαίτερη προτίμηση στο άζωτο, σχηματίζοντας τα περισσότερα νιτροζυλο σύμπλοκα από κάθε άλλο στοιχείο. Τέτοια είναι τα $[\text{RuCl}_5(\text{NO})]^{2-}$, $[\text{RuCl}(\text{bpy})_2(\text{NO})]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{NO})]^{3+}$ και άλλα. Όλα τα σύμπλοκα του είναι διαμαγνητικά d^6 χαμηλού spin και έχουν οκταεδρική δομή. Οι εξαιρέσεις είναι ελάχιστες, όπως αυτή των συμπλόκων $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ και $\text{HRuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ (σημαντικοί καταλύτες υδρογόνωσης) και άλλων παρόμοιας δομής (κυρίως με φωσφίνες) που υιοθετούν τετραγωνική πυραμιδική γεωμετρία λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης στην 6^η θέση σύμπλεξης. Δεν παρουσιάζει οξειδία και δεν έχει καλά χαρακτηρισμένα αλογονίδια, ενώ με θέρμανση με S δίνει RuS_2 (Δομή σιδηροπυρίτη). Γενικά συμπλοκοποιείτε με αλογόνα (κυρίως με χλώριο και βρώμιο), αλλά δεν υπάρχουν απλά αλογονοσύμπλοκα και κάποια σύμπλοκα (όπως το μπλε του ρουθινίου) με αλογόνα, δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως. Η ιδιαίτερη προτίμηση στο άζωτο και στο θείο (ισχυρή προτίμηση) ερμηνεύεται με την αρχή του Pearson για σκληρά και μαλακά οξέα και βάσεις, αφού το Ru^{2+} είναι ενδιάμεσης μαλακότητας οξύ (ως εκ τούτου ευνοείτε η ένωση με N και S, παρά με οξυγόνο). Η προτίμηση αυτή είναι σημαντικό στοιχείο για την αλληλεπίδραση με βιολογικά μόρια ή το DNA, όπως θα δούμε.

Λόγω της κινητικής του αδράνειας σύμπλοκα του φτιάχνονται από πρόδρομα υψηλότερη οξειδωτικής βαθμίδας. Σχηματίζει οκταεδρικά σύμπλοκα με το νερό και την αμμωνία (οξειδώνονται στον αέρα), στα οποία αντιδρώντας με N₂ υπό πίεση, αντικαθίσταται ένας υποκαταστάτης από διάζωτο (σχήμα 2.1).^[32, 41, 49]



Σχήμα 2.1: Οκταεδρικά σύμπλοκα του Ru(II) - ([Ru(NH₃)₅(N₂)]²⁺, [Ru(NH₃)₆]³⁺, [Ru(bpy)₃]²⁺ από αριστερά προς τα δεξιά)^[39]

Τα τρισχηλικά σύμπλοκα με διπυριδίνη (bpy), αιθυλενοδιαμίνη (en) και 1,2-φαινανθρολίνη (phen) παρασκευάζονται με αναγωγή του RuCl₃ από ψευδάργυρο όπως το [Ru(NH₃)₆]²⁺. Το [Ru(bpy)₃]²⁺ είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς απορροφά ακτινοβολία στα 452 nm και οδηγείτε γρήγορα σε μια διαγερμένη τριπλή κατάσταση (Metal to Ligand μετάπτωση) με χρόνο ζωής 600 ns. Με την βοήθεια ενός παράγοντα απόσβεσης και ενός θυσιαζόμενου δότη ηλεκτρονίου λειτουργεί πολύ καλά ως φωτοευαίσθητοποιητής (π.χ. στη φωτολυτική παραγωγή υδρογόνου από νερό). Η δυνατότητα αυτή έχει φέρει στο προσκήνιο δεκάδες διπυριδιλικά σύμπλοκα που μελετούνται και συνθέτονται για αυτήν την χρήση. Τέλος, πολλά σύμπλοκα που περιέχουν τους υποκαταστάτες phen, en, bpy και παράγωγά τους, έχουν δείξει από μικρή έως μεγάλη βιολογική ενεργότητα (κάποια θα δούμε παρακάτω).^[41, 50-54]

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές γεωμετρίες συμπλόκων του Ru²⁺^[32]

Οξειδωτική κατάσταση	Αριθμός Συντάξεως	Γεωμετρία
Ru ^{II} , d ⁶	5	Τριγωνικό Πρίσμα
	5	Τριγωνική Διπυραμιδική

2.2 Η Βιοχημεία του ρουθηνίου(II) και η βιολογική σημασία του

Το ρουθίνιο δεν βρίσκεται σε κάποιο ένζυμο και δεν διαδραματίζει ιδιαίτερο βιολογικό ρόλο, δημιουργεί όμως έντονα στίγματα στο ανθρώπινο δέρμα, είναι καρκινογόνο σε αρκετές ποσότητες και βιο-συσσωρεύεται στα οστά. Δεν υπάρχει κανένα στοιχείο όσον αφορά την τοξικότητα του ρουθηνίου στα τρόφιμα, δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις του είναι εξαιρετικά χαμηλές.^[32] Η

παρουσία ρουθηνίου σε κάποιες τροφές, όπως άνηθος και σπανάκι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τρόπος ανίχνευσης για την κατανάλωσή τους.^[55]

Το ρουθίνιο παρόλο που δεν έχει πλούσια βιοχημεία, βρίσκεται στο ανθρώπινο σώμα σε υψηλότερη συγκέντρωση από το κοβάλτιο που έχει ουσιαστική δράση (βιταμίνη B₁₂), αλλά δεν είναι γνωστή ακριβώς η ποσότητά του σε αυτό. Η ύπαρξή του είναι κυρίως λόγω της κατανάλωσης σε κάποια τρόφιμα και ενδεχόμενης αφομοίωσης του σε περιοχές με απόβλητα εργοστασίων. Τα ισότοπα για παράδειγμα, ¹⁰³Ru και ¹⁰⁶Ru είναι ραδιενεργά και παράγονται σε ελάχιστες ποσότητες σαν απόβλητα πυρηνικών αντιδράσεων σε πυρηνικά εργοστάσια, γι' αυτό και έχει μελετηθεί η πιθανή αφομοίωσή ισοτόπων ρουθηνίου σε μικροοργανισμούς. Απομονωμένος ο μικροοργανισμός *Bacillus subtilis* έδειξε να δεσμεύει ισχυρά ρουθίνιο (III) στα κυτταρικά τοιχώματά του. Το ¹⁰⁶Ru είναι από τα πιο μακρόβια ραδιονουκλίδια που ευθύνεται για την εμφάνιση καρκίνου πολλές δεκαετίες έπειτα.^[56-59]

Παρόλο που το ρουθίνιο έχει μικρή βιολογική σημασία, χρήση τους στη ιατρική όπως ήδη αναφέραμε, είναι τεράστιας σημασίας και πόσο μάλλον δε, αυτή των συμπλόκων του. Παρόλα αυτά, σε φάρμακά που χορηγείτε θα πρέπει να χρησιμοποιείτε με μετριοπάθεια γιατί αν εισαχθεί αρκετή ποσότητα, είναι τοξικό. Όλες οι ενώσεις ρουθηνίου θεωρούνται πολύ τοξικές και καρκινογόνες σε μεγάλη ποσότητα. Στον άνθρωπο το ρουθίνιο μπορεί να ανιχνευθεί κυρίως στο αίμα, τον νωτιαίο μυελό (κόκκαλα) και τα ούρα. Στα φυτά η ποσότητα ρουθηνίου αντιστοιχεί σε 5 ppb ή λιγότερο, παρόλο που φύκια εμφανίζουν να τον συγκεντρώνουν. Δεν είναι γνωστά πολλά δεδομένα για το περιβάλλον και δεν έχουν αναφερθεί περιβαλλοντικές επιπτώσεις.^[55-57]

Επίπροσθέτως, πολλά μέταλλα είναι τοξικά στο άνθρωπο που ακόμα και σε μικρές ποσότητες βλάπτουν το σώμα, όπως το αρσενικό, ο μόλυβδος και ο υδράργυρος, ενώ υπάρχουν φυσικώς στην Γη. Το ρουθίνιο ή πολλές ενώσεις ρουθηνίου μπορούν να λειτουργήσουν σαν παράγοντες που εμποδίζουν την ελεύθερη κυκλοφορία τέτοιων μετάλλων στο αίμα. Γι' αυτό και ο ρόλος του μπορεί να προκαλέσει ευεξία.^[60-64]

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε πως τα φάρμακά του Ru παρουσιάζουν βιοχημεία και για την χρήση τους στην ιατρική με ιδιαίτερη έμφαση στα αντικαρκινικά και αντιβιοτικά σύμπλοκά του, θα ασχοληθούμε στη συνέχεια του κεφαλαίου.

2.3 Μεταλλικά σύμπλοκα στην ιατρική

Η Βιοανόργανη και η βιολογική ανόργανη χημεία προσφέρει την δυνατότητα σχεδιασμού νέων θεραπευτικών και διαγνωστικών παραγόντων καθώς και την κατανόηση ασθενειών που δεν έχουν κατανοηθεί. Από την βιοχημεία πλήθους μετάλλων (χαλκός, κοβάλτιο, σίδηρος, μαγγάνιο κλπ), είναι φανερό ότι τα ανόργανα στοιχεία διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στις βιολογικές και βιοϊατρικές διεργασίες. Αυτό αποδεικνύει ότι πολλές οργανικές ενώσεις που

χρησιμοποιούνται στην ιατρική δεν έχουν αμιγώς οργανική λειτουργία δράσης, αλλά κάποιες ενεργοποιούνται ή βιοσχηματίζονται από μεταλλικά ιόντα συμπεριλαμβανομένων μεταλοενζύμων, ενώ άλλες έχουν άμεση ή έμμεση επίδραση στον μεταβολισμό των μεταλλικών ιόντων.^[65]

Η αλληλεπίδραση του DNA με σύμπλοκα των μετάλλων μεταπτώσεως παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας των ποικίλων εφαρμογών τους στη θεραπεία του καρκίνου, ασθενειών και στη μοριακή βιολογία.^[66]

Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα συμπλόκων που χρησιμοποιείται στην ιατρική είναι το cis-platin. Όμως, το cis-platin λόγω των παρενεργειών που εμφανίζει και της αντίστασης που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα με την παρατεταμένη θεραπεία, οδήγησε τους ερευνητές να μελετήσουν εναλλακτικές λύσεις για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων. Το ίδιο πρόβλημα αντιμετωπίζουν και πολλά αντιβιοτικά λόγω της ανθεκτικότητας που αποκτούν οι μικροοργανισμοί σε αυτά. Για την επίτευξη λοιπόν, αυτού του σκοπού, έχουν συντεθεί αρκετές κατηγορίες μεταλλοσυμπλόκων χρησιμοποιώντας ποικίλους υποκαταστάτες και μεταλλικά ιόντα των οποίων η αντικαρκινική/αντιβιοτική δράση έχει αξιολογηθεί in vitro και in vivo.^[67]

Τέλος, τα σύμπλοκα μετάλλων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φωτοευαίσθητοποιητές για την θεραπεία δέσμευσης νετρονίων (Neutron Capture Therapy, NCT), ως αντιαθροτικά φάρμακα (π.χ. χρυσός), ως ψυχιατρικά φάρμακα (π.χ. λίθιο) και ως ραδιοδιαγνωστικοί/ραδιοθεραπευτικοί παράγοντες (π.χ. τεχνήτιο).^[65]

2.3.1 Σύμπλοκα του ρουθηνίου με βιολογική ενεργότητα

Οι σημαντικές ιατρικές ιδιότητες της κατηγορίας των ενώσεων του ρουθηνίου ως συνέχεια των ήδη αναπτυγμένων φαρμάκων με μέταλλα της ομάδας του λευκοχρύσου, έχουν αναγνωριστεί και πρόσφατα πολλά τέτοια φάρμακα, έχουν περάσει σε κλινικές μελέτες. Τέτοια μεταλλικά σύμπλοκα είναι δυνατόν να εμφανίζουν ορισμένα πλεονεκτήματα κρίσιμης σημασίας στην φαρμακευτική τους δράση όπως θα δούμε παρακάτω. Τα φάρμακά του ρουθηνίου είναι δραστικά εναντίον κυτταρικών σειρών ανθεκτικών στο cis platin και έχουν χαμηλές παρενέργειες λόγω της εκλεκτικότητας στα καρκινικά κύτταρα που τα απορροφούν σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από τα φυσιολογικά. Βεβαίως, η δραστικότητα των μεταλλοφαρμάκων με ρουθίνιο εξαρτάται από τον υποκαταστάτη του συμπλόκου και την οξειδωτική κατάσταση του μετάλλου. Με τροποποιήσεις αυτών των χαρακτηριστικών έχουν αναπτυχθεί αντικαρκινικά με σημαντική δραστικότητα σε ανθεκτικούς όγκους, αντιμυκητιακά, αντιβιοτικά και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα.

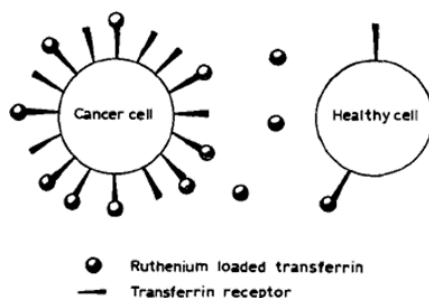
Πίνακας 3: Φαρμακευτικές χρήσεις συμπλόκων ρουθηνίου^[60]

Σύμπλοκα Ru
Ανοσοκατασταλτικά
Αντικαρκινικά
Οδοντικά κράματα
Αντιμικροβιακά (π.χ ελονοσία ή Charas ασθένεια)
Αντιβιοτικά
Αντισηπτικά (καταπολέμηση σήψης)

Γενικά, τα στοιχεία που θα μπορούσαμε να ξεχωρίσουμε και κάνουν ιδανικά τα σύμπλοκα του ρουθηνίου ως φάρμακα, είναι το εύρος των οξειδωτικών καταστάσεων που παίρνει το μεταλλικό κέντρο, η ικανότητα του ρουθηνίου να μιμείται το σίδηρο και να ενώνεται σε πολλά βιολογικά μόρια, τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων του και η ταχύτητα ανταλλαγής υποκαταστατών (αδράνεια - σταθερότητα των ενώσεών του).

Εφόσον το Ru(III) είναι το κυρίαρχο σε φυσιολογικές συνθήκες οι οξειδωτικές καταστάσεις II και IV είναι εύκολα προσβάσιμες από βιολογικά αναγωγικά ή οξειδωτικά. Σε αυτές τις καταστάσεις το μεταλλικό κέντρο είναι εξαυποκατεστημένο με οκταεδρική δομή. Το ρουθηνίο III είναι πιο αδρανές γι' αυτό η οξειδωτική κατάσταση τροποποιείτε από διάφορα μόρια στον οργανισμό (το Ru(III) οξειδώνεται σε Ru(VI) ή ανάγεται σε Ru(II)) και αλληλεπιδρά με τον στόχο πιο εύκολα. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής ερευνάται για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ενεργοποίηση του φαρμάκου, όπως για παράδειγμα με μια αναγωγή στο αναγωγικό περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων. Εξαιτίας των μεταβολικών διαφορών που υπάρχουν μεταξύ καρκινικών και υγιών κυττάρων, τα σχετικά ηλεκτροχημικά δυναμικά στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων είναι γενικά χαμηλότερα από τον περιβάλλοντα κανονικό ιστό, και ιδιαίτερα στο κέντρο του όγκου. Αυτές οι διαφορές ευνοούν την παραγωγή Ru(II) σε σχέση με το Ru(III) στους όγκους, με συνέπεια να υπάρχει μεγαλύτερη αναλογία [Ru(II)/Ru(III)] σε σύγκριση με τον υγιή ιστό. Η οξειδωση του ρουθηνίου II προς III μπορεί να λάβει χώρα με μοριακό οξυγόνο, κυτοχρωμική οξειδάση και άλλες οξειδωτικές ενώσεις, αλλά είναι λιγότερο πιθανό να συμβεί στα καρκινικά κύτταρα που έχουν έλλειψη οξυγόνου (υποξία) ή στο περιβάλλον μικροβιακών μολύνσεων. Η υποξία έχει αποτέλεσμα την ικανότερη δέσμευση φαρμάκων στο DNA (λόγω παρουσίας Ru^{+2}) και συνεπάγεται μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα. Το χαρακτηριστικό αυτό ευνοείτε από την εύκολη οξειδοαναγωγική μετατροπή του ρουθηνίου III σε II. Τέτοια παραδείγματα φαρμάκων είναι τα $cis[Cl_2(NH_3)_4Ru]Cl$ (CCR) και $(ImH)trans-[(Im)_2Cl_4Ru]$ (ICR), (Im=imidazole) εναντίον καρκινικών σειρών HeLa.

Το ρουθίνιο έχει την δυνατότητα να μιμείται το σίδηρο στη δέσμευση σε βιομόρια όπως η τρανσφερίνη και αλβουμίνη κάτι που μειώνει την τοξικότητά του. Αυτό γιατί, η γρήγορη ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και μικροβιακά μολυσμένων κυττάρων κάνει τις απαιτήσεις για σίδηρο μεγαλύτερες, ώστε να αναπτύσσουν περισσότερους υποδοχείς πρωτεϊνών μεταφορέων στην επιφάνειά τους. Έτσι, in vivo το ρουθίνιο που πιάνεται σαν το σίδηρο στον μεταφορέα, φτάνει σε καρκινικά και μολυσμένα κύτταρα 2-12 φορές παραπάνω από τα υγιή μειώνοντας την τοξικότητα σε αυτά και αυξάνοντάς την στόχο του.

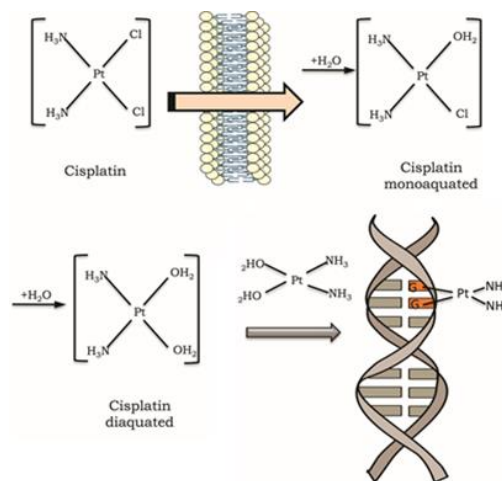


Σχήμα 2.2: Υποδοχείς τρανσφερίνης που περιέχει ρουθίνιο σε καρκινικά-υγιή κύτταρα [58]

Τα σύμπλοκα του ρουθηνίου έχουν αρκετά όμοια κινητική συμπεριφορά με τα σύμπλοκα του Pt(II), ένας ακόμα λόγος που τους προσδίδει ερευνητικό ενδιαφέρον. Η ανταλλαγή υποκαταστατών είναι σημαντικό στοιχείο για την βιολογική ενεργότητα, διότι λίγα είναι τα φάρμακα που φτάνουν στο στόχο τους μη τροποποιημένα. Έτσι, πολλά από τα σύμπλοκα που εμφανίζουν καλή αντικαρκινική/αντιβιοτική δράση φαίνεται ότι υφίστανται in vivo κάποιου είδους μεταβολή με αποτέλεσμα η μορφή που τελικά δεσμεύεται στο DNA ή στο μόριο στόχο να μην είναι ίδια με αυτή που εισάγεται αρχικά στον οργανισμό. Τα περισσότερα αλληλεπιδρούν με μόρια όπως πρωτεΐνες, νερό, μικρές ενώσεις με θείο. Κάποιες από αυτές τις αλληλεπιδράσεις είναι ουσιαστικές για να προκαλέσουν τις επιθυμητές θεραπευτικές ιδιότητες του φαρμάκου. Κατά συνέπεια είναι ίσως πιο δόκιμο να χρησιμοποιείται ο όρος «προ-φάρμακα» για σύμπλοκα του ρουθηνίου που εισάγονται σ' ένα οργανισμό και τροποποιούνται ακολούθως μέσω μιας μεταβολικής πορείας. Η πορεία αυτή εξαρτάται από την φύση των υποκαταστατών και κυρίως από την αδράνεια του μετάλλου που μας επιτρέπει να ελέγξουμε τον ρυθμό της πορείας, άρα και την ποσότητα του φαρμάκου που θα φτάσει στον στόχο καθώς και να αποφύγουμε τυχόν ανεπιθύμητες τροποποιήσεις που αυξάνουν την τοξικότητα, ώστε να φτάσει το φάρμακο στην μορφή που επιθυμούμε (δυσκολότερο για πιο δραστικά ευκίνητα μέταλλα). Επίσης, η ταχύτητα ανταλλαγής υποκαταστάτη εξαρτάται και ελέγχεται ευκολότερα από την συγκέντρωση του υποκαταστάτη στο διάλυμα, ώστε ασθένειες που αλλάζουν αυτές τις συγκεντρώσεις στα κύτταρα ή στο περιβάλλον τους να επηρεάζουν την δραστηριότητα του φαρμάκου.

Οι μεταβολικές πορείες στη συνηθέστερη περίπτωση περιλαμβάνουν ανταλλαγή των υποκαταστατών στο αίμα ή ενδοκυτταρικά και

οξειδοαναγωγικές μετατροπές. Μια τέτοια πορεία είναι και η αναγωγή ενδοκυτταρικά του μεταλλικού ιόντος, όπως η παραπάνω μετατροπή του Ru(III) σε Ru(II). Η πορεία αυτή λέγεται <<ενεργοποίηση με αναγωγή>> και βελτιώνει την συναρμογή στα βιομόρια. Η περίπτωση του αντικαρκινικού cis platin που ενδοκυτταρικά υδρολύεται στη δραστική του μορφή (φαίνεται στο παρακάτω σχήμα) και μετά αλληλεπιδρά με το DNA, είναι χαρακτηριστική ανταλλαγής υποκαταστατών.



Σχήμα 2.3: Μετατροπή του cisplatin στην ενεργή μορφή του ενδοκυτταρικά ^[70]

Επιπροσθέτως, η ανταλλαγή υποκαταστατών και η ταχύτητά της, η καλά ανεπτυγμένη χημεία του ρουθηνίου και οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητές των ενώσεων του μας δίνουν την δυνατότητα για αξιόπιστες μεθόδους σύνθεσης νέων σταθερών συμπλόκων με προβλεπόμενη δομή και ικανότητα ρύθμισης ιδιοτήτων (συγγένεια υποκαταστατών, μεταφορά φορτίου, δυναμικά αναγωγής, ταχύτητες αντικατάστασης), ενώ τα έντονα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων του μας διευκολύνουν στην λεπτομερή μελέτη τους και ανίχνευση της αλληλεπίδρασης τους με βιολογικά μόρια.

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των συμπλόκων του ρουθηνίου στα φάρμακα (οξειδωτικές καταστάσεις +2, +3, +4) είναι η προαναφερθείσα μεγάλη συγγένεια στους υποκαταστάτες με πιο μαλακούς δότες αζώτου (ενδιάμεση σκληρότητα) και θείου. Ειδικότερα, τα μεταλλικά ιόντα της ομάδας του λευκοχρύσου, (όπως και το ρουθίνιο) εμφανίζουν σχετικά μεγάλη συγγένεια για ηλεκτρονιακά ζεύγη που βρίσκονται πάνω σχεδόν σε κάθε είδους άτομα αζώτου και ειδικότερα σε άτομα αζώτου που συναντιόνται σε σηματονικά βιομόρια όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα και το DNA. Συνεπώς, μεγάλος αριθμός συμπλόκων του ρουθηνίου έχει την τάση να δεσμεύεται εκλεκτικά σε ιμινικές θέσεις βιομορίων που σε ουδέτερο pH είναι αποπρωτονιωμένες. Τέτοιες θέσεις μπορεί να είναι είτε το ιμιδαζολικό άζωτο της ιστιδίνης στις πρωτεΐνες, είτε το N7 της πουρίνης του νουκλεοτιδίου στο DNA (άλλες θέσεις αναφέρονται και στα αντίστοιχα κεφάλαια), με αποτέλεσμα να μπορεί κάποιος να εκμεταλλευτεί τις ιδιότητες αυτών των βιομορίων για στόχευση συγκεκριμένων ιστών. Η δυνατότητα αυτή είναι μείζονος σημασίας για την πιθανή φαρμακευτική δράση των συμπλόκων

του. Κατόπιν, σύμπλοκα με θειόλες είναι γενικά λιγότερο σταθερά, χωρίς όμως να αποκλείεται η σύζευξη με θείο σε μόρια όπως η αλβουμίνη (4ο κεφάλαιο).

Αν συνοψίσουμε τα μόρια στόχους που βασίζονται οι μηχανισμοί που λειτουργούν τα φάρμακα του ρουθηνίου έχουμε κυρίως τα παρακάτω:

- Αλβουμίνη και τρανσφερίνη στο πλάσμα του αίματος που λειτουργούν ως μεταφορείς ή βοηθούν στην αποθηκείωση του φαρμάκου
- Κολλαγόνα της εξωκυττάριας μήτρας και των ακτινών στην επιφάνεια των κυττάρων (εμπλέκονται στην αντιμεταστατική δράση συμπλόκων ρουθηνίου)
- Ένζυμα ρυθμιστές στην κυτταρική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα
- DNA στο πυρήνα των κυττάρων

Το μονοπάτι του κάθε φαρμάκου εξαρτάται από τη δέσμευσή του σε πρωτεΐνες μεταφορείς, σε βιομόρια της επιφάνειας κυττάρων ή σε διάχυση στο κύτταρο και καθορίζεται από τον ανταγωνισμό μεταξύ των αντιδράσεων (τροποποιήσεων) που έχουμε ήδη αναφέρει (π.χ. υδρόλυση, αναγωγή του προφαρμάκου). Είναι προφανές, ότι το μονοπάτι αυτό είναι κρίσιμο για την πιθανή αντιμεταστατική ή κυτταροτοξική δράση του κάθε φαρμάκου.

Έτσι, έχει προταθεί πως το DNA αποτελεί τον κυριότερο ενδοκυτταρικό στόχο των αντικαρκινικών / αντιβιοτικών συμπλόκων του ρουθηνίου ως συνέχεια της αρκετά μεγάλης τάσης σύνδεσης του εν λόγω μεταλλικού ιόντος με ιμινικά άτομα αζώτου. Αρκετά σύμπλοκα έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν τον αναδιπλασιασμό του DNA, εμφανίζουν μεταλλαξιογόνο δράση (π.χ. επάγουν απόκκριση SOS), καταστρέφουν το πυρηνικό DNA και ελαττώνουν τη σύνθεση του RNA, διαδικασίες που σχετίζονται με τη δέσμευση, in vivo, όλων αυτών των ενώσεων στο DNA. Η δημιουργία δεσμών συναρμογής ανάμεσα στα νουκλεϊνικά οξέα και σε κατιοντικά σύμπλοκα του ρουθηνίου φαίνεται να προάγεται εξ αιτίας ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Σε μερικές περιπτώσεις η δομή του DNA εμφανίζει κυρτώσεις ή βρόχους με αποτέλεσμα το αρνητικό ηλεκτροστατικό φορτίο του φωσφορικού σκελετού να συνωστίζεται σε περιορισμένο χώρο. Η ηλεκτροστατική «δέσμευση» ενός κατιοντικού συμπλόκου είναι σημαντική είτε γιατί κατευθύνει το μεταλλικό ιόν σε μια συγκεκριμένη θέση στη δίκλωνη έλικα προάγοντας έτσι τη σύμπλεξη, είτε γιατί συγκρατεί το σύμπλοκο σε άμεση γειτνίαση με το DNA ώστε να δεσμευτεί αργότερα με κάποιον από τους τρόπους αλληλεπίδρασης (κεφ.3).

Συμπερασματικά, το ρουθίνιο είναι το δεύτερο μετά τον λευκόχρυσο, μέταλλο που έχει μελετηθεί σε τόση έκταση για την φαρμακευτική του δράση εναντίον κυρίως του καρκίνου, αλλά και διαφόρων άλλων ασθενειών. Συνεπώς, θα ήταν μάταιο να γίνει μια εκτενής αναφορά σε όλα αυτά τα φάρμακα. Γι' αυτό στη συνέχεια αναφέρονται διάφορες κατηγορίες τέτοιων φαρμάκων ρουθηνίου που έχουν μελετηθεί για πιθανή κυτταροτοξική δράση.^[60, 68-74]

➤ Μια σημαντική κατηγορία κυταροτοξικών συμπλόκων του ρουθηνίου είναι τα διαλκυλοσουλφοξειδία, όπως με το διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO). Τέτοια έχουν εμφανίσει αντικαρκινική δράση συγκρίσιμη με το cisplatin, με λιγότερες παρενέργειες και αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης. Ιδιαίτερα το $[\text{Ru}(\text{Im})(\text{DMSO})\text{Cl}_4]^-$ (NAMI), το ανάλογό του $(\text{ImH})\text{trans}-[\text{Ru}(\text{Im})(\text{DMSO})\text{Cl}_4]$ (NAMI-A) και το $[\text{Ru}(\text{II})(\text{C}_6\text{H}_6)(\text{DMSO})\text{Cl}_2]$ (σχήμα 2.4) παρουσιάζουν σημαντική αντιμεταστατική δράση. Παρόλα αυτά, δεν επηρεάζουν την διαμόρφωση του DNA, όπως το cis-platin, αλλά οι αρωματικοί δακτύλιοι προσδίδουν στα μόρια τους υδρόφοβες ιδιότητες που μπορούν να αυξήσουν την αναγνώρισή και μεταφορά τους μέσω κυτταρικών μεμβρανών και τελικά παρεμποδίζουν την τοποισομεράση II (π.χ. παγίδευση σε σύμπλοκο με το DNA), απαραίτητη για την κυτταρική διαίρεση. Τα NAMI, NAMI-A παρόλο που εισήχθησαν σε φάσεις κλινικών δοκιμών, δεν πέρασαν τις φάσεις I, II, διότι καθυστερούσαν την μετάσταση, αλλά δεν αναστέλλαν την ανάπτυξη των αρχικών όγκων. Κατόπιν, τα σύμπλοκα cis- $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2]$ και trans- $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2]$ (φαίνεται στο σχήμα 2.5), όπου το cis θα μας απασχολήσει στην παρούσα εργασία, έχουν αξιολογηθεί για την βιολογική τους ενεργότητα. Οι σημαντικές δομικές διαφορές των δύο ισομερών έχουν ως άμεση συνέπεια οι δύο αυτές ενώσεις να εμφανίζουν μια εντελώς διαφορετική συμπεριφορά στα υδατικά διαλύματα και άρα διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες. Η κυταροτοξική δράση του trans είναι αρκετά σημαντικότερη από αυτή του cis.

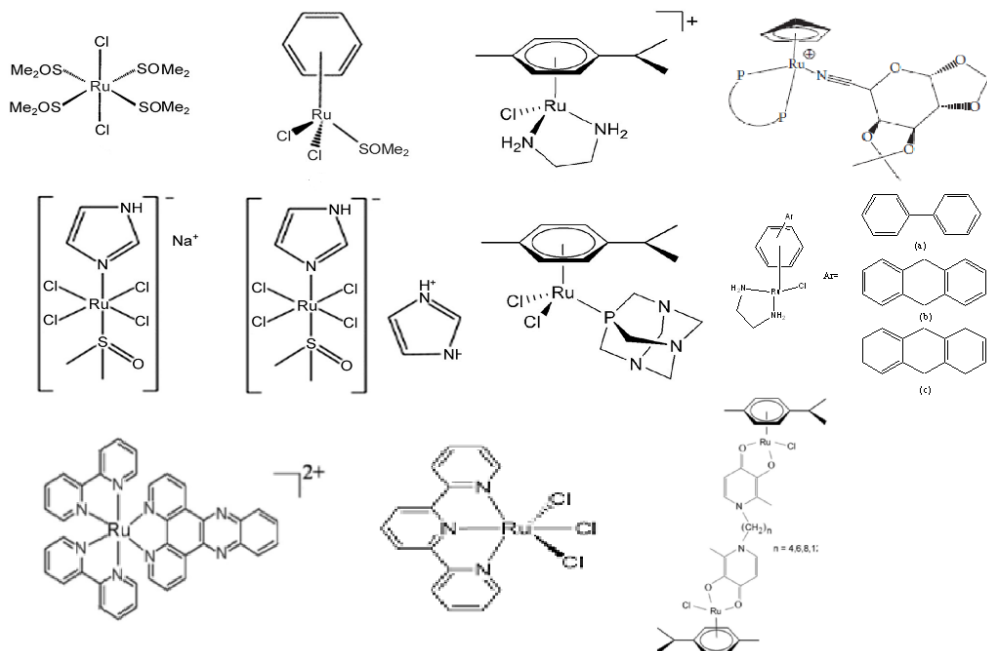
➤ Τεράστιος είναι ο αριθμός αμινικών/ιμινικών (ετεροκυκλικά σύμπλοκα) και πολυαμινοκαρβοξυλικών φαρμάκων του ρουθηνίου. Τα NAMI,-A ανήκουν και στην κατηγορία ετεροκυκλικών τέτοιων συμπλόκων που έχουν γενικό τύπο $(\text{HB})[\text{Ru}(\text{III})\text{B}_2\text{Cl}_4]$, B=ετεροκυκλική βάση (π.χ.ιμιδαζόλιο, ινδαζόλιο). Αυτά, έχουν θετικά αποτελέσματα έναντι μελανωμάτων, σαρκωμάτων και λευχαιμικών κυττάρων P 388. Τα φάρμακα της κατηγορίας είναι τα πρώτα που δοκιμάζονται για αντινεοπλασματικές ιδιότητες με τα fac- $\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_3(\text{NH}_3)_3$ και cis- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ να είναι αποτελεσματικά έναντι κυττάρων P 388. Ακόμα, το $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{L}(\text{bpy})_2]^+$ (L=colchicine ή trimethylcolchine) είναι σταθερά σε διάλυμα και δραστικά εναντίον K562 (λευχαιμικά) και COLO205 (εντερικά) κύτταρα. Τα πολυαμινοκαρβοξυλικά σύμπλοκα είναι καινούργια κατηγορία φαρμάκων διαλυτά στο νερό με αντιπρορωπευτικό τα $\text{K}[\text{Ru}(\text{III})(\text{eddp})\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ και cis- $[\text{Cl}_2(\text{pdta})\text{Ru}(\text{III})]$ (eddp=ethylenediamine-N,N'-di-3-propionate, pdta=1,2-propylendiaminetetraacetic acid) με πολύ καλή αντικαρκινική δράση.

➤ Οργανομεταλλικά σύμπλοκα και σύμπλοκα που περιέχουν αρένια (βενζολικούς δακτύλιους) έχουν ενδιαφέρον με παράδειγμα το γνωστό $[\text{Ru}(\text{II})(\text{C}_6\text{H}_6)(\text{DMSO})\text{Cl}_2]$. Αυτό άνοιξε ένα πεδίο σύνθεσης συμπλόκων με τύπο $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{en})\text{X}]^+$, (X=αλογόνο, arene=p-κυμόλιο ή διφαινύλιο και en=αιθυλενοδιαμίνη ή παράγωγά της), όπως το $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{II})(\text{en})(\text{Cl})]^+$ με κυταροτοξική δράση που φτάνει σε πολλές περιπτώσεις το cisplatin ή παράγωγά του. Κάποια ακόμα της κατηγορίας με καλή βιολογική ενεργότητα είναι τα $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PP})(\text{L})]^+\text{PF}_6$ (PP=1,2bis(diphenylphosphino)ethane και L υδατάνθρακας) ή αρενικά που έχουν υποκαταστάτη δισχιδή αιθυλενοδιαμίνη.

➤ Τα δι- και πολύ-πυριδικά σύμπλοκα είναι μια διαφορετική ποικιλία ενώσεων προσθήκης στο DNA με ενδιαφέρον στην μοντέρνα ανάπτυξη φαρμάκων εναντίον κυττάρων που αντιστέκονται στο cisplatin και με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα. Σημαντικά διπυριδικά είναι το σύμπλοκο με ένωση (μεσω αλκυλικών αλυσίδων) των ομάδων $\{(\eta^6\text{-}p\text{-isopropyltoluene})\text{RuCl}[\text{3-(oxo-jO)-2-methyl-4-pyridinonato-}\kappa\text{O}_4]\}$ (σχ. 2.4), το $\{[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{X}]\}$, (X = naphthazarin ή quinizarin) και το μεικτού σθένους με καρβοξυλικές ομάδες ως γέφυρες $[(\mu\text{-RCO}_2)_4\text{ClRu}_2]$ (R=μέθυλο ή αίθυλο) με καλή κυτταροτοξική δράση.

➤ Τα πολυπυριδικά σύμπλοκα του ρουθηνίου αφορούν συνήθως σύμπλοκα με διπυριδίνη, φαινανθρολίνη και παράγωγά τους, ενώ εμφανίζουν χειρομορφία και μπορούν να δεσμεύονται εναντιοεκλεκτικά σε βιομόρια. Ένα τέτοιο είναι το mer-[Ru(II)Cl₃(terpy)] με αξιοσημείωτη βιολογική ενεργότητα. Επίσης, τα πολυπυριδικά φαρμάκα τύπου RuL₃(PF₆)₂ (L : 2-φαίνυλοπυριδίνη ή ο-τοζυλοπυριδίνη) έχει ενδιαφέρον ιδιότητες. Τρία πολύ σημαντικά κυτταροτοξικά σύμπλοκα τέτοιου είδους είναι τα [Ru(phen)₂(5-idip)]²⁺, [Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ και [Ru(tpy)(ptn)]²⁺ (dppz = dipyridophenazine, 5-idip = 2-indole-[4,5-f]-[1,10]phenanthroline, (ptn = 3-(1,10-phenanthrolin-2-yl)-as-triazino[5,6-f]naphthalene, tpy = 2,2':6',2''-terpyridine). Το τρίτο φαίνεται να μετατρέπει το B DNA σε Z (κεφ.3).^[52, 54, 70, 75-77]

Φάρμακα του ρουθηνίου αξιοποιούνται και κατά της υπέρτασης, καθώς μπορεί να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και να ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση. Κάποια είναι τα trans-[Ru(NH₃)₄{P(OEt)₃(NO)}(PF₆)₃ και trans [RuCl(tmfs)(cyclam)](tfms) (cyclam = 1,4,8,11-tetraazocyclotetradecane, tfms = trifilic acid).^[70]



Σχήμα 2.4: Σύμπλοκα ρουθηνίου που έχουν βιολογική ενεργότητα ^[50]

Εκτός των παραπάνω τα σύμπλοκα ρουθηνίου έχουν πλούσια φωτοχημεία. Πολλά από αυτά μπορεί να δημιουργούν ενδοκυτταρικά ή στο

εξωκυτταρικά ελεύθερες ρίζες με ακτινοβολία ή αντιδρώντας με κυτταρικά αναγωγικά, προκαλώντας το ενδιαφέρον για φωτοδυναμική θεραπεία.

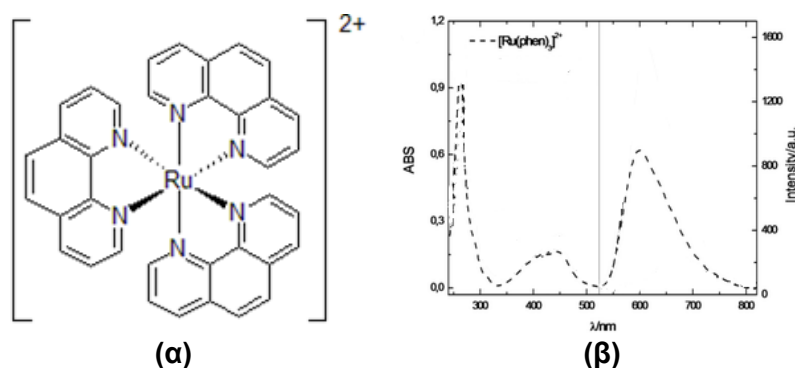
Τέλος, η δυνατότητα στοχευμένου και ακριβή σχεδιασμού συμπλόκων του ρουθηνίου μας βοηθάει και στην ανάπτυξη νέων ραδιοφαρμάκων που περιέχουν ένα από τα ισότοπα του ρουθηνίου.^[60, 70]

2.4 Σύμπλοκο Ru(II)-φαινανθρολίνης

Η σημασία πολυπυριδιλικών ιόντων του ρουθηνίου(II) στην ιατρική είναι φανερή από τα παραπάνω. Αξίζει να αναφέρουμε κάποια χαρακτηριστικά του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ως βάση για την κατανόηση της μελέτης τέτοιων συμπλόκων.^[78]

Αυτό παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά που έχουμε ήδη αναφέρει στην ανάπτυξη αντικαρκινικών / αντιβιοτικών φαρμάκων (κινητική αδράνεια, έντονα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις), ενώ είναι πολυπυριδιλικό σύμπλοκο, κάτι που το ευνοεί, καθώς γνωρίζουμε ότι έχουν μελετηθεί αρκετά οι φασματοσκοπικές και χημικές ιδιότητες τέτοιων συμπλόκων. Έχει την παρακάτω δομή και στο φάσμα απορρόφησής του παρουσιάζει μια ισχυρή κορυφή κοντά (ανάλογα με τον διαλύτη) στα 260 nm λόγω π-π* μεταπτώσεων της φαινανθρολίνης (και κάποιες υψηλότερα, όπως 230 nm) και μια ευρεία πιο ασθενής σε απορρόφηση κορυφή στα 450 περίπου, που οφείλεται σε μετάπτωση από HOMO (μετάλλου) σε LUMO (υποκαταστάτη), είναι δηλαδή MLCT μετάπτωση. Μετά από διέγερση στα 450 nm το σύμπλοκο φθορίζει έντονα με μια ισχυρή κορυφή κοντά στα 600 nm, ενώ στο ^1H NMR φάσμα του στο D_2O (με σημείο αναφοράς TMS σε CDCl_3) εμφανίζονται τέσσερα πρωτόνια (λόγω ισοδυναμίας) όπως και στην 1,10-φαινανθρολίνη με μετατοπίσεις 8.01, 7.49, 8.46, 8.10, σειρά συχνότητας $\text{H}(4) > \text{H}(5) > \text{H}(2) > \text{H}(3)$ και ολοκληρώσεις 1/1/1/1.

Τέλος, το σύμπλοκο δεν παρουσιάζει d-d μεταπτώσεις αν και σε διπυριδυλικά σύμπλοκα εμφανίζονται αρκετές φορές οι μεταπτώσεις $^1\text{A}_1 \rightarrow ^3\text{T}_1$ και $^1\text{A}_1 \rightarrow ^1\text{T}_1$ των d^6 συστημάτων, όπως στο $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.^[7, 79, 80]



Σχήμα 2.5: (α) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (β) Φάσμα απορρόφησης και εκπομπής (διέγερση 446 nm) του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ σε ακετονιτρίλιο (κορυφές στα 263 nm, 446 nm για την απορρόφηση και 600 nm για την εκπομπή)^[39,76]

Κεφάλαιο 3° : DNA και αλληλεπίδρασή του με μικρά μόρια

3.1 DNA

Το DNA και το RNA είναι μακριά, γραμμικά πολυμερή, τα οποία ονομάζονται νουκλεϊκά οξέα και μεταφέρουν πληροφορίες σε μορφή τέτοια, που να μπορούν να μεταβιβάζονται από την μια γενιά στην επόμενη. Γενικά, τα μακρομόρια αυτά αποτελούνται από μεγάλο αριθμό συνδεδεμένων μεταξύ τους νουκλειοτιδίων. Κάθε νουκλεοτίδιο όπως θα δούμε και παρακάτω, αποτελείται από ένα σάκχαρο, μια φωσφορική ομάδα και μια αζωτούχα βάση. Η φωσφορική ομάδα ενώνεται με το σάκχαρο και συγκροτούν μια αλυσίδα (κορμό) που έχει δομικό ρόλο στα νουκλεϊκά οξέα, ενώ η αλληλουχία των αζωτούχων βάσεων στην αλυσίδα αποτελούν τον φορέα της γενετικής πληροφορίας (γονίδιο), μέσω των διαδικασιών της αντιγραφής, μεταγραφής, μετάφρασης. Έτσι, το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ ή αλλιώς DNA περιέχει τις γενετικές πληροφορίες που καθορίζουν την βιολογική ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής και των περισσότερων ιών.^[81] Γνωστό και ως γενετικό υλικό, βρίσκεται πακεταρισμένο με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών στον πυρήνα των κυττάρων με τη μορφή καλά συσπειρωμένων μακρομορίων, τα χρωμοσώματα.^[82]

Η δομή του διαλευκάνθηκε το 1953 από τους Watson και Crick, ως η αποκορύφωση και η σύνθεση πειραματικών αποτελεσμάτων που είχαν ληφθεί από μεγάλο αριθμό επιστημόνων επί πολλά έτη. Αυτή η δομή καθιστά το μόριο μοναδικό και ιδανικό όπως θα αντιληφθούμε, για φορέα της γενετικής πληροφορίας.^[83] Η διαλεύκανση της δομής του βοήθησε σημαντικά στην λεπτομερή κατανόηση βιολογικών διεργασιών, όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, καθώς και στη χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος.^[82]

Η μεγάλη σημασία του για την ζωή, το έχει καταστήσει σημαντικότερο στόχο για τη ανάπτυξη φαρμάκων.^[83] Ιδιαίτερο είναι το ενδιαφέρον για μελέτη μικρών μορίων που ενδεχομένως να επηρεάζουν βιολογικές διεργασίες ελεγχόμενες από το DNA, όπως τα ήδη φυσικά υπάρχοντα βιολογικά μόρια που ελέγχουν πρωταρχικής σημασίας βιολογικές λειτουργίες όταν προσδένονται στα νουκλεϊκά οξέα. Τα φάρμακα που αλληλεπιδρούν με το DNA τις περισσότερες φορές έχουν ως αποτέλεσμα την πρόληψη ή επιβράδυνση ανάπτυξης και διαίρεσης κυττάρων, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ασθενειών που απειλούν άμεσα την ζωή, όπως ο καρκίνος και οι προσβολές από ιούς και βακτήρια.^[83] Έχουν παρασκευαστεί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που βασίζονται στην ικανότητα να τροποποιούν την δομή τους ώστε να αλληλεπιδρούν πιο αποτελεσματικά με νουκλεϊκά οξέα.

Τα τελευταία 30 χρόνια έχει εμφανιστεί ένα διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για την χρήση κινητικά αδρανών συμπλόκων μετάλλων μεταπτώσεως ως συμπλεκτικών παραγόντων στο DNA και στο RNA. Τα

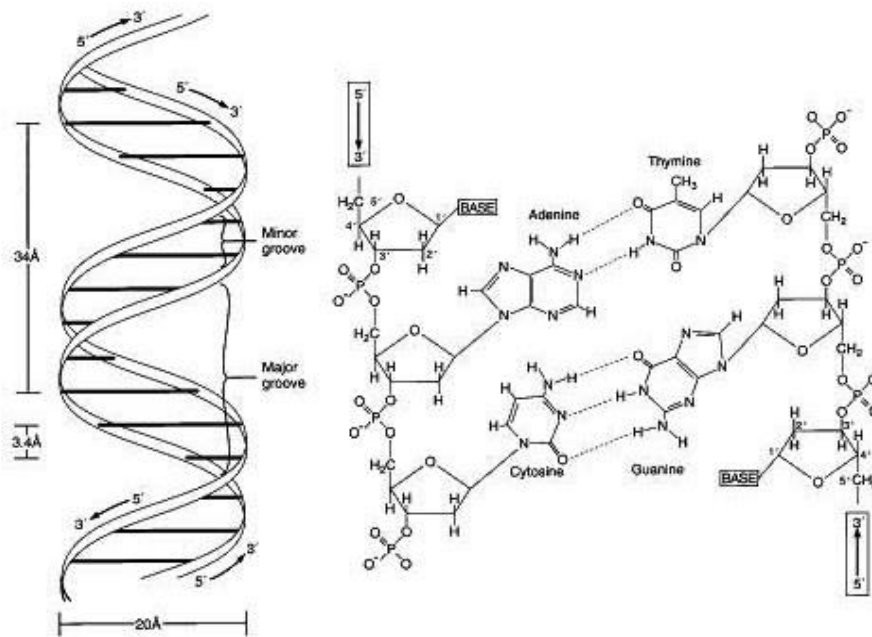
σύμπλοκα αυτά συνήθως έχουν πολύ καλά χαρακτηρισμένες δομές, ενώ διαθέτουν όλα τα χαρακτηριστικά (φασματοσκοπικά, φωτοχημικά και ηλεκτροχημικά) τα οποία επιτρέπουν την λεπτομερή και άμεση μελέτη της αλληλεπίδρασης τους με το γενετικό υλικό. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί μαζικά από μια πληθώρα τρόπων που καθορίζεται από την εκάστοτε δομή του συμπλόκου. Το θετικό τους φορτίο ευνοεί αυτή την αλληλεπίδραση με το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA, ενώ η αδράνεια τους ευνοεί την χρήση τους ως προφάρμακα. Οι αμέτρητες δομικές τροποποιήσεις των συμπλόκων και ο έλεγχός τους, η μοναδική στερεοχημεία και τρισδιάστατη δομή που υιοθετούν καθώς και η διαρκώς βελτιούμενη πορεία των τεχνικών που διαθέτουμε για την εξερεύνησή της σύνδεσης τους με το DNA, μας βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης των μορίων αυτών ως θεραπευτικούς παράγοντες, αλλά και της λειτουργίας του ίδιου του γονιδιώματος.^[82]

Τέτοια παραδείγματα συμπλόκων είναι των d^8 Pt(II), Pd(II), και Au(III) επίπεδων τετραγωνικών που παρουσιάζουν ιδιαίτερη αντικαρκινική δράση λόγω και του σχήματός τους, καθώς και των Re(I), Rh(III) και άλλων οκταεδρικών. Ιδιαίτερης σημασίας για τους λόγους που ήδη έχουμε αναφέρει είναι τα σύμπλοκα (μονο- ή πολύ-μεταλλικά) του κινητικά αδρανούς Ru(II). Εκτός των πλούσιων οπτικών ιδιοτήτων των συμπλόκων του που μας επιτρέπουν την ακριβή μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με το DNA, η ένωση του με χηλικούς υποκαταστατες (κυρίως όταν περιέχουν άτομα αζώτου) δίνει μεταβολές στα φωτοχημικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων όταν αλληλεπιδρούν με δευτερεύοντα μόρια (π.χ. DNA, RNA). Έτσι, έχουμε την δυνατότητα εύκολης μελέτης αλλά και ρύθμισης των χαρακτηριστικών αυτών, παρουσία και απουσία γενετικού υλικού.^[11, 84, 85]

Είναι φανερό πως η μοντέρνα μοριακή γενετική και η ανάπτυξη πολλών σύγχρονων φαρμάκων, δεν θα υπήρχε χωρίς την γνώση της δομής του DNA. Κατόπιν, οι φασματοσκοπικές μέθοδοι μας δώσαν την δυνατότητα να καταλάβουμε πώς το μόριο αυτό, αλληλεπιδρά με φάρμακα, μεταλλαξιογόνες ουσίες, πρωτεϊνικά σύμπλοκα και RNA. Έτσι, θεωρείται πλέον ως ένα ισχυρά εύπλαστο και προσαρμόσιμο μόριο που είναι ικανό υποστεί δομικές μεταβολές, η καθεμία με μοναδικές βιολογικές συνέπειες. Για να γίνει όμως πλήρως αντιληπτό το πως τα μικρά μόρια αλληλεπιδρούν με το γενετικό υλικό, είναι απαραίτητη η κατανόηση της δομής του τελευταίου.^[86]

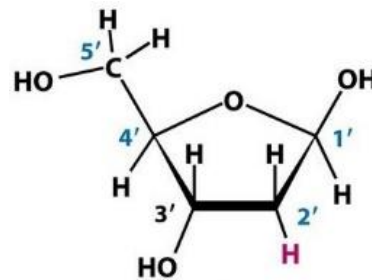
3.2 Η δομή του και οι πιθανές διαμορφώσεις του

Το DNA όπως διευκρινίστηκε από τον Watson και Crick έχει δομή διπλής έλικας όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



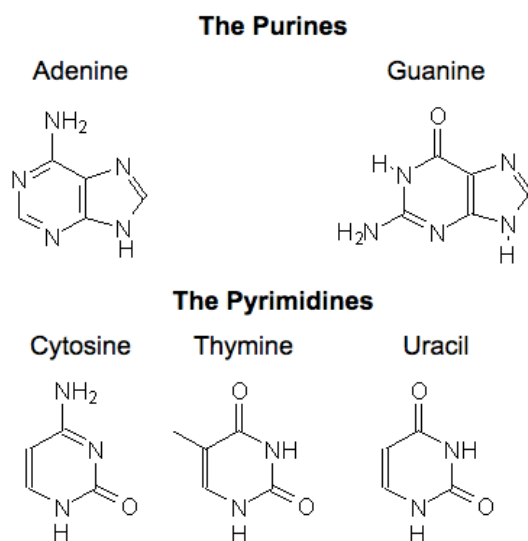
Σχήμα 3.1: Δομή του DNA (φαίνονται το σάκχαρο, η βάση και η φωσφορική ομάδα) [Nucleic Acids Research, 2000. 28(1): p. 235-242]

Το σάκχαρο δεοξυριβόζη συνδέεται με την φωσφορική ομάδα με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Συγκεκριμένα η υδροξυλική ομάδα 5' (5'-OH) της μονάδας σακχάρουενός νουκλεοτιδίου έχει εστεροποιηθεί με μια φωσφορική ομάδα, και αυτή με τη σειρά της συνδέεται στην υδροξυλική ομάδα 3' του γειτονικού σακχάρου.



Σχήμα 3.2: Δεοξυριβόζη [78]

Η αλυσίδα των σακχάρων που συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικές γέφυρες ονομάζεται σκελετός του νουκλεϊκού οξέος και αποτελεί τον κορμό της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας όπως φαίνεται και παραπάνω. Στο σάκχαρο είναι συνδεδεμένη με ομοιοπολικό δεσμό μια αζωτούχα βάση. Οι αζωτούχες βάσεις του DNA είναι τέσσερις: η κυτοσίνη C, η αδενίνη A, η γουανίνη G και η θυμίνη T. Οι νουκλεοβάσεις αδενίνη και γουανίνη έχουν δύο συμπυκνωμένους αρωματικούς δακτύλιους άρα ανήκουν στην κατηγορία των πουρινών, ενώ η κυτοσίνη και η θυμίνη έχουν έναν αρωματικό δακτύλιο οπότε ανήκουν στην κατηγορία των πυριμιδινών. Το N-9' μια πουρίνης και το N-1' μιας πυριμιδίνης ενώνονται με τον άνθρακα C-1' του σακχάρου μέσω N-(αζωτοσύνδετου) γλυκοζιτικού δεσμού. Επίσης, όλες οι βάσεις είναι επίπεδα μόρια. Μαζί, σάκχαρο και βάση αποτελούν την δομική μονάδα του νουκλεοζίτη που ενώνεται με την φωσφορική ομάδα και φτιάχνουν το νουκλεοτίδιο. Η πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα έχει συγκεκριμένη κατεύθυνση, η οποία ονομάζεται πολικότητα. Το ένα άκρο της αλυσίδας έχει ένα ελεύθερο 5'-OH υδροξύλιο ενώ το άλλο άκρο έχει ένα 3'-OH και συμβατικά η κατεύθυνση της αλυσίδας (αλληλουχία των βάσεων) είναι 5' προς 3'. [81, 83]



Σχήμα 3.3: Πυριμιδίνες και πουρίνες [Nova Science Pub Inc, 2013]

Η ικανότητα των νουκλεϊκών οξέων να μεταφέρουν την γενετική πληροφορία οφείλεται στην μοναδική ιδιότητα των αζωτούχων βάσεων να σχηματίζουν ειδικά ζεύγη που σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου. Συγκεκριμένα, η αδενίνη σχηματίζει σταθερού δεσμούς με την θυμίνη (A-T) και η κυτοσίνη με την γουανίνη (G-C) στην διπλή έλικα του DNA, γι' αυτό και ονομάζονται συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων. Η παρατήρηση της συμπληρωματικότητας έγινε από τους Wilkins και Franklin με την μέθοδο περίθλασης ακτίνων X το 1951 και πάνω σε αυτήν βασίστηκαν οι Watson και Crick όταν πρότειναν το μοντέλο διπλής έλικας. Συμπερασματικά, το ζευγάρι των βάσεων έχει ως αποτέλεσμα μια αλυσίδα του DNA ή ένας κλώνος DNA όπως αναφέρεται, να μπορεί να συγκρατήσει έναν άλλο κλώνο δίνοντας την διαμόρφωση του δίκλωνου μορίου, δηλαδή δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες ενωμένες με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων, οι οποίες συστρέφονται ελικοειδώς μεταξύ τους.

Τα κύρια χαρακτηριστικά του μοντέλου Watson και Crick για το DNA που έδωσαν οι περιθλάσεις των ακτίνων X είναι τα εξής :

- Το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες που ελίσσονται γύρω από έναν κοινό άξονα στον χώρο, με δεξιόστροφη φορά. Οι αλυσίδες αυτές έχουν αντίθετες κατευθύνσεις (αντίθετη πολικότητα), είναι δηλαδή στο δίκλωνο μόριο αντιπαράλληλες.
- Οι φωσφοσακχαρικοί κορμοί βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος και οι βάσεις πουρινών και πυριμιδινών στο εσωτερικό μέρος της έλικας
- Οι βάσεις είναι σχεδόν κάθετες στον άξονα της έλικας και απέχουν μεταξύ τους 3,4 Å. Η ελικοειδής δομή επαναλαμβάνεται κάθε 34 Å και επομένως υπάρχουν 10 βάσεις για κάθε στροφή της έλικας. (Υπάρχει στροφή της έλικας 36° ανά βάση)

- Η διάμετρος της έλικας είναι 20 Å^[81, 83, 87]

Οι δύο γλυκοζιτικοί δεσμοί που συνδέουν το ζευγάρι των βάσεων με κάθε δακτύλιο του σακχάρου δεν είναι απευθείας απέναντι ο ένας στον άλλο, στο δίκλινη αλυσίδα. Λόγω αυτού οι δύο κορμοί σακχάρων - φωσφορικών δεν είναι ισοδύναμα τοποθετημένοι κατά μήκος του ελικοειδούς άξονα. Συνεπώς, στην επιφάνεια της διπλής έλικας του DNA σχηματίζεται μια μεγάλη (πλατειά) αυλακα (major groove) και μια μικρή (στενή) αυλακα (minor groove), καθώς οι κλώνοι πλησιάζουν και απομακρύνονται ο ένας από τον άλλο κατά την περιέλιξη των αλυσίδων. Λόγω αυτού οι δύο κορμοί σακχάρων φωσφορικών δεν είναι ισοδύναμα κατανομημένοι κατά μήκος της ελικοειδούς δομής.

Το RNA δεν είναι δίκλινο και έχει τη ίδια μορφή αλυσίδας με το DNA, με την διαφορά ότι αντί για σάκχαρο δεοξυριβόζης, υπάρχει το σάκχαρο ριβόζη και η αζωτούχα βάση θυμίνη έχει αντικατασταθεί με την ουρακίλη (U).^[81]

Είναι σημαντικό να αναφερθούμε στο πως σταθεροποιείται το δίκλινο μόριο του DNA με τον παραπάνω μοναδικό τρόπο που περιγράψαμε. Αρχικά, οι αζωτούχες βάσεις στο εσωτερικό της έλικας στοιβάζονται ουσιαστικά η μια πάνω στην άλλη σχηματίζοντας ένα επίπεδο σχεδόν κάθετο σε αυτό των σακχάρων. Το στοιβάγμα αυτό σταθεροποιεί το δίκλινο μόριο κατά δύο τρόπους. Πρώτον, λόγω του φαινομένου της υδροφοβικότητας αφού οι αζωτούχες βάσεις είναι υδρόφοβα μόρια. Στοιβάζονται με αυτόν τον τρόπο στο εσωτερικό της έλικας, μακριά από το υδατικό περιβάλλον, ενώ οι πολικότερες ομάδες του σκελετού με την αρνητικά φορτισμένη φωσφορική ομάδα, εκτίθενται στο υδατικό περιβάλλον. Το φαινόμενο υδροφοβικότητας ευνοείται θερμοδυναμικά λόγω αύξησης της εντροπίας του συστήματος. Δεύτερον, λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των στοιβαγμένων βάσεων. Η απόσταση των πλησιέστερων γειτονικών ατόμων είναι περίπου 3,6 Å, όσο δηλαδή η ακτίνα Van der Waals. Επιτυγχάνεται αποτελεσματική αλληλεπίδραση δυνάμεων Van der Waals που στο σύνολό τους ευνοούν θερμοδυναμικά, σε σημαντικό βαθμό το μόριο.

Κατόπιν, η ελικοειδής μορφή του κορμού σακχάρων-φωσφορικών της αλυσίδας δίνει ένα εντυπωσιακό χαρακτηριστικό. Οι γλυκοζιτικοί δεσμοί που συνδέονται σε ένα ζευγάρι βάσεων που συγκρατείται με δεσμούς υδρογόνου απέχουν μεταξύ τους 10,85 Å. Ο χώρος αυτός, ταιριάζει τέλεια με τα μεγέθη ζεύγους πουρίνης-πυριμιδίνης, ενώ είναι αισθητά μεγαλύτερος από τον απαιτούμενο για ζευγάρι δύο πυριμιδινών και δεν είναι επαρκής για ένα ζευγάρι δύο πουρινών. Αυτός, ο στερικός παράγοντας είναι ένας από τους λόγους της συμπληρωματικότητας των βάσεων, γιατί επιτρέπει τον σταθερό σχηματισμό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων. Ο σημαντικότερος λόγος της συμπληρωματικότητας όμως, είναι οι ίδιοι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων, όπου οι κατευθύνσεις και οι αποστάσεις τους, είναι ιδανικές για ισχυρές αλληλεπιδράσεις, σταθεροποιώντας κατά πολύ DNA. Σύμφωνα, με την δομή των βάσεων η γουανίνη σχηματίζει τρεις δεσμούς μόνο με την κυτοσίνη και η αδενίνη σχηματίζει δύο διπλούς δεσμούς μόνο με την θυμίνη. Αν τα

πράγματα ήταν διαφορετικά και δεν είχαμε συμπληρωματικότητα οι δεσμοί υδρογόνου στην έλικα θα ήταν λιγότεροι, συνεισφέροντας λιγότερο στην σταθεροποίηση του μορίου. Σε τέτοια περίπτωση, ο σχηματισμός της έλικας δεν θα ευνοούταν.

Επίσης, η ύπαρξη φωσφορικών ομάδων με αρνητικό φορτίο, τις σταθεροποιεί ως προς την υδρόλυση, απωθώντας πυρηνόφιλες ομάδες (όπως υδροξυλίου), ενώ περαιτέρω σταθεροποίηση γίνεται με ιόντα Mg(II) και Na(I). Τέλος, το στοίβαγμα των βάσεων στο δίκλωνο μόριο ευνοείται από την στερεοδιάταξη του σκελετού, που αποτελείται από πενταμελείς δακτύλιους με σχεδόν άκαμπτη δομή.

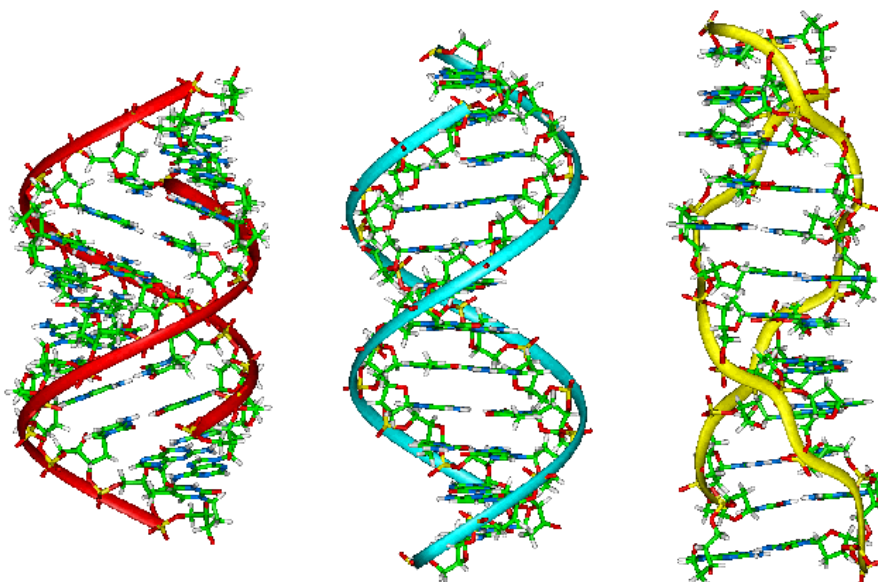
Η συμπληρωματικότητα των βάσεων με τον μοναδικό τρόπο που περιγράψαμε, είναι και ο λόγος που η αλληλουχία των βάσεων ενός κλώνου χαρακτηρίζει ένα μοναδικό νουκλεϊκό οξύ και αντιπροσωπεύει μια μορφή γραμμικών πληροφοριών, ανάλογο με εκείνων των γραμμάτων που φτιάχνουν μια λέξη. Η αλληλουχία αυτή μέσω συμπληρωματικότητας, καθορίζει το αντίγραφο του DNA κατά την αντιγραφή και του RNA κατά την μεταγραφή, το οποίο θα μεταφραστεί στην πρωτεϊνσύνθεση (μετάφραση).^[81, 83]

Το παραπάνω μοντέλο βασίστηκε σε περιθλασίματα ακτίνων Χ άκρως ενυδατωμένων ινών DNA. Είναι γνωστό σήμερα πως σε φυσιολογικές συνθήκες, όλο σχεδόν το DNA στους περισσότερους οργανισμούς, βρίσκεται στη μορφή B, αυτή δηλαδή που προτάθηκε από τους Watson και Crick. Παρόλα αυτά, σε περιβάλλον έλλειψης νερού το DNA μπορεί να υιοθετήσει μια άλλη μορφή που λέγεται A. Επίσης, ο Alexander Rich και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν και μια τρίτη μορφή του DNA, όπου ονομάστηκε Z-DNA. Τμήματα του DNA, όπου κάποιες βάσεις έχουν χημική τροποποίηση με μεθυλίωση, υιοθετούν την διαμόρφωση Z, ενώ μπορεί να εμφανίζεται και σε συνθήκες υγρασίας πάνω από 75% και υψηλής συγκέντρωση ηλεκτρολυτών. Η δομή αυτή είναι αριστερόστροφη και οι φωσφορικές ομάδες του σκελετού είναι διατεταγμένες σε μορφή "ζιγκ-ζαγκ", γι' αυτό πήρε και το όνομα Z. Αυτό οφείλεται στο ότι τα νουκλεοτίδια με πυριμιδίνες έχουν μια αντι-διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού (η βάση βρίσκεται σε αντίθετη κατεύθυνση της δεοξυριβόζης), ενώ τα νουκλεοτίδια των πουρινών αποκτούν μια syn-διαμόρφωση (η βάση βρίσκεται πάνω από την δεοξυριβόζη). Τέλος, μελέτες πλήθους κρυσταλλικών δομών δείχνουν ότι η Z- μορφή του DNA είναι πολύ πιο άκαμπτη από ότι η A και B μορφή, καθώς και ότι η B μορφή κάμπτεται πιο εύκολα.

Γενικά, το DNA μπορεί να υπάρξει σε πολλές διαμορφώσεις, όμως οι τρεις αυτές μορφές έχουν παρατηρηθεί σε οργανισμούς. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται δομικά χαρακτηριστικά και παράμετροι των τριών διαμορφώσεων του DNA.^[70, 81]

Πίνακας 4: Σύγκριση δομικών χαρακτηριστικών και παραμέτρων του A,B και Z-DNA^[70, 81]

Διαμόρφωση	A	B	Z
Σχήμα	Παχύτερο	Κανονικό	Λεπτότερο
Απόσταση μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων	2,3 Å	3,4 Å	3,8 Å
Διάμετρος έλικας	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
Στροφή	Δεξιόστροφη	Δεξιόστροφη	Αριστερόστροφη
Ζεύγη βάσεων ανά στροφή έλικας	11	10,4	12
Απόκλιση από τον κανονικό άξονα έλικας	19°	1°	9°
Κύρια αύλακα	Στενή και βαθιά	Ευρεία και βαθιά	Επίπεδη
Δευτερεύουσα αύλακα	Ευρεία και ρηχή	Στενή και βαθιά	Στενή και βαθιά
Γλυκοζιτικός δεσμός	anti	anti	syn και anti
Κλίση ζευγών βάσεων από την κάθετο προς τον άξονα της έλικας	19°	1°	9°



Σχήμα 3.4:
Τρισδιάστατες δομές A,B,Z DNA (από αριστερά προς τα δεξιά αντίστοιχα)

[http://www.3dscience.com/3D_Models/Biology/DNA/DNA_with_Phosphate.php]

3.3 Τρόποι αλληλεπίδρασης του DNA με μικρά μόρια

Μικρά οργανικά μόρια και σύμπλοκα δεσμεύονται στο DNA αντιστρεπτά ή μόνιμα (μη αντιστρεπτά), με την τελευταία περίπτωση να περιλαμβάνει

συνήθως το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Παράδειγμα μόνιμης δέσμευσης είναι το cis-platin. Η αντιστρεπτή δέσμευση στα νουκλεϊκά οξέα περιλαμβάνει μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (π.χ. ηλεκτροστατικής φύσεως). Όλα τα σύμπλοκα μετάλλων μπορεί να αλληλεπιδρούν με το DNA ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά ή να του προκαλούν ρήξη.^[70]

Γενικά, τα μεταλλικά ιόντα σε διάλυμα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα νουκλεϊκά οξέα με δύο τρόπους αλληλεπίδρασης, εξίσου σημαντικούς για την δομή και την λειτουργία των νουκλεϊκών οξέων. Αυτοί είναι η διάχυτη δέσμευση και η πλευρική δέσμευση.^[88, 89]

- Διάχυτη δέσμευση (diffuse binding)

Στη διάχυτη δέσμευση τα θετικά μεταλλικά ιόντα και τα νουκλεϊκά οξέα διατηρούν την στοιβάδα ενυδάτωσής τους και η αλληλεπίδρασή τους γίνεται μέσω των μορίων του νερού. Είναι μια αλληλεπίδραση Coulomb μεγάλου βεληνεκούς, κατά την οποία τα μεταλλικά ιόντα συσσωρεύονται γύρω από τα νουκλεϊκά οξέα με απομακρυσμένο τρόπο, δημιουργώντας μια αντισταθμιστική ατμόσφαιρα με διάχυτα προσδεδεμένα θετικά ιόντα.

- Πλευρική δέσμευση (site binding)

Το μέταλλο συμπλέκεται σε ειδικούς υποκαταστάτες πάνω στο νουκλεϊκό οξύ και η σύμπλεξη μπορεί να γίνει είτε άμεσα (στην εσωτερική σφαίρα του μεταλλικού ιόντος) είτε μέσω ενός μορίου νερού (εξωτερική σφαίρα του μεταλλικού ιόντος). Στο τρόπο σύνδεσης μέσω εξωτερικής σφαίρας μόνο η ενδότερη στοιβάδα νερού του μετάλλου δεν επηρεάζεται και το μέταλλο με τον υποκαταστάτη νουκλεϊκού οξέος που ενώνεται, μοιράζονται το κέλυφος επιδιάλυτωσης (μέσω των μορίων νερού). Αντίθετα στον άμεσο τρόπο σύνδεσης υπάρχει απευθείας επαφή μεταξύ μετάλλου και νουκλεϊκού οξέος. Συνεπώς, η αφυδάτωση του μεταλλικού ιόντος και του νουκλεϊκού οξέος στο σημείο που ενώνονται γίνεται πριν δημιουργηθεί ο δεσμός (ομοιοπολικός) στην εσωτερική σφαίρα (inner-shell bond). Η πυρηνοφιλία της περιοχής πρόσδεσης του μετάλλου και οι στερεοχημικοί παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην θέση δέσμευσης του μετάλλου στο DNA.^[88]

Η αλληλεπίδραση των μεταλλικών συμπλόκων με το DNA εξαρτάται από το μέταλλο και τον υποκαταστάτη του. Όσον αφορά το μέταλλο, οι προτιμώμενες θέσεις δέσμευσης είναι στις νουκλεοβάσεις (ομάδες δοτών ηλεκτρονίων των βάσεων) ή στα φωσφορικά ιόντα ανάλογα με τον τύπο του μεταλλικού ιόντος. Αφού λοιπόν εξαρτάται η θέση δέσμευσης και από τις νουκλεοβάσεις, μπορούν να συντεθούν σύμπλοκα που δεσμεύονται εκλεκτικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Κατόπιν, η σταθερότητα της δέσμευσης μπορεί να εκφραστεί ποσοτικά με τον υπολογισμό της σταθεράς σχηματισμού K_b φαρμάκου-DNA. Τέλος, η δομή των υποκαταστατών και τα ηλεκτρονιακά τους χαρακτηριστικά είναι αυτά που παίζουν καθοριστικό ρόλο στον τρόπο αλληλεπίδρασης.^[70, 88, 90]

Έτσι, οι τρόποι αλληλεπίδρασης των μικρών μορίων διακρίνονται στους παρακάτω.

- Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

Διακρίνονται στις ηλεκτροστατικές, την ενδοπαρεμβολή και την συναρμογή στην αύλακα. Γενικά οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν την δομή DNA-συμπλόκου, προκαλούν όμως διαμορφωτικές αλλαγές στην αλυσίδα του DNA.

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα ανάμεσα σε ένα κατιοντικό σύμπλοκο και στον ανιοντικό φωσφορικό σκελετό του DNA. Η εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου μειώνει τις απωθητικές δυνάμεις ανάμεσα στις γειτονικές φωσφορικές ομάδες, σταθεροποιώντας την διπλή έλικα. Η αλληλεπίδραση προτιμάται από επίπεδους αρωματικούς υποκαταστάτες στο σύμπλοκο (όπως και η παρεμβολή), αλλά η σταθερά σύνδεσης τους είναι αρκετά μικρότερη από αυτή της παρεμβολής, ενώ εξαρτάται και από το διαλυτικό μέσο. Κατά την διάρκεια τέτοιων αλληλεπιδράσεων μπορεί να προκληθούν αλλαγές στον υποκαταστάτη και το DNA, ώστε να διευκολυνθεί η μετέπειτα δέσμευσή τους. Οι αλληλεπιδράσεις είναι εξωτερικές και μπορούν να συμβούν σε οποιαδήποτε φωσφορική ομάδα κατά μήκος της αλυσίδας, σε αντίθεση με άλλες αλληλεπιδράσεις όπως οι ομοιοπολικές, η παρεμβολή ή η συναρμογή στις αύλακες, που είναι πιο επιλεκτικές.^[89]

Η εξωτερική αλληλεπίδραση ή εξωτερική συναρμογή όπως λέγεται η παραπάνω περίπτωση, προϋποθέτει την ύπαρξη θετικού φορτίου στην ένωση που αντιδρά με το DNA, αφού εξαρτάται από τις ιοντικές δυνάμεις μεταξύ αντίθετων φορτίων. Ένα παράδειγμα είναι το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ του $\text{Ru}(\text{II})$.^[70, 89]



Σχήμα 3.5: Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το DNA

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:A-B-Z-DNA_Side_View.png#file]

Η ενδοπαρεμβολή (intercalation) πραγματοποιείται με μερική εισχώρηση αρωματικών επίπεδων ομάδων των υποκαταστατών ανάμεσα στις βάσεις του DNA, προκαλώντας αποδίπλωση στο σημείο πρόσδεσης, λόγω απομάκρυνσης των ζευγών βάσεων περισσότερο από 3,4 Å για να μπορεί να εισαχθεί ο υποκαταστάτης. Η γωνία αποελίκωσης ποικίλλει ανάλογα με την γεωμετρία του συμπλόκου DNA-ένωσης που δημιουργείται. Καθώς η διπλή έλικα ξετυλίγεται η απόσταση μεταξύ των φωσφορικών ομάδων αυξάνεται με

αποτέλεσμα την μείωση της πυκνότητας του εντοπισμένου φορτίου και έτσι διευκολύνεται η απελευθέρωση των συσσωρευμένων αντισταθμιστικών φορτίων (Na^+). Στη συνέχεια γίνεται μετακίνηση του αρωματικού μέρους της ένωσης από το διάλυμα στην περιοχή παρεμβολής, όπου επιστοιβάζεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων της διπλής έλικας. Κατά την διαδικασία αυτή ο υποκαταστάτης διευθετείται άκαμπτα, κάθετα προς τον άξονα της έλικας. Ευνοείται λόγω υδρόφοβης αλληλεπίδρασης αφού ο μη πολικός αρωματικός δακτύλιος παρεμβάλλεται ανάμεσα σε υδρόφοβα ζεύγη βάσεων, καθώς επίσης σταθεροποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταφοράς φορτίου (διπόλου-διπόλου) με αλληλοεπικάλυψη π-π ηλεκτρονίων. Σημαντικό όμως ρόλο στη σταθεροποίηση έχουν ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι δυνάμεις Van der Waals, γι' αυτό θετικά φορτισμένες ουσίες ευνοούν την παρεμβολή λόγω της έλξης των ουσιών από τις φωσφορικές ομάδες. Με βάση κάποιες προσεγγίσεις μπορούμε να πούμε πως το θετικό φορτίο μπορεί να προκαλέσει μείωση της ενέργειας των LUMO τροχιακών του υποκαταστάτη, ευνοώντας έτσι την αλληλεπίδραση με τα HOMO τροχιακά των βάσεων του DNA. Άλλωστε, οι κατιοντικές ουσίες παρεμβολής προκαλούν επιπρόσθετη απελευθέρωση αντισταθμιστικών ιόντων (για παράδειγμα απελευθέρωση ιόντων Na^+), αφού όπως είπαμε ξετυλίγεται η διπλή έλικα, αυξάνεται η απόσταση των φωσφορικών ομάδων και μειώνεται η πυκνότητα του εντοπισμένου φορτίου (ευνοούνται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις).

Γενικά, με την ενδοπαρεμβολή δεν καταστρέφονται οι δεσμοί υδρογόνου της διπλής έλικας του DNA, αλλά καταστρέφεται (τροποποιείται) η κανονική δομή της, επηρεάζοντας την δράση ενζύμων που προσδένονται στο DNA όπως είναι οι DNA πολυμεράσες και αναστέλλοντας την μεταγραφή οδηγώντας στο κυτταρικό θάνατο.^[70, 83, 91]

Το μέγεθος του επίπεδου τμήματος μαζί με το μέγεθος και τον τύπο των υποκαταστατών του συμπλόκου παίζουν σημαντικό ρόλο για να γίνει διάκριση ανάμεσα στους ενδοπαρεμβολείς και τα μόρια συναρμογής στην αύλακα. Όσο πιο εκτεταμένοι είναι οι αρωματικοί υποκαταστάτες τόσο πιο πολύ ευνοείται η παρεμβολή, αφού όπως έγινε αντιληπτό, το επίπεδο υδροφοβικό κομμάτι έχει ουσιαστικό ρόλο σε αυτήν. Γι' αυτό και πλήθος παραγώγων της 1,10-φαινανθρολίνης σχεδιάζονται ως μεταλλοπαρεμβολείς, ενώ κάποιες φορές λειτουργούν και ως φωτοδιασπαστικοί παράγοντες (κεφ. 1). Είναι γνωστό, πως ο ποικίλος τρόπος υποκατάστασής τους λόγω της δομής τους, μας δίνει τη δυνατότητα να σχεδιάσουμε τη δομή κάθε παραγώγου και να ελέγξουμε τα φωτοχημικά χαρακτηριστικά του συμπλόκου καθώς και τον τρόπο πρόσδεσης με το DNA. Με σημαντικότερη την ενδοπαρεμβολή, τέτοια παράγωγα μπορούν επίσης να προσδεθούν στο DNA μέσω άλλων μη ομοιοπολικών δεσμών, όπως ο δεσμός υδρογόνου και η συναρμογή στις αύλακες. Το PDAM που επιλέχθηκε να μελετηθεί με το DNA στην παρούσα εργασία ειδίκευσης είναι ένα παράγωγο φαινανθρολίνης. Άλλες σημαντικές κατηγορίες υποκαταστατών ως

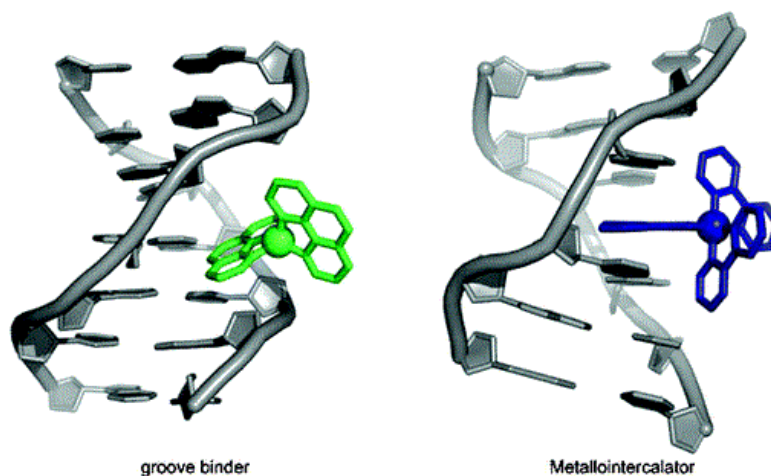
μεταλλοπαρεμβολείς είναι οι πορφυρίνες και οι πολυπυριδίνες.^[11, 90, 92] Επίσης, ένας πολύ γνωστός ενδοπαρεμβολέας είναι η ένωση του ethidium bromide (EtBr) που όπως θα γίνει αντιληπτό είναι σημαντική για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μορίων με το DNA. Μελέτες με Raman φασματοσκοπία μας έδειξαν ότι η παρεμβολή του EtBr προκαλεί μετατροπή σε ένα ποσοστό (15 – 20 %), της B δομής του DNA σε A κάτι που είναι ενδεικτικό για την δράση και άλλων παρεμβολέων.

Επιπλέον, μπορεί να έχουμε και μερική παρεμβολή σε λιγότερο εκτεταμένα αρωματικά συστήματα, λόγω παρεμπόδισης αφού συγκρούονται οι υπόλοιποι υποκαταστάτες με τον φωσφορικό σκελετό. Τέτοια είναι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου $[Ru(\text{phen})_3]^{2+}$, όπου έχουμε απουσία επιμήκυνσης του DNA και εξηγείτε λόγω μερικής παρεμβολής με στοίβαγμα του υποκαταστάτη ανάμεσα σε ζεύγος βάσεων και άνοιγμα μόνο μια μικρής κοιλότητας της παρεμβολής. Το σύμπλοκο αυτό παρουσιάζει μια στερεοεκλεκτικότητα καθώς το Δ ισομερές προσδένεται 30 - 50 % ισχυρότερα στο DNA, μειώνοντας την παρεμπόδιση.^[70, 78, 93]

Η συναρμογή στις αύλακες (groove binding) μπορεί να συμβεί και στην μικρή (minor) και στην μεγάλη (major) αύλακα της αλυσίδας. Σε αυτό το είδος αλληλεπίδρασης γίνεται μετακίνηση του υποκαταστάτη του συμπλόκου από το διάλυμα προς την έλικα (προσέγγιση της αύλακας) και στη συνέχεια αναπτύσσονται μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμοί υδρογόνου με τα ζεύγη αδενίνης-θυμίνης και αλληλεπιδράσεις Van der Waals με τα τοιχώματα της αύλακας. Αυτή η διαδικασία με την παραπάνω σειρά, τους δεσμούς υδρογόνου και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις οδηγεί στην σταθεροποίηση. Σημαντικό γνώρισμα των ενώσεων που συνδέονται στην αύλακα είναι ότι μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να καλύψουν πολλά ζεύγη βάσεων με συνέπεια υψηλό βαθμό αναγνώρισης ακολουθίας νουκλεϊκών οξέων. Παράδειγμα αποτελεί το αντιβιοτικό netropsin με επιλεκτικότητα στην ακολουθία αδενίνης-θυμίνης. Η διαταραχή της διπλής έλικας του DNA επηρεάζει την φυσιολογική λειτουργία του. Ένα φάρμακο με σημαντική αντικαρκινική δράση σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που αλληλεπιδρά με συναρμογή στην μικρή αύλακα, είναι το $[Ru(\text{bpy})_2(\text{bbtb})]^{2+}$ (bbtb = 4,4' - bis(benzothiazol - 2 - yl) - 2,2' - bipyridine).

Κατόπιν, γεωμετρικοί και στερεοχημικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση. Αν το σύμπλοκο που θα συνδεθεί με το DNA έχει πολύ μικρές αλκυλικές αλυσίδες, δεν θα συμβάλουν σε επιπλέον αλληλεπιδράσεις με το DNA για να βελτιώσουν τη δέσμευση του συμπλόκου, ενώ αν οι αλκυλικές αλυσίδες που περιέχει το σύμπλοκο διαθέτουν πάνω από τέσσερις ομάδες $-CH_2-$, είναι πολύ πιο εύκολο να επιτευχθεί η βέλτιστη αλληλεπίδραση. Οι ομάδες αυτές πολλές φορές καθορίζουν την αλληλεπίδραση όπως για την ένωση $Ru(\text{TMP})_3^{2+}$ (TMP=3,4,7,8-tetramethylphenanthroline), όπου οι μεθυλικές ομάδες δεν επιτρέπουν την

παρεμβολή και έχουμε διαφορετική αλληλεπίδραση (συναρμογή στην μεγάλη αύλακα).^[70, 88, 91]



Σχήμα 3.6: Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις [Chemical Communications, 2007 (44)]

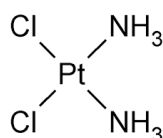
- Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

Τα μεταλλικά ιόντα των συμπλόκων είναι οξέα κατά Lewis και αλληλεπιδρούν με τις ηλεκτρονιακά πλούσιες βάσεις του DNA, καθώς και με τις φωσφορικές ομάδες που είναι διαθέσιμες για απευθείας ομοιοπολικό δεσμό με το μεταλλικό κέντρο. Η αλληλεπίδραση του μετάλλου στις φωσφορικές ομάδες είναι μη ομοιοπολική ή ομοιοπολική και μπορεί να οδηγήσει στην διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών ή στη σταθεροποίηση της διπλής έλικας με όμοιο τρόπο που αναφέραμε στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η προτίμηση των μεταλλικών ιόντων να ενωθούν με τις φωσφορικές ομάδες σε σχέση με τις βάσεις μειώνεται με την παρακάτω σειρά : Mg(II) > Co(II) > Ni(II) > Mn(II) > Zn(II) > Cd(II) > Cu(II).

Στην ομοιοπολική αλληλεπίδραση κάποιος από τους ευκίνητους υποκαταστάτες του συμπλόκου αντικαθίσταται από την βάση (μεταλλείωση). Με την δημιουργία αρχικά μιας αρχικής αναστρέψιμης συνδεδεμένης ετεροπολικής προ-ένωσης, ελέγχεται η θέση και ο ρυθμός μεταλλείωσης. Γι' αυτό, αν το μέταλλο είναι κινητικά αδρανές αυτός ο έλεγχος ίσως να γίνεται ευκολότερος, όπως για τον Pt(II) και το Ru(II) (προφάρμακα). Έτσι, η μεταλλείωση γίνεται σε δύο στάδια με το πρώτο να είναι η υδρόλυση του μεταλλικού συμπλόκου, σχηματίζοντας δραστικά υδατικά είδη και δεύτερον η πυρηνόφιλη προσβολή των βάσεων από τα μεταλλο σύμπλοκα. Οι περισσότερο πυρηνόφιλες θέσεις στο DNA είναι N-7 γουανίνης > N-3 αδενίνης > N-1 αδενίνης > N-1 κυτοσίνης. Γι' αυτό και τα σημεία που προσδένεται το μέταλλο είναι κυρίως τα άζωτα των βάσεων, ενώ είναι πιθανά και τα οξυγόνα σακχάρου ή και φωσφόρου όπως ήδη αναφέραμε. Ο αριθμός και η διαμόρφωση (όπως cis-trans) των ομάδων που απομακρύνονται, καθώς και οι θέσεις σύμπλεξης καθορίζουν τις αλλαγές που πιθανώς μπορεί να προκαλέσει η μεταλλείωση στη δευτεροταγή δομή του DNA, με σημαντικότερες την κάμψη-στρέβλωση του, την τοπική χαλάρωση της έλικας ή διάφορες διαμορφωτικές

αλλαγές. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές (ομοιοπολικές), είναι μη αντιστρέψιμες και εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.^[11, 70, 83, 88, 89, 94]

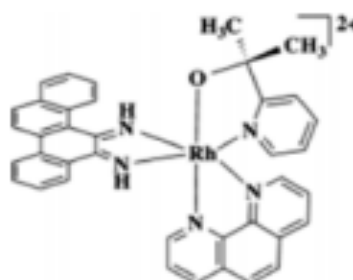
Αλληλεπίδραση με σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού του μορίου με τα νουκλεϊκά οξέα στην μεγάλη ή μικρή αύλακα, είναι η αλκυλίωση. Μπορεί να σχηματιστεί ο δεσμός ανάμεσα σε μια ή και δύο αλυσίδες (σχηματίζοντας γέφυρά μεταξύ δύο μερών μιας αλυσίδας ή δυο αλυσίδων). Σε κάθε περίπτωση, τα προϊόντα που προκύπτουν από αυτήν την προσθήκη στο DNA, είναι μη ανατρέψιμοι αναστολείς της μεταγραφής και της μετάφρασης οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Η μεταλλείωση που περιγράψαμε παραπάνω είναι περίπτωση αλκυλίωσης με το μεταλλικό κέντρο του συμπλόκου. Το μικρό μόριο είναι συνήθως ηλεκτρονιόφιλο και προσβάλλεται πυρηνόφιλα από το DNA. Για παράδειγμα, η ανθραμυκίνη είναι πολύ καλός αλκυλιωτής που προσβάλλεται από το N7 της γουανίνης του DNA μέσω πυρηνόφιλης προσβολής σε έναν άνθρακά του. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η αλληλεπίδραση του ήδη αναφερόμενου αντικαρκινικού φαρμάκου cis-platin μέσω αλκυλίωσης (μεταλλείωση) σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς Pt-N με βάσεις γουανίνης και αδενίνης, αντικαθιστώντας τα δύο χλώρια (μεγάλη προτίμηση ο N-7 της γουανίνης και έπειτα της N-3 αδενίνης).



Σχήμα 3.7: cis-platin ^[Wikipedia]

Τέτοια φάρμακα είναι πολύ τοξικά κυρίως στη φάση της κυτταρικής διαίρεσης.^[70, 83, 84]

Στα σύγχρονα μεταλοσύμπλοκα ή νέας γενιάς όπως αναφέρονται στην βιβλιογραφία, μπορεί να υπάρχει συνδυασμός μη ομοιοπολικών και ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Παράδειγμα αποτελεί σύμπλοκο του ροδίου Rh-PPO και του Rh(chrysi)(phen)(DPE)]²⁺ [DPE = 1,1-di(pyridine-2-yl)ethanol] που ενώνονται ομοιοπολικά με N-3 αδενίνης και εισάγονται στην διπλή έλικα μέσω μικρής αύλακας αντιδρώντας μη ομοιοπολικά με αζωτούχα βάση, που δεν έχει τοποθετηθεί σωστά στην αντιγραφή. Θυμίζουν τον τρόπο που πιάνονται στην αλυσίδα επιδιορθωτικά ένζυμα (εκλεκτικό σε μόρια DNA που έχουν υποστεί μετάλλαξη) και παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση οδηγώντας σε μη αποπτωτικό θάνατο κάτι που δεν συμβαίνει με κλασικά φάρμακα τύπου cisplatin.^[95]

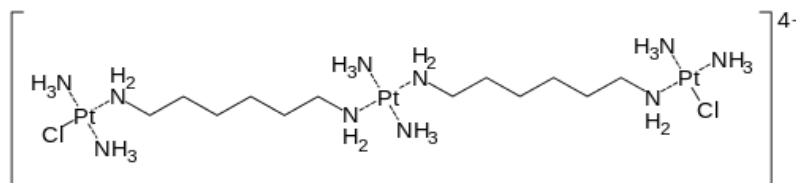


Σχήμα 3.8: Δομή του Rh-PPO ^[92]

- Σφιγκτήρας φωσφορικών (phosphate clamp)

Σχετικά πρόσφατες έρευνες έχουν ρίξει φως σε έναν πιο ιδιαίτερο τρόπο αλληλεπίδρασης συγκεκριμένων πολυπυρηνικών συμπλόκων του Pt(II) με το DNA, τα οποία εμφανίζουν μια τριπυρηνική σύζευξη, που εκτείνεται κατά μήκος του φωσφορικού σκελετού της διπλής έλικας του DNA. Αυτός εμφανίζεται να είναι ένας διαφορετικός τρόπος σύνδεσης με αλληλεπιδράσεις που χρησιμοποιούν αποκλειστικά τις λειτουργικές ομάδες του φωσφορικού σκελετού. Η σύνδεση αυτή δεν είναι ομοιοπολική και αποκλίνει από τις προηγούμενες, δηλαδή τη συναρμογή στις αύλακες και την παρεμβολή. Η σύζευξη στον φωσφορικό σκελετό επιτυγχάνεται, όπως αναφέραμε, με πολυπυρηνικά παράγωγα συμπλόκων του Pt(II), τα οποία μπορούν να ενωθούν με μόρια-υποκαταστάτες που διαφέρουν ως προς το μήκος, τον προσανατολισμό και τη δραστικότητα.

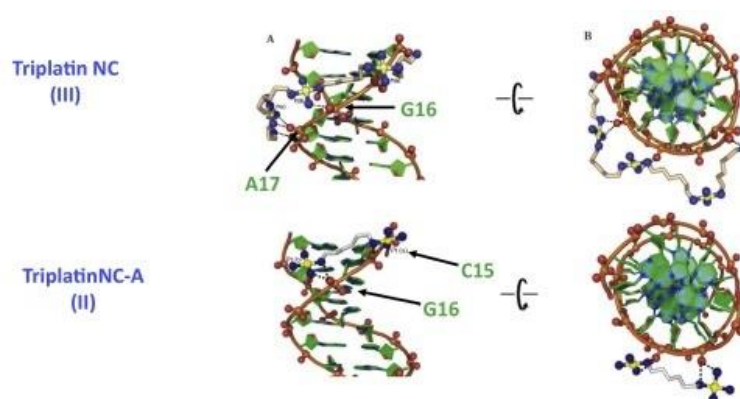
Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα σύμπλοκα με τις ονομασίες triplatinNC και triplatinNC-A και BBR3464. Τα triplatinNC και triplatinNC-A είναι πολυλειτουργικά μόρια που προσδένονται στο DNA, με τρία κατιοντικά κέντρα Pt(II) και δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Τα κέντρα Pt(II) είναι ενωμένα με εύκαμπτες, υδρόφοβες ομάδες, αλλά χωρίς τη δυνατότητα των ίδιων να σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό. Τα triplatinNC και NC-A δεν μπορούν να λειτουργήσουν ως παρεμβολείς στα ζεύγη των βάσεων και δεν μπορούν να προσδεθούν σε καμία από τις δυο αύλακες του DNA, αλλά συνδέονται με τα άτομα O των φωσφορικών ομάδων και έτσι είναι ξεκάθαρο πως αλληλεπιδρούν με τον φωσφορικό σκελετό. Τα τρία σύμπλοκα από τα οποία αποτελούνται τα μόρια, είναι τα επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα tetraamine Pt(II) - για το triplatin NC-A - που σχηματίζουν δισχιδή N-O-N σύμπλοκα με τα άτομα O του φωσφορικού σκελετού σε ένα μοτίβο που ονομάζεται σφιγκτήρας φωσφορικών (phosphate clamp) (N-O ασθενέστερος δεσμός του ομοιοπολικού, παρόμοιος με δεσμό υδρογόνου του οξυγόνου με την κυτοσίνη). Η αντίδραση φαίνεται να προτιμά τα O του φωσφόρου που δεν είναι ενωμένα με το σάκχαρο (1), έναντι των O ατόμων που είναι ενωμένα (2). Οι θέσεις αντίδρασης έχουν σειρά δραστικότητας O(1)>O(2)>οξυγόνο σακχάρου>N.



Σχήμα 3.9: Δομή TriplatinNC ^[93]

Το triplatinNC (και NC-A) εκτείνεται κατά μήκος του φωσφορικού σκελετού με έναν τρόπο σύνδεσης που αποκαλούμε «Backbone Tracking» και διατρέχει τη μικρή αύλακα με έναν τρόπο που ονομάζεται «Groove Spanning». Οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται λόγω της σύνδεσης προκαλούν

μια κάμψη στη μεγάλη αύλακα του DNA. Αυτή η κάμψη πιθανώς να οφείλεται στην αλληλεπίδραση ενός Na^+ με μια βάση του DNA. Είναι μια ειδική περίπτωση μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης που παρουσιάζει όμως, πρωτοφανείς αντικαρκινική δράση. Μάλιστα, εναντίον ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών ωοθηκών φτάνει το cis-platin σε κυτταροτοξικότητα. Παραμορφώνει την πολυνουκλεϊδική αλυσίδα και επιστρατεύει πρωτεΐνες που προστατεύουν το σύμπλοκο φάρμακο-DNA από το να γίνει επιδιόρθωση της αλυσίδας, όπως ακριβώς κάνει το cis-platin. Τέλος, πειραματικά αποτελέσματα έχουν δείξει πως όσο μεγαλύτερο θετικό φορτίο περιέχουν αυτές οι πολυπυρηνικές δομές του λευκοχρύσου τόσο μεγαλύτερη είναι η κυτταρική πρόσληψη του φαρμάκου από τα καρκινικά κύτταρα έναντι των υγιών, αυξάνοντας την δραστηριότητά του.^[96]



Σχήμα 3.10: Αλληλεπίδραση των triplatin με το DNA ^[93]

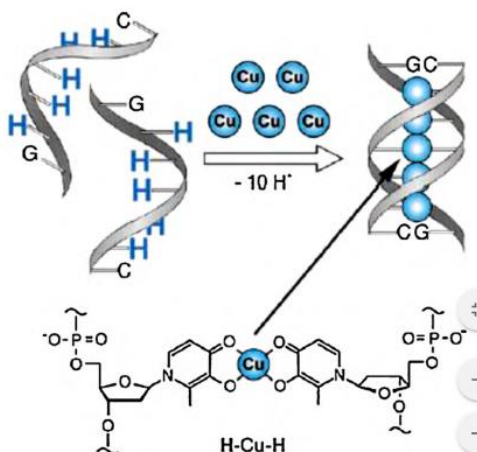
- Διασπαστές αλυσίδας

Οι διασπαστές αλυσίδας αντιδρούν με το DNA προκαλώντας του ρήξη. Αυτό σημαίνει ότι δρουν ως χημικές νουκλεάσες οδηγώντας στην διάσπαση της αλυσίδας του σε κλάσματα που δεν επανενώνονται με DNA λιγάσες. Ο μηχανισμός αυτών των μορίων βασίζεται αρχικά στην εισχώρησή τους στο δίκλωνο μόριο μέσω των φωσφορικών μονοεστέρων ή τροποποιώντας τα σάκχαρα στην 3, 5 θέση ή μέσω διάρρηξης και παρεμβολής και έπειτα, την αποδόμηση του DNA οξειδωτικά, υδρολυτικά ή φωτοχημικά. Συνήθως παράγουν ρίζες που αντιδρούν με τα σάκχαρα και οδηγούν στην διάσπαση της αλυσίδας. Κατόπιν, σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να λειτουργούν απομακρύνοντας του δύο κλώνους, με κατάργηση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων. Μερικά από τα φάρμακα που ως διασπαστές μπορεί επίσης να δρουν μέσω μηχανισμού που στηρίζεται στις τοποισομεράσες. Ένα σύμπλοκο που αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως χημική νουκλεάση είναι το $[\text{Cu}(\text{Phen})_2]^{2+}$ (δισχιδής phen=1,10 φαινανθρολίνη), ενώ το αντιβιοτικό βλεομυκίνη έχει επίσης τέτοια δράση.^[70, 83, 97]

- Αντικαταστάτες δεσμών υδρογόνου

Τέλος, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί και ένας άλλος τρόπος αλληλεπίδρασης όπου τα μεταλλικά ιόντα και σύμπλοκα μπορούν να

αντικαταστήσουν τον δεσμό υδρογόνου στα ζεύγη των βάσεων με τρόπο που γενικά δεν είναι εκλεκτικός. Έχουν αναφερθεί παραδείγματά ιόντων (ελεύθερα ή μη) Hg(II), Zn(II), Ni(II), Co(II) που σχηματίζουν τέτοια σύμπλοκα με το DNA σε υψηλές τιμές pH. Κατά την προσθήκη τους στη β μορφή του DNA σε pH 8,5, η μείωση του pH και η μελέτη του φάσματος NMR ολιγονουκλεοτιδίου υποδηλώνει αντικατάσταση ιμίνο-πρωτονίου σε κάθε βάση της διπλής έλικας από το σύμπλοκο.^[98]



Σχήμα 3.11: Αντικατάσταση δεσμών υδρογόνου από μεταλλικό κέντρο (Δομή Cu²⁺-hydroxygrigridone ζευγών βάσεων)^[95]

3.3.1 Θέσεις δέσμευσης του Ru(II) στο DNA

Τα ιόντα του ρουθηνίου(II) στις ενώσεις τους ακολουθώντας την ήδη γνωστή προτίμησή τους για τα άζωτα, όταν προσδένονται στο DNA ευνοούν την δέσμευσή τους με άζωτα των βάσεων σε αντίθεση με σύμπλοκα ρουθηνίου άλλης οξειδωτικής κατάστασης. Έχουν γίνει μελέτες με διάφορες τεχνικές (φασματοσκοπικές, χρωματογραφία, φασματομετρίες μάζας), συμπλόκων του ρουθηνίου με ολιγονουκλεοτίδια και η προτίμηση για τα άζωτα είναι εμφανής. Συνήθως προτιμάται η δέσμευση του ρουθηνίου με το N-7 της γουανίνης, αλλά αναφέρονται στη βιβλιογραφία και δεσμοί με άζωτα όλων των βάσεων. Για παράδειγμα, διφαινυλικά σύμπλοκα του ρουθηνίου έχουν την προτίμηση 5'-GMP(N7) > 5'-TMP(N3) >> 5'-CMP(N3) > 5'-AMP (N7/N1), ενώ το σύμπλοκο [(η⁶-P-cymene)RuCl₂(pta)] (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) προτιμάει την δέσμευση με κυτοσίνη και αδενίνη. Αμινοσύμπλοκα του ρουθηνίου(II) που έχουν μελετηθεί και με πρωτεΐνες έχουν την σειρά προτίμησης στο DNA G(N7) > A(N3) > C(N3) > A(N1) > A(N7) > G(N3). Όπως για το cis-platin είναι εύκολο να γίνει αντιληπτό ότι η δέσμευση αυτή στις βάσεις σε κάθε περίπτωση, είναι πιθανό να οδηγήσει σε αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων, γ' αυτό και μελετάται η ανάπτυξη τέτοιου τύπου φαρμάκων με πιθανή αντικαρκινική και αντιβιοτική δράση.^[99-101]

Κεφάλαιο 4° : Πρωτεΐνες - Η κατηγορία των αλβουμινών και η αλληλεπίδραση των ανθρώπινων και βοδινών λευκωματίνων ορού (serum albumins) με μικρά μόρια

4.1 Αλβουμίνες

Οι αλβουμίνες ή λευκωματίνες όπως είναι γνωστές, είναι μια οικογένεια σφαιρικών πρωτεϊνών που διακρίνονται για την υδατοδιαλυτότητά τους, την μέτρια διαλυτότητα σε συμπυκνωμένα αλατούχα διαλύματα και την ικανότητα να υφίστανται θερμική πήξη. Οι ουσίες που περιέχουν αλβουμίνες λέγονται αλβουμινοειδή (λευκωματοειδή) με πιο γνωστές το γάλα και το ασπράδι του αυγού στο οποίο η παρουσία της αλβουμίνης το κάνει να πήζει κατά τον βρασμό του.^[102-104]

Οι πιο συνήθεις πρωτεΐνες της κατηγορίας των αλβουμινών είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στον ορό του αίματος (πλάσμα) του ανθρώπου και των ζώων. Αυτές καλούνται λευκωματίνες ορού του αίματος (SA) και έχουν κεντρικό ρόλο ως μεταφορείς. Μπορούν να προσδέσουν πάνω τους και να μεταφέρουν μεγάλο αριθμό λιπαρών οξέων, ορμονών, στεροειδών, ανόργανων ιόντων (όπως Na(I), Mg(II), Cu(II), Ni(II), Hg(II), Ag(II), Zn(II) και Au(I)), αμινοξέων και άλλων πρωτεϊνών, ουσιών ιδιαίτερης σημασίας όπως η αίμη και η χολυρεθρίνη, αλλά και φαρμάκων σε σημεία στόχους που επιθυμούμε. Γενικά, υδρόφοβες χημικές ενώσεις και άλλες που δεν διαλύονται στο αίμα, όπως πολλές παραπάνω, προσδένονται στην λευκωματίνη και μπορούν να κινούνται ελεύθερα σε αυτό. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό επιτρέπει σε φάρμακα τα οποία δεν είναι διαλυτά σε ελεύθερη μορφή στο νερό (και στο αίμα), να μεταφέρονται στο στόχο τους, με την κυκλοφορία του αίματος. Η δυνατότητα αυτή οφείλεται στη διαμορφωτική ευελιξία που έχουν λόγω των δομικών τους χαρακτηριστικών, όπως θα δούμε παρακάτω, γι' αυτό και έχουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την εκλεκτική μεταφορά διαφόρων φαρμάκων σε συγκεκριμένους στόχους.^[81, 102, 104-106]

Οι SAs χρησιμοποιούνται σε μεγάλο αριθμό ιατρικών εργαστηρίων για βιολογικές εφαρμογές και μελέτες, ενώ υφίστανται και σε σημαντικό κομμάτι προϊόντων διατροφής. Οι λευκωματίνες των θηλαστικών έχουν μεγάλες ομοιότητες στην αλληλουχία τους (72–82%) και στην δομή τους (83–88%) με την ανθρώπινη λευκωματίνη ορού (HSA).^[102]

Στον άνθρωπο αλλά και στα ζώα οι SAs είναι οι πιο άφθονες διαλυτές πρωτεΐνες του κυκλοφοριακού συστήματος και αποτελούν το 52–60% του πλάσματος του αίματος. Η παρουσία τους βοηθάει στις μεταβολικές τροποποιήσεις διαφόρων ουσιών και υποκαταστατών, στη μείωση της δράση τοξινών και στον έλεγχο των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του πλάσματος. Κατόπιν, παρουσιάζουν αντιθρομβωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιπηκτική δράση στο αίμα και κάποιες φορές μπορεί να παρουσιάζουν ψευδοενζυματικές ιδιότητες. Η πιο ουσιώδης λειτουργία της για την ρύθμιση του οργανισμού είναι

η διατήρηση της ογκωτικής πίεσης (μείωση νερού στο αίμα - αντίθετο της υδροστατικής πίεσης) που χρειάζεται για την σωστή κατανομή των υγρών του σώματος ανάμεσα αγγεία του αίματος και τους ιστούς. Χωρίς αυτές η υψηλή πίεση στις φλέβες της θα εξανάγκαζε περισσότερα υγρά να μπαίνουν από το αίμα στους ιστούς.^[104-107]

Η σύνθεσή τους γίνεται από παρεγχυματικά κύτταρα του συκωτιού και εισέρχονται στη ροή του αίματος ως μη γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες (13-14 g την ημέρα) έχοντας χρόνο ημιζωής έως και 19 μέρες. Ρυθμίζεται από αμινοξέα, την τιμή της ογκωτικής πίεσης και την ινσουλίνη, γι' αυτό η έλλειψή της μπορεί να οφείλεται και σε διαβήτη. Η μέση κανονική τιμή της σε ενήλικες κυμαίνεται από 35 έως 50 g/L.^[105, 106, 108]

Ανάλογα με τις χημικές ιδιότητες των μορίων τους, πολλά ελεύθερα φάρμακα μπορούν παθητικά να διαχυθούν και να περάσουν τους φραγμούς ενδοθηλιακών κυττάρων και κυττάρων των ιστών φτάνοντας στους ιστούς των οργάνων. Εκεί μπορεί να μεταβολιστούν ή να απομακρυνθούν από τον οργανισμό με διαδικασίες όπως ή χολική απέκκριση (στη χολή) ή η νεφρική απέκκριση. Επίσης, μπορεί να διανεμηθούν εντός του κυττάρου μέσω συγκεκριμένων συστημάτων μεταφοράς όπως υποδοχείς ενδοκύτωσης και πρωτεΐνες μεταφοράς. Μόνο αυτά τα ελεύθερα φάρμακα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους θεραπευτικούς στόχους (π.χ. υποδοχείς) δίνοντας θεραπευτικά αποτελέσματα και στις περισσότερες περιπτώσεις η συγκέντρωσή τους στους ιστούς είναι ανάλογη με την συγκέντρωσή τους στο πλάσμα. Έτσι η δέσμευση στην SA είναι σημαντικός παράγοντας για να καταλάβουμε τα φαρμακοκινητικά και φαρμακολογικά αποτελέσματα του φαρμάκου.^[109] Η φύση και το μέγεθος της δέσμευσης έχουν απευθείας επιπτώσεις στη κατανομή του φαρμάκου, την φαρμακοκινητική, την θεραπευτική δράση, τον σχεδιασμό και τον έλεγχο του φαρμάκου.^[105]

Ακόμα, μπορούμε να συνοψίσουμε κάποια χαρακτηριστικά που κάνουν τις SAs μοναδικά υποσχόμενες για μεταφορείς αντικαρκινικών φαρμάκων:

- Φυσιικοί μεταφορείς πλήθος φυσικών προϊόντων και άλλων υδρόφοβων ουσιών
- Δεν επηρεάζονται και δεν αποσυντίθενται από φυσικούς μηχανισμούς κάθαρσης του οργανισμού
- Συσσωρεύονται σε σημεία αγγειακής διαρροής (έχουν σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη όγκων^[110])
- Απορροφάται σε μεγάλο βαθμό και μεταβολίζεται από ραγδαίως αναπτυσσόμενα καρκινικά κύτταρα που έχουν έλλειψη θρεπτικών ουσιών. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι πολύ σημαντικό για την αντικαρκινική δράση σε συγκεκριμένα κύτταρα στόχο.^[108]

Εκτός της λευκωματίνης, υπάρχουν και άλλες σημαντικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως μεταφορείς όπως οι α-fetoprotein (AFP), η αφαμίνη (AFM) και η βιταμίνης D δεσμευτική πρωτεΐνη (DBP) που χαρακτηρίζονται επίσης από τα ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά και τις δεσμευτικές τους ιδιότητες. Κατόπιν,

χωρίς να επεκταθούμε μπορούμε να αναφερθούμε στη ύπαρξη άλλων τύπων αλβουμινών από την SA. Αυτές είναι η αποθηκευτική πρωτεΐνη onalbumin στο ασπράδι του αυγού και αρκετές αποθηκευτικές αλβουμίνες σε διάφορους σπόρους φυτών, συμπεριλαμβανομένων της πρωτεΐνης κάνναβης (hemp protein).^[111, 112]

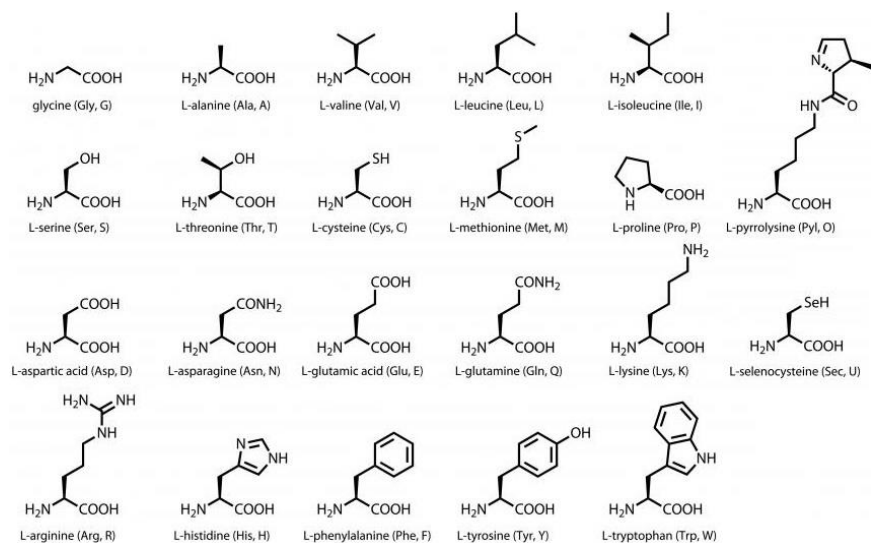
Είναι φανερό πως η κατηγορία των SAs πρωτεϊνών είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την ανάπτυξη και λειτουργία μεγάλου αριθμού φαρμάκων με ποίκιλες δράσεις όπως αντιβιοτική και αντικαρκινική. Για να γίνει όμως πλήρως αντιληπτό το πως τα φάρμακα αυτά αλληλεπιδρούν με τις SAs είναι απαραίτητη η κατανόηση της δομής των τελευταίων. Θα επικεντρωθούμε στην ανθρώπινη (HSA) για την τεράστια σημασία της ως μεταφορέας φαρμάκων στον άνθρωπο και στην βοδινή (BSA) όπου η αλληλεπίδρασή της μελετάται στην παρούσα εργασία. Η BSA είναι μια από τις πιο γνωστές πρωτεΐνες αυτού του τύπου λόγω της τεράστιας διαθεσιμότητάς της (λαμβάνεται εύκολα από το γάλα αγελάδας και το βοδινό κρέας) την δομική ομοιότητα της, καθώς και την παρόμοια αλληλεπίδραση της με μικρά μόρια με την ανθρώπινη. Το χαμηλό κόστος της και η διαθεσιμότητά της, την καθιστούν την πιο κοινή πρωτεΐνη για χρήση σε ιατρικά σκευάσματα και ιατρικές, βιοχημικές και χημικές εφαρμογές/μελέτες.^[102]

4.2 Δομή των HSA και BSA

Για να κατανοήσουμε την δομή των SAs θα πρέπει να γίνει γνωστό ότι οι πρωτεΐνες είναι πολυμερικές ουσίες που αποτελούνται από μεγάλο αριθμό αμινοξέων ενωμένων μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Το κάθε αμινοξύ περιέχει έναν α-άνθρακα ενωμένο με ένα άτομο υδρογόνου, μια καρβοξυλική ομάδα, μια αμινική ομάδα και μια χαρακτηριστική ομάδα R. Οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι αμιδικοί μεταξύ του καρβοξυλικού άκρου και της αμινομάδας δύο αμινοξέων και κατά σύμβαση σε ένα πολυπεπτίδιο, η ελεύθερη αμινομάδα γράφεται ως αριστερό άκρο, ενώ η ελεύθερη καρβοξυλομάδα ως δεξιό. Η κατεύθυνση αυτή (αριστερά προς δεξιά) θεωρείται παράλληλη, ενώ η αντίθετη αντιπαράλληλη. Στους περισσότερους οργανισμούς όπως στα ζώα και τον άνθρωπο, οι πρωτεΐνες αποτελούνται από 20 διαφορετικά αμινόξια (L-ισομερή ή σε S διαμόρφωση).

Οι πεπτιδικοί δεσμοί αποτελούν την σπονδυλική στήλη των πρωτεϊνών, δημιουργώντας μια πολυπεπτιδική αλυσίδα με σταθερό κορμό και ένα μεταβαλλόμενο τμήμα διαφορετικών πλευρικών αλυσίδων. Το κάθε πεπτίδιο (κατάλοιπο) στην αλυσίδα περιέχει ιμινικά υδρογόνα (N-H) και καρβονυλομάδες (C-O) που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με λειτουργικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων με σχηματισμό δεσμού υδρογόνου. Επιπροσθέτως, τα πεπτίδια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, λόγω του θείου κάποιων αμινοξέων. Με την βοήθεια των αλληλεπιδράσεων αυτών μεταξύ πεπτιδίων ίδιων ή διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων,

αυτές αποκτούν την τρισδιάστατη δομή τους στο χώρο. Αυτή μπορεί να είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και αποτελεί το κλειδί για τον προσδιορισμό φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους.



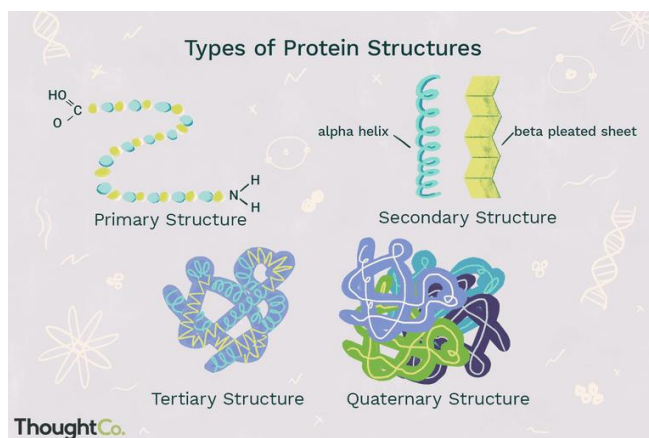
Σχήμα 4.1: 20 αμινοξέα που απαντώνται στους περισσότερους οργανισμούς [78]

Η αλληλουχία των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης ονομάζεται πρωτοταγή δομή της. Κατόπιν, όταν η αλυσίδα αναδιπλώνεται στο χώρο συνθέτει την δευτεροταγή δομή της η οποία αποτελείται από τις περιοδικές δομές της α-έλικας και β-πτυχωτής επιφάνειας, καθώς και από στροφές και θηλιές. Αυτές οι δομές δημιουργούνται και σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου. Η α-έλικα έχει ραβδόμορφη μορφή με τον συμπαγή σπειραματοειδή κορμό της αλυσίδας στο εσωτερικό της, όπου οι ομάδες CO και NH (του κορμού της κύριας αλυσίδας) συνδέονται όλες με δεσμούς υδρογόνου, εκτός από αυτές των άκρων της αλυσίδας. Ο δεσμός σχηματίζεται μεταξύ ομάδας CO και NH τέσσερων αμινοξέων μπροστά στην αλυσίδα. Στο εξωτερικό της έλικας βρίσκονται οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων. Η έλικα περιστρέφεται πλήρως ανά 3,6 αμινοξέα, είναι δεξιόστροφη γιατί ευνοείται ενεργειακά λόγω μικρών στερικών συγκρούσεων και τα γειτονικά αμινοξέα απέχουν μεταξύ τους 1,5 Å. Οι β-πτυχωτές επιφάνειες αποτελούνται από β-πτυχώσεις, δηλαδή πολυπεπτιδικές αλυσίδες πλήρως εκτεταμένες, που έρχονται κοντά μεταξύ τους και δημιουργούν δεσμό υδρογόνου μεταξύ CO και NH. Τα γειτονικά αμινοξέα απέχουν μεταξύ του 3,5 Å και οι πλευρικές τους ομάδες έχουν αντίθετη κατεύθυνση. Οι β-πτυχώσεις μπορεί να είναι παράλληλες ή αντιπαράλληλες μεταξύ τους. Κατόπιν, μια πρωτεΐνη για να αποκτήσει την συμπαγή δομή της στο χώρο αναστρέφεται, δημιουργώντας στροφές και θηλιές. Με τις δομές αυτές, μια πολυπεπτιδική αλυσίδα αλλάζει κατεύθυνση. Είναι καθορισμένες και σταθερές, παρόλο που στην περίπτωση των δομών της θηλιάς, δεν είναι περιοδικές.

Η τελική δομή του πολυπεπτιδίου στο χώρο αποτελεί την τριτοταγή δομή,

που αναφέρεται στη χωροταξική σχέση αμινοξέων που απέχουν αρκετά μεταξύ τους και στη θέση των δισουλφιδικών δεσμών όπου υπάρχουν (βλέπε σχήμα 4.4). Είναι ουσιαστικά η διαδρομή που ακολουθεί η πολυπεπτιδική αλυσίδα μιας πρωτεΐνης στο χώρο. Στο υδατικό περιβάλλον του οργανισμού η πολυπεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται με τέτοιο τρόπο ώστε οι υδρόφοβες ομάδες να θάβονται στο εσωτερικό της πρωτεΐνης και οι υδρόφιλες/φορτισμένες ομάδες στο εξωτερικό. Το χαρακτηριστικό αυτό, μαζί με τους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται και με αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ κοντινών πλευρικών ομάδων, σταθεροποιεί την τριτοταγή δομή. Εξαιρούνται μερικές πρωτεΐνες που διαπερνούν μεμβράνες, όπως οι πορίνες (εξωτερικές υδρόφοβες ομάδες).

Επιπλέον, μια πρωτεΐνη μπορεί να αποτελείται από πολλές διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που την συγκροτούν. Αυτές αποτελούν τις υπομονάδες της πρωτεΐνης και η τεταρτοταγής δομή αναφέρεται στη χωροδιάταξη των υπομονάδων και τα είδη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους.^[70, 81]



Σχήμα 4.2: Δομές μια πρωτεΐνης ^[78]

Τέλος, αν αναφερθούμε στα ένζυμα, αυτά είναι πρωτεϊνικά μόρια με εξειδικευμένο ρόλο και μπορεί να περιέχουν μέταλλα στα ενεργά τους κέντρα ή ως δομικά συστατικά. Η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών συνεπώς, με μεταλλικά κέντρα δεν είναι απλά εφικτή, αλλά και ιδιαίτερα σημαντική.^[70]

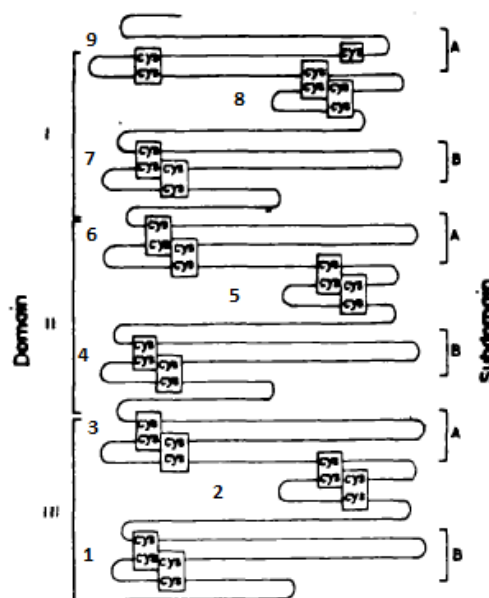
➤ HSA

Είναι μια πρωτεΐνη που ζυγίζει 66,438 kDa ή περίπου 66,5 g/mol. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 και έχει 16.961 νουκλεοτίδια. Αποτελείται από τρία πανομοιότυπα κομμάτια που λέγονται μονάδες I, II, III και περιέχει 585 αμινοξέα. Μπορούμε να την χαρακτηρίσουμε απλή πρωτεΐνη που στο σύνολό της είναι μια συνεχή αλυσίδα. Δεν έχει ενωμένες στη φυσιολογική της μορφή, πρόσθετες ομάδες και διάφορους υδρογονάνθρακες ή λιπίδια. Είναι διαλυτή σε υδατικά μέσα λόγω των πολλών όξινων (Asp, Glu) και βασικών (Lys, Arg) αμινοξέων που περιέχει και χαρακτηρίζεται από μικρή περιεκτικότητα σε τρυπτοφάνη και υψηλή σε κυστεΐνη, λευκίνη και στα ιοντικά αμινοξέα, λυσίνη και γλουταμινικό οξύ. Έχει

χαρακτηριστεί κρυσταλλογραφικά (ανάλυση 2,3 Å) ελεύθερη, από τον Carter και Ho το 1994, αλλά και ενωμένη με διάφορους υποκαταστάτες τα επόμενα χρόνια.^[104, 113, 114]

Ο προσδιορισμός της δομής της κρυσταλλογραφικά αποτέλεσε σταθμό στην μελέτη της πρωτεΐνης και ερμήνευσε όλα τα πειραματικά δεδομένα που είχαν ανιχνευθεί μέχρι τότε. Σε όλη αυτήν την πορεία χαρακτηριστικό ρόλο έπαιξε η απομόνωση κρυστάλλων ανασυνδυασμένης HSA (99,9 % ίδια με την φυσική) και HSA άγριου τύπου που χαρακτηρίστηκαν κρυσταλλογραφικά από τον Carter και He το 1992. Ο χαρακτηρισμός αυτών των τύπων αλβουμινών που είναι σχεδόν ίδιες με την φυσική HSA, άνοιξε τον δρόμο για τον πλήρη χαρακτηρισμό της το 1994.^[104, 115]

Το 67 % της πρωτεΐνης είναι α-έλικες, ενώ το υπόλοιπο στροφές (10%) και εκτεταμένα πολυπεπτίδια (23%). Τα τρία όμοια κομμάτια (μονάδες) συναρμολογούνται με τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματίζουν ένα μόριο με σχήμα καρδιάς. Κάθε μονάδα αποτελείται από δύο υπομονάδες A και B. Προφανώς, η κάθε υπομονάδα αποτελείται κυρίως από α-έλικες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η A υπομονάδα έχει 6 έλικες και η B 4 έλικες που ενώνονται μεταξύ τους με τρόπο που δημιουργεί ευλύγιστες λούπες (σχήμα 4.5). Οι 34 από τις 35 κυστεΐνες που υπάρχουν στην πρωτεΐνη σχηματίζουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς και την σταθεροποιούν, ενώ το θείο της κυστεΐνης με τον αριθμό 34 στην αλυσίδα, είναι ενωμένο με υδρογόνο.

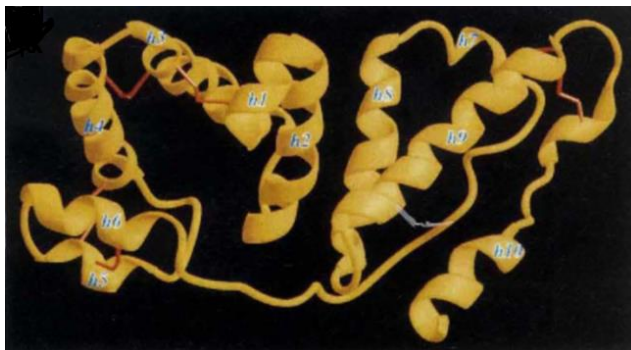


Σχήμα 4.3: Οι διπλές λούπες στην δομή της HSA ^[113]

Η κάθε λούπα είναι διπλή αφού αποτελείται από 2 δισουλφιδικούς δεσμούς και για κάθε μονάδα ακολουθείτε ένα μοτίβο μεγάλη-μικρή-μεγάλη λούπα, σύμφωνα με το μέγεθος της έλικας (σχήμα 4.5). Με αυτόν τον τρόπο, κάθε μονάδα έχει 3 διπλές λούπες δίνοντας στο σύνολο 18 δισουλφιδικούς δεσμούς. Παρόλα αυτά, εξαίρεση αποτελεί ο πρώτος δεσμός (μεταξύ 1 και 3 έλικας) που λείπει και τελικά έχουμε 17 τέτοιους δεσμούς. Τα ζεύγη των δισουλφιδικών δεσμών σύμφωνα με την τράπεζα δομών πρωτεϊνών (Protein Data Bank), είναι σπάνιο φαινόμενο να υπάρχουν ανάμεσα σε έλικες, δίνοντας μοναδικές δομικές δυνατότητες στην πρωτεΐνη όπως θα δούμε παρακάτω.

Οι έξι υπομονάδες μοιράζονται το ίδιο ελικοειδές μοτίβο. Σε αυτό το μοτίβο οι 1,3,4,6,7,9 δισουλφιδικοί δεσμοί σχηματίζουν τις μεγάλες λούπες και οι 2,5,8

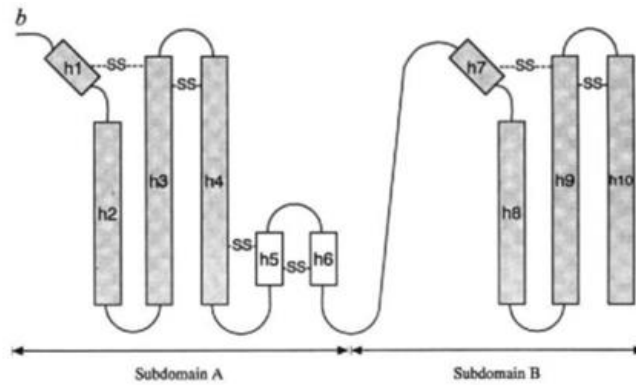
δισουλφιδικοί δεσμοί σχηματίζουν τις μικρές λούπες. Γενικά, μπορούμε να πούμε πως κάθε μονάδα έχει 10 έλικες με την αντιστοιχία που αναφέρθηκε για την κάθε υπομονάδα. Αν τις ονομάσουμε h1-h6 και h7-h10 και τις απεικονίσουμε κρυσταλλογραφικά (σχ. 4.4) μπορούμε ευκολότερα να συγκρίνουμε την κάθε μονάδα.



Σχήμα 4.4: Υπομονάδα II της ανασυνδυασμένη HSA (100% όμοια με την φυσική), φαίνονται με κόκκινο οι δισουλφιδικοί δεσμοί και όλες οι έλικες είναι αριθμημένες ^[112]

Ο πρώτος δισουλφιδικός δεσμός γίνεται μεταξύ της πρώτης και της τρίτης έλικας, με εξαίρεση την IA υπομονάδα που δεν υπάρχει. Οι 1-4 έλικες συνδέονται μεταξύ τους με όμοιο τρόπο με τις 7-10 έλικες της B υπομονάδας. Έτσι, σχηματίζεται μια δέσμη τριών ελίκων που όμως περιέχει 4 έλικες (η h1 ενώνεται με την h2 όπως φαίνεται στο σχήμα 4.7) και σταθεροποιείται από τους 2 δισουλφιδικούς δεσμούς της διπλής λούπας μεταξύ 1-3 και 3-4 έλικας. Η ένωση των ελίκων γίνεται με στροφές. Το μοτίβο αυτό για την A υπομονάδα, ακολουθείτε από μια μικρή δέσμη με την μικρή διπλή λούπα δισουλφιδικών δεσμών, μεταξύ των ελίκων 5 και 6 σχηματίζοντας συνολικά μια δομή που μοιάζει με αυτή των γλοβινών. Στη συνέχεια μια εκτεταμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα συνδέει την A υπομονάδα με την B και η οποία ακολουθώντας όμοιο τρόπο με τις πρώτες 4 έλικες, δημιουργεί πάλι μια τριπλή δέσμη ελίκων. Η τελευταία έλικα με αριθμό 10 επεκτείνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι η πρώτη έλικα της επόμενης μονάδας, δίνοντας τις μεγαλύτερες σε μήκος έλικες της πρωτεΐνης. Η μεγαλύτερη έλικα έχει 31 αμινοξέα και είναι αυτή που ενώνει το IB-IIA υπομονάδες. Τελικά, μετράμε στην πρωτεΐνη 28 έλικες και όχι 30 και όλες οι δέσμες είναι αντιπαράλληλες.

Κατόπιν, μεταξύ των 4 ελίκων της A και B υπομονάδας διακρίνουμε κάποιες διαφορές. Αρχικά στην A υπομονάδα οι 4 αυτές έλικες βρίσκονται κοντά στο C τελικό άκρο της πρωτεΐνης και ξεκινάνε από το N, ενώ στη B βρίσκονται στο N τελικό άκρο. Επίσης, όπως ήδη αναφέραμε, πριν το τελικό άκρο στη B υπομονάδα εκτείνεται η πολυπεπτιδική αλυσίδα, δίνοντας μια έλικα που είναι η τελευταία και ταυτόχρονα η πρώτη της επομένης ομάδας. Το σχήμα που δημιουργείται μοιάζει με δομή απλής πάνω-κάτω δέσμης ελίκων. ^[104, 114, 115]



Σχήμα 4.5: Έλικες και δομή μιας μονάδας της HSA ^[112]

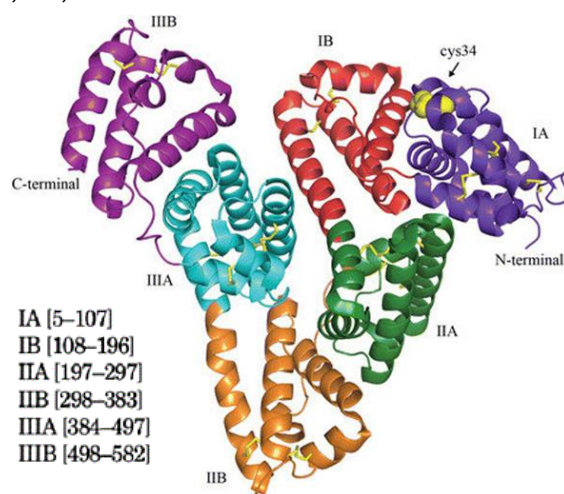
Τα κομμάτια που ενώνουν τις υπομονάδες μεταξύ τους είναι οι εκτεταμένες αλυσίδες Lys-106 με Glu-119, Glu-292 με Val-315 και Glu-492 με Ala-511 για τις υπομονάδες IA-IB, IIA-IIB, IIIA-IIIB αντίστοιχα. Αυτές οι συνδέσεις δεν σταθεροποιούν την θέση των μεταξύ υπομονάδων και είναι ένα σημαντικό στοιχείο για το ότι οι διαμορφωτικές αλλαγές γίνονται συχνά σε αυτό το σημείο. Η τοποθεσία των δισουλφιδικών δεσμών προσδίδει ακαμψία για κάθε υπομονάδα, η έλλειψη τέτοιων δεσμών όμως μεταξύ των υπομονάδων, επιτρέπει αλλαγές στη δομή του μορίου σύμφωνα με τις συνθήκες και τον υποκαταστάτη που αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη.^[104, 116]

Οι έλικες σε κάθε μονάδα έρχονται κοντά και συνδέονται με υδροφοβικές δυνάμεις που αναπτύσσονται κυρίως μεταξύ των h2, h3 και h8 ελίκων. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να πούμε ότι μεταξύ των υπομονάδων υπάρχει ένας ψευδοδιεπιφανειακός άξονας συμμετρίας (με γωνίες 168° για την I, 163° για την II και 171° για την III μονάδα). Αντίθετα, η έλλειψη τέτοιων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μονάδων λόγω της εκτεταμένης έλικας που τις ενώνει (h10(I)-h1(II) και h10(II)-h1(III)), δημιουργεί ψευδοδιεπιφανειακό άξονα βίδας (screw axis) μεταξύ των μονάδων (με γωνίες 165° για I-II and 167° για II-III). Η πρώτη έλικα αλληλεπιδρά και αυτή υδροφοβικά με τις άλλες και σταθεροποιείτε σε μικρότερο βαθμό, αφού δεν συμμετέχει σε δισουλφιδικό δεσμό. Επιπλέον, οι έλικες h2 και h8 είναι οι μόνες μακριές που βρίσκονται στην λούπα χωρίς δισουλφιδικό δεσμό (σχ. 4.7).^[104, 114]

Η κρυσταλλογραφική δομή της HSA, σύμφωνα με όσα είπαμε, φαίνεται παρακάτω και η πρωτεΐνη καταλαμβάνει χώρο περίπου 80x80x30 Å ή μπορούμε να πούμε ότι βρίσκεται εντός ισόπλευρου τριγώνου με 80 Å πλευρά και βάθος 30 Å. Ανάμεσα στα δύο μισά τις πρωτεΐνης υπάρχει ένας κενός χώρος πλάτους 10 Å και 12 Å βάθους. Αυτή η δομή επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες, όπως με κρυσταλλογραφία σκέδασης μικρή γωνίας και αφορά την δομή της HSA σε ουδέτερο διάλυμα.^[104, 105, 113, 114]

Κρυσταλλογραφικά, έχουν προσδιοριστεί πάνω από 50 δομές κάτω από διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, συνδεδεμένες ή μη σε υποκαταστάτες. Οι δύο που ξεχωρίζουν είναι αυτές των συμπλόκων απόπρωτεΐνης και HSA-myristate. Σε pH 5,7-7,2 και συνθήκες αίματος η HSA έχει την δομή του

σχήματος 4.8, ενώ σε άλλες τιμές pH αλλάζει αρκετά η δομή της και δίνει τις διαμορφώσεις E, F, N, B και A.^[116, 117]



Σχήμα 4.6: Κρυσταλλογραφική δομή HSA και ο αριθμός αμινοξέων κάθε υπομονάδας (φαίνονται με διαφορετικό χρώμα η κάθε υπομονάδα, η Cys34 και η αρχή και το τέλος της πρωτεΐνης)^[114, journal of Hepatology, 2014. 61(2): p. 396-407]

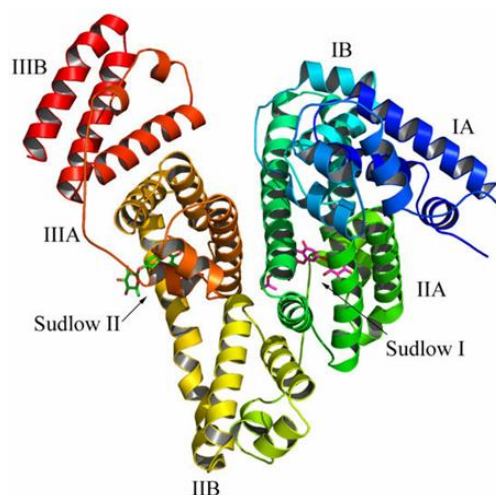
Αν αναφερθούμε σε κάποια χαρακτηριστικά της HSA, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το φορτίο και το ισοηλεκτρικό σημείο της. Ο μεγάλος αριθμός ιοντισμένων αμινοξέων δίνει υψηλό συνολικό φορτίο, 185 ιόντα για κάθε μόριο στο pH 7, γι' αυτό και έχει υψηλή διαλυτότητα στο νερό. Τα όξινα αμινοξέα υπερισχύουν των βασικών, γι' αυτό έχουμε συνολικό άθροισμα φορτίου -15 και ισοηλεκτρικό σημείο 5 στο νερό (25 °C). Παρόλα αυτά, η κατανομή του φορτίου στο μόριο δεν είναι συμμετρική και οι μονάδες I,II,II έχουν -9, -8, +2 συνολικό άθροισμα φορτίων. Επικρατεί η μικρή εξουδετέρωση των όξινων αμινοξέων από βασικά, εκτός από ένα σημείο με πολλά βασικά στη μονάδα I. Υπάρχουν όμως μέρη που ξεχωρίζουν, γιατί έχουν ουδέτερο pH και είναι σημαντικά γιατί μπορούν να αντιδράσουν με λιπαρά οξέα ή υδρόφοβες ουσίες όπως εκτεταμένοι αρωματικοί δακτύλιοι (φαινανθρολίνη στο σύμπλοκο που χρησιμοποιούμε). Τέλος, σημαντική είναι η αντίσταση που παρουσιάζει στην θερμοκρασία μετουσίωσης που φτάνει τους 60 °C, λόγω της σταθερότητας που προσδίδουν οι δισουλφιδικοί.^[104, 114]

➤ BSA

Η βασική της διαφορά με την HSA είναι η ύπαρξη 2 τρυπτοφανών (σχήμα 4.12) στις θέσεις 212 και 134, ενώ στην ανθρώπινη υπάρχει μία στο 214. Αν εξαιρέσουμε το χαρακτηριστικό αυτό και την υψηλή συγκέντρωση βαλινών στην HSA, θα λέγαμε ότι δομικά είναι σχεδόν ίδιες. Το ποσοστό ομοιότητας είναι 75,6 % και η BSA περιέχει 583 αμινοξέα, καθώς και υιοθετεί το σχήμα καρδιάς που περιγράψαμε. Έχει μοριακό βάρος 66,411 kDa και αν κάνουμε μια σύγκριση των ιδιοτήτων θα δούμε ότι επίσης δεν διαφέρει πολύ με την HSA. Η μη συμμετρική κατανομή φορτίου ισχυρεί και εδώ, δίνοντας φορτία -11, -7, και + 1 για της I,II,III υπομονάδες αντίστοιχα και η συνολική κατανομή -17. Το ισοηλεκτρικό σημείο είναι 4,7 στο νερό στους 25 °C, ενώ υπάρχουν και εδώ

ουδέτερα σημεία που μπορούν να αντιδράσουν με υδρόφοβες ουσίες και λιπαρά οξέα.

Δομικά οι δισουλφιδικοί δεσμοί βρίσκονται ακριβώς στο ίδιο σημείο που βρίσκονται στην HSA. Επίσης, ο τρόπος που διπλώνεται η πρωτεΐνη και φτιάχνει την τεταρτοταγή δομή της είναι ακριβώς ίδιος με την HSA, παρόλο τις διαφορές στην αλληλουχία και μικρές δομικές διαφορές στην θέση και στο τύλιγμα των υπομονάδων (π.χ. διαφορές στο μήκος ελίκων). Η δομική ομοιότητα δεν έχει να κάνει άμεσα μόνο με την αλληλουχία. Τα μόρια αλβουμίνης είναι γενικά ευλύγιστα λόγω της λειτουργίας τους, γι' αυτό και υιοθετούν τέτοια δομή.



Σχήμα 4.7: Κρυσταλλική δομή BSA και τα Sudlow σημεία I, II (κύρια σημεία πρόσδεσης φαρμάκων) [Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, (2012). 89: p. 177-186]

Η δομή της φαίνεται στο σχήμα 4.9 και έχει προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά (ανάλυση 2,3 Å).^[114, 118, 119]

4.3 Θέσεις δέσμευσης και τρόποι αλληλεπίδρασης μικρών μορίων με τις HSA και BSA

Όπως είδαμε το φάσμα των ουσιών που αλληλεπιδρούν με τις BSA και HSA είναι αρκετά μεγάλο. Οι τρόποι με τους οποίους αλληλεπιδρά κάθε κατηγορία μικρών μορίων έχουν σημαντικό πειραματικό ενδιαφέρον και θα γίνει μια σύνοψη τους στο παρόν κεφάλαιο και για τις δύο αλβουμίνες. Αν προσπαθήσουμε να κατηγοριοποιήσουμε της ουσίες που προσδένονται στις πρωτεΐνες, αυτές είναι λιπαρά οξέα και λιπίδια, μεταλλικά ιόντα και σύμπλοκα, νανουλικά και φάρμακα, πολυμερή και δενδριμερή, αμινοξέα και υδαάνθρακες. Κατόπιν, υπάρχουν διάφοροι φυσικοί και χημικοί μετουσιωτές που μπορούν να ξεδιπλώνουν και να αναδιπλώνουν την πρωτεΐνη, έχοντας επιπτώσεις στην υγεία του οργανισμού. Τέλος, θα αναφερθούν παραδείγματα κάποιων φαρμάκων που έχει μελετηθεί πειραματικά η αλληλεπίδρασή τους με την μια ή την άλλη πρωτεΐνη.^[105]

Γενικά, ισχυρή αλληλεπίδραση αυξάνει την συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα και το επιτρέπει να φτάσει στο στόχο του κάτι που δεν συμβαίνει με πιο ασθενές αλληλεπιδράσεις. Η διαφορά στην αλληλεπίδραση των φαρμάκων στις δύο πρωτεΐνες είναι μικρές, παρόλο που η BSA είναι κατά 75,6 % ίδια με την HSA. Έτσι, η BSA χρησιμοποιείται σαν μοντέλο για την αξιολόγηση του φαρμάκου για τους λόγους που προείπαμε στην εισαγωγή. Από τους ερευνητές μελετήθηκε και η περίπτωση χορήγησης πρωτεΐνης διαφορετικού είδους σε άλλο όπως BSA ή HSA σε αρουραίους, κάτι που είχε θετικά αποτελέσματα, χωρίς συμπτώματα αλλεργίας.^[109, 120, 121]

Μπορούμε να διακρίνουμε κάποιες κύριες θέσεις δέσμευσης και τρόπους αλληλεπίδρασης για σύνολο μορίων, χωρίς βέβαια να είναι μόνο αυτές/οί. Τέτοιες θέσεις είναι τα Sudlow σημεία I και II (Sudlow sites), τα σημεία πρόσδεσης λιπαρών οξέων (FAs), οι τρυπτοφάνες και η κυστεΐνη 34.

- Sudlow σημείο I

Βρίσκεται στην IIA υπομονάδα, είναι λιγότερο καθορισμένο από το II και περιέχει αρκετές γειτονικές και αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές δέσμευσης με κύριες αυτές τις warfarin και της azaroprazone (αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές). Έτσι, μπορούμε να χωρίσουμε το σημείο σε δύο 2 υποσημεία Ia, Ib ανεξάρτητα μεταξύ τους (αριστερό και δεξιό υποσημείο). Στη βιβλιογραφία χωρίζεται και σε ένα τρίτο υποσημείο στην είσοδο της τσέπης με τα αμινοξέα Phe211, Trp214, Ala215, Leu238 και Lys199, Arg218. Στο σημείο αυτό δεσμεύονται οι φαινολικές ομάδες των oxyphenbutazone, warfarin και thyroxine.

Το σημείο Sudlow I είναι μεγάλο και ευέλικτο και μπορεί να δεσμεύει μεγάλη ποικιλότητα φαρμάκων ακόμα και πάνω από ένα ταυτόχρονα. Στο κομμάτι της warfarin βρίσκεται και η τρυπτοφάνη 214 (212 στην BSA), κάτι ιδιαίτερα σημαντικό όπως θα δούμε στη συνέχεια. Οι υποκαταστάτες που δεσμεύονται ισχυρά στο σημείο I είναι δικαρβοξυλικά οξέα και ογκώδης ετεροκυκλικά μόρια με αρνητικό φορτίο στο κέντρο του μορίου. Τέτοια είναι η βαρφαρίνη (έχει ήδη αναφερθεί ως warfarin) και η σουλφοναμίδη (sulphinamide). Μπορούν να προσδεθούν και μετρίου μεγέθους λιπαρά οξέα (FA7-βλέπε FA σημεία).

Κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το σημείο I είναι μεγαλύτερο από το II και η δυνατότητα να πιάνονται φάρμακα σε διαφορετικά σημεία αυτής της κοιλότητας στην IIA υπομονάδα, μπορεί να περιλαμβάνει και γειτονικά κομμάτια στην διεπαφή με την IB υπομονάδα (148-154 αμινοξέα). Το σημείο είναι μια τσέπη που αποτελείται από δυο άπολα cluster (στην είσοδο και στο εσωτερικό), δημιουργώντας υδρόφοβο περιβάλλον. Η τσέπη περιέχει όμως, ένα κομμάτι κεντρικά τοποθετημένων πολικών αμινοξέων (Tyr150, His242, Arg257 στο βάθος της τσέπης) και Lys199, Arg218 και Arg222 στην είσοδο της τσέπης). Η βαρφαρίνη για παράδειγμα, ενώνεται σε αυτό το σημείο με 3 δεσμούς υδρογόνου με τις Tyr150, His242 και την Lys199 ή την Arg222. Η πλειοψηφία των φαρμάκων τοποθετείται έτσι ώστε να δημιουργείται δεσμός υδρογόνου με

την τυροσίνη 150. Επίσης, η προτίμηση σε επίπεδα αρωματικές ουσίες οφείλεται στο ότι χωράνε άνετα ανάμεσα από της πλευρικές αλυσίδες των Leu238 και Ala291 στο κέντρο της τσέπης (αποτελούν το 'στόμα' της τσέπης). Λόγω της ευελιξίας της τσέπης μπορεί να χωρέσουν και μόρια νερού που μειώνουν την αλληλεπίδραση υποκαταστατών.

Το σημείο I είναι υπεύθυνο για την δέσμευση ποικιλίας φαρμάκων στις HSA και BSA με ενδιάμεση ή μη καλά προσδιορισμένη ισχύς δέσμευσης. Μερικά σημαντικά φάρμακα που προσδένονται εκεί είναι τα thyroxine, warfarin, sylfinamide, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF), oxyphenbutazone, phenylbutazone, azapropazone, indomethacine, iophenoic acid, triiodobenzoic acid, AZT (3'-azide-3'-deoxythymidine), 3,5-diidosalicylic acid και iodipamide.

- Sudlow σημείο II

Είναι το κύριο σημείο δέσμευσης των φαρμάκων. Βρίσκεται σε μια υδροφοβική τσέπη και δεσμεύει ισχυρά μικρούς αρωματικούς υποκαταστάτες που είναι ουδέτεροι ή αρνητικά φορτισμένοι στην περιφέρειά τους. Τέτοιοι υποκαταστάτες είναι η L-τροπτοφάνη, η ιβουπροφένη (ibuprofen), η διαζεπάμη (diazepam), το naroxen, και λιπαρά οξέα με αλυσίδα μεσαίου μεγέθους. Σε σύγκριση με τα άλλα σημεία δέσμευσης, το II συμπεριφέρεται ως το πιο ξεκάθαρο στην μελέτη αλληλεπίδρασης μικρών μορίων-πρωτεΐνης. Αυτό γιατί οι ουσίες που αλληλεπιδρούν δεσμεύονται σφιχτά και είναι συγκεκριμένες, δίνοντα σίγουρα παραδείγματα ανταγωνιστικής δράσης.

Έχουν γίνει αναλυτικές έρευνες για την μελέτη του σημείου πρόσδεσης φαρμάκων Sudlow II. Το σημείο αυτό είναι μικρότερο του σημείου I. Αποτελείται από μια υδροφοβική κοιλότητα 16 Å βάθους και 8 Å πλάτους με ένα πολικό σημείο (κατιοντικό) στην είσοδο της κοιλότητας που δημιουργείται από τα αμινοξέα Tyr411 και Arg410.

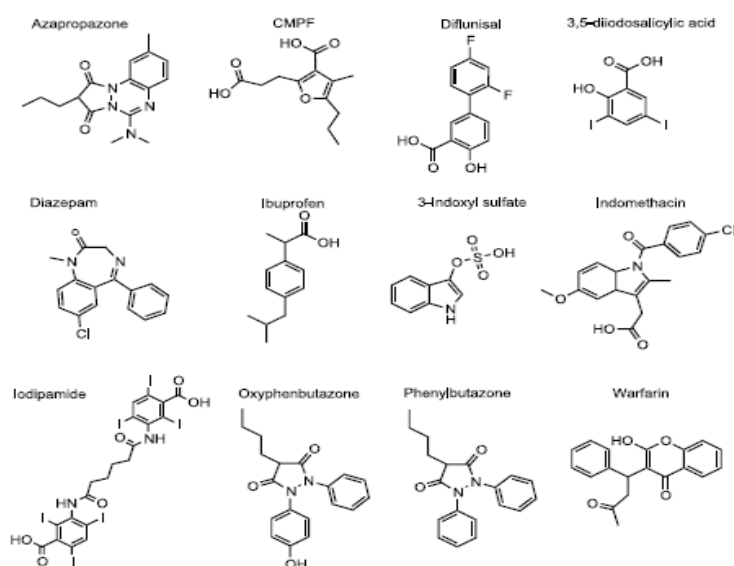
Αυτό το χαρακτηριστικό συνάδει με τις δομές των φαρμάκων που αλληλεπιδρούν στο σημείο και είναι συνήθως αρωματικά καρβοξυλικά οξέα με μεγάλο υδροφοβο κομμάτι και αρνητικά φορτισμένη όξινη ομάδα. Τα diflunisal, διαζεπαμίνη (Diazepam) και ιβουπροφαίνη (ibuprofen) είναι φάρμακα που αλληλεπιδρούν με την υδροξυλική ομάδα της τυροσίνης 411. Η Αργινίνη 410 και η σερίνη 489 συμβάλλουν σε σχηματισμό γέφυρων άλατος και δεσμών υδρογόνων με το diflunisal και ibuprofen.

Δεν χωρίζεται σε υποσημεία όπως το I και δείχνει στερεοεκλεκτικότητα, ενώ η πρόσδεση επηρεάζεται αρκετά από την δομική τροποποίηση του υποκοταστάτη με μικρότερες ομάδες. Έτσι, δεν είναι τόσο ευέλικτο όσο το I και φαίνεται από το ότι η (R)-ibuprofen δεσμεύεται 2,3 φορές ισχυρότερα από το (S)-εναντιομερές της ή η diazepam δεσμεύεται, ενώ το ανάλογο τη με φθόριο flunitrazepam, όχι. Μπορεί να γίνει δεσμεύση και λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (FA3,4), όπως το diazepam. Παρόλο την μικρή κίνηση των πλευρικών ομάδων του σημείου στην δέσμευση του diazepam οι αλυσίδες των Leu387 και

Leu453 περιστρέφονται αρκετά για να δεχτούν το φαινυλικό κομμάτι του μορίου.

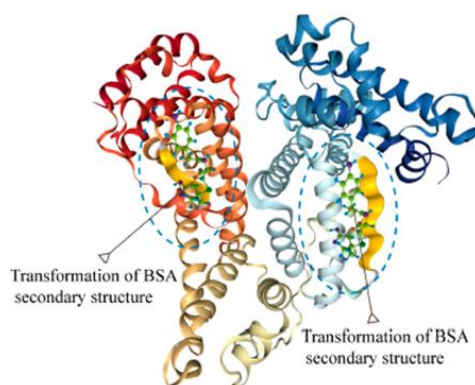
Μερικά από τα φάρμακα που προσδένονται σε αυτό το σημείο είναι τα diazepam, Indoxyl sulphate, ibuprofen, naproxen, etodolac, ketoprofen και diflunisal.

Ανεξάρτητα από το σημείο δέσμευσης των φαρμάκων το κοινό χαρακτηριστικό είναι το υψηλό υδροφοβικό περιεχόμενο που έχουν. Το χαρακτηριστικό αυτό οφείλεται στο ότι κυριαρχούν υδροφοβικά αμινοξέα, συνεπώς και η αλληλεπίδραση σταθεροποιείται με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις.^[104, 105, 109, 114, 122]



Σχήμα 4.8: Φάρμακα που δεσμεύονται στα Sudlow σημεία ^[119]

Η αλληλεπίδραση στα δύο παραπάνω υδροφοβικά σημεία που έχουμε αναφέρει για τις HSA και BSA οδηγούν σε δομικές αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών. Κατά την διάρκεια της πρόσδεσης οι δεσμοί υδρογόνου στην πρωτεΐνη διαταράσσονται κάτι που προφανώς αλλάζει την δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης. Έτσι, μπορεί να καταστρέφονται α-έλικες, ακόμα και να δημιουργούνται β πτυχωτές επιφάνειες (σχήμα 4.11).^[123]



Σχήμα 4.9: Μετατροπή με σχηματισμό β επιφανειών στη δευτεροταγή δομή της BSA μετά από αλληλεπίδραση στα Sudlow sites I,II ^[120]

Αν επεκταθούμε στην BSA θα δούμε ότι τα συγκεκριμένα σημεία μπορούν να δεσμεύουν τις παραπάνω ουσίες με τον ίδιο τρόπο. Τα υδροφοβικά αμινοξέα, όπως στην HSA, βρίσκονται στο βάθος των τσεπών και τα πολικά στο εξωτερικό. Παρόλα αυτά, το σχήμα και η κατανομή του φορτίου που

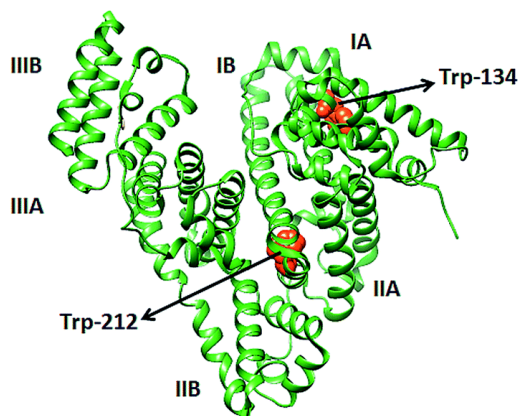
ρυθμίζει την ισχύτητα δέσμευσης υποκαταστατών, είναι γνωστό ότι διαφέρει σε ένα βαθμό. Έτσι, υπάρχουν διαφορές στην αλληλεπίδραση για τα δύο είδη, γι' αυτό και η προσομοίωση της BSA ως μοντέλο για την αλληλεπίδραση στην HSA δεν είναι πάντα 100% ακριβής.^[114, 124]

- Τρυπτοφάνες

Ένα σημείο πρόσδεσης μικρών μορίων είναι και η περιοχή που βρίσκονται οι τρυπτοφάνες. Η Trp 214 στην HSA και 212 στην BSA βρίσκονται σε μια αρκετά υδροφοβική κοιλότητα της υπομονάδας IIA στη (λούπα 4), ενώ η Trp 134 βρίσκεται εξωτερικά σε μια πιο υδροφιλική περιοχή της υπομονάδας IB (λούπα 3).^[114, 125]

Το περιβάλλον της τρυπτοφάνης 214 στην HSA είναι το Lys⁺AlaTrpAlaValAla⁺, κάτι που το κάνει ιδιαίτερα υδροφοβικό. Το ίδιο ισχύει και για τις τρυπτοφάνες της BSA που όμως δεν έχουν θετικό φορτίο προς το C άκρο, έχουν όμως προς το N. Το αντίστοιχο περιβάλλον είναι το TrpSerValAlaGlyAlaSerGlu για την 134 και το TrpGlyPheLeu για την 212, προς το C άκρο. Αυτό το χαρακτηριστικό αυξάνει την αλληλεπίδραση στα συγκεκριμένα σημεία αλκυλικών ανιόντων, ειδικά αν περιέχουν άπολες και ηλεκτραρνητικές περιοχές. Κατόπιν, η υδροφοβικότητα των σημείων μπορεί να ευνοεί και αλληλεπίδραση ουδέτερων αλκυλικών αλυσίδων αν εισέρχονται στις υδροφοβικές κοιλότητες των Trp 214 και 212, κάτι που ανιχνεύεται εύκολα φασματοσκοπικά όπως θα δούμε στην επόμενη παράγραφο.

Η σημασία των τρυπτοφάνων έγκειται στην εύκολη μελέτη της αλληλεπίδρασης στις περιοχές που βρίσκονται και στη δυνατότητα να ξεχωρίσουμε την αλληλεπίδραση στην Trp-212 από αυτή στο σημείο της Trp-134 της BSA που βρίσκεται σε πιο υδρόφιλη περιοχή. Ένα παράδειγμα αποτελεί το φάρμακο για τον θυροειδή 2-mercapto-1-methylimidazole (Methimazole, MMI) που είναι αρκετά λιποφιλικό και εισέρχεται βαθιά στην υδρόφοβη περιοχή της τρυπτοφάνης 212 και 214 (HSA) στην IIA υπομονάδα, και όχι στο πιο υδρόφιλο περιβάλλον τη τρυπτοφάνης 134. Η περίπτωση αυτή ανιχνεύεται εύκολα με σύγκριση των φασμάτων HSA και BSA.



Σχήμα 4.10: Τα σημεία που βρίσκονται οι τρυπτοφάνες στην BSA ^[RSC Advances, 2016. (63)]

Η δυνατότητα αυτή αξιοποιείτε και στην ανίχνευση αλληλεπίδρασης σε γειτονικές περιοχές, όπως όταν μια ένωση αλληλεπιδρά στο σημείο Sudlow I. Αυτό βρίσκεται στην IIA υπομονάδα και επηρεάζει την τρυπτοφάνη 212 (214) που αλληλεπικαλύπτεται με ένα κομμάτι του Sudlow I (στην HSA και BSA), μέσω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και των δομικών αλλαγών που έπονται την αλληλεπίδραση. Έτσι, μπορούμε εύκολα να ανιχνεύσουμε

φασματοσκοπικά την αλληλεπίδραση στο σημείο αυτό. Με τον ίδιο τρόπο αξιοποιούνται και οι τυροσίνες κοντά στο σημείο Sudlow II της IIIA υπομονάδας.^[114, 119, 120, 126]

Κατόπιν, έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία χολικά οξέα που αλληλεπιδρούν με τις τρυπτοφάνες της BSA. Τα κετονικά φαίνεται να αλληλεπιδρούν και με τις δύο τρυπτοφάνες, ενώ τα υδροξυλικά με μια (την πιο υδρόφιλη).^[114, 127]

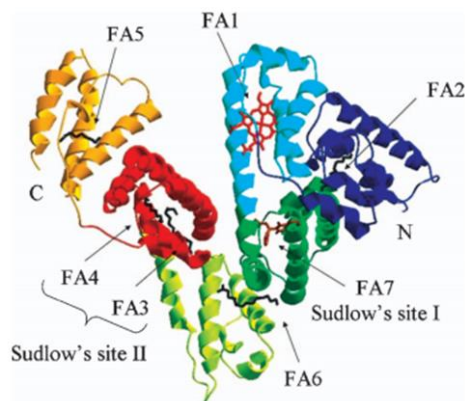
- Σημεία δέσμευσης λιπαρών οξέων (FAs)

Τα λιπαρά οξέα (όπως και τα λιπίδια) είναι αδιάλυτα στο αίμα και μεταφέρονται σχεδόν εξ ολοκλήρου από πρωτεΐνες μεταφορείς, όπως οι αλβουμίνες. Συνεπώς, είναι ιδιαίτερα σημαντικά τα σημεία πρόσδεσής τους.

Η HSA μπορεί να προσδέσει λιπαρά οξέα σε 7 σημεία με διαφορετική ισχύ. Στα FA1-5 τα καρβοξυλικά άκρα είναι ενωμένα με ηλεκτροστατική/πολική αλληλεπίδραση, δημιουργώντας γέφυρα άλατος όπως λέγεται, δηλαδή συνδυασμό δεσμού υδρογόνου και ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Στο FA1 δημιουργείτε γέφυρα άλατος στην αργινίνη 257, πεππίδιο που βρίσκεται στην αλυσίδα μεταξύ της IB-IIA υπομονάδας, ενώ στο FA2 έχουμε δεσμούς υδρογόνου με την τυροσίνη 150 από την IB υπομονάδα, την αργινίνη 257 και την σερίνη 287 από την IIA. Το FA2 βρίσκεται σε μοναδική θέση μεταξύ 3 υπομονάδων IA, IB και IIA. Τα FA3 και 4 είναι σε μια κοιλότητα στην IIIA που βρίσκεται το σημείο πρόσδεσης Sudlow II. Εκεί τα λιπαρά οξέα κάνουν γέφυρα άλατος μεταξύ αργινίνης 348 και 485 και δεσμό υδρογόνου με την σερίνη 342 για το FA3 και στο FA4 δημιουργούνται γέφυρες άλατος στην τυροσίνη 411 και σερίνη 489. Επίπροσθέτως, το FA5 βρίσκεται εντός του IIIB και δημιουργεί γέφυρες άλατος στην τυροσίνη 401 και λυσίνη 525.

Αντίθετα, οι FA6 και 7 θέσεις έχουν μικρότερη ισχύ πρόσδεσης, καθώς ο πολικός δεσμός του άκρου του οξέος με αμινοξύ δεν δημιουργείτε. Η κοιλότητα που είναι το FA7 σημείο είναι εντός του σημείου Sudlow I, όπως και στα FA3 FA4 που αλληλοεπικαλύπτονται με το σημείο Sudlow II. Όλες οι αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούνται με υδροφοβικούς δεσμούς των αλυσίδων. Ένα από τα παραπάνω σημεία (FA2) στην υπομονάδα IB έχει την δυνατότητα να προσδένει fusidic acid (αντιβιοτικό), χολυρεθρύνη (τοξικός μεταβολίτης) και μόρια αίμης χωρίς ανταγωνιστική πρόσδεση με τα δύο πρώτα. Αυτό γιατί τα μόρια αίμης αλληλεπιδρούν με π-π αλληλεπίδραση μεταξύ τυροσινών 138 και 161 και τετραπυρρολικού δακτυλίου της πορφυρίνης σε μια κοιλότητα που παίρνει σχήμα D. Το σιδηρικό κέντρο της αίμης προστατεύεται τις μακριά συνδεόμενες λούπες μεταξύ IA και IB υπομονάδας που δημιουργούν μια σχισμή ανάμεσά τους. Οι άλλες δύο ενώσεις αλληλεπιδρούν με την Arg117 που ανάλογα με την ένωση που θα δεσμευτεί διαμορφώνει την πλευρική της αλυσίδα για να δεχτεί την πολική καρβοξυλική ή ακετυλοξική ομάδα των υποκαταστατών (σε μια κοιλότητα που παίρνει σχήμα L).^[109, 111, 128-130]

Στην BSA τα σημεία πρόσδεσης είναι 7, έχουν μεγάλη ομοιότητα με την HSA και βρίσκονται στις ίδιες περιοχές. Η αλβουμίνη στο αίμα είναι συνήθως ενωμένη με 1-2 λιπαρά οξέα, ενώ πειραματικά μπορεί να ενωθεί μέχρι 6.

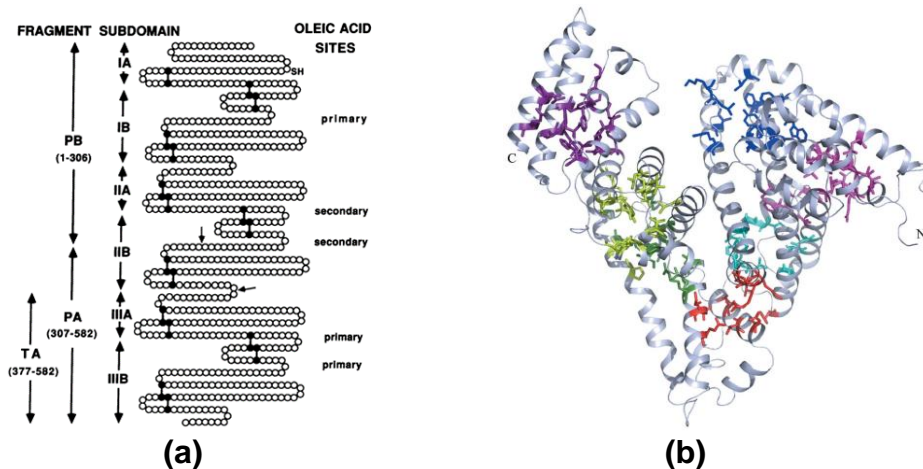


Σχήμα 4.11: Τα σημεία δέσμευσης των λιπαρών οξέων στην HSA ^[127]

Μπορούμε σύμφωνα με την συγγένεια πρόσδεσης (άρα και την ισχύτητα της αλληλεπίδρασης) να τα κατηγοριοποιήσουμε σε τρία πρωτεύον και άλλα δευτερεύον/τριτεύον σημεία πρόσδεσης. Οι λούπες που διπλώνονται οι έλικες είναι ευέλικτες και παρέχουν έναν μηχανισμό ελέγχου των τσεπών αυτών. Τα σημαντικότερα σημεία πρόσδεσης τέτοιων ενώσεων είναι στην III υπομονάδα μεταξύ των αμινοξέων 377-583 (FA3-5) και ιδιαίτερα στην λυσίνη με αριθμό 474 (FA5). Στην περιοχή αυτή, βρίσκονται δύο από τα πρωτεύον σημεία πρόσδεσης των λιπαρών οξέων.

Στις περισσότερες περιπτώσεις δημιουργείτε αμιδικός δεσμός μεταξύ του οξέος και του αμινικού άκρου της λυσίνης ή γέφυρα άλατος με λυσίνη και αργινίνη. Άλλο σημαντικό σημείο πρόσδεσης λιπαρών οξέων είναι η λυσίνη 350 στην BSA και η 116 (FA2) σε μια τσέπη ανάμεσα στις λούπες 2 και 3 (μονάδα I), όπου εκεί έχουμε δευτερεύον πρόσδεση. Το σημείο αυτό βρίσκεται κοντά στην Trp134 (είναι εντός της τσέπης) και ως εκ τούτου ανιχνεύεται εύκολα. Η λυσίνη 350 (FA3) βρίσκεται στην IIB υπομονάδα σε μια υδρόφοβη ελικοειδή τσέπη στην λούπα 6 και βάση κάποιων μελετών μπορεί να θεωρηθεί το ισχυρότερο σημείο πρόσδεσης στην BSA. Στο σχήμα 4.13 φαίνεται η θέση των πρωτεύον και δευτερεύον σημείων πρόσδεσης των λιπαρών οξέων στην BSA.

Λιπαρά οξέα που δεν περιέχουν καρβοξυλικό άκρο όπως είναι το methyl palmitate, διάφορα στεροειδή και λιπίδια προσδένονται πολύ ασθενώς σε διάφορα υδροφοβικά σημεία της πρωτεΐνης που θεωρούνται τριτεύον, δεν έχουν προσδιοριστεί όλα με ακρίβεια και δεν θα μας απασχολήσουν. Παρόλα αυτά, η μεγάλη συγκέντρωση των αλβουμινών στο αίμα τις κάνει να μεταφέρουν ένα μικρό ποσοστό τέτοιων ουσιών, κάτι που είναι σημαντικό για διάφορες διεργασίες. Εξαιρεση αποτελούν τα χολικά οξέα (bile acids) τα οποία προσδένονται ισχυρότερα στις αλβουμίνες δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου (λόγω του υδροξυλίου) με αμινοξέα σε διάφορα σημεία, χωρίς να μας απασχολήσουν.^[104, 109, 114, 129, 131]



Σχήμα 4.12: (a) 5 θέσεις των πρωτεύον και δευτερεύον σημείων δέσμευσης λιπαρών οξέων στην BSA (b) Όλες οι θέσεις στην BSA (φαίνονται με χρώμα) ^[126, 128]

- Κυστεΐνη 34 (Cys34)

Όταν το θείο στην Cys34 είναι πλήρως ελεύθερο, τότε η πρωτεΐνη λέγεται μερκαπταλβουμίνη. Το 70-80 % περιέχει ελεύθερο το θείο στο αίμα. Το υπόλοιπο είναι οξειδωμένο με αμινοξέα ή σε μορφή θειούχων οξέων. Υποκαταστάτες που περιέχουν θείο (π.χ. σουλφονιδρικά άκρα) αλληλεπιδρούν εύκολα με την Κυστεΐνη 34. Η κυστεΐνη 34 βρίσκεται στην υπομονάδα IA μέσα σε μια κοιλότητα στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην δέσμευση φαρμάκων για την HSA και BSA. Η δέσμευση των υποκαταστατών είναι ομοιοπολική.

Ενδεικτικά και κάποια σημαντικά φάρμακα είναι τα παράγωγα του bucillamine (αντιρευματικό), η D-penicillamine που θεραπεύει την τοξικότητα του χρυσού και διώχνει βαρέα μέταλλα από το αίμα, το αντιυπερτασικό captopril, το διουρητικό αιθακρυνικό οξύ, τα αντιρευματικά auranofin και aurothiomalate, το disulfiram για την θεραπεία του χρόνιου αλκοολισμού, το αναλγητικό acetaminophen που μετά τον μεταβολισμό του ενώνεται με την αλβουμίνη με θειοαιθερικό δεσμό, το αντικαρκινικό cisplatin που πιάνεται και σε μεθειονίνες και οι κυτταροτοξικές μουστάρδες αζώτου. Επιπροσθέτως, NO (οξειδωτικό αέριο) που υπάρχει το αίμα από ενδοθηλιακά κύτταρα, πιάνεται στο θείο της αλβουμινη κατα 82 %.^[104, 109, 114]

- Άλλα σημεία δέσμευσης και διάφορες ουσίες

Το σημείο της κυστεΐνης 34 αναφέραμε ότι οξειδώνεται με αμινοξέα όπως άλλα μόρια κυστεΐνης ή γλουταθειόνης. Στο πλάσμα του αίματος περίπου το 30 % του υδροθείου της κυστεΐνης 34 οξειδώνεται με τέτοιο τρόπο. Η παρουσία των κυστεϊνών και γλουταθειονών ενωμένα με την Cys34 επηρεάζουν την σύσταση των αμινοξέων της πρωτεΐνης, δημιουργώντας πολλές φορές σύγχυση. Κατόπιν, ανάλογα με τον τρόπο απομόνωσής της, η αλβουμίνη έχει

την δυνατότητα να διμερίζεται με δισουλφιδικό δεσμό στην Cys34. Η παραπάνω οξειδωση μπλοκάρει την κυστεΐνη ώστε να μην διμερίζεται σε τέτοιες περιπτώσεις. Υπάρχουν και άλλα αμινοξέα ή πεπτιδικές ορμόνες που προσδένονται στις αλβουμίνες με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και ηλεκτροστατικές (αν έχουν ανιοντικό κέντρο). Τέτοιες είναι οι ιντερφερόνες, η μελατονίνη και η corticotropin που πιάνεται στην μονάδα I στα αμινοξέα 1-183.^[104, 132]

Επιπροσθέτως, στο κυκλοφοριακό σύστημα η αλβουμίνη αφομοιώνει γλυκόζη μέσω μιας μη ενζυματικής διαδικασίας. Σε φυσιολογικά άτομα και ζώα ελάχιστο ποσοστό της αλβουμίνης του κυκλοφοριακού συστήματος είναι ενωμένο με γλυκόζη ομοιοπολικά, γι' αυτό και η ίδια δεν είναι γλυκοπρωτεΐνη. Η απουσία υδατάνθρακα χρησιμοποιείται σαν μέθοδο για να καταλάβουμε πόσο καθαρή είναι με διάφορες χρωματομετρικές μεθόδους (η ίδια είναι άχρωμη). Στους διαβητικούς τα ποσοστά αυξάνονται φτάνοντας μέχρι 20 %. Τα σημεία πρόσδεσης γλυκόζης και σακχάρων στις BSA και HSA είναι κυρίως αργινίνες και λυσίνες (όπως K4, R222, R257, R336, R348 και R445 για την HSA) και δημιουργείτε γλυκοζιτικός δεσμός με άζωτά τους.^[104, 114, 133]

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται και πιο εξειδικευμένα σημεία πρόσδεσης κάποιων ουσιών, όπως κατιοντικά φάρμακα (imipramine, chlorpromazine, και quinidine) και πολυμερή ή δενδριμερή. Παράδειγμα είναι το δενδριμερές PAMAM (poly(amidoamine)) G4, όπου βρέθηκαν 6 πιθανά ανιοντικά σημεία πρόσδεσης κατά μήκος των HSA και BSA (IB, IIB, IIIB υπομονάδες) με έντονη παρουσία ασπαρτικού και γλουταμινικού οξέος. Η αλληλεπίδραση είναι ηλεκτροστατική και εκεί μπορούν να προσδεθούν εκτός από κατιοντικά πολυμερή, λιπίδια, αμινοξέα ή κατιοντικά φάρμακα. Ακόμα, το πολυμερές poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) που αλληλεπιδρά με την BSA, με δεσμούς υδρογόνου και υδροφοβες αλληλεπιδράσεις. Επίσης, η κατιοντική οργανική ένωση της λιδοκαΐνης (καλό αναισθητικό) δεσμεύεται με κατιοντική-ππ αλληλεπίδραση με την Arg114, με πολική αλληλεπίδραση με την Lys190 και ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με την Asp187. Η θέση βρίσκεται σε άνοιγμα της τσέπης μεταξύ I, II μονάδας και εκτείνεται κατά μήκος του πίσω μέρους της πρωτεΐνης. Στην δέσμευση συμμετέχουν μόνο αμινοξέα της IB υπομονάδας και δεν σταθεροποιείτε από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, λόγω του θετικού φορτίου. Αυτό βρίσκεται σε αντίθεση με τις περισσότερες ενώσεις που αλληλεπιδρούν με τις SAs, αλλά και με κατιοντικές αλειφατικές ενώσεις οι οποίες εισέρχονται σε υδροφοβικές κοιλότητες με το πολικό σημείο να βρίσκεται στο εξωτερικό της πρωτεΐνης, ώστε να σταθεροποιούνται με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις.^[105, 114, 134, 135]

Δεν μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε κάποιο συγκεκριμένο σημείο από τα παραπάνω, παρά μόνο τον τρόπο αλληλεπίδρασης, γι' αυτό και δεν θα επεκταθούμε. Ακόμα, θα αναφέρουμε μόνο την ένωση pyridoxal 5'-phosphate που δεσμεύεται με τις SAs με ομοιοπολικό δεσμό στην λυσίνη 190 για την HSA και στην 221 ή 224 στην BSA και είναι σημαντική γιατί με την βοήθεια

τροποποιήσεων της πριν και μετά την πρόσδεσή, αποτελεί έναν σημαντικό τρόπο μεταφοράς της βιταμίνη B6.^[114]

Δεν λείπουν, βέβαια ως μόρια αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες οι χημικοί μετουσιωτές που διασπούν δεσμούς υδρογόνου ή δεσμούς μεταξύ αμινοξέων, διαταράσσουν υδροφοβικές και Van der Waals αλληλεπιδράσεις και καταστρέφουν την δομή της πρωτεΐνης (π.χ. χαστροπικά αντιδραστήρια όπως γουανιδίνη και διασπαστές πεπτιδικής αλυσίδας όπως θρυψίνη).^[12, 136]

Τέλος, το υψηλό υδροφοβικό περιεχόμενο (υδρόφοβες ομάδες) είναι κοινό χαρακτηριστικό στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη, ανεξάρτητα του σημείου δέσμευσης, όλων σχεδόν των μικρών μορίων (με εξαίρεση μεταλλικά ιόντα και πολύ ασθενείς αλληλεπιδράσεις). Το χαρακτηριστικό αυτό είναι ιδιαίτερης σημασίας (κάτι που φαίνεται και από τον τεράστιο όγκο βιβλιογραφίας που αφορά την μελέτη αλληλεπίδρασης μορίων με τις SA) για την ανάπτυξη φαρμάκων που σε πολλές περιπτώσεις είναι αδιάλυτα στο νερό, όπως πολλά μεταλλικά σύμπλοκα.^[104, 114]

4.3.1 Μεταλλικά σύμπλοκα και ιόντα

Η βιοανόργανη χημεία τα τελευταία χρονιά έχει δείξει ότι ο αριθμός των ανόργανων συμπλόκων που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες δεν είναι μικρός και η ενδεχόμενη θεραπευτική δράση τέτοιων συμπλόκων είναι σημαντική. Έτσι, έχει μελετηθεί η αλληλεπίδραση με αλβουμίνες, πλήθους συμπλόκων του Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pt^{2+} που έχουν ισχυρή φαρμακευτική δράση.

Η δέσμευση των μεταλλικών συμπλόκων έχει παρατηρηθεί ότι είναι αρκετά ειδική στο σημείο της εξωτερικής τρυπτοφάνης 134 (φαίνεται φασματοσκοπικά) που βρίσκεται στην επιφάνεια και είναι πιο εύκολα προσιτή. Έχει αναφερθεί επίσης από ερευνητές ότι το σημείο προτίμησης αλληλεπίδρασης συμπλόκου-HSA και BSA είναι το Sudlow I της υπομονάδας IIΑ. Σε κάθε περίπτωση οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις παίζουν και σε αυτήν την περίπτωση τον πιο κρίσιμο ρόλο στην διαδικασία δέσμευσης με την πρωτεΐνη. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων με την BSA κάποιες φορές οδηγεί σε διατάραξη της διαμόρφωσής της και λειτουργία της, επηρεάζοντας δυσουλφιδικούς δεσμούς και οδηγώντας σε μερική καταστροφή των α-ελίκων και ως εκ τούτου ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης ή αλλάζοντας την πολικότητα του περιβάλλοντος (στο οποίο εκτίθενται οι τρυπτοφάνες) ως αποτέλεσμα μοριακών αλληλεπιδράσεων.^[137]

Επιπροσθέτως, μεταλλικά σύμπλοκα είναι πιθανόν να δεσμεύονται στα σημεία πρόσδεσης μεταλλικών ιόντων. Στις αλβουμίνες BSA και HSA υπάρχουν τέσσερα βασικά σημεία πρόσδεσης μετάλλων που διαφέρουν στην εκλεκτικότητα τους. Αυτά είναι τα N-τελικό σημείο (NTS ή ALCUN), η Cys34, το MBS (Multi-Metal Binding Site) που βρίσκεται ανάμεσα στις μονάδες I και II και το σημείο B που δεν έχει προσδιοριστεί επακριβώς.

Το σημείο πρόσδεσης του Cu(II) και του Ni(II) λέγεται ATCUN (amino terminal copper and nickel) και βρίσκεται στα πρώτα 3 αμινοξέα Asp-Ala-His. Είναι το κυριότερο σημείο πρόσδεσης μετάλλων και βρίσκεται και στην HSA και στην BSA. Για αυτήν την αλληλεπίδραση χρησιμοποιούνται το ελεύθερο $-NH_2$ άκρο, η ιστιδίνη στην 3η θέση, και άζωτα αμινοξέων, ενώ σε υδατικό περιβάλλον έχουμε και αξονικό μόριο νερού στη σφαίρα συναρμογής. Στην θέση αυτή προτιμούνται δομικά, μέταλλα που φτιάχνουν τετραγωνική δομή όπως το Ni(II) και Cu(II). Το σύμπλοκο Cu-HSA είναι ιδιαίτερα σταθερό. Οι SAs είναι η κύριες πρωτεΐνες που μεταφέρουν τον χαλκό και το νικέλιο στο αίμα. Λιγότερο ισχυρά σε αυτό το σημείο, προσδένονται τα ιόντα του Mn(II) και Co(II).

Ο ψευδάργυρος ενώνεται σε σημείο που λέγεται MBS (multi-metal binding site) και εκεί προσδένονται κυρίως ο Zn(II) και το Cd(II) και λιγότερο ο χαλκός(II) και το νικέλιο(II). Το σύμπλοκο περιλαμβάνει δύο άζωτα ιμιδαζολικά των ιστιδινών 67 και 247, δύο οξυγόνα από το καρβονύλιο της πλευρικής αλυσίδας Asn 99 και Asp 249 και ένα τρίτο οξυγόνο από ένα νερό στην συναρμογή. Τα άζωτα του ιμιδαζολίου είναι αξονικά στο σύμπλοκο με το μέταλλο και δημιουργείτε τριγωνική διπυραμίδα παραμορφωμένη με πέμπτο υποκαταστάτη το νερό. Σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί μόριο χλωρίου να αντικαταστήσει το νερό. Στο σημείο αυτό πιάνεται συνήθως Zn(II) και Cd(II) και ασθενέστερα Cu(II) και Ni(II).

Μια ιδιαίτερα χρήσιμη για μεταλλικά σύμπλοκα που προσδένονται ως φάρμακα θέση, είναι η Cys34. Η ανθρώπινη αλβουμίνη μεταφέρει πολλά μεταλλοφάρμακα που είναι και καλά αντικαρκινικά. Τα περισσότερα από αυτά που αλληλεπιδρούν καλά με το θείο, προσδένονται στην κυστεΐνη 34 στις BSA και HSA. Τέτοια είναι κυρίως μαλακά μέταλλά όπως Au(I) και Pt(II) και δεν παρουσιάζουν χηλικό φαινόμενο, αλλά ομοιοπολικό δεσμό μετάλλου-θείου. Ο υδράργυρος δεσμεύεται κατά 90% από την αλβουμίνη με τέτοιο δεσμό.

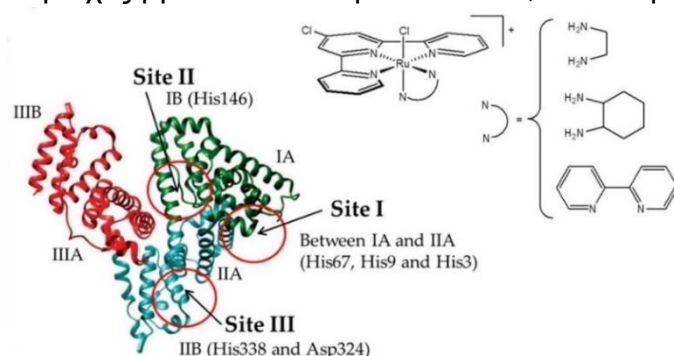
Το σημείο B δεν έχει προσδιοριστεί επακριβώς αλλά φαίνεται να συμπεριλαμβάνει ένα άζωτο στην σύμπλεξη και ενώνεται κυρίως με Cd(II) και Mn(II).

Επίσης, αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι μπορούν να δεσμεύονται εύκολα ιόντα Ca(II) σε 19 σημεία πάνω σε ιμιδαζολικούς δακτυλίους των αμινοξέων. Παρόλα αυτά, η σύνδεση δεν είναι τόσο ισχυρή. Οι θέσεις δέσμευσης του ασβεστίου είναι ανταγωνιστικές με τα ιόντα μαγνησίου και μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία του ενός επηρεάζει την ποσότητα του άλλου στο πλάσμα, άρα και δεσμευμένα στις αλβουμίνες (μεγαλύτερη δέσμευση γίνεται με το ασβέστιο). Άλλα μέταλλα όπως βανάδιο και ο σίδηρος δεσμεύονται τόσο λίγο που δεν έχουν ενδεχόμενη φαρμακευτική δράση.^[114, 137-140]

- Ρουθίνιο

Πολλά σύμπλοκα του ρουθηνίου με αντικαρκινική και αντιβιοτική δράση που αλληλεπιδρούν με την HSA και BSA, αναφέρονται στην βιβλιογραφία. Τα σύμπλοκα του ρουθηνίου(II) προτιμούν τις πλευρικές αλυσίδες της ιστιδίνης αλλά και της ασπαραγίνης. Η καλή αλληλεπίδραση του ρουθηνίου με το άζωτο

φανερώνει αυτή την προτίμηση, αν και με την ασπαραγίνη η σύμπλεξη γίνεται στο οξυγόνο. Ο δεσμός στην ιστιδίνη γίνεται μεταξύ του ρουθηνίου και του ιμιδαζολικού αζώτου και είναι ομοιοπολικός. Στη BSA πολυπυριδιλικά σύμπλοκα του Ru(II) έχουν δείξει να δεσμεύονται στην περιοχή ανάμεσα στην IA και IIA μονάδα και σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου με τα γειτονικά αμινοξέα. Για την θέση δέσμευσης σημαντικό ρόλο παίζει ο χηλικός υποκαταστάτης και η μορφή του συμπλόκου πριν την υδρόλυση του χλωρίου και μετά (λειτουργούν ως προφάρμακα αποβάλλοντας ένα χλώριο). Τέτοια σημεία είναι η ιστιδίνη 146 χαμηλά στην είσοδο της υπομονάδας IB, η ιστιδίνη 338 και η ασπαραγίνη 324 στην περιοχή 324-336 και 338-348. Οι τελευταίες περιοχές βρίσκονται ανάμεσα των IA, IIA υπομονάδων όπως προαναφέραμε.



Σχήμα 4.13: Σημεία αλληλεπίδρασης συμπλόκων ρουθηνίου με την BSA ^[141]

Αυτής της κατηγορίας είναι τα σύμπλοκα $[Ru(Cl-try)(N-N)Cl]Cl$ και πολυπυριδιλικά σύμπλοκα, όπως το σύμπλοκο $[Ru(phen)_3]Cl_2$. Ως θετικά φορτισμένο προσεγγίζει εύκολα το αρνητικά φορτισμένο περιβάλλον της πρωτεΐνης σε pH 7,4 και έπειτα το υδρόφοβο μόριο της phen εισέρχεται σε κοιλότητες κυρίως της IIA υπομονάδας. Τα σημεία δέσμευσης είναι πολλά και η αλληλεπίδραση ασθενώς, κάτι που ευνοεί το φάρμακο γιατί μπορεί να απελευθερώνεται στον επιθυμητό στόχο. Κατόπιν, το ρουθίνιο ως ενδιάμεσης σκληρότητας αλληλεπιδρά με το μόριο της κυστεΐνης. Τέτοιο παράδειγμα είναι το $[Ru(\eta^6-Bip)(en)Cl]^+$. Η αλληλεπίδραση αυτή για το Ru^{2+} και Ru^{3+} εξαρτάται πολύ από την σφαίρα συναρμογής των συμπλόκων, διότι μπορεί να παρεμποδίζεται στερικώς στην υδροφοβική κοιλότητα που βρίσκεται η Cys34.

Έχουν ανιχνευθεί και περιπτώσεις συμπλόκων Ru(II) που αλληλεπιδρούν μόνο με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (συνεισφέρουν δεσμοί υδρογόνου και ηλεκτροστατικές), όπως τα $[Ru(bpy)_2(mal)]^{2+}$ (RBM) και $[Ru(phen)_2(mal)]^{2+}$ (RPM) στην HSA (bpy=2, 2-bipyridine, phen=1,10-phenanthroline, mal=malonyl carboxylate).

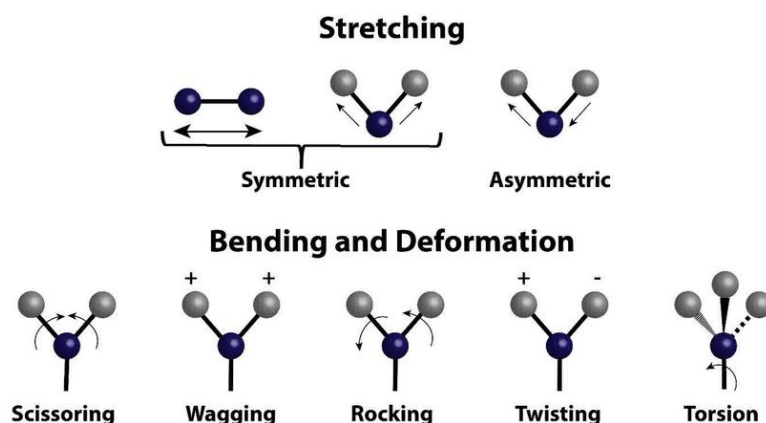
Ακόμα, σύμπλοκα του Ru(III) έχουν δείξει καλή αλληλεπίδραση στο σημείο της υδροφοβικής κοιλότητας της τρυπτοφάνης 214 δημιουργώντας ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ γειτονικών ιστιδινών και στη IIA υπομονάδα με την ιστιδίνη 242. Εκτός του ρουθηνίου σημαντικές είναι και οι αλληλεπιδράσεις των SAs με αντικαρκινικά φάρμακα λευκοχρύσου και χρυσού.^[17, 141-143]

Τέλος, συμπεραίνουμε ότι η μελέτη της αλληλεπίδραση βιοδραστικών συμπλόκων ρουθηνίου με τις SAs έχει ιδιαίτερη σημασία στην ανάπτυξη αντικαρκινικών-αντιβιοτικών φαρμάκων.

Κεφάλαιο 5^ο: Φυσικοχημικές μέθοδοι-τεχνικές και οι βασικές αρχές τους

5.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Infrared Spectroscopy) δίνει πληροφορίες για τις μοριακές ταλαντώσεις που συμβαίνουν σ'ένα μόριο. Η ενέργεια της ακτινοβολίας IR δεν είναι κατάλληλη για να προκαλέσει διέγερση ηλεκτρονίων, όπως στο UV. Είναι όμως κατάλληλη για να ανιχνεύσει δονήσεις δεσμών. Στα πολυατομικά μόρια τα άτομα κινούνται γύρω από τη θέση ισορροπίας τους είτε μέσω δονήσεων τάσης (συμμετρική, ασύμμετρη) είτε μέσω δονήσεων κάμψης (επί του επιπέδου, εκτός επιπέδου). Καταγραφή των διερχομένων ακτινοβολιών σχηματίζει το φάσμα απορρόφησης. Η ένταση μιας ταινίας IR εξαρτάται από τον τύπο της δόνησης και από τη διαφορά ηλεκτραρνητικότητας μεταξύ των ατόμων που συμμετέχουν στο δεσμό. Οι περισσότερες πληροφορίες μπορούν να διεξαχθούν από την περιοχή $1.400-4.000\text{ cm}^{-1}$ σ' ένα φάσμα IR. Από ένα φάσμα IR μπορούν να ληφθούν πληροφορίες για τις λειτουργικές ομάδες μιας ένωσης με τελικό στόχο τον προσδιορισμό της δομής της. Το πιο κοινού τύπου και με αρκετή ακρίβεια φασματόμετρο IR, είναι αυτό μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) που χρησιμοποιεί μια μαθηματική πράξη (μετασχηματισμός Fourier) για να προσδιορίσει τις συχνότητες που διαπέρασαν το δείγμα μετά από την ακτινοβολήση σε όλες τις συχνότητες IR.^[82, 144]



Σχήμα 5.1: Δονήσεις τάσης (ν) και στρέψης (δ)
[http://www.columbia.edu/cu/chemistry/ugrad/hssp/EXP_7.html]

5.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι η ισχυρότερη και με τις πιο ευρείες εφαρμογές μέθοδος για τον προσδιορισμό της δομής μιας ένωσης και των χαρακτηριστικών του δεσμού τους, αλλά και την εύρεση της αλληλεπίδρασης φαρμάκου-DNA. Παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες για την μοριακή δομή της ένωσης και χρησιμοποιείται συνδυαστικά με άλλες

μεθόδους, όπως IR και UV-Vis. Σε ορισμένες περιπτώσεις η δομή της ένωσης μπορεί να χαρακτηριστεί και μόνο με την χρήση της.

Στην πραγματικότητα η φασματοσκοπία NMR είναι ένα σύνολο τεχνικών που εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες αποδιέγερσης του κάθε πυρήνα στις οποίες δεν θα αναφερθούμε διεξοδικά. Βασική αρχή της φασματοσκοπίας είναι η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με έναν πυρήνα εντός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Ένας πυρήνας στο εσωτερικό του περιέχει νετρόνια και πρωτόνια με συγκεκριμένη τιμή του spin (ιδιοπεριστροφή) και στο σύνολό του ο πυρήνας χαρακτηρίζεται από την κβαντομηχανική ιδιότητα του πυρηνικού spin (I). Όταν ο αριθμός των πρωτονίων και/ή ο αριθμός των νετρονίων είναι περιττός (όπως στους ^1H και ^{13}C) το πυρηνικό spin δεν είναι μηδενικό και παρουσιάζει μαγνητική ροπή. Με επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου τα πρωτόνια και νετρόνια προσανατολίζονται ομόρροπα ή αντίρροπα της φοράς του πεδίου, αφού αλληλεπιδρούν με το πεδίο λόγω της μαγνητικής ροπής τους. Δημιουργούν δύο κβαντισμένες ενεργειακές καταστάσεις όπου σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφούν φωτόνια με συχνότητα στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (rf). Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα που είναι χαρακτηριστική των ηλεκτρονίων γύρω από κάθε πυρήνα, δημιουργεί επαγώμενο τοπικό μαγνητικό πεδίο αντιτιθέμενο στο εξωτερικό με αποτέλεσμα το σωματίδιο του πυρήνα να αισθάνεται μικρότερο ολικό πεδίο σε σχέση με το εξωτερικό (προάσπιση). Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να διερευνήσουμε το ηλεκτρονιακό περιβάλλον κάθε ατόμου που παρουσιάζει διαφορετική ΔE των καταστάσεων. Αυτή η διαφορά ενέργειας μας δίνει την πληροφορία στο σήμα NMR.^[86, 144]

Η αποδιέγερση μετά την ακτινοβολήση του δείγματος εντός μαγνητικού πεδίου, στη φασματοσκοπία NMR δεν είναι αυθόρμητη, αλλά εξαναγκασμένη και γίνεται με δύο διεργασίες. Η πρώτη διεργασία ονομάζεται αποδιέγερση σπιν-πλέγμα (χρόνος αποδιέγερσης T_1) και δεύτερη διεργασία, ονομάζεται αποδιέγερση σπιν-σπιν (με χρόνο αποδιέγερσης T_2). Αυτές οι διαδικασίες κατά την αποδιέγερση, συμβαίνουν ταυτόχρονα και σε αυτές βασίζονται όλες οι διαφορετικές τεχνικές στο NMR μίας (1-D) και δύο διαστάσεων (2-D) ^1H -NMR, ^{13}C -NMR. Για παράδειγμα, το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (NOE) δημιουργείται λόγω της αλληλεπίδρασης του πυρήνα με τον χώρο που βρίσκεται, μέρος της διαδικασίας αποδιέγερσης διπόλου διπόλου. Ο μηχανισμός αποδιέγερσης καθορίζεται από την κατεύθυνση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου σε σχέση με το μαγνητικό και έτσι σε κάθε τεχνική διερευνώνται οι διάφορες ιδιότητες του δείγματος. Το φάσμα NMR δυο διαστάσεων, ή φάσμα ομοπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^1H COSY (correlation spectroscopy, COSY) και το φάσμα NOESY βοηθούν στον προσδιορισμό των «γειτονικών» πρωτονίων. Από την άλλη, τα φάσματα ετεροπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) και HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) συσχετίζουν τα πρωτόνια με τους άνθρακες που παρουσιάζουν σύζευξη κατά μήκος ενός απλού δεσμού

και είναι ιδανικά για την μελέτη ενώσεων που δίνουν πολύπλοκα φάσματα, με κορυφές πολύ κοντά η μία στην άλλη. Τέλος, το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) συσχετίζει τα πρωτόνια με τους άνθρακες που παρουσιάζουν σύζευξη κατά μήκος δύο ή τριών χημικών δεσμών.^[145]

Αν αναφερθούμε στα χαρακτηριστικά του σήματος αυτά είναι η θέση του σήματος που υποδεικνύει το ηλεκτρονιακό περιβάλλον του πρωτονίου (ή άνθρακα) που προκαλεί το σήμα, το εμβαδό ολοκληρώνοντας την κορυφή στο σήμα που μας δίνει τον αριθμό των πυρήνων που προκαλούν το σήμα (χρήσιμο μόνο σε NMR πρωτονίου) και η μορφή του σήματος που παρέχει πληροφορίες για γειτονικούς ίδιου πυρήνες (χρήσιμο επίσης σε ^1H -NMR). Τέλος, μπορεί να προσδιοριστεί ο χρόνος χαλάρωσης του κάθε πυρήνα (0.1 έως 10 s) για πιο σύνθετες μελέτες (π.χ. τετραπολική αλληλεπίδραση).^[144, 145]

5.3 Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Στην φασματοσκοπία UV-Visible έχουμε απορρόφηση της ακτινοβολίας με μήκος κύματος περίπου 200 – 900 nm, δηλαδή στην περιοχή του υπεριώδους και του ορατού (και σε κοντινές περιοχές όπως η near-IR και near-UV) στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Η ενέργεια των φωτονίων αυτών, αντιστοιχεί σε ηλεκτρονιακή μετάπτωση ενός μορίου. Με όμοιο τρόπο που περιγράψαμε τις δονητικές καταστάσεις σε ένα χημικό μόριο, περιγράφουμε και τις ενεργειακές καταστάσεις των ηλεκτρονίων σε ένα μόριο. Η ενέργεια των ηλεκτρονίων στα μοριακά τροχιακά του μορίου είναι κβαντισμένη και η διαφορά ενέργειας των καταστάσεων αντιστοιχεί σε φωτόνιο της περιοχής UV-Vis. Μόρια που περιέχουν π-ηλεκτρόνια ή μη-δεσμικά ηλεκτρόνια απορροφούν ενέργεια στην περιοχή του υπεριώδους ή του ορατού φωτός για να διεγείρουν αυτά τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερα αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά. Έτσι, μιλάμε για διεγέρσεις ηλεκτρονίων μεταξύ μοριακών τροχιακών με σημαντικότερες τις $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $\sigma \rightarrow \sigma^*$, και $n \rightarrow \sigma^*$ μεταπτώσεις. Στα μεταλλικά σύμπλοκα οι μεταπτώσεις αυτές μπορεί να οφείλονται σε μεταπτώσεις MOs του υποκαταστάτη ή σε MOs μεταξύ μετάλλου και υποκαταστάτη δίνοντας τις ταινίες μεταφορά φορτίου MLCT και LMCT. Κατόπιν, στα σύμπλοκα μπορούμε να παρατηρήσουμε στο φάσμα και d-d μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων του μεταλλικού κέντρου αν και είναι απαγορευμένες (μικρή πιθανότητα πραγματοποίησης), λόγω ενός μηχανισμού δονητικής σύζευξης. Οι μεταπτώσεις στο ορατό είναι υπεύθυνες για το χρώμα της κάθε ουσίας. Στο κοινό φασματοφωτόμετρο UV-Vis, το δείγμα ακτινοβολείται με ακτινοβολία μήκους κύματος 200 - 800 nm. Ακτινοβολείται, επίσης ο διαλύτης που περιέχει το δείγμα. Τελικά, δίνεται το φάσμα απορρόφησης (απορρόφηση/μήκος κύματος), όπου $A = \log(I_0/I)$ με I_0 ένταση της baseline και I του δείγματος. Σύμφωνα με τον νόμο Lambert-Beer $\epsilon = A/C \cdot L$ (A απορρόφηση, C συγκέντρωση και ϵ μοριακή απορροφητικότητα) και μας δίνεται η δυνατότητα υπολογισμού

της συγκέντρωσης της ουσίας ή της μοριακής απορροφητικότητας ϵ , φυσική σταθερά χαρακτηριστική για κάθε ένωση.^[41, 144, 146]

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι, που ανιχνεύουν τις ηλεκτρονικές μεταπτώσεις μπορούν να παρέχουν λεπτομερείς πληροφορίες για τις ηλεκτρονικές και μαγνητικές ιδιότητες τόσο του μεταλλικού ιόντος όσο και των υποκαταστατών. Οι εφαρμογές της φασματοσκοπίας UV-Vis είναι πολλές και διακρίνονται σε αναλυτικές και δομικές. Οι αναλυτικές εφαρμογές περιλαμβάνουν:

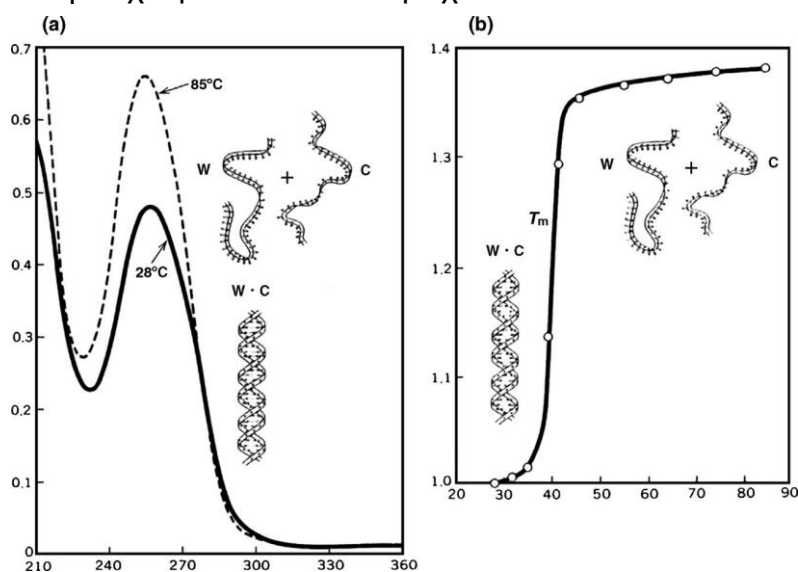
- Φωτομετρικό ποσοτικό προσδιορισμό
- Προσδιορισμό του πλήθους των συστατικών-απορροφητών σε συστήματα με πολλά συστατικά
- Προσδιορισμό των σταθερών ισορροπίας συστημάτων με πολλά συστατικά
- Φωτομετρική κινητική μελέτη

Οι δομικές εφαρμογές περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό στοιχείων της δομής του απορροφητή μέσω της ερμηνείας φασμάτων. Η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους είναι πολύτιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό της δομής των μεταλλικών συμπλόκων. Με τη μέθοδο UV-Vis μπορούν να προσδιοριστούν τα ακόλουθα: 1) με ποιο/α άτομο/α συμπλέκεται το μέταλλο μελετώντας τις κορυφές που μετατοπίζονται κατά τη σύμπλεξη και την ένταση των κορυφών, 2) τη στοιχειομετρία του συμπλόκου εφαρμόζοντας τη μέθοδο συνεχών μεταβολών Job, 3) τη σταθερά σχηματισμού και την εξαγωγή θερμοδυναμικών μεγεθών του συμπλόκου, 4) σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των μεταλλικών συμπλόκων με το DNA (τιτλοδότηση, καμπύλες θερμικής μετουσίωσης του DNA, μεταβολές του φάσματος DNA).^[82]

Το τυπικό φάσμα UV-Vis του διαλύματος B-DNA έχει μια κορυφή απορρόφησης με μέγιστο στα 258,5 nm και ελάχιστο στα 231 nm. Η κορυφή αυτή αποδίδεται σε $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεις των αζωτούχων βάσεων. Ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας είναι περίπου $6600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Οι μεταβολές της κορυφής μας δίνουν πληροφορίες για τις δομικές αλλαγές που επάγονται της αλληλεπίδρασης του DNA με διάφορα μόρια. Όταν οι αζωτούχες βάσεις βρίσκονται κοντά μεταξύ τους στο δίκλωνο μόριο, η κορυφή έχει μικρότερο συντελεστή ϵ σε σχέση με την μονόκλωνη αλυσίδα, λόγω της αλληλεπίδρασης των π ηλεκτρονίων των βάσεων που στοιβάζονται στη δίκλωνη αλυσίδα. Έτσι, όταν αυξάνεται η απόσταση των βάσεων μειώνεται η ένταση της κορυφής, φαινόμενο που λέγεται υποχρωμισμός και υποδηλώνει παρεμβολή. Το αντίθετο υποδηλώνει καταστροφή δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων και καλείται υπερχρωμισμός, ενώ η μετατόπιση της κορυφής (βαθυχρωμία ή υψιχρωμία) υποδηλώνει σταθεροποίηση και αποσταθεροποίηση της έλικας αντίστοιχα.^[70, 86, 147]

5.3.1 T_m ανάλυση (Θερμική μετουσίωση του DNA)

Ακολουθώντας τις αλλαγές στην ένταση της κορυφής του DNA μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα και για την δράση ενζύμων και για την έκταση της αλληλεπίδρασης ενός φαρμάκου με το DNA. Μια μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η συνεχής παρατήρηση της αλλαγής της έντασης της κορυφής, αυξάνοντας την θερμοκρασία του διαλύματος καθώς η κορυφή είναι οξεία σε μεγάλο εύρος θερμοκρασίας και μπορούμε να την παρατηρήσουμε. Κατασκευάζεται η καμπύλη απορρόφησης στα 258,5 nm σε συνάρτηση με την θερμοκρασία, και λέγεται καμπύλη τήξης (melting curve) του DNA, αφού αυτό χωρίζεται σε δύο μονόκλινα μόρια με αύξηση της θερμοκρασίας. Το 'ισοδύναμο σημείο' στην καμπύλη λέγεται θερμοκρασία τήξης T_m και η μεταβολή του για κάθε δείγμα είναι αυτή που μας δίνει της ζητούμενες πληροφορίες. Φυσιολογικά, το διάλυμα του DNA έχει T_m από 60-100 °C ανάλογα την αλληλουχία βάσεων που περιέχει.^[86]



Σχήμα 5.2: (α) Αύξηση της έντασης της κορυφής του DNA με την θερμοκρασία
(β) Καμπύλη τήξης (melting curve) ^[84]

5.4 Ιξωδομετρία

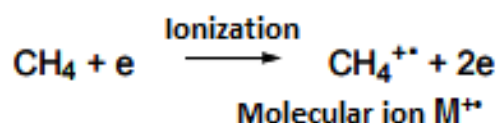
Το ιξώδες ενός ρευστού (στη Φυσικοχημεία) είναι ένα μέτρο της αντίστασης που αυτό παρουσιάζει στη σταδιακή παραμόρφωσή του μετά από διατμητική ή εντατική τάση, που εκφράζεται επίσης και με την αντίσταση που προβάλλει κατά τη ροή του. Το μέλι για παράδειγμα, παρουσιάζει υψηλό ιξώδες. Η ιδιότητα του ιξώδους για τα υγρά εξετάζεται ιδιαίτερα από την υδροδυναμική και το ιξώδες μετριέται με ειδικό όργανο που λέγεται ιξωδόμετρο (στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το ιξωδόμετρο Ostwald).

Η ιξωδομετρία είναι μια υδροδυναμική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους νουκλεϊκών οξέων, τη μελέτη επιδράσεων των διαλυτών στη μεγάλο μήκους δομή και διαμόρφωσή τους, καθώς και την ακαμψία τους. Επιπροσθέτως, είναι βασικό εργαλείο για την μελέτη

αλληλεπιδράσεων του DNA με μικρά μόρια. Αυτό γιατί το μήκος του DNA (L^3) είναι ευθέως ανάλογο με το ιξώδες του διαλύματός του (για παράδειγμα η ενδοπαρεμβολή που προκαλεί αύξηση του περιμετρικού μήκους του νουκλεϊκού οξέος αυξάνει το ιξώδες και η συναρμογή στις αύλακες που λυγίζει (κάμπτει) το DNA προκαλεί μικρή μείωση).^[148-150]

5.5 Φασματομετρία μάζας (MS)

Σε αντίθεση με τις φασματοσκοπίες, η φασματομετρία μάζας είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της ύλης και μιας πηγής ενέργειας διαφορετικής της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Σε αυτήν την μέθοδο μια ένωση αρχικά εξατμίζεται και στη συνέχεια με την χρήση μιας τεχνικής ιοντισμού, μετατρέπεται σε ιόντα που διαχωρίζονται και ανιχνεύονται. Συνήθως βομβαρδίζεται με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας (ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, EI) και από την σύγκρουση ένωσης-ηλεκτρονίου, παράγεται ένα ενδιάμεσο μόριο που είναι συγχρόνως και ρίζα και κατιόν, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Η μάζα αυτού του μορίου είναι ισοδύναμη με αυτή του αρχικού μορίου λόγω της αμελητέας μάζας του ηλεκτρονίου που χάνεται, γι' αυτό και καλείται μητρικό ή μοριακό ιόν (M^+).



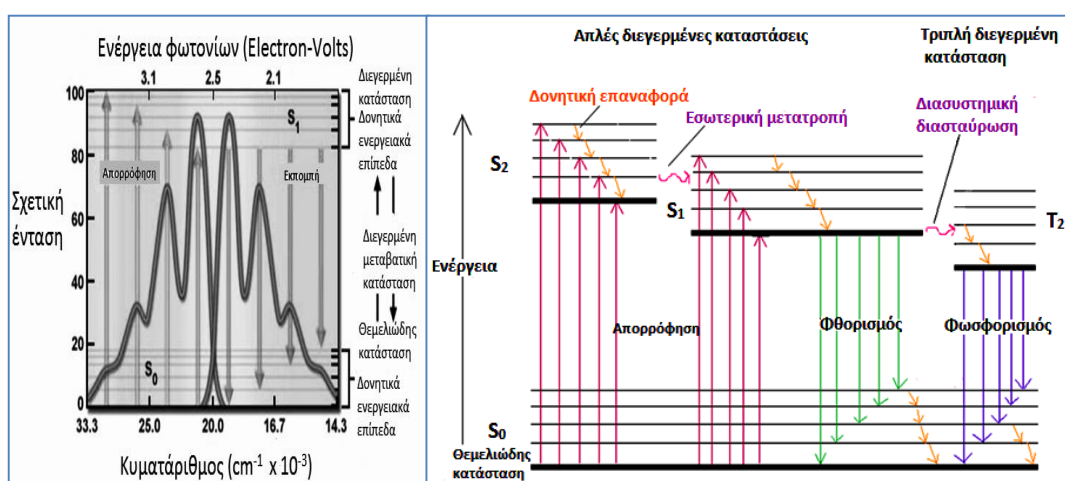
Σχήμα 5.3: Ιοντισμός και παραγωγή του μητρικού ιόντος για το μεθάνιο ^[142]

Το μητρικό ιόν είναι συχνά πολύ ασταθές και θραυσματοποιείται σε δύο διακριτά θραύσματα (μια ρίζα και ένα κατιόν). Αυτά στη συνέχεια μπορεί να ξαναθραυσματοποιηθούν (CH_3^+ , CH_2^+ κλπ, για το μεθάνιο). Τελικά, τα ιόντα που προκύπτουν επιταχύνονται και οδηγούνται σε μαγνητικό πεδίο, όπου εκτρέπονται ακολουθώντας καμπύλες διαδρομές και ανιχνεύονται. Αυτό συμβαίνει μόνο στα φορτισμένα θραύσματα (μητρικό ιόν και κατιόντα) και ανάλογα με το μέγεθος και το φορτίο, εκτρέπονται με διαφορετικό τρόπο. Στην ουσία διαχωρίζονται ανάλογα με τον λόγο μάζας/ φορτίου (m/z) του κάθε ιόντος. Το φάσμα μάζας που προκύπτει μας δείχνει την σχετική αφθονία του κάθε ιόντος που ανιχνεύθηκε και επειδή συνήθως το φορτίο του ιόντος είναι +1 (στις οργανικές ενώσεις), αυτό που μετριέται είναι η μάζα του κατιόντος. Το σταθερότερο κατιόν (όχι πάντα το μητρικό) έχει την μεγαλύτερη αφθονία άρα και υψηλότερη κορυφή στο φάσμα, η οποία λέγεται βασική κορυφή. Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και μοριακού τύπου μιας ένωσης.^[144]

5.6 Φθορισμομετρία (Fluorescence)

Ο φθορισμός και ο φωσφορισμός αποτελούν ειδικές κατηγορίες της φωταύγειας. Κατά τη διέγερση απορροφάται ένα φωτόνιο, και τα απορροφούμενα είδη μεταπίπτουν σε μια ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση. Η εκπομπή των φωτονίων συνοδεύει την αποδιέγερση και καλείται φωτοφωταύγεια (φθορισμός, φωσφορισμός), και αποτελεί το πιο πιθανό φυσικό φαινόμενο κατά την αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη. Ο φθορισμός συμβαίνει όταν η μετάπτωση στη θεμελιώδη κατάσταση πραγματοποιείται από διεγερμένη απλή κατάσταση ενώ όταν η αποδιέγερση πραγματοποιείται από διεγερμένη τριπλή κατάσταση συμβαίνει φωσφορισμός. Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος φθορισμού λαμβάνεται το φάσμα διέγερσης (excitation) και το φάσμα εκπομπής (emission). Με τη βοήθεια φασμάτων φθορισμού μπορεί να προσδιορισθεί για παράδειγμα, η σταθερά σπόςβεσης Stern-Volmer (K_{sv}), να προσδιορισθεί πώς επιδρά το μέταλλο στο φθορισμό του υποκαταστάτη (π.χ. μείωση του φθορισμού του υποκαταστάτη κατά τη σύμπλεξη με το μέταλλο, quenching), να προσδιορισθεί η σταθερά σχηματισμού συμπλόκων και η σταθερά σύνδεσης μικρών μορίων με το DNA, καθώς επίσης αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την εξαγωγή πληροφοριών για τον τρόπο αλληλεπίδρασης μεταλλικών συμπλόκων με το DNA.^[70, 151-153]

Οι αζωτούχες βάσεις του DNA φθορίζουν έντονα επιτρέποντας έτσι τον σχεδιασμό και την μελέτη βιοχημικών και βιοφυσικών πειραμάτων που περιλαμβάνουν το DNA. Προσδιορίζονται τρόποι αλληλεπίδρασης του DNA με πρωτεΐνες και φάρμακα, συνήθως μελετώντας την ανταγωνιστική δράση τους με ενώσεις που συνδέονται στο DNA με γνωστό τρόπο. Τέτοιο παράδειγμα είναι ο ήδη γνωστός από το αντίστοιχο κεφάλαιο, ενδοπαρεμβολέας ethidium bromide (EtBr).



Σχήμα 5.4: Αριστερά : Διέγερση και εκπομπή. Δεξιά : Οι μηχανισμοί με τους οποίους πραγματοποιείται η φωταύγεια ^[150]

Το αιθίδιο βρωμίδιο συνδέεται στο DNA με κλασική παρεμβολή ανάμεσα σε δύο βάσεις και χρησιμοποιείται ως ένωση αναφοράς. Μελετάται το φάσμα φθορισμού του συμπλόκου EB-DNA και οι αλλαγές που λαμβάνουν χώρα με

προσθήκη του φαρμάκου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Αυτό συμβαίνει γιατί το EB σε διάλυμα δεν φθορίζει έντονα, ενώ το σύμπλοκο EB-DNA παρουσιάζει έντονα αυξημένο φθορισμό στα 592 nm. Έτσι, η ελάττωση της κορυφής με την προσθήκη του φαρμάκου αποκαλύπτει τον ανταγωνισμό φαρμάκου και EB στη σύνδεσή τους με το DNA και είναι ενδεικτικό αντικατάστασης του EB στο σύμπλοκο EB-DNA από το φάρμακο, πιθανόν στην ίδια θέση σύνδεσης (κλασσική παρεμβολή). Η αμελητέα ελάττωση δεν δείχνει αντικατάσταση και έχει παρατηρηθεί κυρίως σε φάρμακα που δεν είναι παρεμβολείς. Τέτοιες ανταγωνιστικές μελέτες προϋποθέτουν ένωση με παραπλήσια σταθερά σύνδεσης με την ένωση αναφοράς και η οποία δεν απορροφά στην περιοχή του συμπλόκου DNA-ένωση αναφοράς, για αξιόπιστα αποτελέσματα.

Τέλος, με την χρήση τεχνικών φθορισμού όπως ο φθορισμός μεταφοράς ενέργειας επαφής, μπορούμε να διακρίνουμε την ενδοπαρεμβολή από την συναρμογή στις αύλακες (FCET : fluorescence contact energy transfer).^[70, 86, 148]

5.7 Κυκλικός Διχρωϊσμός (CD)

Η τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού μετράει τις διαφορές στην απορρόφηση του αριστερόστροφου - δεξιόστροφου κυκλικά πολωμένου φωτός και είναι μια από τις πλέον ενδεδειγμένες μεθόδους για την μελέτη της ασυμμετρίας του συστήματος.^[154]

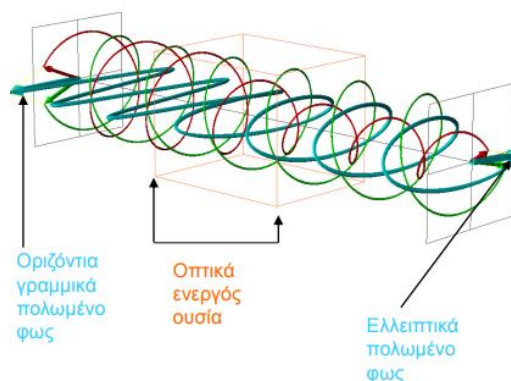
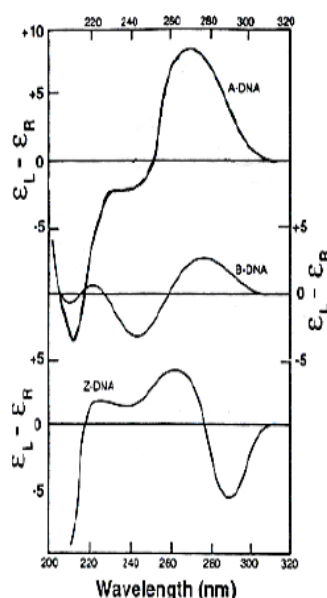
Για να παράγουμε κυκλικά πολωμένο φως πρέπει να έχουμε δύο κύματα φωτός ίδιου πλάτους A, με τα ηλεκτρικά πεδία τους E_0 κάθετα μεταξύ τους και με κάποιο τρόπο να καθυστερήσουμε την δίοδο (κίνηση) του ενός κύματος μέσω ενός υλικού κατά χρόνο dt ίσο με το $\frac{1}{4}$ της περιόδου T του κύματος, δηλαδή να έχουν διαφορά φάσης ($\Delta\phi$) 90° ή -90° . Έτσι, δημιουργείται αριστερόστροφη και δεξιόστροφη πόλωση όπως φαίνεται στο σχήμα.

Το βασικότερο σημείο που μας ενδιαφέρει είναι ότι η σύνθεση δεξιόστροφα και αριστερόστροφα πολωμένου φωτός με τα ίδια πλάτη οδηγεί σε γραμμικά πολωμένο φως το οποίο όταν διέρχεται από ένα μέσο διάδοσης όπως τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες, εμφανίζει διαφορετικές απορροφήσεις για το δεξιόστροφα (A_R) και το αριστερόστροφα (A_L) πολωμένο φως και μετατρέπεται σε ελλειπτικά πολωμένο φως.

Η διαφορετική απορρόφηση του αριστερόστροφου και του δεξιόστροφου πολωμένου φωτός (λόγω διαφορετικού συντελεστή απόσβεσης ϵ_{Left} και ϵ_{Right}) καλείται κυκλικός διχρωϊσμός. Το μόριο του DNA έχει ελικοειδή μορφή και όπως έχει αναφερθεί οι βάσεις απορροφούν UV-Vis ακτινοβολία. Αυτή η μορφή και το χειρόμορφο κέντρο άνθρακα C1 είναι υπεύθυνα για τον διχρωϊσμό που παρουσιάζει το μόριο του DNA. Οι διαφορετικές απορροφήσεις του φωτός (που στο φάσμα UV-Vis παρουσιάζουν μια κορυφή) φαίνονται στο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (θετικές ή αρνητικές ανάλογα με την απορρόφηση, κάτι που καλείται φαινόμενο Cotton), όπου το στοίβαγμα των αρωματικών βάσεων επηρεάζει άμεσα τη μορφή των φασμάτων CD. Συμπερασματικά, το φάσμα CD

των νουκλειικών οξέων γενικά, αντανακλά τις σχετικές θέσεις και τον προσανατολισμό των χρωμοφώρων (αζωτούχες βάσεις) στο μακρομόριο.^[151, 154]

Συνεπώς, από το φάσμα CD μπορεί να γίνει διαχωρισμός των διαφορετικών διαμορφώσεων του DNA (κάτι που δεν γίνεται με UV-Vis) και να γίνουν αντιληπτές οι δομικές αλλαγές που επιφέρουν στα δομικά χαρακτηριστικά του DNA (άρα και στις αζωτούχες βάσεις), άλλα μικρά μόρια. Στο φάσμα CD του B-DNA έχουμε μέγιστη θετική κορυφή που οφείλεται σε απορρόφηση δεξιόστροφου φωτός στα περίπου 270 nm, αρνητική στα 210 nm και μηδέν απορρόφηση στα 258 όπου είναι η μέγιστη κορυφή στο UV-Vis (άθροισμα αυτών των απορροφήσεων). Έτσι, κατά τη συναρμογή μέσω παρεμβολής παρατηρείται αύξηση των δύο ταινιών του DNA (σταθεροποίηση B-διαμόρφωσης), κατά την συναρμογή σε αύλακες και ηλεκτροστατική σύνδεση δεν παρουσιάζεται σημαντική μεταβολή, ενώ μετατόπισης θετικής ταινίας προς τα δεξιά υποδηλώνει μεταβολή στην A έλικας σε B.



Σχήμα 5.5: Αριστερά : φάσματα CD του A-, B-, Z- DNA (από πάνω προς τα κάτω αντίστοιχα)

Δεξιά : Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού που δίνει ελλειπτικά πολωμένος φως ^[152, Chem. Biol. Drug Des., 2009. 74: p. 101–120]

Τέλος, είναι γνωστό ότι σύνδεση ενός μη χειρόμορφου μορίου με ένα χειρόμορφο μόριο, το καθιστά τελικά οπτικά ενεργό (δηλαδή παρουσιάζει φαινόμενο Cotton, θετικό ή αρνητικό) και ανιχνεύσιμο με την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού, ενώ μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τον τρόπο σύνδεσης του μορίου. Το φαινόμενο αυτό λέγεται εξ επαγωγής κυκλικός διχρωϊσμός (Induced Circular Dichroism, ICD) και είναι βασικό την μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA με την τεχνική του CD.^[70, 154, 155]

5.8 Μέθοδοι ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης μικρών μορίων με την BSA

Οι φασματοσκοπικές ιδιότητες της BSA διαφέρουν με αυτές τις HSA, κυρίως λόγω της παρουσίας της δεύτερης τρυπτοφάνης που υπάρχει σε αυτήν.

Η τρυπτοφάνη φθορίζει έντονα και απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στο UV-Vis. Έτσι, η σύγκριση των φασμάτων των δύο πρωτεϊνών δεν είναι τόσο εύκολη. Παρόλα αυτά, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης δεν διαφέρουν από αυτές από ήδη αναφέραμε και για το DNA. Στην βιβλιογραφία μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων που μελετά την αλληλεπίδραση της BSA με διάφορες ουσίες, όπως φάρμακα, λιπαρά οξέα και μεταλλικά σύμπλοκα χρησιμοποιεί την φασματοσκοπία UV-Vis, φθορισμομετρικές τεχνικές (3D φθορισμομετρία, σύγχρονη φθορισμομετρία και άλλα), φασματοσκοπία FT-IR σε διάλυμα, φάσμα κυκλικού διχρωισμού, αλλά και φασματοσκοπία NMR. Χαρακτηριστική είναι και η μελέτη της αλληλεπίδρασης με ιξωδομετρία καθώς οι διαμορφωτικές αλλαγές μεταξύ των υπομονάδων στο μόριο, λόγω της ευλυγισίας που προκύπτει από την έλλειψη δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ τους, αυξάνουν την τιμή του ανάλογα με το εύρος της αλληλεπίδρασης. Δεν λείπουν βέβαια και οι μελέτες ανταγωνιστικής δράσης με ουσίες που έχουν γνωστή αλληλεπίδραση όπως οι warfarin, phenylbutazone, dansylamide και iodipamide για το σημείο I και οι ibuprofen, flufenamic acid και diazepam για το σημείο II. Αυτές λέγονται σημειωτές πρόσδεσης (site markers).^[22, 156-161]

Κατόπιν, αξίζει να αναφέρουμε κάποια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της BSA. Τα αμινοξέα που φθορίζουν στην BSA είναι οι δύο τρυπτοφάνες που έχουμε αναφέρει και οι τυροσίνες. Ανάλογα με το σημείο που θέλουμε να εστιάσουμε επιλέγουμε το κυματαριθμό που θα διεγείρουμε με ιδιαίτερο ενδιαφέρον να παρουσιάζει οι τρυπτοφάνη 214. Αυτή βρίσκεται σε υδροφοβική περιοχή της δεύτερης υπομονάδας, ενώ η 135 βρίσκεται στην επιφάνεια (φθορίζει λιγότερο στο υδρόφιλο περιβάλλον της), πράγμα που σημαίνει ότι υδρόφοβοι υποκαταστάτες μπορούν να πλησιάσουν την 214 και να επηρεάσουν το φάσμα της, δίνοντας πληροφορίες για την αλληλεπίδραση. Οι τρυπτοφάνες εκπέμπουν στα 350 nm μετά από διέγερση στα 295 (με διέγερση στα 280 nm εκπέμπουν στα 340 nm με συνεισφορά των τυροσινών). Σε χαμηλότερη περιοχή εκπέμπουν και οι τυροσίνες.

Το φάσμα CD οφείλεται στους χειρόμορφους άνθρακες της αλβουμίνης, όπως συμβαίνει και με το DNA. Το σήμα εμφανίζεται στα αρνητικά κάτω από 250 nm, ενώ γίνεται θετικό κάτω από περίπου 210-220 nm. Πάνω από 250 nm είναι μηδενικό. Το φάσμα απορρόφησης παρουσιάζει μια μέγιστη κορυφή στα περίπου 280 nm, και έντονο σήμα προς μικρότερα μήκη κύματος αρκετά κοινό σε αυτή την περιοχή για τις πρωτεΐνες, λόγω παρουσίας αμινοξέων με αρωματικό δακτύλιο όπως η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη και η φαινυλανανίνη. Στα 280 nm η απορρόφηση οφείλεται κυρίως στις τρυπτοφάνες. Στις παραπάνω περιπτώσεις μιλάμε για υδατικά διαλύματα BSA σε pH~7. ^[120, 160, 162-165]

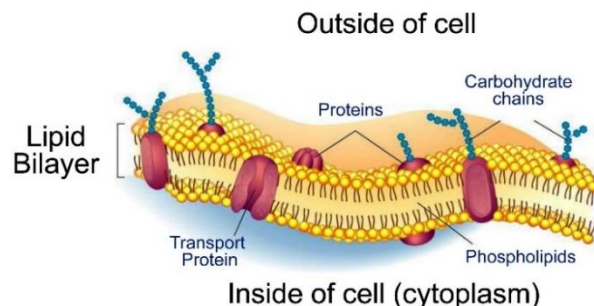
Το εύρος των μεθόδων μελέτης της αλληλεπίδρασης με μικρά μόρια περιλαμβάνει και άλλες μεθόδους, όπως είναι οι υπολογιστικές μέθοδοι (molecular docking), οι τεχνικές φασματοσκοπίας Raman, οι ηλεκτροφορητικές τεχνικές και η κρυστάλλωση BSA-φαρμάκου, που δεν θα μας απασχολήσουν στην παρούσα εργασία.^[117, 166-168]

Κεφάλαιο 6° : Κύτταρα και in vitro μελέτη

6.1 Κύτταρο

Οι οργανισμοί χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες σε σχέση με τη κυτταρική τους οργάνωση, τους προκαρυωτικούς και τους ευκαρυωτικούς. Οι διαφορές τους ως προς την μορφολογία τους και την φυσιολογία τους είναι σαφής με τους πρώτους να χαρακτηρίζονται από απλή κυτταρική οργάνωση. Το γενετικό υλικό των προκαρυωτικών κυττάρων βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα χωρίς να περιβάλλεται από μεμβράνη (δεν υπάρχει οργανωμένος πυρήνας) συγκεντρωμένο σε μια περιοχή που ονομάζεται πυρηνοειδές, ενώ δεν υπάρχουν κυτταρικά οργανίδια ή σύστημα ενδοκυττάρων μεμβρανών. Το κύτταρο περιβάλλεται από πλασματική μεμβράνη και κυτταρικό τοίχωμα. Όλα τα βακτήρια, οι σχιζομύκητες και τα κυανοφύκη αποτελούν τους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Ευκαρυωτικοί είναι όλοι οι υπόλοιποι οργανισμοί : τα πρώτιστα (φύκη και πρωτοζωα), οι μύκητες, τα φυτά, τα ζώα και ο άνθρωπος. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν πολύπλοκη δομή και οργάνωση, διαθέτουν μεμβράνη που περιβάλλει το γενετικό τους υλικό (πυρήνας) και σύνολο κυτταρικών οργανιδίων και ενδοκυττάρων μεμβρανών στο κυτταρόπλασμα. Περιβάλλονται από την πλασματική μεμβράνη, ενώ ορισμένα διαθέτουν και κυτταρικό τοίχωμα.

Ιδιαίτερη σημασία για την λειτουργία του κυττάρου έχουν οι βιολογικές μεμβράνες που παρουσιάζουν εκλεκτικότητα για διάφορα μεταλλικά ιόντα ανάλογα με την λειτουργία τους εντός και εκτός κυττάρου. Η δομή των μεμβρανών είναι αυτή του ρευστού μωσαϊκού και αποτελείται από φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες (σχήμα 6.1). Το υδρόφιλο μέρος των λιπιδίων βρίσκεται εξωτερικά στις επιφάνειες της μεμβράνης και το υδρόφοβο εσωτερικά σχηματίζοντας μια διπλή μεμβράνη που στην επιφάνειά της διατάσσονται διάφορες πρωτεΐνες.^[70, 169]



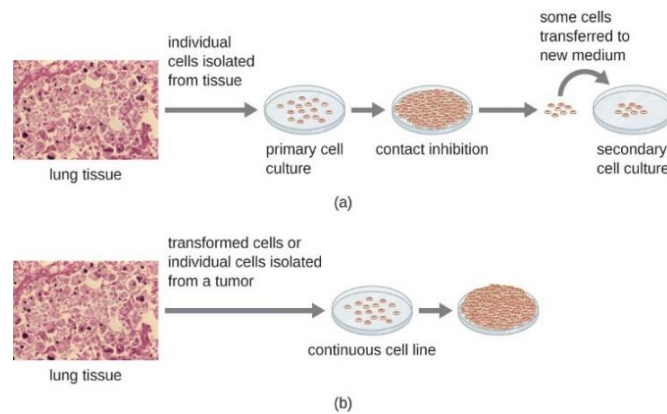
Σχήμα 6.1: Δομή ρευστού μωσαϊκού των βιολογικών μεμβρανών ^[Molecular Membrane Biology, 2013. 30(3): 229-45]

6.2 Κύτταροκαλλιέργειες και καρκινικά κύτταρα

Για την βιολογική αξιολόγηση *in vitro* είναι απαραίτητο να μπορούν να αναπτυχθούν καρκινικά και υγιή κύτταρα ανώτερων οργανισμών σε εργαστηριακό περιβάλλον. Αυτό επιτυγχάνεται ευκολότερα στα καρκινικά κύτταρα που μπορούν να διατηρούνται σε τεχνητό περιβάλλον χωρίς μείωση του δυναμικού ανάπτυξής τους και διαίρεσής τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα, σε αντίθεση με τα υγιή κύτταρα που επιβιώνουν δυσκολότερα. Όταν αυτά λαμβάνονται από όργανα ζώων με ειδική διαδικασία (θρυψινοποίηση), η καλλιέργεια λέγεται πρωτογενής. Ως κυτταροκαλλιέργεια θεωρούμε την διατήρηση και ανάπτυξη μεμονωμένων κυττάρων *in vitro* για πάνω από 24 ώρες. Η συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων ανώτερων οργανισμών απαιτεί προσκόλληση σε σταθερό υπόστρωμα για την σωστή ανάπτυξή τους, η οποία επιτυγχάνεται με την έκκριση ινώδων πρωτεϊνών και συστατικών προσκόλλησης (π.χ. λαμιμίνη, φιμπρονεκτίνη, κολλαγόνο). Μετά το τέλος της διαδικασίας προσκόλλησης, τα κύτταρα λαμβάνουν την μορφολογία τους (ινοβλάστες θηλαστικών, επιθηλιακά κύτταρα κλπ.). Η διατήρηση και ανάπτυξή τους γίνεται σε ειδικές φιάλες ή σε τρυβλία Petri. Οι χώροι των καλλιεργειών θα πρέπει να είναι απολυμασμένοι, τα θρεπτικά υλικά αποστειρωμένα και να περιέχουν αντιβιοτικά όπως πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Κατόπιν, ελέγχεται το pH (7,2-7,4) του θρεπτικού μέσου, η θερμοκρασία του χώρου (32-37 °C για θηλαστικά), το ποσοστό διοξειδίου του άνθρακα (~5%) και οξυγόνου (~95%) στην ατμόσφαιρα του χώρου καλλιέργειας και οι ουσίες στο θρεπτικό υλικό (γλυκόζη, ανόργανα άλατα, βιταμίνες, αμινοξέα, ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες). Οι ανακαλλιέργειες των κυττάρων γίνονται με θρυψινοποίηση που σπάει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-επιφάνειας φιάλης. Στις καλλιέργειες μπορούν να γίνουν μελέτες κυτταρικού κύκλου ζωής, μεταβολισμού, κυτταρικής κίνησης, έλεγχος τοξικότητας χημικών ουσιών (αντικαρκινικών), μελέτη δράσης ορμονών και αυξητικών παραγόντων και πολλές άλλες που θα ήταν δύσκολο να γίνουν *in vivo*. Συνεπώς, κατανοούμε την σημασία ανάπτυξης κυτταροκαλλιεργειών στο εργαστήριο, η οποία μας προσφέρει ανεκτίμητες υπηρεσίες

Τα καρκινικά κύτταρα όταν καταλάβουν τον διαθέσιμο χώρο στην καλλιέργεια σχηματίζουν στοιβάδες από κύτταρα δηλαδή πολλαπλές στοιβάδες κυττάρων. Αυτό δεν το κάνουν τα υγιή κύτταρα, όπου όταν πληρώσουν τον διαθέσιμο χώρο αναστέλλουν την ανάπτυξή τους λόγω επαφής (contact inhibition) και πρέπει να φτιαχτεί δευτερογενής καλλιέργεια ώστε να επιβιώσουν. Έτσι, σχηματίζουν μονοστοιβάδες (σχήμα 6.4).^[169]

Στον οργανισμό τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται ασταμάτητα και ανεξέλεγκτα, δημιουργώντας στερεούς όγκους ή ρέοντα στο αίμα ως μη φυσιολογικά κύτταρα. Μπορεί να παραμείνουν αδρανή χωρίς συνέπειες στη ζωή του οργανισμού (καλοήθης ογκίδια) ή να μετατραπούν σε κακοήθης με δυσμενείς εξελίξεις στον οργανισμό και δημιουργία καρκίνου. Το γενετικό υλικό παρόλο που βρίσκεται προφυλαγμένο στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων, μπορεί να υποστεί διάφορες τροποποιήσεις (μεταλ-



Σχήμα 6.2: (a) Πρωτογενής και δευτερογενής κυτταροκαλλιέργεια υγιών κυττάρων πνευμονιού (επιφάνεια τρυβλίων Petri) (b) Συνεχή ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων πνευμονιού χωρίς αναστολή [OpenStax, *Microbiology*. 2018. Chapter 6]

λάξεις) στην αλληλουχία των βάσεων του που να μην μπορούν να επιδιορθωθούν από τα επιδιορθωτικά ένζυμα του κυττάρου. Αν η βλάβη αυτή αφορά σημαντικά γονίδια του οργανισμού οδηγεί στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων ή καρκινογένεση, λόγω της συσσώρευσης αυτών των μεταλλαγών στο DNA. Αυτές οι μεταλλαγές οδηγούν σε αλλαγή στα επίπεδα ή στο πρότυπο έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε μονοπάτια ελέγχου και αναγνώρισης πιθανών ανεπανόρθωτων βλαβών (ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά), με αποτέλεσμα την καρκινογένεση. Έτσι, ενώ ο υγιής οργανισμός οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) τα κύτταρα που οδηγούνται προς την αθανασία (καρκινογένεση), αυτό δεν συμβαίνει στον ασθενή. Τα μεταλλαξιγόνα μπορεί να έχουν άμεση ή έμμεση επίδραση στο γενετικό υλικό και διακρίνονται γενικά σε δυο μεγάλες κατηγορίες, αυτή των χημικών ουσιών και αυτή της ακτινοβολίας. Ο επικρατέστερος τρόπος αντιμετώπισης των νεοπλασιών (όγκων) είναι η αφαίρεσή του με χειρουργική επέμβαση ή η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου με κατάλληλο φάρμακο, ακτινοβολία, αντισώματα ή ανοσοβιολογικά κύτταρα.^[170-172]

Οι διαφορές των καρκινικών κυττάρων με τα υγιή κύτταρα (πίνακας 6) είναι αρκετές και μπορεί να αξιοποιηθούν για εκλεκτική στόχευση των φαρμάκων, ώστε να θανατώνουν μόνο τα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, τα ηλεκτροχημικά δυναμικά στο εσωτερικό των όγκων και η υποξία σε αυτά, ευνοεί την μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα συμπλόκων Ru(II) στα καρκινικά σε σχέση με τα υγιή, όπως ήδη έχουμε αναφέρει. Τέλος, τα καρκινικά κύτταρα δείχνουν μειωμένη ανάγκη για προσθήκη ορού στο καλλιεργητικό υλικό in vitro και για προσκόλληση σε στερεό υλικό ώστε να αναπτυχθούν, άρα έχουν ευκολότερη ανάπτυξη.^[70, 169, 173]

Πίνακας 5: Σύγκριση υγιών με καρκινικά κύτταρα^[173]

Χαρακτηριστικά	Καρκινικά κύτταρα	Υγιή κύτταρα
Σχήμα	Μη κανονικό	Κανονικό

Πυρήνας	Μεγαλύτερος, πιο σκούρος	Φυσιολογικός (ανάλογα με το κύτταρο)
Ανάπτυξη	Ανεξέλεγκτη	Ελεγχόμενη
Ωρίμανση	Δεν πραγματοποιείτε	Φυσιολογική (κυτταρικός διπλασιασμός)
Επικοινωνία	Δεν επικοινωνούν	Φυσιολογική
Ορατότητα	Αόρατα στα ανοσοκύτταρα	Ορατά στα ανοσοκύτταρα
Οξυγόνο	Ελάχιστο	Αρκετό
Γλυκόζη	Μεγάλη κατανάλωση	Φυσιολογική κατανάλωση
Απαιτούμενη ενέργεια	5 %	95 %
Ποσότητα ATP	2 μονάδες ATP	38 μονάδες ATP
Περιβάλλον κυττάρου	Όξινο	Βασικό
Προτίμηση θρεπτικού υλικού	Γλυκόζη	Λιπαρά, κετόνες, υδατάνθρακες (γλυκόζη)

6.3 In vitro μελέτη

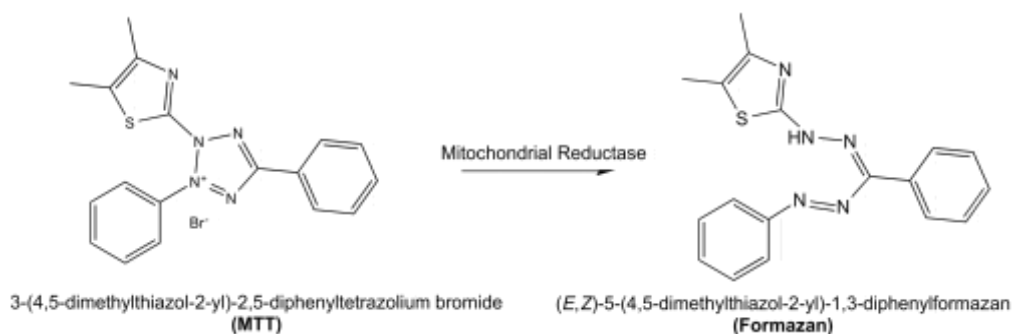
Οι in vitro δοκιμασίες και μέθοδοι αξιολόγησης είναι αρκετές και η επιλογή της κατάλληλης εξαρτάται από το μοντέλο καλλιέργειας, τα χαρακτηριστικά του φαρμάκου, το μόριο στόχο του φαρμάκου στο κύτταρο, το μηχανισμό τοξικότητας και τον τρόπο ανίχνευσης, καθώς και τις πειραματικές δυνατότητες κάθε εργαστηρίου. Εδώ, θα αναφερθούμε στη μελέτη ζωτικότητας με την χρωματομετρική δοκιμασία MTT που βασίζεται στη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων.

Η δοκιμασία αυτή προσδιορίζει την ζωτικότητα των κυττάρων (ποσοστό υγιών κυττάρων σε μια καλλιέργεια) και χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση in vitro της κυτταροτοξικότητας ενός φαρμάκου. Άλλες μέθοδοι αξιολόγησης τοξικότητας είναι αυτή της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και η δοκιμασία με την χρωστική Trypan Blue. Κατόπιν, η είσοδο του φαρμάκου στο εσωτερικό των κυττάρων μπορεί να μελετηθεί με μικροσκοπία φθορισμού και τη βοήθεια χρωστικών, όπως το κυανό του μεθυλενίου, το ιωδιούχο προπιδίο ή η DAPI (χρώση του DNA).

- MTT

Η χρωματομετρική δοκιμασία MTT μετράει τη μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων, που έχει άμεση σχέση με την κυτταρική ανάπτυξη, βασισμένη στην μετατροπή του MTT (3-(4,5-διμέθυλο-θειαζόλ-2-ίλ)2,5-διφαινύλο-τετραζόλιο) σε φορμαζάνη, από το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογονάση στα μιτοχόνδρια. Η φορμαζάνη απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος (550-

570 nm, χρώση ιώδες) από αυτό του MTT (400 nm, χρώση κίτρινη). Οι διαφορές στα επίπεδα φορμαζάνης που προσδιορίζονται αντανακλούν τη μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων παρουσία/απουσία φαρμάκου και επιτρέπουν να εκτιμήσουμε το ποσοστό (%) ζωτικών κυττάρων στην καλλιέργεια σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Η ποσότητα φορμαζάνης μετρίεται με φασματοφωτόμετρο σε οργανικό διαλύτη (συνήθως DMSO που διαλύετε εύκολα).



Σχήμα 6.3 : Μετατροπή της MTT σε φορμαζάνη από την ηλεκτρική αφυδρογόνωση [Journal of Visualized Experiments, 2013. (81)]

Τέλος, το φάσμα των αξιολογήσεων μιας ένωσης ή ενός φαρμάκου *in vitro* είναι προφανές πως δεν περιορίζεται μόνο στη μελέτη κυτταροτοξικότητας, αλλά και σε μελέτη αντιμεταστατικής δράσης (π.χ. μέθοδο επούλωσης), αξιολογήσεις τοξικότητας σε γονίδια και χρωμοσώματα (γονιδιοτοξικότητα), αξιολογήσεις μεταλλαξιογόνων δράσης, τοξικοκινητικές μελέτες, μελέτες έκφρασης πρωτεϊνών/γονιδίων, κυτταρικού κύκλου και πολλές άλλες χωρίς να μας απασχολήσουν στη παρούσα εργασία.^[174]

Κεφάλαιο 7° : Αντιδραστήρια-Όργανα-Μικροσκευές-Μεθοδολογία

7.1 Αντιδραστήρια

- **KBr**: Merck
- **Celite 545 (particle size 0,02 - 0,1mm)**: Merck
- **Selenium (IV) oxide**: Alfa Aesar GmbH & Co KG
- **H₂O**: από τη συσκευή απιονισμένου ύδατος Milli-Q plus της Millipore
- **2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline (neocuproine)**: Merck
- **1,4 Dioxane**: Fisher Chemical
- **Dimethyl Sulfoxide**: Fisher Chemical
- **Pd on carbon (Pd/C)**: Merck
- **Hydroxylamine hydrochloride**: ACS reagents, ACROS Organics
- **Ethanol absolute**: ACS reagents, ACROS Organics
- **Diethyl ether**: Fischer Chemicals
- **EtBr**: Merck
- **Pyridine**: Chem-Lab NV
- **HClO₄ (60%)**: Riedel-de Haen AG
- **Tetrahydrofuran**: Merck
- **MgSO₄**: Penta
- **NaOH**: Merck
- **Dichloromethane**: Fisher chemical
- **Methanol**: Sigma Aldrich
- **RuCl₃·nH₂O**: Heraeus
- **Acetone**: Sigma Aldrich
- **Na₂HPO₄·7H₂O**: Merck
- **NaH₂PO₄·2H₂O**: Merck
- **Na₂HPO₄·2H₂O**: Merck
- **KH₂PO₄**: Merck
- **Na₂SO₄**: Carlo Erba Reagents
- **NaCl**: PENTA
- **d₆-DMSO**: Merck
- **Calf Thymus DNA sodium salt**: Sigma Aldrich
- **Distamycin A hydrochloride (from Streptomyces distallicus)**: Sigma Aldrich
- **Phenylbutazone**: TCI Chemicals
- **Ibuprofen/(2-(4-isobutylphenyl)propionic acid)**: TCI Chemicals
- **Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V**: Pan Biotech
- **Medium (D-MEM)**: BiochemAG
- **Θρυψίνη-EDTA**: BiochemAG
- **FBS**: PAALaboratories
- **L-Γλουταμίνη**: PAA Laboratories
- **Πενικιλίνη**: Biochem AG
- **MTT reagent**: Trevigen
- **MCF-7 & PC3 Cell Lines human**: Sigma Aldrich

7.2 Όργανα - Μικροσκευές

- **Ιξωδόμετρο:** SI Analytics CK 300
- **Φασματοφωτόμετρο IR:** IR Affinity-1, Shimadzu
- **Φθορισμόμετρο λάμπας Xe:** Shimadzu Spectro fluorophotometer RF 5301PC
- **Φασματοφωτόμετρο UV-Vis CARY 3E:** Συνδεδεμένο με Η/Υ και κυκλοφορητή ύδατος στο θερμοστατούμενο πολλαπλό υποδοχέα κυψελίδων, Varian
- **Φασματοφωτόμετρο CD J 715:** Spectropolarimeter, Jasco Corp
- **pH-μετρο Xenon:** Ηλεκτρόδιο λευκοχρύσου RUSSELC MAWL/3.7/180
- **Ψηφιακός Αναλυτικός Ζυγός:** OHAUS $\pm 0.1\text{mg}$, Bel Engineering $\pm 0,01\text{g}$
- **Μικροπιπέτες:** 'Precision Variable-Volume Pipettes' i) 100-1000 μL . High Tech. Lab., ISO 9001 και ii) 10-100 μL , Hamilton, ISO 9001
- **Κυψελίδα UV-Vis, CD:** από χαλαζία, οπτικών διαδρομών 0,1 cm & 1 cm
- **Κυψελίδα φθορισμομετρίας:** από χαλαζία, οπτικής διαδρομής 1 cm
- **Κυψελίδες NMR:** NMR tubes, SDS, διαμέτρου 5 mm και μήκους 178 mm
- **Φασματοφωτόμετρο NMR:** 300 MHz, Bruker
- **Φασματομετρο μάζας MS:** Finnigan Surveyor MSQ Plus
- **Φασματοφωτόμετρο ELISA:** Sirio S Seac RADIM-Group Diachel ELISA platereader

7.3 Μεθοδολογία – Παρασκευή διαλυμάτων

A) Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη και του πρόδρομου συμπλόκου $\text{cis-Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$

Για τον χαρακτηρισμό του υποκαταστάτη (παράγωγο της 1,10-φαινανθρολίνης, **PDAM**) χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές-μέθοδοι:

- Φασματομετρία μάζας (MS)
- Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)
- Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)
- Φθορισμομετρία (Fluorescence)

➤ Φασματοσκοπία Μάζας

Το φάσμα μάζας του υποκαταστάτη λήφθηκε στο φασματόμετρο μάζας του τομέα οργανική χημείας, του τμήματος χημείας, ΕΚΠΑ. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι μεθανόλη.

➤ Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Λήφθηκε το φάσμα IR σε παστίλια του υποκαταστάτη με KBr, ύστερα από εφαρμογή πίεσης 10 τόνων.

➤ Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Παρασκευάστηκε διάλυμα της PDAM σε διαλύτη μεθανόλη, συγκέντρωσης $1,56 \times 10^{-5}$ M. Για το παρασκευάζον διάλυμα λήφθηκε το φάσμα UV-Vis στην περιοχή 220-600 nm και σε θερμοκρασία 25 °C. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα οπτικής διαδρομής $b=1$ cm.

➤ Φθορισμομετρία

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σε διάλυμα της PDAM σε μεθανόλη με συγκέντρωση $1,56 \times 10^{-5}$ M. Τα μήκη κύματος διέγερσης της PDAM (excitation wavelength) είναι 256 nm και 270 nm όταν ο διαλύτης είναι μεθανόλη. Μετρήθηκε ο φθορισμός της από τα 290-900 nm και το μήκος κύματος διέγερσης από 220-400 nm. Όλες οι μετρήσεις έγιναν με εύρος σχισμής εισόδου-εξόδου του μονοχρωμάτορα (slit width) 5 nm. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα οπτικής διαδρομής $b=1$ cm και η θερμοκρασία ήταν 25 °C.

Για τον χαρακτηρισμό του πρόδρομου συμπλόκου **cis-Ru(DMSO)₄Cl₂** χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές-μέθοδοι:

- Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)
- Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

➤ Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Λήφθηκε το φάσμα IR σε παστίλια του υποκαταστάτη με KBr, ύστερα από εφαρμογή πίεσης 10 τόνων.

➤ Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Παρασκευάστηκαν διαλύματα του **cis-Ru(DMSO)₄Cl₂** σε μεθανόλη, DMSO και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (BufferP), συγκεντρώσεων $1,01 \times 10^{-3}$ M. Για τα παρασκευασθέντα διαλύματα λήφθηκαν φάσματα UV-Vis στην περιοχή 230-500 nm και σε θερμοκρασία 25 °C. Μετρήθηκαν τα ίδια διαλύματα αμέσως μετά την διάλυσή τους στο διαλύτη και μετά από 24 ώρες. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα οπτικής διαδρομής $b=1$ cm.

B) Χαρακτηρισμός του συμπλόκου

Για τον χαρακτηρισμό του συμπλόκου του ρουθηνίου(II) με την PDAM από το πρόδρομο **cis-Ru(DMSO)₄Cl₂**, **cisRu-PDAM** χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές-μέθοδοι:

- Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)
- Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)
- Φθορισμομετρία (Fluorescence)
- Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD)
- Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

➤ Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Λήφθηκε το φάσμα IR σε παστίλια του υποκαταστάτη με KBr, ύστερα από εφαρμογή πίεσης 10 τόνων.

➤ Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Παρασκευάστηκαν διαλύματα του συμπλόκου cisRu-PDAM σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (BufferP), συγκεντρώσεων $1,91 \times 10^{-5}$ M και $1,25 \times 10^{-5}$ M αντίστοιχα. Για τα παρασκευασθέντα διαλύματα λήφθηκαν φάσματα UV-Vis στην περιοχή 230-700 nm και σε θερμοκρασία 25 °C. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα οπτικής διαδρομής $b = 1$ cm.

Για τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο Job παρασκευάστηκε μια σειρά 11 διαλυμάτων που περιείχε ποσότητες χ (ml) διαλύματος PDAM σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 10^{-3} M και ποσότητες $1-\chi$ (ml) διαλύματος cis-Ru(DMSO)₄Cl₂, ίδιας συγκέντρωσης, όπου $\chi = 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0$. Ο τελικός όγκος των 11 διαλυμάτων ήταν 1 ml. Αφέθηκαν 72 ώρες για επώαση. Σε αυτά τα διαλύματα ελήφθησαν τα UV-Vis φάσματα στην περιοχή 300-600 nm σε κυψελίδα με οπτική διαδρομή 1 cm και θερμοκρασία 25 °C.

Ακόμα, για να πραγματοποιηθεί η φασματοσκοπική τιτλοδότηση του υποκαταστάτη με το μέταλλο, παρασκευάστηκε σειρά μεθανολικών διαλυμάτων τελικής συγκέντρωσης σε PDAM προσθέτοντας συγκεκριμένο όγκο μεθανολικού διαλύματος cis-Ru(DMSO)₄Cl₂, έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι R ($R = [\text{Ru(II)}]/[\text{PDAM}]$). Αφέθηκαν 72 ώρες για επώαση. Στα διαλύματα αυτά λήφθηκε φάσμα UV-Vis, από 230-600 nm, με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 0,1 cm, σε θερμοκρασία 25 °C.

➤ Φθορισμομετρία

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σε διαλύματα του cisRu-PDAM σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, με συγκεντρώσεις $1,91 \times 10^{-5}$ M και $1,25 \times 10^{-5}$ M αντίστοιχα. Το μήκος κύματος διέγερσης του συμπλόκου (excitation wavelength) είναι 256 nm, 269 nm και 520 nm όταν ο διαλύτης είναι μεθανόλη και 276 nm στο ρυθμιστικό διάλυμα (BufferP). Μετρήθηκε ο φθορισμός του συμπλόκου από τα 270-900 nm και το μήκος κύματος διέγερσης από 220-600 nm. Όλες οι μετρήσεις έγιναν με εύρος σχισμής εισόδου-εξόδου του μονοχρωμάτορα (slit width) 5 nm. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα οπτικής διαδρομής $b = 1$ cm και η θερμοκρασία ήταν 25 °C.

Κατόπιν, παρασκευάστηκε σειρά διαλυμάτων για φθορισμομετρική τιτλοδότηση, όμοια με τα διαλύματα φασματοσκοπικής τιτλοδότησης για το UV-Vis, αφέθηκαν για επώαση 72 ώρες και μετρήθηκε ο φθορισμός με μήκος κύματος διέγερσης $\lambda_{\text{ex}} = 271$ nm, κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm και 25 °C θερμοκρασία (slit width 5 nm).

➤ Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD)

Λήφθηκε το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού συγκέντρωσης $1,91 \times 10^{-5}$ M του συμπλόκου σε μεθανόλη, στην περιοχή 200-600 nm με κυψελίδα $b=1$ cm, στους 25 °C.

➤ Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Λήφθηκε το φάσμα $^1\text{H-NMR}$, σε διάλυμα συγκέντρωσης 5 mg/mL και διαλύτη δευτεριωμένο DMSO ($d_6\text{-DMSO}$), σε θερμοκρασία 25 °C.

Γ) Μελέτη της αλληλεπίδρασης με DNA

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου cisRu-PDAM (αντίστοιχα και του προδρόμου συμπλόκου cis-Ru(DMSO) $_4$ Cl $_2$) με το DNA, πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους-τεχνικές: φασματοσκοπία UV-Vis, κυκλικό διχρωϊσμό, φθορισμομετρία και ιξωδομετρία.

➤ Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

i. Παρασκευή αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$

Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 1,7867 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και αραιώνονται με απιονισμένο νερό milli-Q σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα A). Έπειτα ζυγίζονται 0,9073 g KH_2PO_4 και αραιώνονται ομοίως με νερό milli-Q σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα B). Εν συνεχεία αναμιγνύονται 58,7 mL του διαλύματος A και 41,3 mL του διαλύματος B σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζεται το αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, το οποίο έχει $\text{pH} \approx 7$ και μετριέται κάθε φορά πριν τη χρήση του. Φυλλάσετε στους ~ 4 °C στο ψυγείο (σκοτάδι).

ii. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 1:10 (**BufferP**)

Παρασκευάζεται με 1:10 αραιώση του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$. Δηλαδή, μεταφέρονται 10 mL του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται με απιονισμένο νερό milli-Q.

iii. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 1:10 με Na^+ (0,1 M σε NaCl)

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

➤ Παρασκευή διαλύματος DNA και υπολογισμός συγκέντρωσής του

Ζυγίζονται περίπου 5 mg ινών φυσικού DNA θύμου αδένος βοοειδούς και προστίθενται σε αυτά 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1:10 με Na^+ . Το διάλυμα αφήνεται για μία νύχτα σε ήπια ανάδευση στο σκοτάδι. Έπειτα, το πυκνό διάλυμα του DNA αραιώνεται σε αναλογία 1:20 αναμιγνύοντας 0,1 mL του διαλύματος DNA και 1,9 mL του ρυθμιστικού διαλύματος 1:10. Για την baseline

χρησιμοποιείτε το εξής διάλυμα: 0,1 mL του ρυθμιστικού διαλύματος 1:10 με Na^+ και 1,9 mL του ρυθμιστικού διαλύματος 1:10. Ο συντελεστής απορρόφησης του DNA στα 258 nm, είναι $\epsilon=6.600$ και μετρώντας την απορρόφηση στο UV-Vis, υπολογίζεται κάθε φορά η συγκέντρωση του διαλύματος DNA. Το διάλυμα χρησιμοποιείτε κατευθείαν για την κατασκευή των διαλυμάτων.

➤ Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου cisRu-PDAM με το DNA παρασκευάστηκε μια σειρά διαλυμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του συμπλόκου και μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του DNA έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι $R=[\text{DNA}]/[\text{cisRu-PDAM}]$. Η αρχική ποσότητα συμπλόκου διαλύθηκε σε μεθανόλη, γι'αυτό σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης ώστε τελικά η ποσότητα της (μεθανολικό διάλυμα cisRu-PDAM + μεθανόλη) να παραμένει σταθερή και μικρότερη του 3% v/v. Λήφθηκαν τα φάσματα UV-Vis των διαλυμάτων από 700-200 nm, σε θερμοκρασία 25°C. Επίσης, η baseline του κάθε διαλύματος περιείχε αντί του συμπλόκου, τον ίδιο όγκο μεθανόλης στο καθένα.

Κατόπιν, για την κατασκευή στις καμπύλης θερμικής μετουσίωσης του DNA χρησιμοποιήθηκαν 2 διαλύματα ίδια τελικής συγκέντρωσης DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα, όπου το ένα περιείχε συμπλόκο σε τέτοια συγκέντρωση, ώστε να προκύψει ο λόγος $R=[\text{cisRu-PDAM}]/[\text{DNA}]=0,45$. Το σύμπλοκο διαλύθηκε αρχικά σε DMSO, γι'αυτό και στο τελικό διάλυμα χωρίς σύμπλοκο (μόνο DNA), προστέθηκε ίση ποσότητα DMSO με εκείνο που περιείχε το σύμπλοκο (μικρότερη του 3% v/v). Κατασκευάσαμε τις καμπύλες θερμικής μετουσίωσης φασματοφωτομετρικά, μετρώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 258 nm, ανα °C, με ταχύτητα αύξησης της θερμοκρασίας 0,5 °C/min, σε εύρος θερμοκρασιών 25-90 °C και με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm. Όλα τα παραπάνω διαλύματα μετά την κατασκευή τους, παρέμειναν για επώαση 24 ώρες στο σκοτάδι, πριν μετρηθούν.

➤ Κυκλικός διχρωϊσμός

Για την λήψη των φασμάτων τους, παρασκευάστηκε 1 σειρά διαλυμάτων (cisRu-PDAM)-DNA σταθερής συγκέντρωσης DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα και μεταβαλλόμενης τελικής συγκέντρωσης cisRu-PDAM, έτσι ώστε να έχουμε τους επιθυμητούς λόγους $R=[\text{cisRu-PDAM}]/[\text{DNA}]$. Η αρχική ποσότητα συμπλόκου διαλύθηκε σε DMSO, γι'αυτό σε όλα τα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα DMSO ώστε τελικά η ποσότητα της (διάλυμα cisRu-PDAM + DMSO) να παραμένει σταθερή και μικρότερη του 3% v/v. Στην περίπτωση του προδρόμου συμπλόκου cis-Ru(DMSO)₄Cl₂, παρασκευάστηκαν 2 σειρές διαλυμάτων όπως αυτή του (cisRu-PDAM)-DNA, όμως με αρχική διάλυση σε bufferP. Στην μία το cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ διαλύθηκε στο διαλύτη (bufferP) 24 ώρες πριν την κατασκευή των διαλυμάτων (24h) και στην άλλη απευθείας (0h).

Για την περαιτέρω διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA μελετήθηκε η ανταγωνιστική δράση του σε σχέση με το αντιβιοτικό distamycin A. Παρασκευάστηκε μια σειρά διαλυμάτων DNA-DisA-(cisRu-PDAM) σε ρυθμιστικό διάλυμα, διατηρώντας σταθερή την αναλογία [disA]/[DNA] και ίση με 1/3 και μεταβάλλοντας την τελική συγκέντρωση του συμπλόκου ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι $R=[cisRu-PDAM]/[DNA]$. Το σύμπλοκο cisRu-PDAM διαλύθηκε αρχικά σε DMSO, γι' αυτό και εδώ είχαμε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας DMSO στο κάθε διάλυμα, ώστε τελικά η ποσότητά του (διάλυμα cisRu-PDAM σε DMSO + DMSO) να παραμένει σταθερή και μικρότερη του 3% v/v. Όλα τα διαλύματα μετά την κατασκευή τους, παρέμειναν για επώαση 24 ώρες, προτού ληφθούν τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού τους, στην περιοχή 600-200 nm, στους 25 °C και με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm.

➤ Φθορισμομετρία

Για να εφαρμοστεί η τεχνική της φθορισμομετρίας στην διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου cisRu-PDAM και του προδρόμου cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ με το DNA, μελετήθηκε η ανταγωνιστική δράση του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) σε σχέση με αυτά. Παρασκευάστηκε 1 σειρά διαλυμάτων (DNA-EtBr-(cisRu-PDAM) σε ρυθμιστικό διάλυμα, διατηρώντας σταθερή την αναλογία [DNA]/[EtBr] και ίση με 8/1 και μεταβάλλοντας την τελική συγκέντρωση του συμπλόκου, έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι $R=[cisRu-PDAM]/[DNA]$. Ομοίως με τα προηγούμενα, το σύμπλοκο αρχικά διαλύθηκε σε DMSO, γι' αυτό και προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα DMSO στα διαλύματα ώστε τελικά η ποσότητά του σε όλα, να είναι σταθερή (<3%). Στην περίπτωση του προδρόμου συμπλόκου cis-Ru(DMSO)₄Cl₂, παρασκευάστηκαν 2 σειρές διαλυμάτων όμοια με το (cisRu-PDAM)-DNA, αλλά στην μία το cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ διαλύθηκε στο διαλύτη (bufferP) 24 ώρες πριν την κατασκευή των διαλυμάτων (24h) και στην άλλη απευθείας (0h). Σε όλα τα διαλύματα, η προσθήκη του συμπλόκου έγινε 3 ώρες μετά την ανάμειξη EtBr και DNA (ώστε να επωαστούν). Κατόπιν, παρέμειναν για επώαση 24 επιπλέον ώρες, πριν μετρηθούν. Ως μήκος κύματος διέγερσης επιλέχθηκε το $\lambda=526$ nm και μετρήθηκε ο φθορισμός των διαλυμάτων από τα 550-900 nm, στους 25 °C, με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm. Ακόμα, όλες οι μετρήσεις έγιναν με εύρος σχισμής εισόδου-εξόδου του μονοχρωμάτορα (slit width) 3 nm.

Ακολούθως, στη σειρά των διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης συμπλόκου και μεταβαλλόμενης DNA που χρησιμοποιήθηκε στη λήψη φάσματος UV-Vis (μετά την 24ωρη επώαση), μετρήθηκε ο φθορισμός τους στην περιοχή 290-900 nm, με μήκος κύματος διέγερσης (excitation wavelength) 276 nm. Το εύρος σχισμής εισόδου-εξόδου του μονοχρωμάτορα (slit width) ήταν 5 nm, η θερμοκρασία 25 °C και η κυψελίδα οπτικής διαδρομής b=1cm.

➤ Ιξωδομετρία

Για να υπολογιστεί το ιξώδες του DNA παρουσία του συμπλόκου, παρασκευάστηκε 1 σειρά διαλυμάτων (cisRu-PDAM)-DNA σταθερής συγκέντρωσης DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα και μεταβαλλόμενης τελικής συγκέντρωσης cisRu-PDAM, έτσι ώστε να έχουμε τους επιθυμητούς λόγους $R=[\text{cisRu-PDAM}]/[\text{DNA}]$ (αραίωση των ίδιων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στον κυκλικό διχρωϊσμό). Για το πρόδρομο σύμπλοκο cis-Ru(DMSO)₄Cl₂, παρασκευάστηκαν με όμοιο τρόπο 2 σειρές διαλυμάτων με διάλυση του συμπλόκου στον ρυθμιστικό διάλυμα 24 ώρες και 0 ώρες πριν την προσθήκη του στα τελικά διαλύματα. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την σειρά διαλυμάτων PDAM-DNA. Όλα τα διαλύματα παρέμειναν μετά την κατασκευή τους, 24 ώρες για επώαση, προτού πραγματοποιηθεί το πείραμα της ιξωδομετρίας.

Δ) Μελέτη της αλληλεπίδρασης με BSA

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου cisRu-PDAM (αντίστοιχα του υποκαταστάτη PDAM και του προδρόμου συμπλόκου cis-Ru(DMSO)₄Cl₂) με τη BSA, πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους-τεχνικές: φασματοσκοπία UV-Vis, κυκλικό διχρωϊσμό και φθορισμομετρία.

- Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου 0,1 M με Na⁺, 137 mM NaCl (**BufferP + Na⁺**)

Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 3,561 g Na₂HPO₄·2H₂O και αραιώνονται με απιονισμένο νερό milli-Q σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα A). Έπειτα ζυγίζονται 3,121 g NaH₂PO₄·2H₂O και αραιώνονται ομοίως με νερό milli-Q σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα B). Εν συνεχεία αναμιγνύονται 40,5 mL του διαλύματος A και 9,5 mL του διαλύματος B σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται νερό milli-Q μέχρι την χαραγή. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών νατρίου 0,1 M, το οποίο έχει pH≈7,4 και μετριέται κάθε φορά πριν τη χρήση του.

Στο ήδη παρασκευασθέν διάλυμα φωσφορικών νατρίου 0,1 M προστίθενται 0,8006 g NaCl, που ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας. Με αυτόν τον τρόπο παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείτε στα πειράματα με την BSA. Φυλλάσσεται στο ψυγείο (σκοτάδι) στους 4 °C και χρησιμοποιείτε εντός 2 ημερών από την κατασκευή του.

- Παρασκευή διαλύματος BSA και υπολογισμός συγκέντρωσής του

Ζυγίζονται περίπου 6,64 mg BSA σε σκόνη και προστίθενται σε αυτά 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου 0,1 M με Na⁺, 137mM NaCl. Το διάλυμα αφήνεται για 5 λεπτά σε ήπια ανάδευση. Έπειτα 1 ml του παρασκευασθέντος διαλύματος, αραιώνεται με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα στα 5 ml. Μετριέται η απόρροφηση στο UV-Vis με baseline το ρυθμιστικό φωσφορικών νατρίου 0,1 M με Na⁺. Η συγκέντρωση του διαλύματος BSA

υπολογίζεται από την απορρόφηση στα 280 nm με $\epsilon = 43800$. Ως baseline χρησιμοποιούμε το ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα της BSA χρησιμοποιείτε για όλα τα πειράματα εντός 10 ωρών από την κατασκευή του.

➤ Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου cisRu-PDAM με τη BSA, παρασκευάστηκε 1 σειρά διαλυμάτων BSA-(cisRu-PDAM) σε ρυθμιστικό διάλυμα (το παραπάνω), διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση της BSA και μεταβάλλοντας την τελική συγκέντρωση του συμπλόκου, έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι $R = [\text{cisRu-PDAM}]/[\text{BSA}]$. Τα διαλύματα αφέθηκαν για επώαση 1,5 ώρα και μετρήθηκε η απορρόφηση τους σε εύρος μήκους κύματος 500-200 nm. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm, σε θερμοκρασία 25 °C. Η baseline των διαλυμάτων περιείχε την αντίστοιχη ποσότητα συμπλόκου και δεν περιείχε ποσότητα BSA (η αντίστοιχη ποσότητα της σε κάθε διάλυμα συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα).

➤ Φθορισμομετρία

Για την εφαρμογή της τεχνικής αυτής, παρασκευάστηκαν τα ίδια διαλύματα σταθερής συγκέντρωσης BSA και μεταβαλλόμενης συμπλόκου cisRu-PDAM που χρησιμοποιήθηκαν στην φασματοσκοπία UV-Vis και μετρήθηκε το φάσμα εκπομπής (φθορισμός) του καθενός. Τα διαλύματα αφέθηκαν για επώαση 1,5 ώρα, πριν από την μέτρησή τους με μήκος κύματος διέγερσης $\lambda = 280$ nm. Το εύρος εκπομπής ήταν 300-900 nm, η κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm, στους 25 °C και με εύρος σχισμής εισόδου-εξόδου του μονοχρωμάτορα (slit width) 3 nm.

Για τη περαιτέρω μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου cisRu-PDAM, μελετήθηκε η ανταγωνιστική δράση των φαρμάκων phenylbutazone και ibuprofen σε σχέση με αυτό. Παρασκευάστηκε 1 σειρά διαλυμάτων (BSA-drug)-(cisRu-PDAM) σε ρυθμιστικό διάλυμα (το παραπάνω), διατηρώντας σταθερή την αναλογία $[\text{BSA}]/[\text{drug}]$ (όπου drug phenylbutazone ή ibuprofen) και ίση με 1/1 και μεταβάλλοντας την τελική συγκέντρωση του συμπλόκου, έτσι ώστε να προκύψουν οι επιθυμητοί λόγοι $R = [\text{cisRu-PDAM}]/[\text{BSA}]$. Τα διαλύματα αφέθηκαν για επώαση 1,5 ώρα και μετρήθηκε η εκπομπή (φθορισμός) του κάθε διαλύματος με μήκος κύματος διέγερσης $\lambda = 280$ nm, σε εύρος 300-900 nm. Η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν οπτικής διαδρομής 1 cm, η θερμοκρασία 25 °C και το εύρος σχισμής εισόδου-εξόδου του μονοχρωμάτορα (slit width) 3 nm.

➤ Κυκλικός διχρωϊσμός

Για τη λήψη των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού παρασκευάστηκαν 3 διαλύματα στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Το κάθε διάλυμα περιείχε αντίστοιχα, γνωστή συγκέντρωση BSA και BSA-(cisRu-PDAM) σε αναλογίες $[\text{cisRu-PDAM}]/[\text{BSA}]$ 0,59 και 3,90. Ληφθηκαν τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού τους,

στην περιοχή 400-200 nm, στους 25 °C και με κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm, αμέσως μετά την κατασκευή τους.

Σημείωση : Σε όλες τις σειρές διαλυμάτων με BSA το σύμπλοκο διαλύθηκε αρχικά σε DMSO, γι' αυτό σε κάθε διάλυμα προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα DMSO ώστε τελικά να μένει σταθερή και μικρότερη του 3 % v/v.

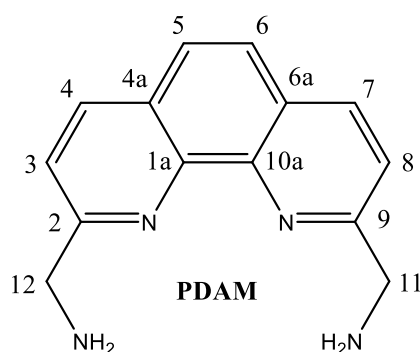
- Υπολογισμός ενέργειας FRET (fluorescence resonance energy transfer)

Για τον υπολογισμό της ενέργειας FRET μετρήθηκε η απορρόφηση UV-Vis διαλύματος συμπλόκου cisRu-PDAM 2×10^{-6} M (200-600 nm) και ο φθορισμός διαλύματος BSA στην ίδια ακριβώς συγκέντρωση (διέγερση στα 280 nm, εύρος μέτρησης 300-900 nm, slit width 3 nm). Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ακριβώς το ίδιο, με pH=7,42 και ίδια ιοντική ισχύ, η θερμοκρασία 25 °C και η κυψελίδες 1 cm.

Κεφάλαιο 8° : Σύνθεση και χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη PDAM και του πρόδρομου συμπλόκου cis-Ru(DMSO)₄Cl₂

8.1 Σύνθεση της PDAM

Το νέο παράγωγο της 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης, 2,9-δι(αμινομέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνη (PDAM), συντέθηκε και χαρακτηρίστηκε στο εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ, από την ερευνητική ομάδα του Αν. Καθηγητή, Κώστα Μεθενίτη. Η πορεία που ακολουθήθηκε, σχεδιάστηκε σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Οι μεθυλομάδες στις 2,9-θέσεις της αρχικής ένωσης, αντικαθίστανται με αμινομάδες –NH₂. Όλα τα ενδιάμεσα προϊόντα χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές NMR, UV-Vis, IR και MS (παράρτημα), όπως και το τελικό προϊόν της PDAM. Ο συντακτικός τύπος του υποκαταστάτη PDAM φαίνεται στο σχήμα 8.1 (με την αντίστοιχη αρίθμηση που έγινε για την διευκόλυνση της απόδοσης των φασμάτων NMR στα ενδιάμεσα και στο τελικό προϊόν).



Σχήμα 8.1 : Συντακτικός τύπος 2,9-(διαμινομέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης (PDAM)

- Σύνθεση **PDALD**

Σε δλιαιμη φιάλη τοποθετούνται 31 mmol (3,45 g) SeO₂ και διαλύονται σε 75,00 mL διοξάνιο και 3,00 mL H₂O υπό συνεχή ανάδευση, έως ότου να διαλυθούν πλήρως οι κρύσταλλοι του στερεού. Παράλληλα σε άλλη σφαιρική, 14,4 mmol (3,00 g) 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης (νεοκουπρίνης) διαλύονται σε 75,00 mL διοξάνιο. Στο θερμό διάλυμα του SeO₂ προστίθεται στάγδην το διάλυμα της 2,9-(διμέθυλο)-1,10-φαινανθρολίνης σε χρόνο 30 λεπτών και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε ελαιόλουτρο (101 °C) με χρήση αναρροής για 30 λεπτά επιπλέον. Κατά την ανάμειξη το διάλυμα από διαυγές γίνεται πορτοκαλοκόκκινο. Το SeO₂ δρά ως τοποεκλεκτικό ήπιο οξειδωτικό, μετατρέποντας στις 2,9 μεθυλικές ομάδες σε αλδευδικές. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εν θερμώ διήθηση από celite για την απομάκρυνση υπολειμμάτων του SeO₂ και έκπλυση με θερμό διοξάνιο (η αλδεύδη είναι αδιάλυτη στο ψυχρό). Το διήθημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματιού για 24 ώρες. Έπειτα, πραγματοποιείτε διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner, έκπλυση με διαιθυλαιθέρα (3 · 10,00 mL) και παραλαμβάνεται πορτοκαλοκίτρινο στερεό

(PDALD), το οποίο ανακρυσταλλώνεται από THF (τετραϋδροφουράνιο). Ζυγίστηκαν 1,3 g PDALD. Απόδοση $\alpha=38,2\%$

- Σύνθεση **PDOX**

Σε σφαιρική φιάλη των 250,00 mL, διαλύονται με τη βοήθεια θέρμανσης 5,1 mmol (1,2 g) PDALD και 34,5 mmol (2,4 g) υδροχλωρική υδροξυλαμίνη, σε 4,8 mL πυριδίνη και 80 mL absolute EtOH. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε ελαιόλουτρο (95 °C) με χρήση αναρροής για ακόμα 3 ώρες περίπου. Μετά το τέλος της αντίδρασης εμφανίζεται ανοιχτό καφέ ίζημα. Αφήνουμε το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να κρυώσει και πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και έκπλυση με παγωμένο H₂O (3 · 10,00 mL) και κρύο διαιθυλεθέρα (2 · 10,00 mL). Παραλαμβάνονται καφέ κόκκοι στερεού (**PDOX**) που ανακρυσταλλώνονται από DMSO και H₂O σε αναλογία 55:45. Ζυγίστηκαν 1,25 g PDOX. Απόδοση $\alpha=92,3\%$

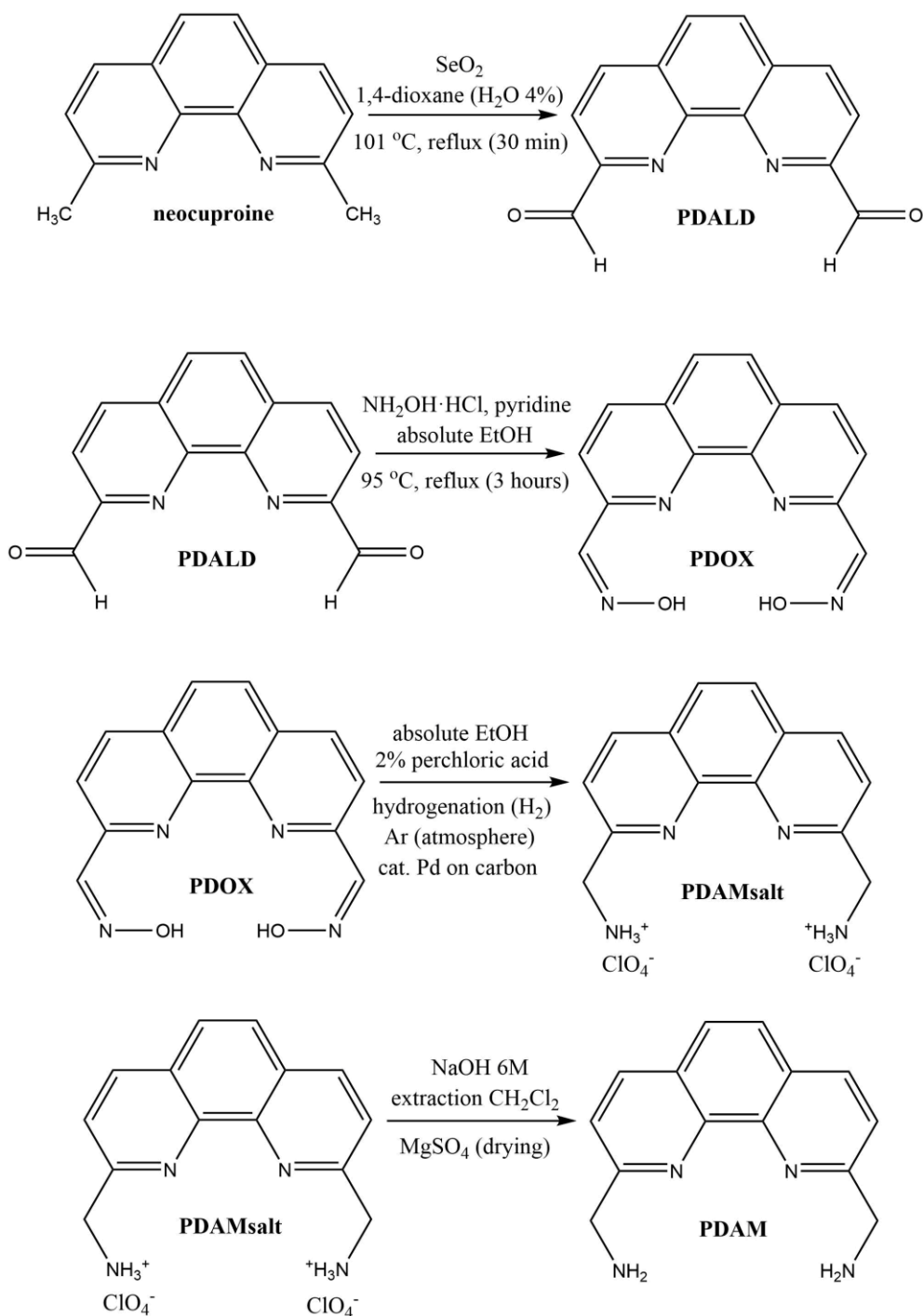
- Σύνθεση **PDAMsalt**

Σε σφαιρική φιάλη των 500,00 mL διαλύονται 4,5 mmol (1,2 g) PDOX σε 231,6 mL absolute EtOH και 8,4 mL HClO₄ 60%. Αφού διαλυθούν πλήρως, προστίθενται 2,3 mmol (0,24 g) παλλάδιο προσροφημένο σε άνθρακα (Pd on carbon). Στη συνέχεια, γίνεται απαέρωση παγώνοντας τη φιάλη σε υγρό N₂ υπό κενό και μετά αφήνοντάς την να ξεπαγώσει. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία άλλες δύο φορές. Έπειτα, διαβιβάζεται Ar γιατί απαιτούνται αδρανείς συνθήκες, προκειμένου πραγματοποιηθεί η υδρογόνωση της οξίμης. Πραγματοποιείται η παροχή υδρογόνου υπό έντονη ανάδευση για μιάμιση ώρα. Το χρώμα του διαλύματος γίνεται από σκούρο μαύρο, γκριζωπό. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση, το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε ελαιόλουτρο (78 °C) με χρήση αναρροής για ακόμα μισή ώρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εν θερμώ διήθηση από celite για την απομάκρυνση υπολειμμάτων του Pd on carbon και έκπλυση με θερμή EtOH. Το διήθημα συμπυκνώνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή έως ελάχιστου όγκου διαλύτη και αφήνεται στο ψυγείο για 24 ώρες για να καταβυθιστεί το στερεό άλας. Τέλος, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και έκπλυση με παγωμένη αιθανόλη, για παραλαβή του **PDAM(salt)**. Η ουσία ανακρυσταλλώνεται από απόλυτη EtOH και διαιθυλαιθέρα σε αναλογία 1:1 και εκπλένεται από το ίδιο μείγμα διαλυτών. Ζυγίστηκαν 0,9 g PDAM(salt). Απόδοση $\alpha=45,5\%$

- Σύνθεση **PDAM**

Σε κωνική φιάλη διαλύονται 0,9 g άλας της αμίνης σε 20,00 mL απόλυτης EtOH. Προσθέτουμε στάγδην ~10,00 mL υδατικού διαλύματος NaOH, συγκέντρωσης 6 M, έως ότου το pH το διαλύματος να φτάσει το 12-13. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) και συγκεντρώνεται η οργανική φάση. Συνολικά, πραγματοποιούνται 5 εκχυλίσσεις με (5 · 60 mL) διχλωρομεθάνιο. Έπειτα, προστίθεται ξηραντικό άνυδρο MgSO₄

ή Na_2SO_4 και το διάλυμα αφήνεται ολόκληρη τη νύχτα σε σφαιρική φιάλη, υπό αργή ανάδευση. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό για να απομακρυνθεί το ξηραντικό και παραλαμβάνεται η οργανική φάση, ώστε να συμπυκνωθεί σε ελαχίστου όγκου διαλύτη. Αφήνεται στο ψυγείο (~24h) για να καταβυθιστεί πλήρως το ίζημα και στη συνέχεια διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με κρύο διαιθυλεθέρα. Παραλαμβάνουμε καφέ στερεό (**PDAM**). Ζυγίστηκαν 0,1 g αμίνης. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε $\alpha=46,7\%$.^[175-178]



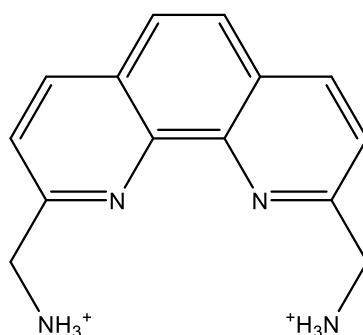
Σχήμα 8.2 : Πορεία σύνθεσης της PDAM

8.2 Χαρακτηρισμός της PDAM

Το μόριο της PDAM χαρακτηρίστηκε στην ερευνητική εργασία ειδίκευσης της Ρ. Παππά (2019).^[179] Παρακάτω, επαναλήφθηκε ο χαρακτηρισμός της με τεχνικές φασματομετρίας μάζας MS, φασματοσκοπίας IR, UV-Vis και φθορισμομετρίας και είναι σε απόλυτη συμφωνία. Κατόπιν, παρατίθενται οι χημικές μετατοπίσεις των φασμάτων NMR της PDAM σε d6-DMSO, ενώ τα αντίστοιχα φάσματα ¹H-NMR, ¹H-¹H-COSY και ¹³C-NMR παρουσιάζονται στο παράρτημα.

¹H-NMR (d6-DMSO): 4.09 (H_{11,12} singlet), 8.39 (H_{4,7} doublet), 7.82 (H_{3,8} doublet), 7.87 (H_{5,6} singlet) ppm. **¹³C-NMR** (d6-DMSO): 163.25 (C_{2,9}), 144.87 (C_{10a,10b}), 137.28 (C_{4,7}), 126.43 (C_{5,6}), 127.92 (C_{4a,6a}), 121.82 (C_{3,8}), 48.44 (C_{11,12}) ppm (αρίθμηση σύμφωνα με το σχήμα 8.1, § 8.1).^[7]

Επιπλέον, με φασματοσκοπική μελέτη της επίδρασης του pH, βρέθηκε ότι η PDAM είναι ισχυρή βάση και σε pH=7 (υδατικό διάλυμα), οι (2,9)-NH₂ αμινομάδες είναι πρωτονιομένες (pK_a~9 για την πρωτονιομένη της μορφή, BH₂²⁺).



Σχήμα 8.3: PDAM στην πρωτονιομένη μορφή της BH₂²⁺

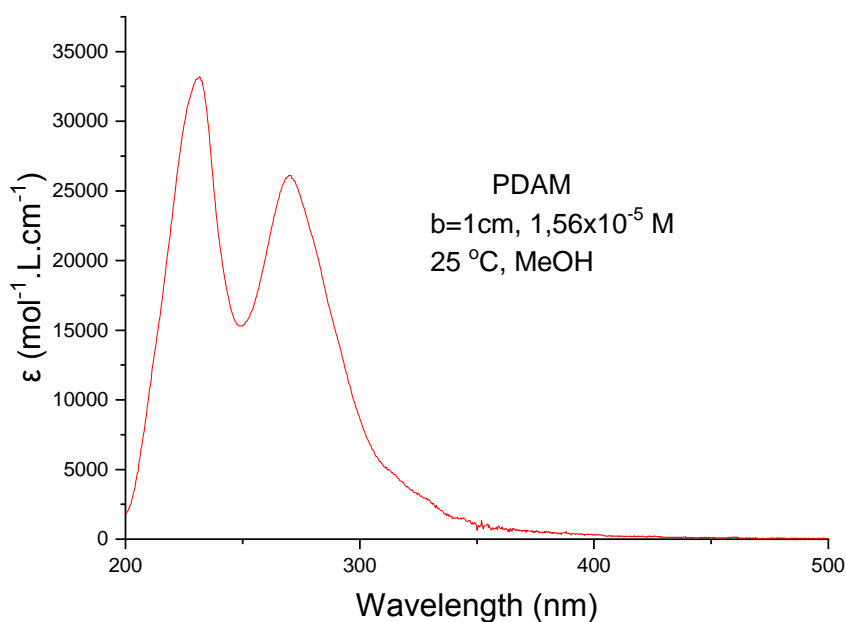
8.2.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

Το φάσμα UV-Vis του υποκαταστάτη PDAM σε μεθανόλη και σε συγκέντρωση 1,56x10⁻⁵ M, φαίνεται στο σχήμα 8.4. Στο πίνακα 6 παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του σε αυτό το σύστημα διαλύτη και η απόδοση των κορυφών του.

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης UV-Vis του υποκαταστάτη PDAM σε μεθανόλη

Διαλύτης	λ _{max}	ε(mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹)	Απόδοση
Μεθανόλη	231	33100	IL
	270	26100	(π→π* και
	292(sh)	13200	n→π*)

	315	3300	
	329	2900	



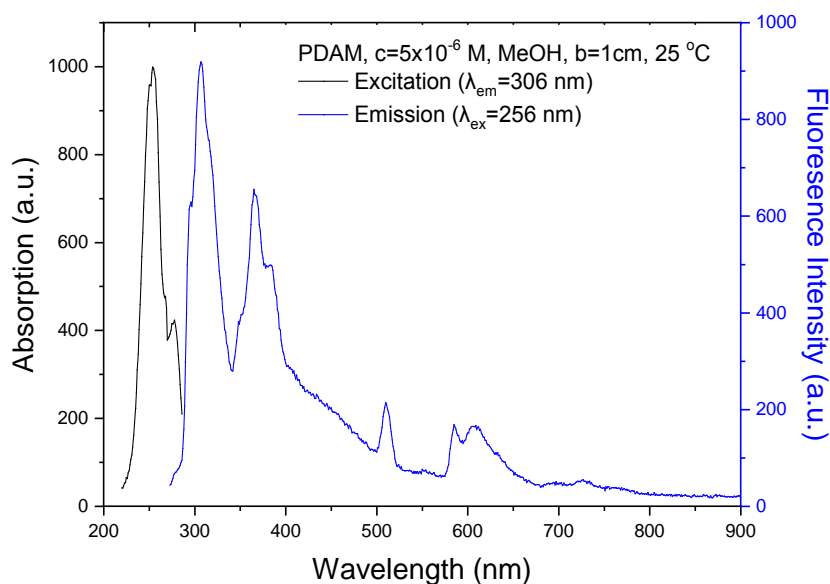
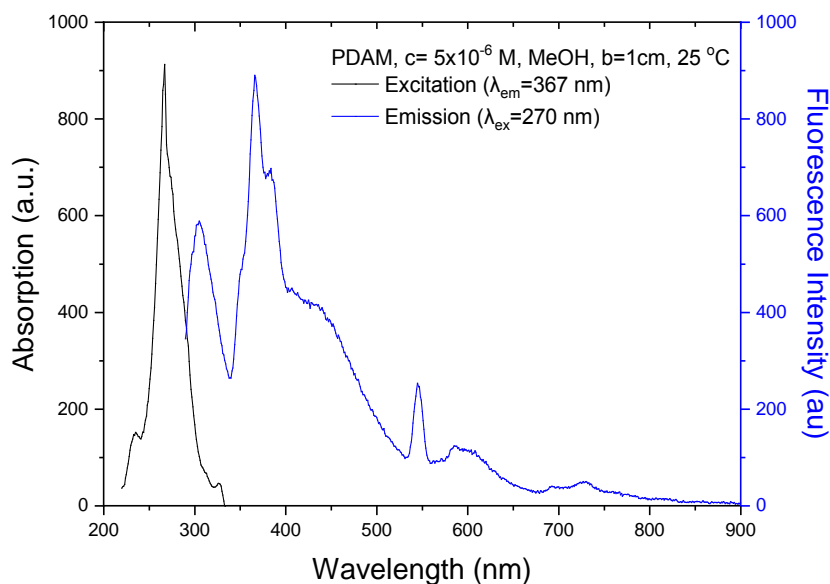
Σχήμα 8.4: Φάσμα UV-Vis της PDAM σε μεθανόλη

Στα φάσματα της PDAM σε μεθανόλη, διακρίνονται δύο πολύ ισχυρές ταινίες απορρόφησης στα 231 nm και 271 nm, ένας ώμος στα 292 nm και δύο ασθενής κορυφές στα 315 nm και 329 nm. Οι κορυφές αυτές έχουν χαρακτηριστική ένταση $\pi \rightarrow \pi^*$ και $n \rightarrow \pi^*$ (IL : IntraLigand) ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων του επιπέδου αρωματικού συστήματος της 1,10-φαινανθρολίνης. Μάλιστα, οι ισχυρές κορυφές του υποκαταστάτη σε μήκη κύματος μικρότερα των 300 nm είναι χαρακτηριστικές και σε άλλα παράγωγα της rhen και αποδίδονται σε IL μεταπτώσεις σε απλές (singlet) διεγερμένες καταστάσεις.^[3, 80, 180]

8.2.2 Φθορισμομετρία

Η τεχνική της φθορισμομετρίας εφαρμόστηκε για το χαρακτηρισμό της PDAM. Το μόριο της PDAM φθορίζει έντονα και τα φάσματα εκπομπής και διέγερσης της σε μεθανόλη παρουσιάζονται στο σχήμα 8.5 και στον πίνακα 7 συνοψίζονται τα μήκη κύματος εκπομπής της PDAM στον συγκεκριμένο διαλύτη. Η συγκέντρωση της PDAM είναι 5×10^{-6} M. Τα μήκη κύματος διέγερσης είναι 256 nm και 270 nm. Οι ταινίες εκπομπής που παρατηρούνται, οφείλονται σε αποδιέγερση των IL ηλεκτρονικών μεταπτώσεων με κύρια συνεισφορά των $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεων. Οι $n \rightarrow \pi^*$ διεγερμένες καταστάσεις συνήθως αποδιεγείρονται με τρόπο που δεν εκπέμπουν ακτινοβολία, γι' αυτό δεν παρουσιάζουν φθορισμό. Εκεί βασίζεται μια αποτελεσματική στρατηγική για να

βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα του φθορισμού παραγώγων φαινανθρολίνης. Γίνεται εισαγωγή κατάλληλων ομάδων στο δακτύλιο της φαινανθρολίνης, ώστε να αυξηθεί η ενέργεια μεταξύ των $\pi \rightarrow \pi^*$ και $n \rightarrow \pi^*$ ενεργειακών επιπέδων με στόχο την αύξηση της εκπομπής, στο φθορισμό.^[3, 9]



Σχήμα 8.5: Τα φάσματα φθορισμού της PDAM σε μεθανόλη

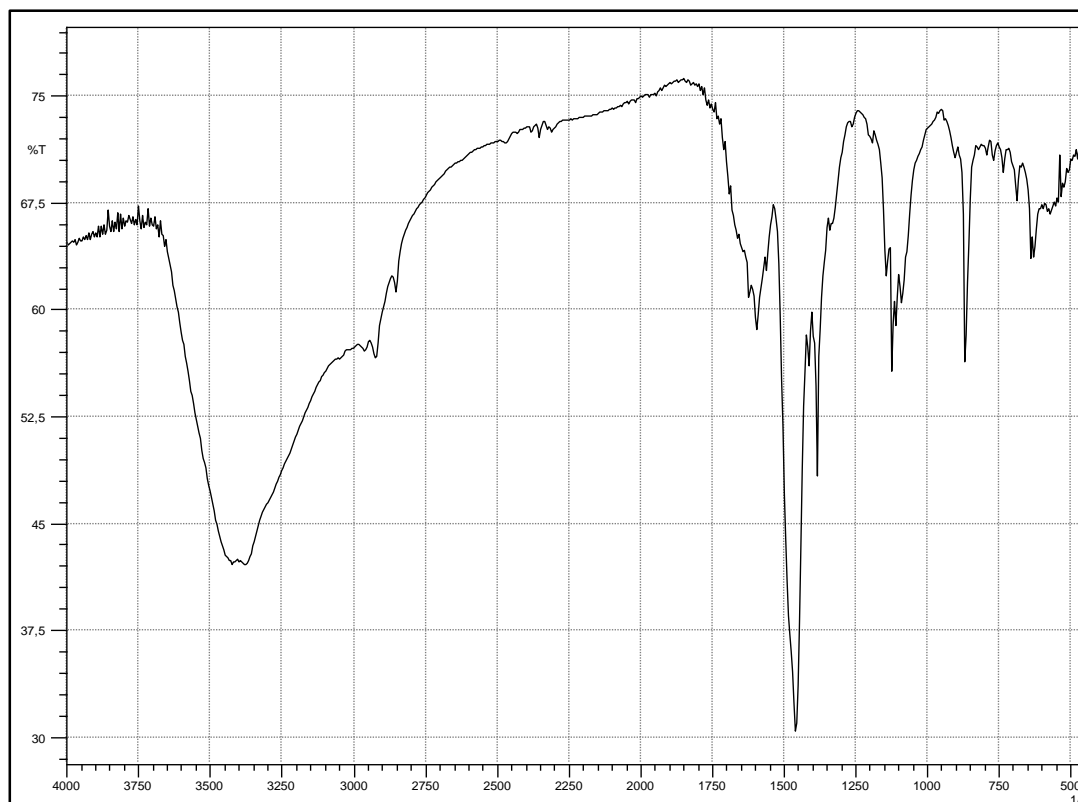
Πίνακας 7: Μήκη κύματος εκπομπής και της αντίστοιχης διέγερσης (σε nm) για την PDAM σε μεθανόλη

Διαλύτης	Μήκος κύματος διέγερσης (nm)	Μήκος κύματος εκπομπής (nm)

Μεθανόλη	256	306, 367, 384, 436, 585, 607
	270	306, 367, 384, 436, 585

8.2.3 Φασματοσκοπία IR

Η PDAM χαρακτηρίστηκε επίσης με φασματοσκοπία υπερέυθρου (IR) και το αντίστοιχο φάσμα παρουσιάζεται στο σχήμα 8.6.



Σχήμα 8.6: Φάσμα υπερέυθρου της PDAM

Από το παραπάνω φάσμα IR μπορούμε να εντοπίσουμε τις χαρακτηριστικές και αναμενόμενες κορυφές για τον υποκαταστάτη. Οι σημαντικότερες φαίνονται στον Πίνακα 8.^[176, 181-183]

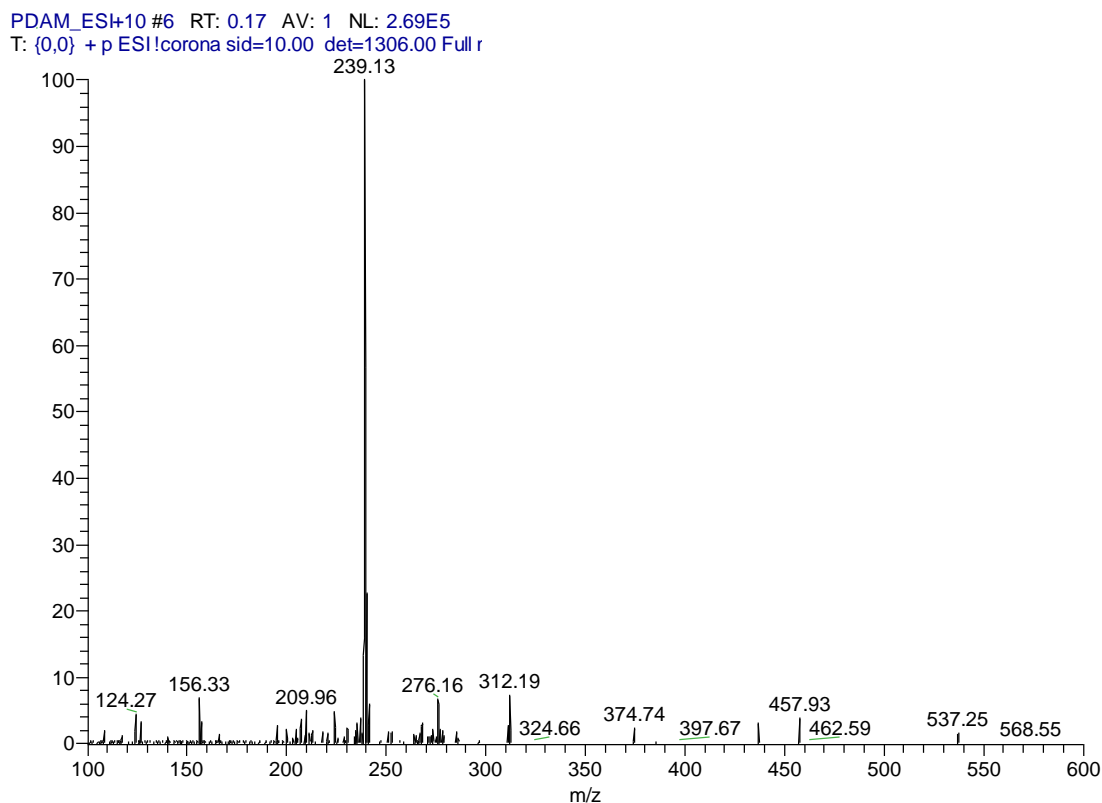
Πίνακας 8: Οι χαρακτηριστικές ταινίες του φάσματος IR του υποκαταστάτη PDAM

Κυματριθμοί	Απόδοση κορυφών
865 cm ⁻¹	Δόνηση τάσης δεσμού -C-N
1089-1124 cm ⁻¹	Δονήσεις έκτασης δεσμού -C-N
1596 cm ⁻¹	Δόνηση έκτασης δεσμού -C=N
1622 cm ⁻¹	Δόνηση τάσης δεσμού -C=C
2928-2960 cm ⁻¹	Δονήσεις έκτασης δεσμού αλειφατικών -H

3045 cm ⁻¹	Δόνηση έκτασης δεσμού αρωματικών –H
3294 και 3372 cm ⁻¹	Δονήσεις έκτασης δεσμού –N-H

8.2.4 Φασματοσκοπία μάζας (MS)

Το φάσμα μάζας MS της PDAM με θετικό ιοντισμό παρουσιάζεται στο σχήμα 8.7 και λήφθηκε σε διαλύτη μεθανόλη.



Σχήμα 8.7: Φάσμα MS για την PDAM σε διαλύτη μεθανόλη

Το κύριο θραύσμα που προκύπτει από το φάσμα ESI-MS (m/z) με θετικό ιοντισμό, είναι το [C₁₄H₁₄N₄⁺] ([M+H]⁺), με m/z ίσο με 239.13.^[184]

8.3 Σύνθεση του συμπλόκου cis-Ru(DMSO)₄Cl₂

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL (ή μικρότερη) που περιέχει 5 mL DMSO προστίθεται 1 g RuCl₃·xH₂O. Στη φιάλη προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το μείγμα θερμαίνεται ήπια (προτείνεται η χρήση ελαιολούτρου) μέχρι πλήρους διαλύσεως του στερεού. Το στάδιο αυτό διαρκεί περίπου 30 λεπτά. Σε όλο αυτό το διάστημα η φιάλη ανακινείται συνεχώς με το χέρι. Η μαγνητική ανάδευση δεν ενδείκνυται καθώς ο μαγνήτης κολλάει συνεχώς στο αδιάλυτο στερεό. Είναι σημαντικό να διαλυθεί όλο το RuCl₃ πριν αυξηθεί η θερμοκρασία. Καθώς η

θερμοκρασία αυξάνει το διάλυμα γίνεται πορτοκαλί (στην αρχή είναι σχεδόν μαύρο) και σταδιακά πιο ρευστό. Η θέρμανση παρατείνεται για ακόμα 15 λεπτά με συνεχή ανακίνηση. Κάποια στιγμή σε αυτό το στάδιο, όταν το διάλυμα είναι πολύ λεπτόρρευστο, προκαλείται στιγμιαίος βρασμός και το χρώμα μετατρέπεται από πορτοκαλί σε καφέ-κίτρινο. Το διάλυμα διατηρείται θερμό ακόμα 10 λεπτά, διατηρώντας όμως το βρασμό υπό έλεγχο και απομακρύνοντας περιοδικά τη φιάλη από την πηγή της θερμότητας, αν αυτό είναι απαραίτητο. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου παρατηρείται συχνά ο σχηματισμός ενός κηρώδους στερεού στα τοιχώματα του ψυκτήρα το οποίο έχει βρεθεί ότι είναι παραφορμαλδεΐδη.

Κατόπιν το μείγμα συμπυκνώνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή, υπό θέρμανση, μέχρι οι πρώτοι κρύσταλλοι του προϊόντος να αρχίσουν να σχηματίζονται. Το στάδιο αυτό διαρκεί περίπου 15 λεπτά. Προτείνεται το μείγμα να αφήνεται κατά διαστήματα προς ψύξη μιας και οι κρύσταλλοι δε σχηματίζονται σε πολύ υψηλή θερμοκρασία. Το μείγμα ψύχεται και προστίθενται 20 ml ακετόνης. Μετά από περίπου 30 λεπτά το μείγμα διηθείται και το κίτρινο προϊόν εκπλένεται με ακετόνη και αφήνεται να ξηρανθεί. Το σύμπλοκο μπορεί να ανακρυσταλλωθεί από μείγμα ακετόνης / DMSO 6:1 χωρίς όμως αυτό να είναι απαραίτητο. Η απόδοση κυμαίνεται από 70-80 %.

Το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία UV-Vis και IR και είναι σε απόλυτη συμφωνία με την βιβλιογραφία.^[41, 185]

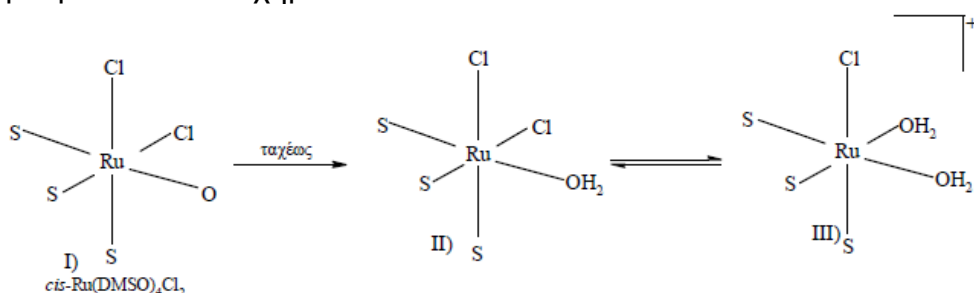
8.4 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου cis-Ru(DMSO)₄Cl₂

8.4.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

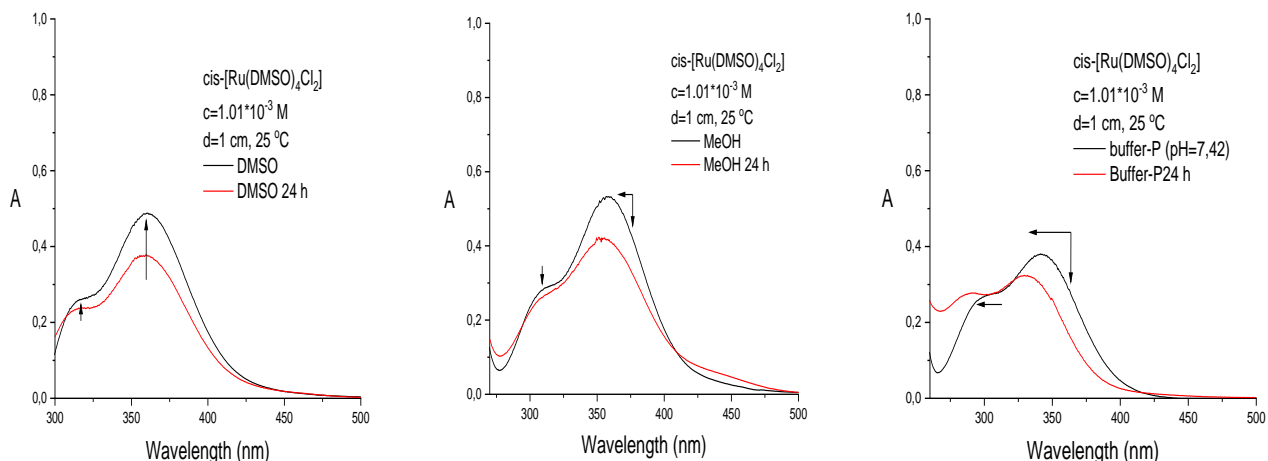
Στο σχήμα 8.8 παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis του συμπλόκου σε 0 ώρες και 24 ώρες από την διάλυσή του στο κάθε διαλύτη. Η συγκέντρωση σε όλες τις περιπτώσεις είναι 1,01x10⁻³ M.

Σχήμα 8.8: Φάσματα UV-Vis του cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ σε DMSO, MeOH, BufferP 0 και 24 ώρες μετά την διάλυσή του

Η χημική συμπεριφορά του συμπλόκου cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ σε υδατικό διάλυμα φαίνεται στο σχήμα 8.9.



Σχήμα 8.9: Χημική συμπεριφορά του cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ σε υδατικό διάλυμα



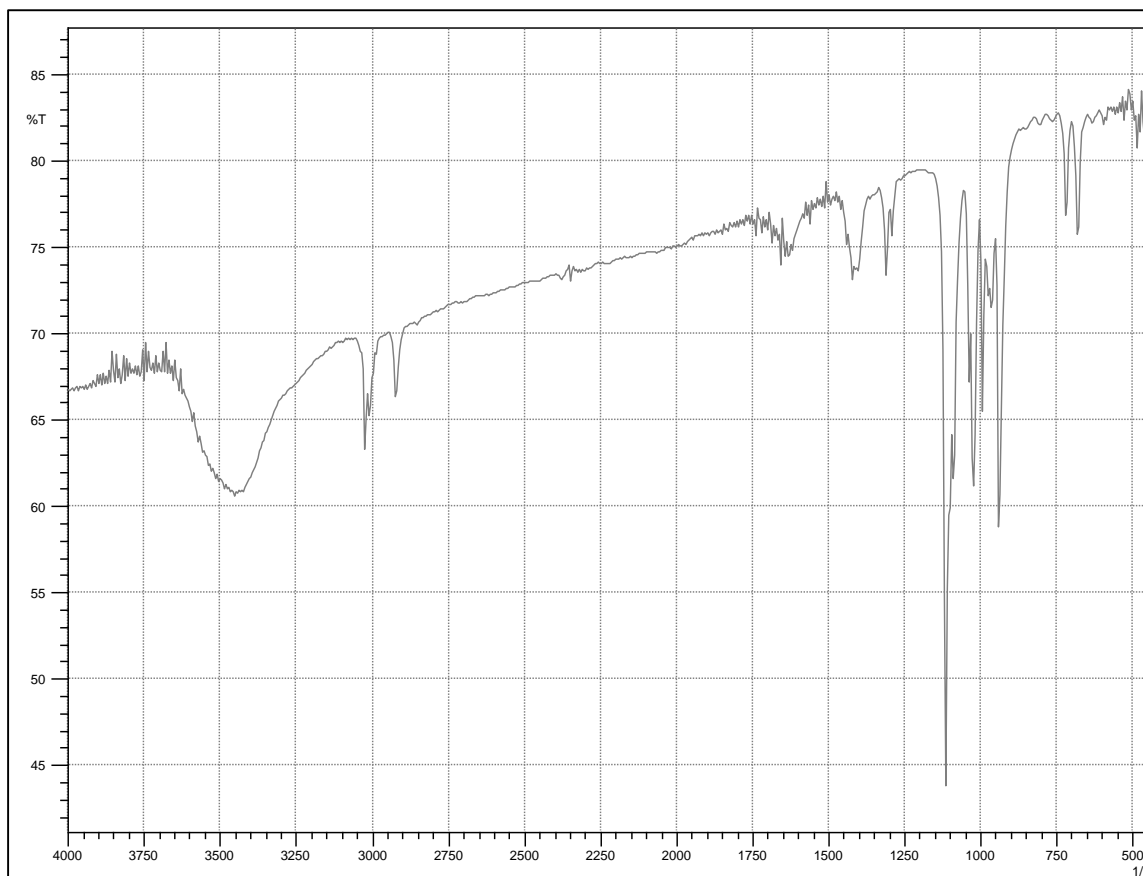
Αμέσως μόλις διαλύεται το σύμπλοκο αντικαθιστά το DMSO που είναι συμπλεγμένο μέσω του οξυγόνου του με νερό και εντός 12 ωρών αντικαθίσταται το ένα χλώριο με μόριο νερού. Η παρουσία ελεύθερων ιόντων χλωρίου στο διάλυμα αναστέλλει την αποχώρηση του χλωρίου στο τελευταίο στάδιο. Ο μηχανισμός αυτός είναι σημαντικός για την δραστικότητα του συμπλόκου στην αλληλεπίδραση με το DNA (παράρτημα). Οι έντονες μεταβολές του φάσματος UV-Vis του συμπλόκου (341 nm \rightarrow 326 nm και 300 nm \rightarrow 290 nm) σε 24 ώρες, στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (BufferP) ερμηνεύονται βάση του παραπάνω μηχανισμού.

Από το θεωρητικό μέρος, ξέρουμε ότι τα σύμπλοκα Ru(II) είναι οκταεδρικά χαμηλού spin. Η θεωρία για τα d^6 σύμπλοκα οκταεδρικού πεδίου προβλέπει δύο $d \rightarrow d$ μεταπτώσεις. Στην περίπτωση του cis-Ru(DMSO) $_4$ Cl $_2$ η γεωμετρία είναι παραμορφωμένη σε βαθμό που θεωρείτε κατά προσέγγιση C_{2v} και περιμένουμε 6 μεταπτώσεις. Τελικά, αυτές εμφανίζονται ομαδοποιημένες σε δύο ομάδες, όπου $A_2 + B_1 + B_2 \rightarrow {}^1A_{1g}$ δίνει την ταινία στα 355 nm και η $A_1 + B_1 + B_2 \rightarrow {}^1A_{1g}$ που δίνει τον ώμο στα 307 nm, σε διαλύτη DMSO.

Κατόπιν, πηγαίνοντας από το DMSO στην μεθανόλη και στο ρυθμιστικό διάλυμα βλέπουμε μια μετατόπιση των κορυφών του συμπλόκου σε μικρότερα μήκη κύματος. Χαρακτηριστική είναι η απορρόφηση της ταινίας όπου εμφανίζεται στα 358 nm στο DMSO, στα 354 nm στη μεθανόλη και στα 326 nm στο ρυθμιστικό διάλυμα. Η παρατήρηση αυτή οφείλεται σε αρνητικό διαλυτοχρωμικό φαινόμενο και έχει να κάνει με την πολικότητα του διαλύτη, δεδομένου ότι αλλάζει η πολικότητα του μορίου όταν ένα ηλεκτρόνιο μεταβαίνει από ένα τροχιακό σε άλλο. [76, 92, 186, 187]

8.4.2 Φασματοσκοπία IR

Το σύμπλοκο $\text{cis-Ru(DMSO)}_4\text{Cl}_2$ χαρακτηρίστηκε επίσης με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και το αντίστοιχο φάσμα παρουσιάζεται στο σχήμα 8.10.



Σχήμα 8.10: Φάσμα υπερύθρου του $\text{cis-Ru(DMSO)}_4\text{Cl}_2$

Στην κρυσταλλική κατάσταση το $\text{cis-Ru(DMSO)}_4\text{Cl}_2$ έχει παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία με τα 3 από τα 4 μόρια DMSO να δεσμεύονται στο ρουθίνιο μέσω του ατόμου S σε facial διαμόρφωση, ενώ το τέταρτο DMSO δεσμεύεται μέσω του ατόμου O. Στο φάσμα IR είναι χαρακτηριστικές οι δονήσεις έκτασης στα $1087(\text{m}) \text{ cm}^{-1}$, $1097(\text{sh}) \text{ cm}^{-1}$ και $1115(\text{s}) \text{ cm}^{-1}$, οι οποίες αποδίδονται στο S-δεσμευμένο DMSO, ενώ εμφανίζεται και μια ισχυρή δόνηση στα 938 cm^{-1} που αποδίδεται στο O-συμπλεγμένο DMSO (έκταση δεσμού Ru-O). Εδώ αξίζει να αναφέρουμε ότι η απόσταση Ru-S για το cis σύμπλοκο είναι μικρότερη σε σχέση με το αντίστοιχο $\text{trans-Ru(DMSO)}_4\text{Cl}_2$. Αυτό οφείλεται στην trans επίδραση του S και στην ισχυρότερη π-οπισθοσύνδεση που παρουσιάζουν τα trans διευθετημένα DMSO, ενώ συνεισφέρει και η στερική παρεμπόδιση λόγω συνωστισμένων DMSO στην trans διευθέτηση. Οι παραπάνω λόγοι είναι και αυτοί που δικαιολογούν την υψηλότερη σταθερότητα του cis συμπλόκου έναντι του trans. Βιβλιογραφικά, για το trans ισομερές περιμένουμε μια ισχυρή δόνηση στα 1086 cm^{-1} (S-δεσμευμένο του DMSO), κάτι που δεν βλέπουμε στο παραπάνω φάσμα. Τέλος, η δόνηση έκτασης του δεσμού Ru-Cl αναμένεται στα 338 cm^{-1} , κάτι που δεν μπορούμε να παρατηρήσουμε με βεβαιότητα στο φάσμα IR του συμπλόκου.^[76]

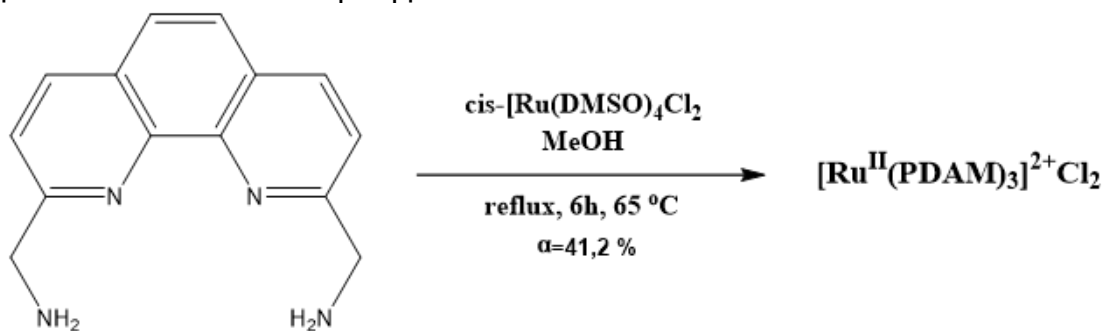
Κεφάλαιο 9^ο : Σύνθεση και χαρακτηρισμός του συμπλόκου cisRu-PDAM

9.1 Σύνθεση του συμπλόκου cisRu-PDAM

Η σύνθεση του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε ως εξής: σε μια σφαιρική φιάλη των 50 mL διαλύονται 50 mg (0,21 mmol) της PDAM σε 15 mL μεθανόλης σε σταθερή θερμοκρασία 65 °C και προστίθενται σε αυτό 15 mL μεθανολικού διαλύματος 33,9 mg cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ (0,07 mmol). Πραγματοποιείται θέρμανση με αναρροή (reflux) στους 65 °C για 6 ώρες. Το χρώμα του αρχικά υποκίτρινου διαλύματος του υποκαταστάτη PDAM μεταβάλλεται σε σκούρο πορτοκαλοκόκκινο αμέσως μετά την προσθήκη του διαλύματος του μετάλλου. Μετά το πέρας των 6 ωρών, το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται συμπύκνωση, μέχρι τον ελάχιστο όγκο διαλύτη, και το διάλυμα μένει στο ψυγείο όλη τη νύχτα, προκειμένου να καταβυθιστεί το επιθυμητό σύμπλοκο. Το μείγμα διηθείται και παραλαμβάνεται σκούρο μαύρο στερεό το οποίο εκπλένεται με κρύα μεθανόλη. Παραλαμβάνονται 15 mg συμπλόκου cisRu-PDAM (0,017 mmol), με απόδοση της αντίδρασης ίση με α=41,2%.

Λόγω απουσίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων δεν μπορεί να καθοριστεί με βεβαιότητα η δομή του συμπλόκου. Αυτό, χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία UV-Vis, φθορισμομετρία, IR, κυκλικό διχρωϊσμό, ¹H-NMR και φασματομετρία MS. Τα διαλύματα στην μέθοδο Job και τις τιτλοδοτήσεις αφέθηκαν για επώαση 72 ώρες αφού το ιόν του Ru(II) είναι κινητικά αδρανές και χρειάζεται 24 έως 48 ώρες για να ολοκληρώσει τις αντιδράσεις του.^[41] Μετά από έλεγχο διαλυτότητας, το σύμπλοκο είναι αδιάλυτο σε νερό, μεθανόλη, ρυθμιστικό διάλυμα, διχλωρομεθάνιο και χλωροφόρμιο σε συγκεντρώσεις άνω του 10⁻³ M. Έχει υψηλότερη διαλυτότητα (2-3 mg/ml) σε ακετονιτρίλιο και είναι πλήρως διαλυτό σε ακόμα πιο πυκνά διαλύματα, σε DMSO (5 mg/ml).

Προτείνεται, η δισχιδής σύμπλεξη του ρουθηνίου μέσω τον φαινανθρολικών ατόμων αζώτου του υποκαταστάτη, σε αναλογία μετάλλου/υποκαταστάτη ίση με 1/3.



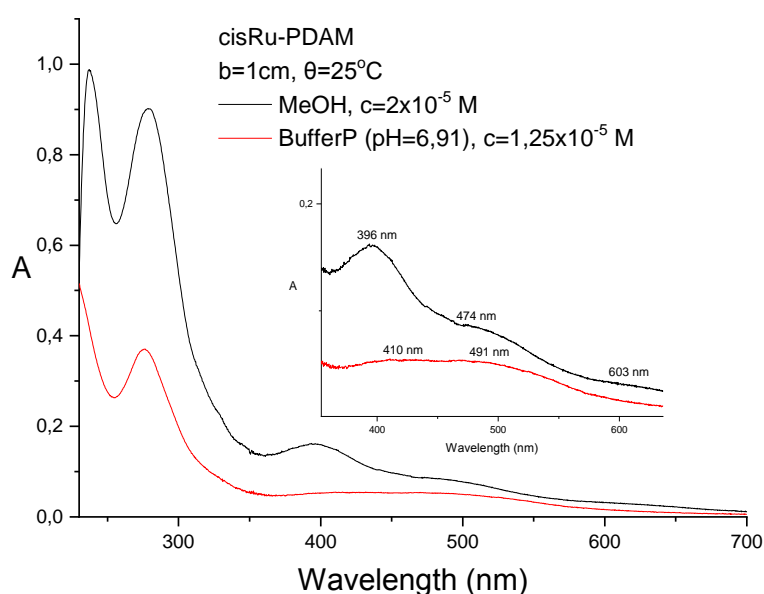
Σχήμα 9.1: Πορεία σύνθεσης του συμπλόκου cisRu-PDAM

9.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου cisRu-PDAM

9.2.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα UV-Vis του συμπλόκου σε διαλύτες μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (BufferP), φαίνονται στο σχήμα 9.2, ενώ στον πίνακα 9 παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά του χαρακτηριστικά στα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών.

Αν συγκρίνουμε το φάσμα του συμπλόκου σε μεθανόλη με αυτό της PDAM μπορούμε εύκολα να επιβεβαιώσουμε την σύμπλεξη του υποκοταστάτη με το μέταλλο. Συγκεκριμένα, η απορρόφηση της PDAM έχει μετατοπιστεί από τα 270 nm στα 279 nm και από 231 nm σε 236 nm, ενώ οι ασθενείς ταινίες στα 315 nm και 329 nm έχουν σχεδόν εξαφανιστεί. Οι μεταβολές αυτές, δικαιολογούνται στην περίπτωση που η σύμπλεξη επηρεάζει άμεσα το χρωμοφόρο ($\pi \rightarrow \pi^*$ και $n \rightarrow \pi^*$ ηλεκτρονικές μεταπτώσεις (§8.2.1)), δηλαδή το φαινανθρολινικό δακτύλιο και για το λόγο αυτό προτείνεται ότι η σύμπλεξη πραγματοποιείται μέσω των ατόμων N της φαινανθρολινικής ομάδας.



Σχήμα 9.2: Φάσματα UV-Vis του συμπλόκου cisRu-PDAM σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα

Ταυτόχρονα, και στα δύο συστήματα διαλυτών εμφανίζονται ασθενείς ευρείες ταινίες απορρόφησης στην περιοχή 400-600 nm. Το σύμπλοκο του ρουθηνίου είναι οκταεδρικό χαμηλού spin d^6 σύστημα και αναμένουμε 2 d-d μεταπτώσεις στο ορατό ($^1A_1 \rightarrow ^3T_1$ και $^1A_1 \rightarrow ^1T_1$). Κατόπιν, σύμπλοκα του Ru(II) με πολυπυριδιλικούς υποκαταστάτες εμφανίζουν ταινίες απορρόφησης στο ορατό που οφείλονται σε MLCT μεταπτώσεις. Συνεπώς, οι κορυφές αυτές αποδίδονται σε d→d ή MLCT μεταπτώσεις, χωρίς να μπορούμε να

αποδόσουμε με βεβαιότητα την κάθε μια ξεχωριστά. Τέλος, η διαφορά στην κορυφή στα 276 nm στο ρυθμιστικό και στα 279 nm στη μεθανόλη οφείλονται σε αρνητικό διαλυτοχρωμικό φαινόμενο.^[3, 79, 80, 187, 188]

Πίνακας 9: Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά συμπλόκου cisRu-PDAM σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

Διαλύτης	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\epsilon(\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	Απόδοση
BufferP	276	29600	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$)
	410	4400	$d \rightarrow d$ ή MLCT
	491	4200	$d \rightarrow d$ ή MLCT
Μεθανόλη	237	49500	IL
	279	45000	($\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$)
	396	8100	$d \rightarrow d$ ή MLCT
	474	4400	$d \rightarrow d$ ή MLCT
	603	1600	$d \rightarrow d$ ή MLCT

- Εύρεση στοιχειομετρίας συμπλόκου σε διάλυμα- Μέθοδος Job

Η μέθοδος Job χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της στοιχειομετρίας του συμπλόκου cisRu-PDAM. Η στοιχειομετρία του προσδιορίζεται από το διάγραμμα της απορρόφησης σε ένα μήκος κύματος, όπου απορροφά το σχηματιζόμενο σύμπλοκο και δεν απορροφούν ούτε το μέταλλο ούτε ο υποκαταστάτης, συναρτήσει του όγκου του υποκαταστάτη που περιέχεται σε κάθε διάλυμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε μήκος κύματος 530 nm. Τα φάσματα UV-Vis στην περιοχή 300-600 nm που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση της στοιχειομετρίας του συμπλόκου, παρουσιάζονται στο σχήμα 9.3.

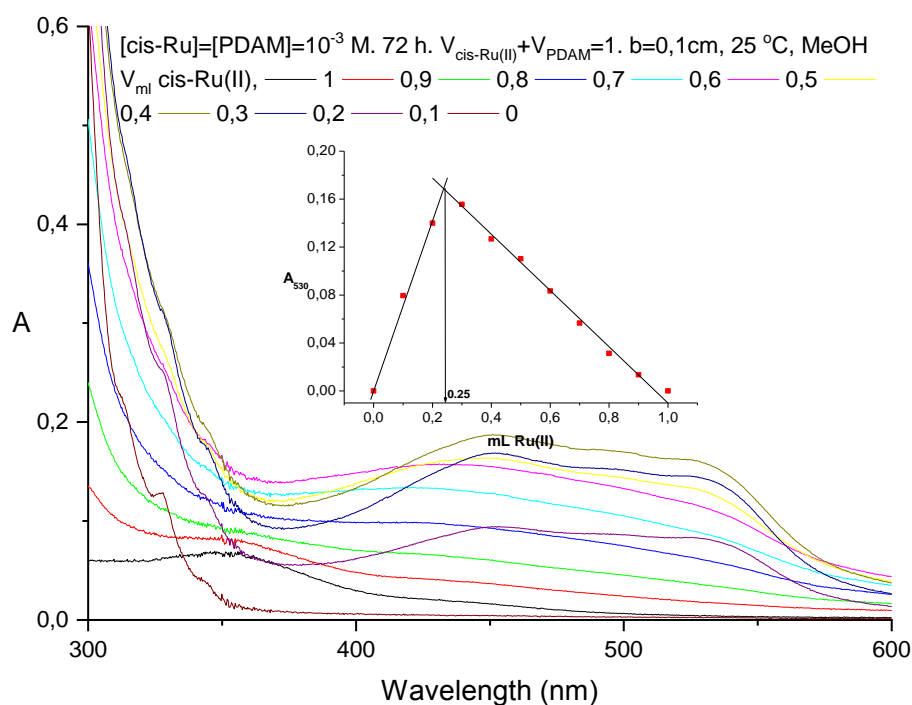
Στο ένθετο του Σχήματος παρουσιάζεται η καμπύλη συνεχών μεταβολών (διάγραμμα μεθόδου Job) στα 530 nm. Οι απορροφήσεις (A) είναι διορθωμένες ως προς την απορρόφηση της PDAM και του προδρόμου Ru(II) στα 530 nm, σύμφωνα με τη σχέση:

$$A_{\lambda \text{corr}} = A_{\lambda} - (A_{\text{oL}} \times V_{\text{L}} / V_{\text{oL}}) - (A_{\text{oRu}} \times V_{\text{Ru}} / V_{\text{oRu}})$$

όπου $A_{\lambda \text{corr}}$ η διορθωμένη τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος nm, A_{λ} η απορρόφηση του διαλύματος στο μήκος κύματος λ , A_{oL} η απορρόφηση στο μήκος κύματος λ του διαλύματος που περιέχει μόνο τον υποκαταστάτη PDAM, V_{L} ο όγκος του διαλύματος του υποκαταστάτη που αναμίχθηκε με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος του μετάλλου (cis-Ru(DMSO)₄Cl₂) ώστε να σχηματιστεί διάλυμα τελικού όγκου $V_{\text{oL}} = V_{\text{L}} + V_{\text{Ru}}$. A_{oRu} η απορρόφηση στα 530 nm του διαλύματος που περιέχει μόνο το πρόδρομο σύμπλοκο του Ru(II), V_{Ru} ο όγκος

του διαλύματος του Ru(II) που αναμίχθηκε με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος PDAM, ώστε να σχηματιστεί διάλυμα τελικού όγκου $V_{oL}=V_L + V_M= 1\text{mL}$ (§7.3(B)).^[189]

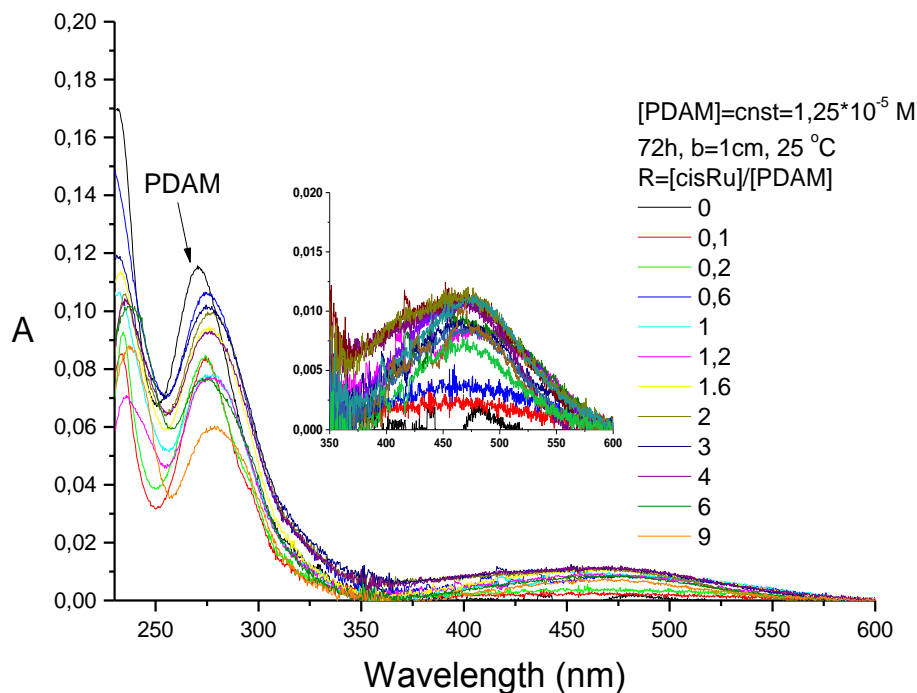
Από το ένθετο διάγραμμα του σχήματος 9.3 προκύπτει ότι η στοιχειομετρία του συμπλόκου είναι Ru(II):PDAM=1:3, δηλαδή σχηματίζεται το σύμπλοκο $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{PDAM})_3]^{2+}$.



Σχήμα 9.3: Φάσμα UV-Vis στα 300-600 nm με $b=0,1\text{ cm}$, $\theta=25^\circ\text{ C}$ για τα διαλύματα Ru(II)-PDAM $C_{\text{Ru(II)}}=C_{\text{PDAM}}=10^{-3}\text{ M}$, $V_{\text{Cu(II)}} + V_{\text{PDALC}} = 1\text{ mL}$. Στο ένθετο η καμπύλη JOB στα 530 nm συναρτήσεως του όγκου του διαλύματος του Ru(II)

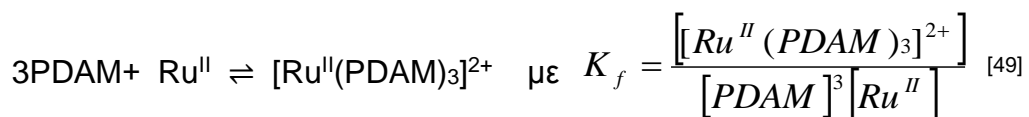
- Φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση του υποκαταστάτη PDAM με $\text{cis-Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$ – Εύρεση σταθεράς σχηματισμού του συμπλόκου

Με φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση είναι δυνατόν να υπολογιστεί η σταθερά σχηματισμού K_f του συμπλόκου cisRu-PDAM. Στο σχήμα 9.4 παρουσιάζονται τα φάσματα των διαλυμάτων με σταθερή PDAM συγκέντρωσης $1,25 \times 10^{-5}\text{ M}$ και μεταβαλλόμενη συγκέντρωση προδρόμου συμπλόκου (λόγος R, §7.3(B)). Παρατηρούμε ότι με προσθήκη του ρουθηνίου έχουμε σταδιακή μείωση της έντασης απορρόφησης του υποκαταστάτη (υποχρωμία) και μετατόπιση του μεγίστου από τα 270 nm στα 279 nm (red shift), όσο αυξάνει ο λόγος R. Παρατηρείται, επίσης, η εμφάνιση κορυφών στην περιοχή 400-600 nm που, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποδίδονται σε $d \rightarrow d$ ή MLCT μεταπτώσεις.



Σχήμα 9.4: φάσματα UV-Vis διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης $[PDAM]=1,25 \times 10^{-5} \text{ M}$ και μεταβαλλόμενης μετάλλου $[Ru(II)]=0-1,125 \times 10^{-4} \text{ M}$, σε διαλύτη μεθανόλη. Στο ένθετο σχήμα παρουσιάζονται οι απορροφήσεις στην περιοχή 400-600 nm

Η ισορροπία που λαμβάνει χώρα είναι η εξής :



Αν ορίσουμε ως x_i την συγκέντρωση του συμπλόκου στην ισορροπία για το κάθε διάλυμα έχουμε:

$$K_f = \frac{x_i}{([Ru]_o - x_i)([PDAM]_o - 3x_i)^3} \quad (1)$$

και από τη σχέση Lambert-Beer ($A=\epsilon bc$) προκύπτει :^[41]

$$x_i = \frac{Ai - \epsilon_{Ru}[Ru]_o - \epsilon_{PDAM}[PDAM]_o}{\epsilon_{com} - \epsilon_{Ru} - 3\epsilon_{PDAM}} \quad (2),$$

Όπου:

$[Ru]_o$ και $[PDAM]_o$ οι αρχικές συγκεντρώσεις του προδρόμου συμπλόκου και του υποκαταστάτη πριν γίνει η αντίδραση,

ϵ_{Ru} , ϵ_{PDAM} , ϵ_{comp} οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας του προδρόμου (ελεύθερο), της PDAM και του συμπλόκου στο συγκεκριμένο μήκος κύματος που επιλέγουμε, αντίστοιχα,

A_i (ή A_{279}) η απορρόφηση των διαφόρων διαλυμάτων, στο μήκος κύματος που επιλέχθηκε.

Το μήκος κύματος που επιλέχθηκε είναι τα 279 nm, όπου απορροφά το σύμπλοκο. Η ολική απορρόφηση στα 279 nm, (A_{279}) είναι το άθροισμα των απορροφήσεων της ελεύθερης PDAM και του συμπλόκου $[Ru^{II}(PDAM)_3]^{2+}$. Η απορρόφηση του προδρόμου συμπλόκου στα 279 nm και για τις συγκεντρώσεις που εργαζόμαστε είναι πρακτικά μηδεν. Η εξίσωση (2) λύνεται με την βοήθεια των (3),(4),(5),(6):

$$A_{276} = \epsilon_L \cdot [PDAM] \cdot b + \epsilon_{comp} \cdot [Ru(PDAM)_3]^{2+} \cdot b \quad (3)$$

Η ολική (αναλυτική) συγκέντρωση της PDAM δίνεται από τη σχέση :

$$[PDAM]_T = [PDAM] + 3 \cdot [Ru^{II}(PDAM)_3]^{2+} = 12,50 \mu M, \quad (4)$$

Η ολική (αναλυτική) συγκέντρωση των ιόντων Ru^{II} δίνεται από τις σχέσεις:

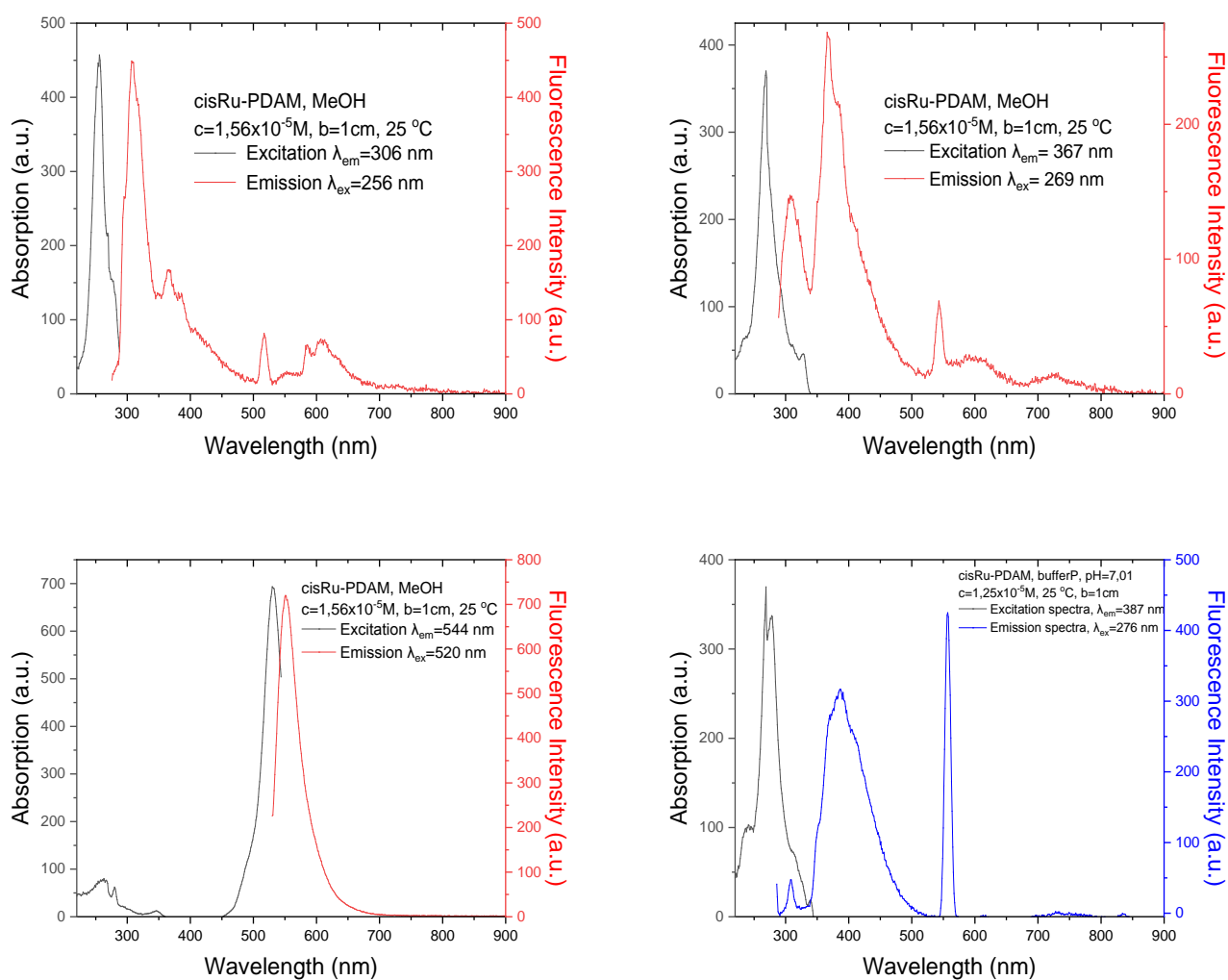
$$[Ru^{II}]_T = R \times 1,25 \times 10^{-5} M \quad (5)$$

$$[Ru^{II}]_T = [Ru^{II}] + [Ru^{II}(PDAM)_3]^{2+}, \quad (6)$$

Μετά τον υπολογισμό του x_i , υπολογίζεται η σταθερά σχηματισμού K_f (ίδια για κάθε διάλυμα) του συμπλόκου με στοιχειομετρία $Ru(II):PDAM=1:3$ από την εξίσωση (1), σε διαλύτη μεθανόλη και τελικά ο μέσος όρος των τιμών μας δίνει την σταθερά σχηματισμού που είναι ίση με $K_f = 4,6(\pm 0,6) \times 10^{14} M^{-3}$. Η σταθερά αυτή, είναι ενδεικτική της ισχυρής σύνδεσης τριών δισχιδίων υποκαταστατών με το μέταλλο (σύστημα d^6).^[3, 41]

9.2.2 Φθορισμομετρία

Το σύμπλοκο φθορίζει έντονα και τα φάσματα εκπομπής και διέγερσής του σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών παρουσιάζονται στο σχήμα 9.5. Τα μήκη κύματος διέγερσης είναι 256 nm, 269 nm και 520 nm στη μεθανόλη και 276 nm σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (BufferP).



Σχήμα 9.5: Φάσματα διέγερσης και εκπομπής του συμπλόκου cisRu-PDAM συγκέντρωσης $1,91 \times 10^{-5}$ M, σε μεθανόλη (κόκκινο) και ρυθμιστικό διάλυμα (μπλε)

Στο πίνακα 10 παρουσιάζονται οι ταινίες εκπομπής του συμπλόκου σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα, στα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών.

Πίνακας 10: Μήκη κύματος εκπομπής και διέγερσης για το cisRu-PDAM σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα

Διαλύτης	Μήκος κύματος διέγερσης (nm)	Μήκος Κύματος εκπομπής (nm)
Μεθανόλη	256	306, 367, 384, 585, 607
	269	306, 367, 384, 585
	520	551
Buffer Phosphate	276	387, 309

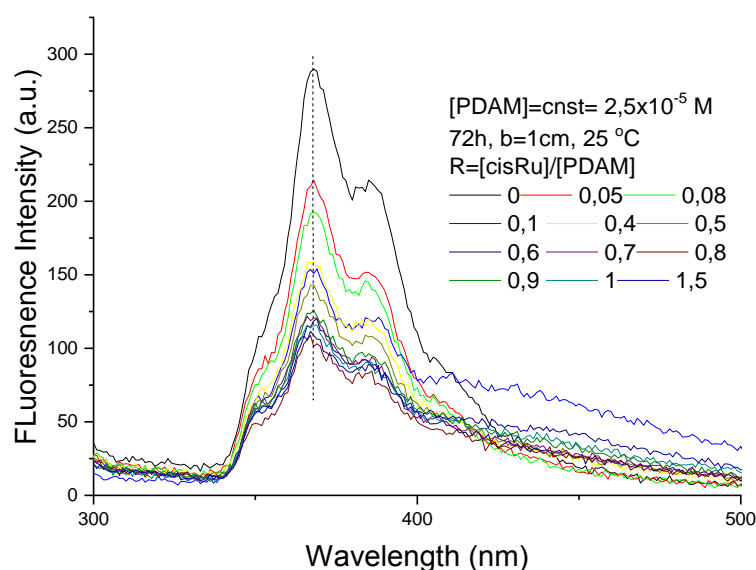
Το σύμπλοκο cisRuPDAM εμφανίζει, σε μεθανολικά διαλύματα, υψηλής εντάσεως φθορισμό για μήκος κύματος διέγερσης 256 nm και 269 nm, δηλαδή εκεί που φθορίζει έντονα ο υποκαταστάτης PDAM (αποδιέγερση IL

μεταπτώσεων) (§ 8.2.2). Σε ρυθμιστικό διάλυμα το σύμπλοκο εμφανίζει μια ταινία εκπομπής με διέγερση στα 276 nm, εκεί δηλαδή που εμφανίζεται η ταινία απορρόφησης στο UV-Vis για τον ίδιο διαλύτη. Χαρακτηριστικό της έντασης εκπομπής στο ρυθμιστικό διάλυμα είναι ότι εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με τα μεθανολικά διαλύματα, κάτι που είναι χαρακτηριστικό σε υδατικά διαλύματα πολυπυριδιλικών συμπλόκων Ru(II), έναντι οργανικών διαλυμάτων.

Για μήκη κύματος διέγερσης στα 520 nm, εμφανίζει μια έντονη ταινία απορρόφησης στα 544 nm, η οποία αποδίδεται στην μεταφορά ηλεκτρονικού φορτίου από το μέταλλο στον υποκαταστάτη (MLCT), που σε πολυπυριδιλικά σύμπλοκα δημιουργεί μια διεγερμένη κατάσταση που αποδιεγείρεται χωρίς περαιτέρω αντίδραση. Αυτή η κορυφή είναι ενδεικτική για την σύμπλεξη του μετάλλου με τον υποκαταστάτη.^[32, 190, 191]

- Φθορισμομετρική τιτλοδότηση του υποκαταστάτη PDAM με cis-Ru(DMSO)₄Cl₂

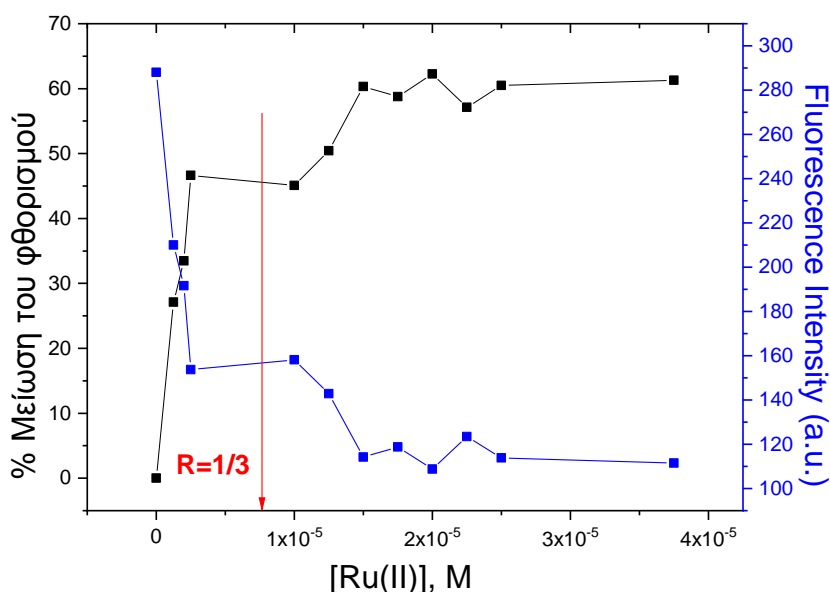
Παρασκευάστηκαν διαλύματα με σταθερή PDAM συγκέντρωσης $2,5 \times 10^{-5}$ M και μεταβαλλόμενη συγκέντρωση προδρόμου συμπλόκου σε μεθανόλη (λόγος R, §7.3(B)). Λήφθηκαν τα φάσματα εκπομπής στην περιοχή 300-900 nm, με μήκος κύματος διέγερσης 271 nm και παρουσιάζονται στο σχήμα 9.6.



Σχήμα 9.6: Φθορισμομετρική τιτλοδότηση PDAM σε μεθανόλη (εύρος 200-500 nm)

Όπως γίνεται εμφανές στο παραπάνω φάσμα φθορισμού, η ένταση φθορισμού της PDAM μειώνεται καθώς αυξάνεται η ποσότητα του διαλύματος του Ru(II). Συνεπώς, τα ιόντα Ru(II) αποσβένουν το φθορισμό του υποκαταστάτη. Αυτό υποδηλώνει ότι το προκύπτον σύμπλοκο δεν έχει τόσο

ισχυρή ένταση φθορισμού όσο έχει η PDAM πριν την προσθήκη οποιασδήποτε ποσότητας ιόντων Ru(II). Αυτό είναι φανερό από την ένταση της εκπομπής (μέγιστα τον κορυφών) στα φάσματα φθορισμού του συμπλόκου σε σχέση με αυτά της PDAM (σχήματα 8.5 και 9.6). Για το συγκεκριμένο μήκος κύματος διέγερσης (271 nm) εμφανίζονται στο φάσμα φθορισμού με μεγάλη 2 κορυφές με μήκη κύματος εκπομπής 367 και 384 nm. Στις κορυφές αυτές στο φάσμα φθορισμού, δεν παρατηρείται ιδιαίτερη μετατόπιση των μηκών κύματος εκπομπής καθώς προστίθονται τα ιόντα Ru(II) (σχ. 9.6). Η μείωση της έντασης του φθορισμού της PDAM στα 367 nm γίνεται καλύτερα αντιληπτή στο σχήμα 9.7.



Σχήμα 9.7: Διάγραμμα % μείωσης του φθορισμού και έντασης του φθορισμού συναρτήσει της [Ru(II)]

Παρατηρούμε ότι ο φθορισμός της PDAM μειώνεται απότομα μέχρι τον λόγο $R=[cisRu]/[PDAM]=1/3$ και έπειτα, με προσθήκη των ιόντων ρουθηνίου, έχουμε ηπιότερη μείωση και σταθεροποίηση του φθορισμού της, υποδηλώνοντας ότι κάτι άλλο είναι πιθανό να σχηματίζεται μετά τον σχηματισμό του προτεινόμενου συμπλόκου $[Ru(PDAM)_3]^{2+}$ και σε περίσσεια Ru(II). Οι παραπάνω παρατηρήσεις είναι συστηματικές καθώς το πείραμα πραγματοποιήθηκε 3 φορές.

Γενικά, υπάρχουν 2 είδη απόσβεσης του φθορισμού, η στατική (static) και η δυναμική (dynamic). Αυτή που βλέπουμε είναι η φαινόμενη (apparent). Στη στατική απόσβεση (static quenching) σχηματίζεται ένα μη φθορίζον σύμπλοκο ανάμεσα στο φθοροφόρο και τον αποσβέστη (quencher). Η αλληλεπίδραση του φθοροφόρου με τον αποσβέστη έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης εκπομπής και το ασύμπλεκτο φθοροφόρο φθορίζει κανονικά. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αποσβέστη, επηρεάζεται η ένταση εκπομπής αλλά όχι ο χρόνος ζωής εκπομπής επειδή υπάρχουν περισσότερες αλληλεπιδράσεις.

Στην περίπτωση δυναμικής απόσβεσης (dynamic quenching), όλα τα μόρια του φθοροφόρου συγκρούονται με τα μόρια του αποσβέστη κατά τη διάρκεια της διέγερσης. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αποσβέστη (quencher) επηρεάζεται και η ένταση εκπομπής και ο χρόνος ζωής της εκπομπής. Στα δυο αυτά είδη απόσβεσης θα πρέπει να υπάρχει μοριακή επαφή μεταξύ φθοροφόρου και αποσβέστη για να παραγματοποιηθεί το φαινόμενο. Συνήθως, στη δυναμική απόσβεση το μήκος κύματος του φθοροφόρου στο φάσμα απορρόφησης (§9.2.1) παραμένει αμετάβλητο κάτι που δεν συμβαίνει στο παρόν σύμπλοκο, υπονοώντας αυξημένη πιθανότητα για μηχανισμό στατικής απόσβεσης. Παρόλα αυτά, για να καταλήξουμε σε έναν μηχανισμό με ακρίβεια χρειάζεται εκτενέστερη μελέτη και προσδιορισμό του χρόνου ζωής του φθοροφόρου τ_0 .^[192-198]

Επιπλέον, από τα φάσματα φθορισμού μπορεί να προσδιορισθεί η σταθερά Stern-Volmer (K_{sv}) και η σταθερά K_f χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες σχέσεις: ^[199-202]

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

$$\frac{1}{(F - F_0)} = 1/\{K_f(F_{\max} - F_0)[Ru^{II}]\} + 1/(F_{\max} - F_0),$$

Benesi-Hildebrand

Όπου:

F_0 : η ένταση του φθορισμού στο διάλυμα μόνο της PDAM ($R=0$),

F : η ένταση φθορισμού των διαλυμάτων PDAM-Ru(II) στους διάφορους λόγους R ,

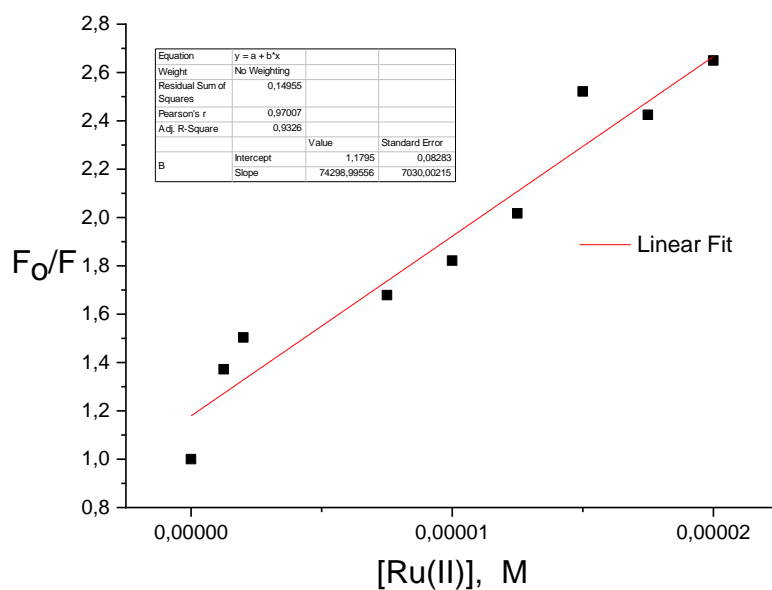
K_{sv} : η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer,

K_f : η σταθερά σχηματισμού για την σύμπλεξη του ρουθηνίου με την PDAM,

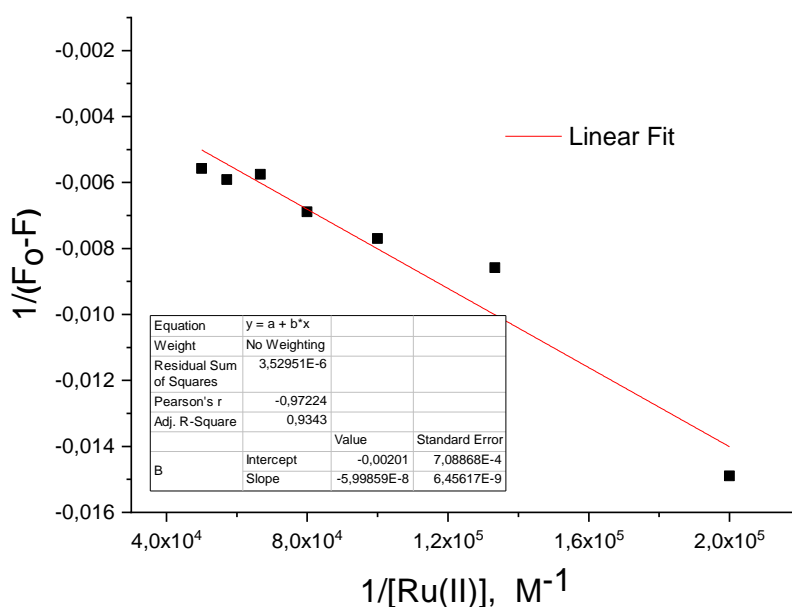
F_{\max} : η μέγιστη ένταση του φθορισμού σε διάλυμα PDAM-Ru(II),

Όλες οι εντάσεις αφορούν την ταινία εκπομπής στα 367 nm.

Συνεπώς, κατασκευάζοντας ένα διάγραμμα F_0/F συναρτήσει της $[Ru(II)]$ μπορούμε να προσδιορίσουμε την K_{sv} , η οποία θα ισούται με τη κλίση της ευθείας που θα προκύψει (**Stern-Volmer**). Τη σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου, μπορούμε να την υπολογίσουμε μέσω του διαγράμματος $1/(F-F_0)$ συναρτήσει του $1/[Ru(II)]$. Τα διαγράμματα αυτά φαίνονται στα σχήματα 9.8, 9.9.



Σχήμα 9.8: Διάγραμμα $F_0/F=f([Ru(II)])$



Σχήμα 9.9: Διάγραμμα $1/(F_0-F)=f(1/[Ru(II)])$

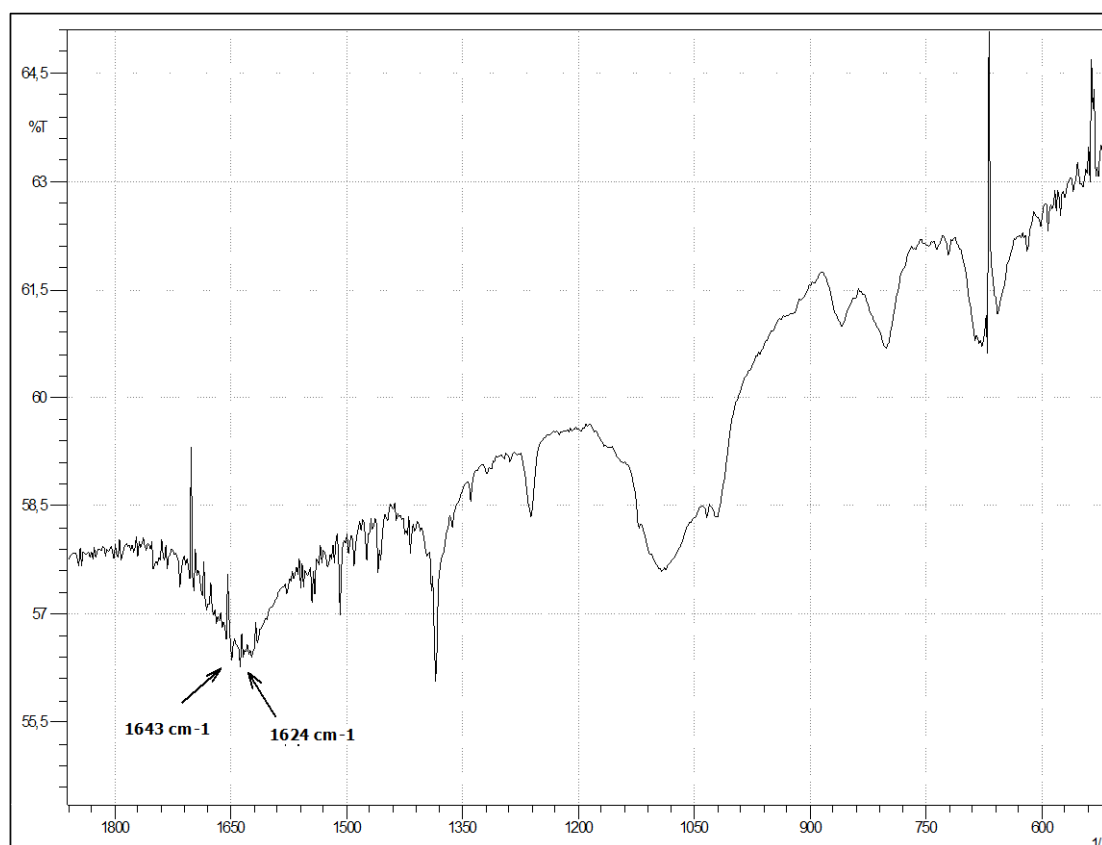
Από τα παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι $K_{sv}=7,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ και $K_f=3,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Η σταθερά σχηματισμού αφορά τη συμπλοκοποίηση του ρουθηνίου με ένα φθοροφόρο και είναι σε συμφωνία με την βιβλιογραφία για σύμπλοκα φαινανθρολίνης με d^6 μεταλλικά ιόντα. Αντίθετα, η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου cisRu-PDAM συμπλεγμένη με τρεις PDAM (γινόμενο των σταθερών για την σύμπλεξη κάθε μορίου PDAM), είναι αυτή που υπολογίστηκε από την φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση (§9.2.1).^[3, 41, 49]

9.2.3 Φασματοσκοπία IR

Στο σχήμα 9.10 παρουσιάζεται το φάσμα IR του συμπλόκου στη περιοχή 1800-500 cm^{-1} και στο πίνακα 11 φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του στο εύρος 4000-400 cm^{-1} , σε σύγκριση με τις αντίστοιχες του υποκαταστάτη.

Το φάσμα IR επιβεβαιώνει ότι το Ru(II) συμπλέκεται με την PDAM μέσω των εσωτερικών ατόμων αζώτου (N) της 1,10-φαινανθρολίνης. Αυτό γίνεται αντιληπτό διότι οι ταινίες που επηρεάζονται περισσότερο αφορούν το δεσμό C=N και C=C της 1,10-φαινανθρολίνης (κόκκινο χρώμα στο πίνακα 11). Οι ταινίες δόνησεις αυτών των δεσμών μετατοπίζονται σε υψηλότερους κυματάριθμους λόγω αύξηση της ισχύς τους, αφού λαμβάνουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το μέταλλο. Αυτό είναι χαρακτηριστικό της χαμηλής σ-δοτικότητας και υψηλής π-δεκτικότητας των εσωτερικών αζώτων της 1,10-φαινανθρολίνης.^[1, 3, 203, 204]

Χαρακτηριστική είναι επίσης η απουσία των κορυφών που οφείλονται στο δεσμευμένο με το ρουθίνιο DMSO, του προδρόμου συμπλόκου, επιβεβαιώνοντας την απουσία του στο προκύπτον σύμπλοκο.



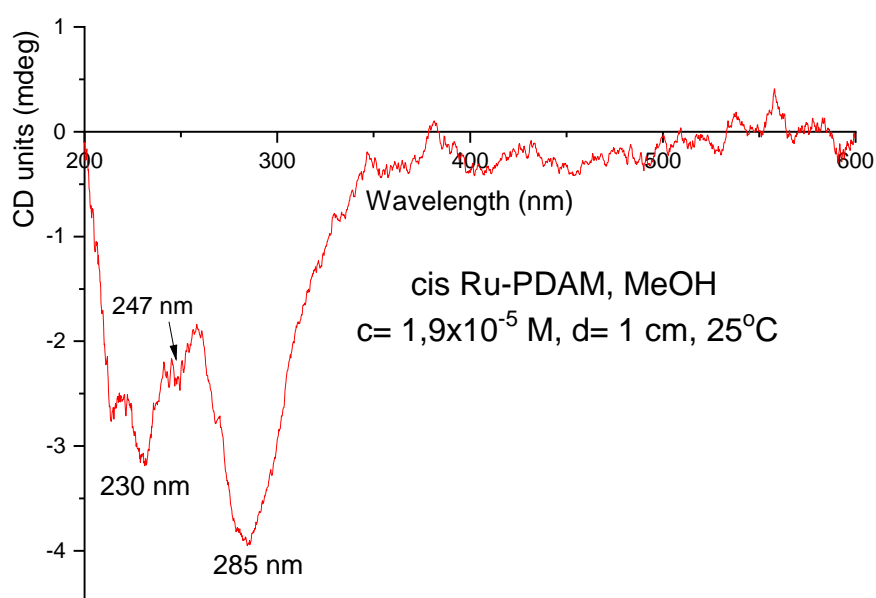
Σχήμα 9.10: Φάσμα IR για το σύμπλοκο cisRu-PDAM στην περιοχή 1800-500 cm^{-1}

Πίνακας 11: Οι χαρακτηριστικές ταινίες του φάσματος IR του συμπλόκου cisRu-PDAM, σε σχέση με τις αντίστοιχες του υποκαταστάτη PDAM (§8.2.3)

PDAM (cm ⁻¹)	cisRu-PDAM (cm ⁻¹)	Απόδοση κορυφών
865	858	Δόνηση τάσης δεσμού -C-N
1089-1124	1079-1129	Δονήσεις έκτασης δεσμού -C-N
1596	1624	Δόνηση έκτασης δεσμού -C=N
1622	1640	Δόνηση τάσης δεσμού -C=C
2928-2960	2923-2961	Δονήσεις έκτασης δεσμού αλειφατικών -H
3045	3045	Δόνηση έκτασης δεσμού αρωματικών -H
3294 και 3372	3335 και 3375	Δονήσεις έκτασης δεσμού -N-H

9.2.4 Κυκλικός διχρωϊσμός

Για τον χαρακτηρισμό του συμπλόκου cisRu-PDAM λήφθηκε το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του σε μεθανόλη (περιοχή 200-600 nm) και παρουσιάζεται στο σχήμα 9.11.

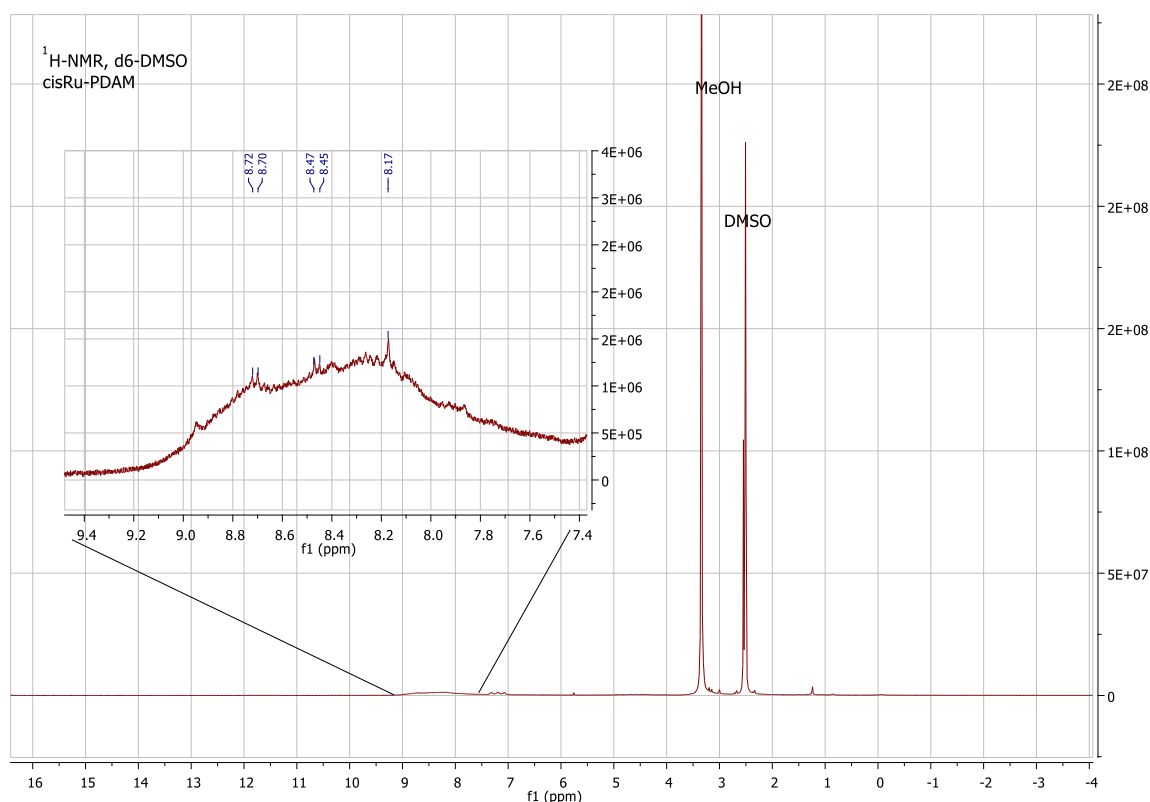


Σχήμα 9.11: Το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του συμπλόκου cisRu-PDAM στην περιοχή 200-600 nm

Η PDAM δεν αποτελεί χειρόμορφο μόριο, πράγμα που σημαίνει ότι στο CD δε θα βλέπαμε διχρωϊκά σήματα. Το σύμπλοκο cisRu-PDAM παρουσιάζει αρνητικό διχρωϊκό σήμα στα 285 nm, 247 nm και 230 nm. Τα σήματα στα 285 και 230 εμφανίζονται κοντά στο μήκος κύματος που εμφανίζει το μέγιστο στα UV-Vis ηλεκτρονικά φάσματα. Η εμφάνιση τόσο ισχυρών σημάτων υποδηλώνει την υιοθέτηση μιας συγκεκριμένης στερεοδιάταξης της PDAM όταν συμπλέκεται με το Ru(II), γεγονός που καθιστά το σύμπλοκο οπτικά ενεργό. Ένα τέτοιο γεγονός οφείλεται στο ότι το σύμπλοκο είναι χειρόμορφο μόριο και παρουσιάζει $-\Delta$ και $-\Lambda$ εναντιομερή, κάτι που καθιστά οπτικά ενεργές τις μεταπτώσεις που οφείλονται στην φαινανθρολινική ομάδα του μορίου (conformational effect). Αυτό συμβαίνει στα σύμπλοκα του τύπου $M(A-A)_3$, όπου A-A δισχιδής υποκαταστάτης και M το μέταλλο. Κατόπιν, αν συγκρίνουμε το παραπάνω φάσμα με αυτό του συμπλόκου του transRu(II)-PDAM (όταν συντίθεται από το trans-Ru(DMSO)₄Cl₂) (παράρτημα), μπορούμε να δούμε πως το διχρωϊκό σήμα στα 285 nm (278 nm για το trans) έχει πολύ μεγαλύτερη ένταση στο cisRu-PDAM, κάτι που υποδυκνύει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, πιθανώς στη σύνθεση του $-\Lambda$ εναντιομερούς (αρνητικό σήμα). Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερης σημασίας στην αλληλεπίδραση του συμπλόκου με βιομόρια. Γενικά, η χειρομορφία είναι αρκετά ελκυστικό χαρακτηριστικό, διότι μπορεί να ενισχύει την πρόσληψη του φαρμάκου υιοθετώντας συγκεκριμένη διαμόρφωση και να δεσμεύεται στερεοεκλεκτικά με το DNA του στόχου.^[49, 205-207]

9.2.5 Φασματοσκοπία NMR

Το φάσμα που παρουσιάζεται στο σχήμα 9.12 χρησιμοποιώντας ως διαλύτη *d*6-DMSO, με συγκεντρώσεις [cisRu-PDAM]=5 mg/mL.



Σχήμα 9.12: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του cisRu-PDAM σε d6-DMSO

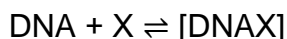
Παρατηρώντας το παραπάνω φάσμα πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$) και συγκρίνοντας το με το φάσμα του ελεύθερου υποκαταστάτη PDAM (παράρτημα), παρατηρούμε ότι οι κορυφές του συμπλόκου cisRu-PDAM που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της φαινανθρολιτικής ομάδας έχουν μετατοπιστεί όλες σε υψηλότερες συχνότητες, δηλαδή σε χαμηλότερα πεδία και είναι ευρείες. Συγκεκριμένα, η απλή κορυφή από τα 7.87 ppm μετατοπίζεται στα 8.17 ppm (+0,30), η διπλή από τα 7.82 ppm στα 8.46 ppm (+0,64), ενώ η διπλή από τα 8.39 ppm μετατοπίζεται στα 8.71 (+0,32) ppm. Οι μετατοπίσεις αυτές δείχνουν ότι η φαινανθρολιτική ομάδα, που αποτελεί το χρωμοφόρο τμήμα της ένωσης μας, επηρεάζεται άμεσα κατά τη σύμπλεξη με το Ru(II). Αυτό υποδηλώνει τη βέβαιη συμμετοχή των N του αρωματικού δακτυλίου κατά τη σύμπλεξη της PDAM με το Ru(II), διότι είναι ο μόνος τρόπος να εξηγηθεί αυτή η μεγάλη μετατόπιση των αντίστοιχων σημάτων σε υψηλότερες συχνότητες. Μάλιστα, η ισχυρότερη μετατόπιση αφορά τα 3,8 πρωτόνια που βρίσκονται πιο κοντά (γειτονικά) στο άζωτο (αρίθμηση σύμφωνα με το σχήμα 8.1). Το εύρος που εμφανίζουν στο $^1\text{H-NMR}$ φάσμα τα πρωτόνια της 1,10-φαινανθρολινομάδας μπορεί να αποδοθεί στις διάφορες στερεοχημικές διατάξεις της αμινομεθυλενομάδας. Στη βιβλιογραφία, τέτοιου είδους μεταβολές παρατηρούνται σε σύμπλοκα ρουθηνίου-φαινανθρολίνης που συμπλοκοποιούνται μέσω του φαινανθρολικού αζώτου.^[208, 209]

Κεφάλαιο 10^ο : Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου cisRu-PDAM με CT-DNA

10.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σε διαλύματα με σταθερή συγκέντρωση συγκέντρωση συμπλόκου ίση με $1,25 \times 10^{-5}$ M και μεταβαλλόμενη DNA, στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=7,01 (§7.3 (Γ)). Εκτός από την ερμηνεία των φασμάτων για την αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA, μπορούμε να εξετάσουμε και το πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδρασή τους. Έτσι, υπολογίζεται η σταθερά σύνδεσης συμπλόκου με DNA (K_b), μέσω φασμάτων UV-Vis εφαρμόζοντας τη μέθοδο Scatchard.

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

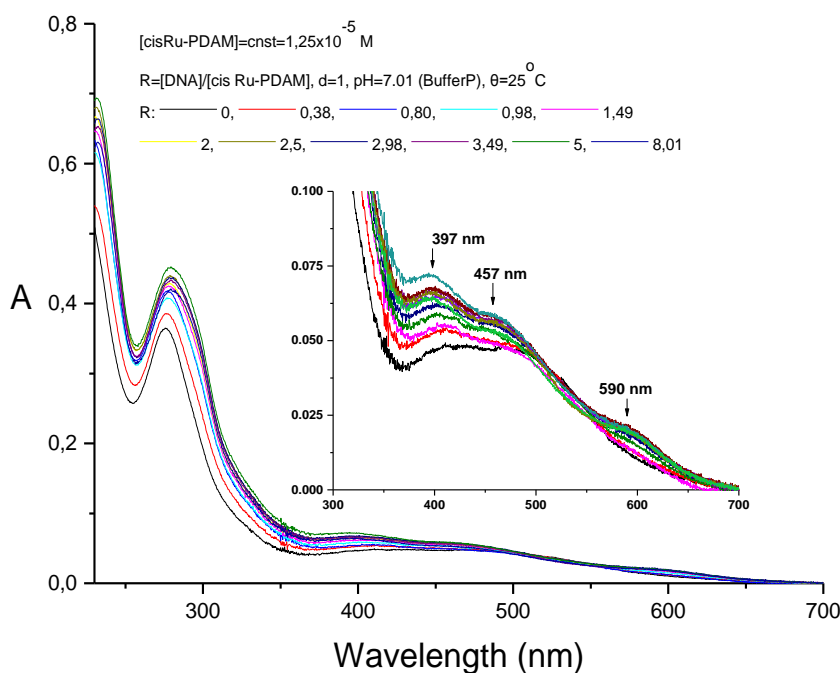


από τη σχέση:

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

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

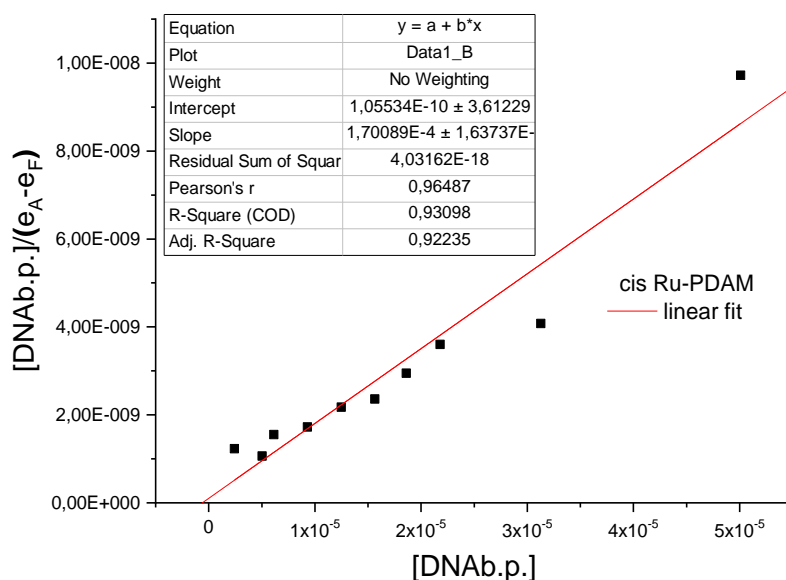
Στο σχήμα 10.1 παρουσιάζονται οι μεταβολές στις ταινίες απορρόφησης στην περιοχή 230-700 nm για το σύστημα που περιέχει το σύμπλοκο cisRu-PDAM και στο σχήμα 10.2 η μεταβολή του λόγου $[\text{DNA}_{bp}]/(e_A - e_F)$ ως συνάρτηση της $[\text{DNA}_{bp}]$ για το ίδιο σύστημα (bp=base pair).^[210]



Σχήμα 10.1: Το φάσμα UV – Vis διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης συμπλόκου και μεταβαλλόμενης DNA, στην περιοχή 230-700 nm (Scatchard) (§7.3 (Γ))

Παρατηρούμε ότι, η αλληλεπίδραση του cisRu-PDAM με το DNA προκαλεί σταδιακή μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης από τα 276 nm ($R=[\text{DNA}]/[\text{cisRu-PDAM}]=0$) στα 279 nm ($R=[\text{DNA}]/[\text{cisRu-PDAM}]=8,01$), δηλαδή βαθυχρωμισμό (red-shift) κατά 4 nm. Ο βαθυχρωμισμός αυτός συνοδεύεται από σύγχρονη αύξηση της έντασης της απορρόφησης A στο μέγιστο (υψιχρωμισμός), όχι όμως με σταθερό τρόπο. Για $R < 5$ η απορρόφηση αυξάνει με την αύξηση του R, και για $R > 5$ η απορρόφηση μειώνεται. Συγχρόνως εμφανίζεται και ένας ώμος στα 320 nm, μη εμφανής στο φάσμα του διαλύματος του συμπλόκου ($R=0$). Στη περιοχή 300-700 nm, όπου συναντώνται οι d-d ή MLCT του Ru(II), παρατηρούνται επίσης αλλαγές, σε σχέση με το φάσμα του συμπλόκου απουσία DNA ($R=0$). Όταν το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το DNA οι απορροφήσεις αυτές μετατοπίζονται από τα 413 και 467 nm για το ελεύθερο σύμπλοκο ($R=0$) στα 397 και 457 nm ($R=8,01$), αντίστοιχα. Συγχρόνως εμφανίζεται μια ασθενής απορρόφηση στα 590 nm. Οι MLCT μεταπτώσεις αλληλεπικαλύπτονται με τις π-π* του υποκαταστάτη. Έτσι, οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ισχυρή αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA (επηρεάζοντας τις π→π* μεταπτώσεις του υποκαταστάτη), με μη ομοιοπολικό τρόπο και αποκλείοντας την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση. Γι' αυτό, πιθανώς να αλληλεπιδρά με παρεμβολή ή μέσω αύλακας.^[209, 211] Επιπλέον φαίνεται το σύμπλοκο να αλληλεπιδρά με περισσότερους από έναν τρόπους με το DNA, που εξαρτώνται από το λόγο R.

Το μήκος κύματος που επιλέξαμε να εφαρμόσουμε την μέθοδο Scatchard είναι τα 276 nm, εκεί δηλαδή που απορροφά το σύμπλοκο cisRu-PDAM σε ρυθμιστικό διάλυμα.

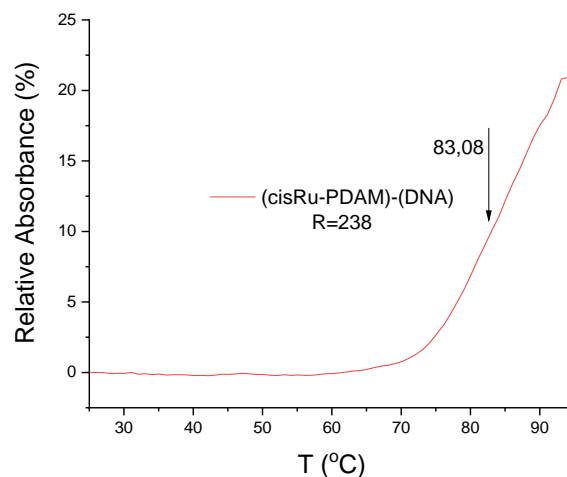
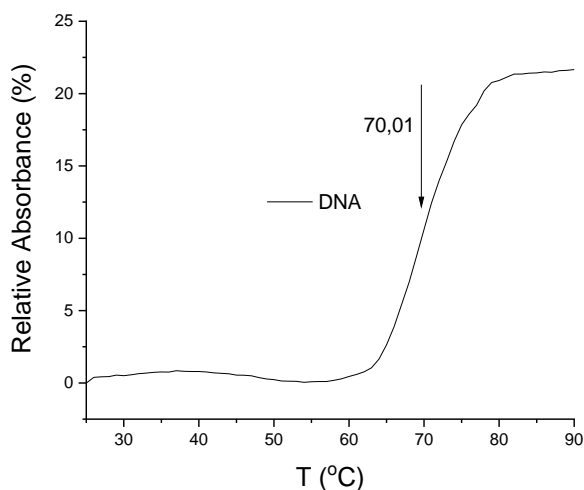


Σχήμα 10.2: Υπολογισμός της σταθεράς σύνδεσης K_b του συμπλόκου cisRu-PDAM με εφαρμογή της μεθόδου Scatchard

Από το διάγραμμα του σχήματος 10.2 υπολογίστηκε η σταθερά K_b και βρέθηκε ίση με $1,61 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Η μεγάλη τιμή της σταθεράς αυτής επιβεβαιώνει την ισχυρή σύνδεση του cisRu-PDAM με το DNA και είναι ενδεικτική της ενδοπαρεμβολής. Αντίστοιχες σταθερές παρουσιάζουν πολυπυριδιλικά σύμπλοκα και σύμπλοκα φαινανθρολικών παραγώγων. Σε περίπτωση συναρμογής στην αύλακα η σταθερά σύνδεσης είναι της τάξης 10^4 - 10^5 . Η ισχύς της παραπάνω σύνδεσης επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα των μελετών με κυκλικό διχρωισμό, φθορισμομετρία και ιξωδομετρία που εξετάζονται στη συνέχεια.^[23, 86, 153, 211, 212]

- Θερμική μετουσίωση του DNA (T_m).

Προσδιορίστηκαν τα σημεία τήξεως του DNA απουσία και παρουσία του συμπλόκου cisRuPDAM, χρησιμοποιώντας διαλύματα σταθερής συγκέντρωσης σε DNA ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) για λόγους $R = [\text{cisRu-PDAM}]/[\text{DNA}]$ 0 και 0,238. Στο Σχήμα 10.3 παρουσιάζονται οι καμπύλες μεταβολής της σχετικής απορρόφησης % των διαλυμάτων στα 259 nm σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.

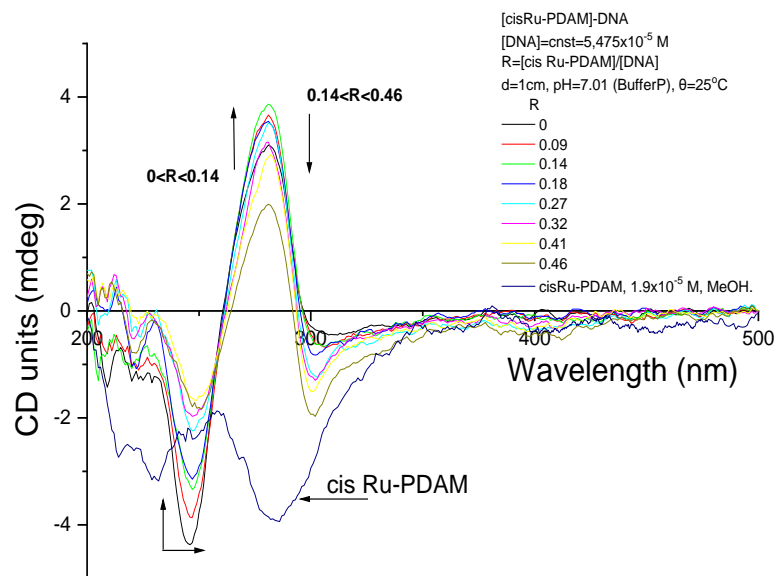


Σχήμα 10.3: Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης διαλύματος DNA (αριστερά) και διαλύματος (cisRu-PDAM)-(DNA) με λόγο 0,238 (δεξιά)

Από τις καμπύλες θερμικής μετουσίωσης υπολογίστηκε η $\Delta T_m = T_{m(\text{DNA})} - T_{m(\text{cisRu-PDAM})} = 13 \text{ }^\circ\text{C}$. Σύμφωνα, με την βιβλιογραφία η αύξηση του σημείου τήξεως σε εύρος βαθμών (+3 °C) - (+14 °C) μας δείχνει σταθεροποίηση της δομής του DNA και σχετίζεται με αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής, χωρίς να αποκλείεται και η σύνδεση μέσω μικρής αύλακας.^[213-215]

10.2 Κυκλικός διχρωϊσμός

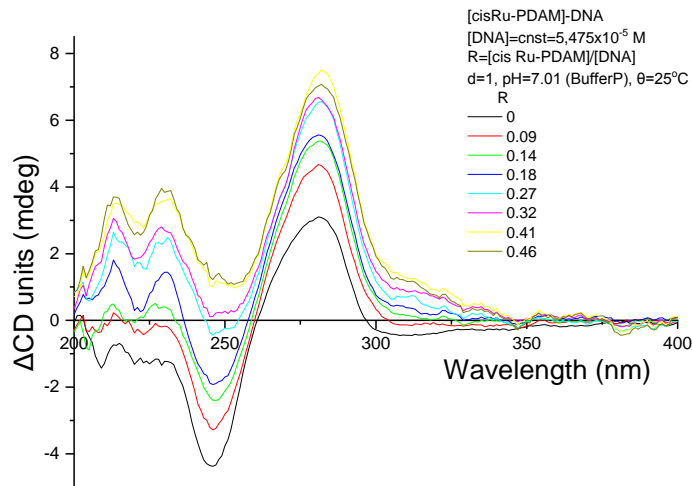
Στο θεωρητικό μέρος έγινε φανερό πως η τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού έχει τεράστια σημασία στην μελέτη αλληλεπίδραση μικρών μορίων με βιομόρια. Στο σχήμα 10.4 παρουσιάζονται τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης DNA ίσης με $5,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ και μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης συμπλόκου, στην περιοχή 200-500 nm και σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με $\text{pH}=7,01$. Στο ίδιο σχήμα παρουσιάζεται και το φάσμα του συμπλόκου σε μεθανόλη, συγκέντρωσης $1,9 \times 10^{-5} \text{ M}$.



Σχήμα 10.4: Φάσματα CD της σειράς διαλυμάτων (cisRu-PDAM)-DNA (§7.3(Γ))

Από την παρατήρηση των φασμάτων του σχήματος 10.3, γίνεται αντιληπτό ότι η επίδραση του συμπλόκου στο DNA επιφέρει σημαντικές διαφορές στο διχρωϊκό σήμα του και επιβεβαιώνει την αλληλεπίδραση του συμπλόκου-DNA με δυο τρόπους. Παρατηρούμε ότι οι μεταβολές εξαρτώνται από το λόγο R. Το αρνητικό φαινόμενο Cotton με ελάχιστο στα 246 nm (-4,29 mdeg) για το ελεύθερο DNA (σχετίζεται με την ελλικότητα του DNA), με την προσθήκη συμπλόκου, μετατοπίζεται σταδιακά στα 250 nm (red shift) και η ένταση του μειώνεται με αύξηση του λόγου R (-1,79 mdeg για R =0,46)). Το θετικό Cotton στα 276 nm (+3,1 mdeg) για το ελεύθερο DNA (σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις των ζευγών βάσεων) με την προσθήκη cisRu-PDAM και για λόγους $0 < R < 0,14$ αυξάνει (+3,87 mdeg για R= 0,14). Στη συνέχεια για λόγους $0,14 < R < 0,46$ μειώνεται σταδιακά (+1,98 mdeg για R= 0,46). Το λ_{max} παραμένει σταθερό στα 276 nm. Επιπλέον, από την αρχή της προθήκης του συμπλόκου στα διαλύματα του DNA εμφανίζεται ασθενές αρνητικό Cotton στα 302 nm που για λόγους $R > 0,14$ είναι πλέον εμφανές. Στην ίδια περιοχή εμφανίζονται αρνητικό Cotton (285 nm) διαλύματα του συμπλόκου cisRu-PDAM (σχ. 10.3).

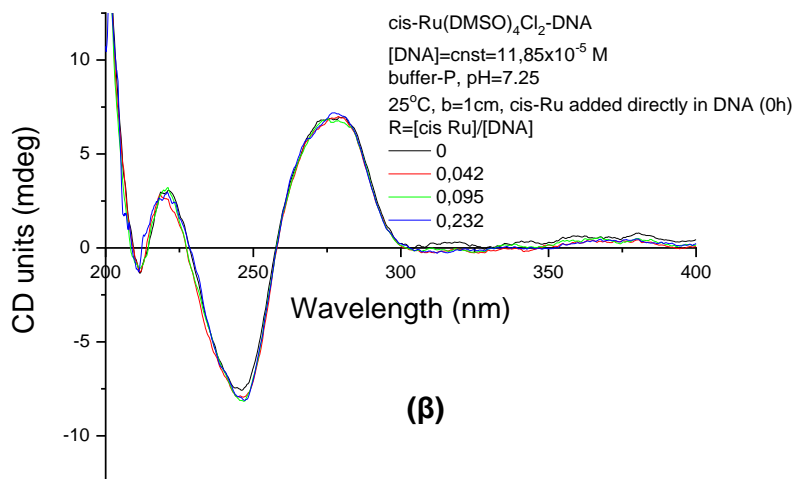
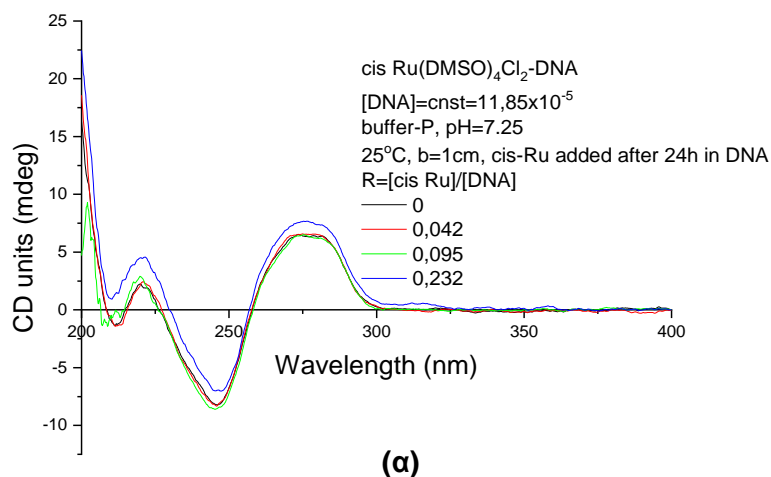
Για να διερευνηθούν τα φαινόμενα Cotton στην περιοχή που απορροφά το DNA και το σύμπλοκο, από κάθε φάσμα CD του σχήματος 10.3 αφαιρέθηκε το φάσμα CD του συμπλόκου ίδιας συγκέντρωσης. Τα φάσματα διαφοράς που προκύπτουν παρουσιάζονται στο σχήμα 10.5.



Σχήμα 10.5: Φάσματα διαφοράς σειράς διαλυμάτων (cisRu-PDAM)-DNA μείον cisRu-PDAM σε μεθανόλη, $1,9 \times 10^{-5}$ M

Στο βαθμό που μπορούμε να αποδεχθούμε ότι τα φάσματα που προκύπτουν μετά τις αφαιρέσεις μας υποδεικνύουν μόνο τις μεταβολές που επιφέρουν στη δομή του DNA οι αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου, καταλήγουμε σε ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Παρατηρείται μια συνεχής μείωση της έντασης του αρνητικού Cotton στα 246 nm που συνδυάζεται με μετατόπιση του ελαχίστου σταδιακά προς τα 250 nm. Καταλήγουμε και πάλι στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση προκαλεί σταδιακή αποέλιξη του δίκλωνου DNA. Επιπλέον παρατηρείται αύξηση του μεγίστου του θετικού Cotton στα 276 nm με ελαφρά μετατόπιση στα 278 nm, που υποδηλώνει μετατροπή της δομής του DNA από B σε A. Επιπλέον, εμφανίζεται ένα ασθενές θετικό Cotton στα 315-320 nm, εκεί που εμανίστηκε ο ώμος στα φάσματα κατά την φασματοφωτομετρική τιτλοδότηση του συμπλόκου με DNA (σχ. 10.1). Οι μεταβολές αυτές υπονοούν αλληλεπίδραση με παρεμβολή (κλασσική ή μερική).^[70, 211, 215-217]

Στο σχήμα 10.6 παρουσιάζονται τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού του συστήματος (cis-[Ru(DMSO)₄Cl₂])-(DNA), με σταθερή συγκέντρωση [DNA]= $11,85 \times 10^{-5}$ M και μεταβαλλόμενη προδρόμου συμπλόκου, σε ρυθμιστικό διάλυμα. Στο (α) φαίνεται η σειρά διαλυμάτων που φτιάχτηκε με διάλυμα προδρόμου αφού είχε διαλυθεί στο ρυθμιστικό και αφέθηκε 24 ώρες, ενώ στο (β) προστέθηκε κατευθείαν μόλις διαλύθηκε στα διαλύματα με το DNA, πριν και οι δύο σειρές αφεθούν για επώαση 24 ώρες με το DNA.



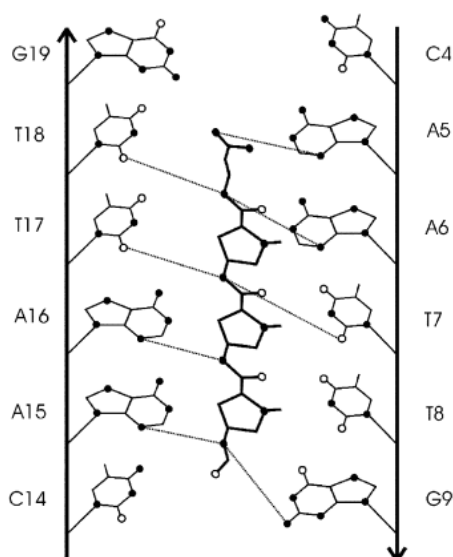
Σχήμα 10.6: Φάσματα CD σειράς διαλυμάτων με σταθερή συγκέντρωση DNA και μεταβαλλόμενη προδρόμου συμπλόκου, **(α)** 24h, **(β)** 0h (§7.3(Γ))

Από τα παραπάνω φάσματα παρατηρούμε ότι το DNA δεν μεταβάλλει την δευτεροταγή του δομή, όταν το πρόδρομο σύμπλοκο προστίθεται σε αυτό αμέσως μετά την διάλυση του στο ρυθμιστικό διάλυμα. Στην περίπτωση που έχουν περάσει 24 ώρες και το σύμπλοκο έχει αντικαταστήσει το ένα χλώριό του και το Ο-δεσμευμένο DMSO με μόρια νερού (§8.2.1) παρατηρούμε μια μείωση της έντασης στο αρνητικό Cotton (245 nm) του φάσματος του DNA, που σημαίνει ότι για να αλληλεπιδράσει το DNA με το cis-[Ru(DMSO)₄Cl₂] πρέπει να αποελιχθεί. Ταυτόχρονα, έχουμε και μείωση της έντασης του θετικού Cotton (275 nm), που σημαίνει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των βάσεων του DNA εξασθενεί. Κατά την αντίδραση του cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ με DNA θύμου αδένα

βοοειδούς, ακόμα και λίγες ώρες μετά, φαίνεται πως η δομή της διπλής έλικας έχει υποστεί τροποποίηση, όπως διαπιστώνεται από τη μείωση της σχετικής έντασης των ταινιών του φάσματος CD. Η φασματική αυτή αλλαγή μοιάζει αρκετά με την αντίστοιχη συστήματος trans-Ru(DMSO)₄Cl₂-DNA (παράρτημα), κάτι που συμφωνεί με την βιβλιογραφία. Τελικά, μπορεί να αποδοθεί σε προοδευτική καταστροφή της δομής του DNA γεγονός που πιθανώς σχετίζεται με τη σύμπλεξη του ρουθηνίου με N7 κυρίως, γουανινών και ενδεχομένως σχηματισμό χηλικών προϊόντων προσθήκης κατά μήκος της έλικας. (παράρτημα).^[218]

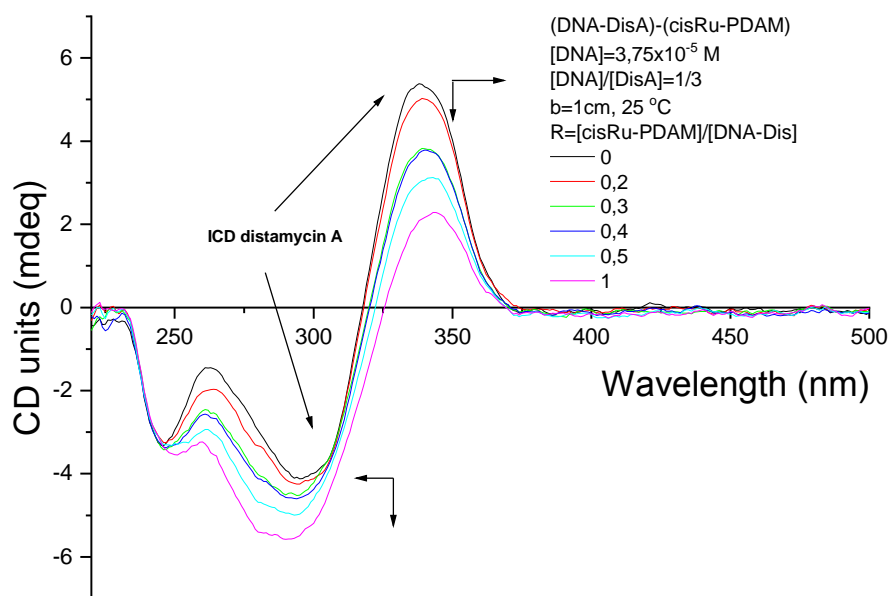
Για την περαιτέρω διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA, η distamycin A (dis A) χρησιμοποιήθηκε σαν ένωση αναφοράς, ώστε να μελετηθεί η ανταγωνιστική της δράση σε σχέση με το σύμπλοκο.

Το αντιβιοτικό distamycin A (dis A) είναι ένα επίπεδο μόριο με σχήμα μισοφέγγαρου που έχει μελετηθεί διεξοδικά η αλληλεπίδρασή του με το DNA. Το μόριό της dis A αλληλεπιδρά ισχυρά με την διπλή έλικα του DNA στην μικρή αύλακα μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ αδενίνης και θυμίνης. Έτσι, σταθεροποιεί το μόριο του DNA και μάλιστα, το κάθε μόριο distamycin A αλληλεπιδρά με 5 βάσεις τους DNA όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Χαρακτηριστικό της αλληλεπίδρασης της dis A με το DNA είναι το πολύ ισχυρό θετικό φαινόμενο Cotton (ICD) που εμφανίζεται στα φάσματα κυκλικού διχρωσισμού στα 330 nm παρουσία DNA και distamycin A (πιο έντονο σε λόγους [disA]/[DNA] 1/3 και 1/5, όπου έχουμε κορεσμό). Επίσης, τα φαινόμενα Cotton του DNA εμφανίζονται στα 262 nm (θετικό) και 232 nm (αρνητικό) με αύξηση διχρωμικού σήματος, παρουσία dis A (λόγοι 1/3, 1/5), λόγω της μείωσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ των βάσεων του DNA μετά την εισαγωγή της dis A στην μικρή αύλακα.^[219, 220]



Σχήμα 10.7: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της distamycin A με την μικρή αύλακα ενός oligομερούς νουκλεοτιδίου

Στα διαλύματα που παρασκευάστηκαν η συγκέντρωση του DNA ήταν σταθερή και ίση 5×10^{-5} M, η συγκέντρωση του συμπλόκου μεταβαλλόμενη, ενώ ο λόγος $[\text{disA}]/[\text{DNA}]$ κρατήθηκε επίσης σταθερός και ίσος με 1/3. Στο σχήμα 10.8 παρουσιάζονται τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού των παραπάνω συστημάτων στην περιοχή 200-500 nm, για διάφορους λόγους $R = [\text{cisRu-PDAM}]/[\text{DNA-disA}]$.

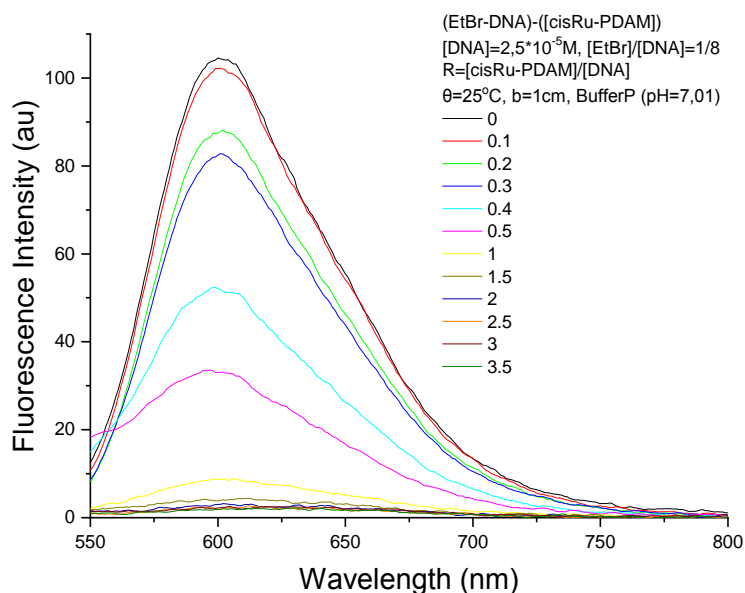


Σχήμα 10.8: Φάσματα CD σειράς διαλυμάτων DNA-DisA-(cisRu-PDAM) στην περιοχή 200-500 nm (§7.3(Γ))

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι με την προσθήκη του συμπλόκου, το θετικό Cotton του CD φάσματος της distamycin A λόγω του ICD φαινομένου, μειώνεται σταδιακά, ένδειξη της απομάκρυνσης της distamycin A από την μικρή αύλακα του DNA. Μια τέτοια εξέλιξη θα μπορούσε να ερμηνευθεί είτε ως το αποτέλεσμα της ανταγωνιστικής δράσης του συμπλόκου cisRu-PDAM, έναντι της distamycin A, για την μικρή αύλακα είτε ως το αποτέλεσμα της μεταβολής στην μορφή του DNA που επιφέρει η αλληλεπίδραση του με το σύμπλοκο (ή και τα δύο ταυτόχρονα). Παρόλα αυτά, το φαινόμενο Cotton της distamycin A δεν χάνεται πλήρως, ακόμα και σε λόγο $[\text{cisRu-PDAM}]/[\text{DNA}]$ 1/1, ένδειξη που μας δείχνει ότι το σύμπλοκο δεν δρα ανταγωνιστικά με αυτήν (σε αντίθεση π.χ. με το EtBr, §10.3), αλλά το απομακρύνει από την μικρή αύλακα μετά την μεταβολή που επιφέρει στη δομή του DNA.^[86]

10.3 Φθορισμομετρία

Για την εφαρμογή της τεχνικής της φθορισμομετρίας μελετήθηκε η ανταγωνιστική δράση του συμπλόκου με την ένωση αναφοράς το βρωμιούχο αιθίδιο, EtBr (§5.9). Ο κορεσμός του EtBr με το DNA συμβαίνει σε αναλογία $[DNA]/[EtBr]=8/1$.^[221] Έτσι, τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν είχαν σταθερή συγκέντρωση DNA και ίση με $2,5 \times 10^{-5}$ M και μεταβαλλόμενη συγκέντρωση συμπλόκου, ενώ ο λόγος $[DNA]/[EtBr]$ κρατήθηκε σταθερός και ίσος με 8/1. Στο σχήμα 10.9 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού των διαλυμάτων στην περιοχή 550-900 nm με μήκος κύματος διέγερσης $\lambda_{ex}=526$ nm.

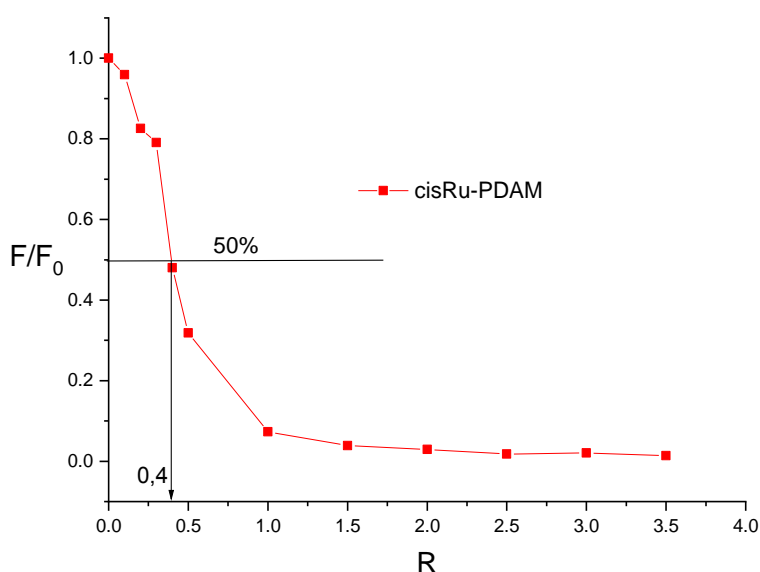


Σχήμα 10.9: Φάσμα φθορισμού σειράς διαλυμάτων (EtBr-DNA)-(cisRu-PDAM), $\lambda_{ex}=526$ nm (§7.3 (Γ))

Αν εστιάσουμε στον φθορισμό του EtBr που εκπέμπεται στα ~600 nm, στην περίπτωση της προσθήκης του cisRuPDAM στα διαλύματα (EtBr-DNA) παρατηρείται δραματική μείωση του φθορισμού, υποδεικνύοντας ισχυρή αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA και τρόπο σύνδεσης, ενδεχομένως μέσω παρεμβολής.

Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου cisRuPDAM με το DNA, γίνεται καλύτερα αντιληπτή και στο σχήμα 10.8. Από το σχήμα αυτό μπορούμε να καταλάβουμε ότι το σύμπλοκο cisRu-PDAM δρά ανταγωνιστικά ως προς τον κλασσικό παρεμβολέα EtBr. Μάλιστα, η ανταγωνιστική δράση του συμπλόκου είναι πολύ έντονη για λόγους $R > 0.2$, γεγονός που δείχνει ότι το σύμπλοκο διώχνει το EtBr από το DNA και παρεμβάλλεται το ίδιο στις υδρόφοβες περιοχές του. Επιπλέον, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα του σχήματος 10.10 παρατηρείται ότι η ένταση φθορισμού μειώνεται στο 50% σε λόγο $R=0,4$. Βέβαια, η μείωση της έντασης του φθορισμού δεν είναι απαραίτητο να οφείλεται στην παρεμβολή του συμπλόκου μας, αλλά και στην πιθανότητα το DNA να αποκτά τέτοια διαμόρφωση ώστε το EtBr να εκτίθεται σε υδρόφιλο περιβάλλον με αποτέλεσμα να σταματά να φθορίζει. Έτσι, τα αποτελέσματα αυτά

υποδεικνύουν αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής ή μέσω κάποιου άλλου τρόπου που εκθέτει το EtBr σε υδρόφιλο (πολικό) περιβάλλον.



Σχήμα 10.10: Διάγραμμα της έντασης του φθορισμού (F/F_0) του συστήματος (EtBr-DNA)-(cisRu-PDAM) συναρτήσει του λόγου R

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

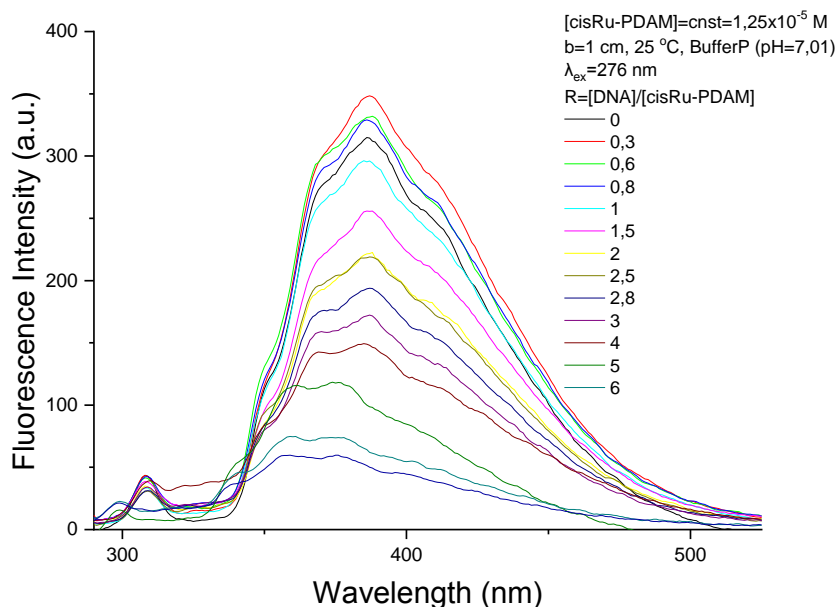
$$K_{EB}[EB]=K_{app}[Q_{1/2}]$$

Όπου, K_{EB} η σταθερά συνδεσης του EtBr με το DNA (λαμβάνεται ίση με $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), $[EB]$ η συγκέντρωση του EtBr ($3,125 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) και $[Q_{1/2}]$ η συγκέντρωση της ένωσης που προκαλεί μείωση του φθορισμού κατά 50%. Υπολογίστηκε η K_{app} για το σύμπλοκο και βρέθηκε $3,12 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Η τιμή αυτή, δείχνει ισχυρή ανταγωνιστική δράση με το EtBr και πολύ πιθανότερο τρόπο αλληλεπίδρασης του συμπλόκου, μέσω παρεμβολής και όχι συναρμογής στην άυλακα.^[222-225]

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η μεταβολή στο φθορισμό διαλυμάτων cisRu-PDAM, σταθερής συγκέντρωσης $1,25 \times 10^{-5} \text{ M}$ και μεταβαλλόμενη DNA, στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Στο σχήμα 10.9 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού των διαφόρων διαλυμάτων μετά από διέγερση σε $\lambda_{ex} = 276 \text{ nm}$ (§7.3 (Γ)).

Από τη μελέτη των φασμάτων φθορισμού του σχήματος 10.11, παρατηρούμε ότι η ένταση φθορισμού του διαλύματος cisRu-PDAM μειώνεται όσο αυξάνει η ποσότητα του DNA, χωρίς να παρατηρείται μετατόπιση των μηκών κύματος στο μέγιστο της εκπομπής (387 nm). Γνωρίζοντας ότι το DNA δεν δίνει εκπομπή φθορισμού στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, συμπεραίνεται ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το DNA και η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί απόσβεση του φθορισμού.

Η προσθήκη του DNA προκαλεί σημαντική μείωση του φθορισμού του συμπλόκου μέχρι τον λόγο $R=8$. Η μείωση αυτή υποδεικνύει μεταβολή της πολικότητας του περιβάλλοντος του φθοροφόρου, δηλ. του φαινανθρολινικού δακτυλίου του μορίου της PDAM στο σύμπλοκο. Συνήθως, μια τέτοια μεταβολή σημαίνει αύξηση τη πολικότητας του περιβάλλοντος του μορίου, σε σχέση με αυτήν πριν την αλληλεπίδραση. [221]



Σχήμα 10.11: Φάσμα φθορισμού διαλύματος σταθερής συγκέντρωσης $[cisRu-PDAM]=1,25 \times 10^{-5}$ και μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης DNA ($R=0-8$) (§7.3 (Γ))

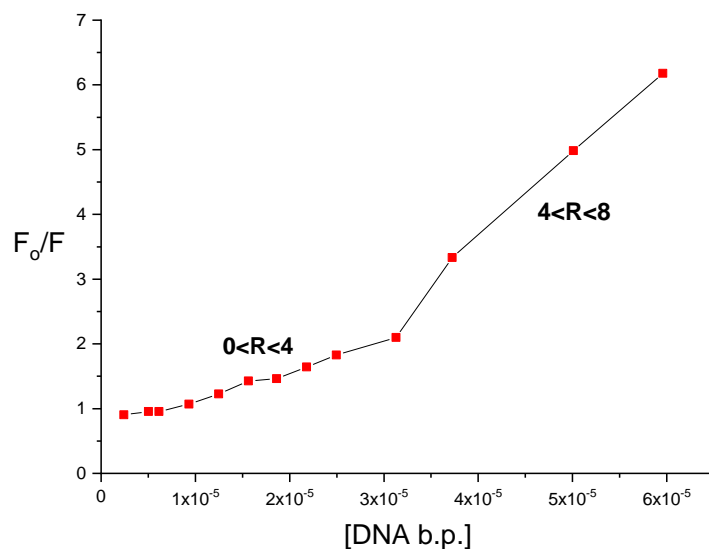
Γενικά, είναι ήδη γνωστό πως υπάρχουν 2 είδη απόσβεσης του φθορισμού, η στατική (static) και η δυναμική (dynamic), ενώ αυτή που βλέπουμε είναι φαινόμενη (apparent). Η απόσβεση (quenching) αυτή συσχετίζεται γραμμικά με το DNA μέσω της γραμμικής σχέσης του F_0/F συναρτήσεως της συγκέντρωσης του DNAbp. Ο μηχανισμός απόσβεσης είναι δυνατόν να προβλεφθεί από τα διαγράμματα της εξίσωσης Stern- Volmer:

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

Όπου:

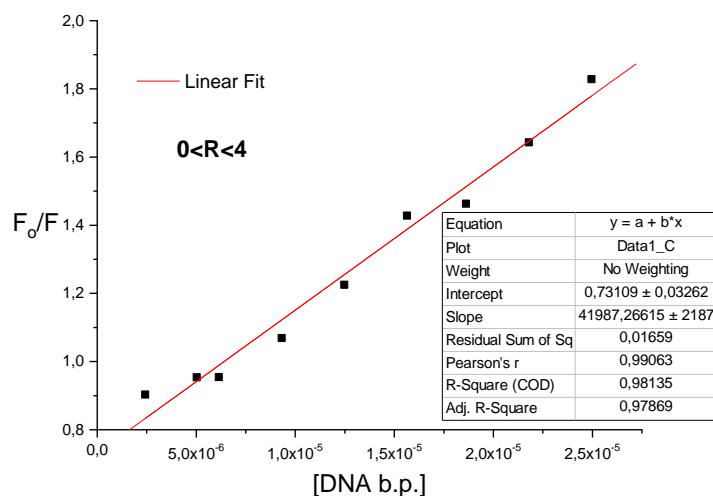
F_0 : η ένταση του φθορισμού στο διάλυμα μόνο του cisRu-PDAM ($R=0$),
 F : η ένταση φθορισμού των διαλυμάτων (cisRu-PDAM)-(DNA) στους διάφορους λόγους R και
 K_{sv} : η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer. Η έντασεις αυτές μετριοούνται στα 387 nm, όπου εκπέμπει το σύμπλοκο. [221, 226]

Στο σχήμα 10.10 που ακολουθεί παρουσιάζεται το διάγραμμα της μεταβολής του λόγου (F_0/F) σε συνάρτηση της $[DNA_{b.p.}]$ ($b.p.=base\ pair$).

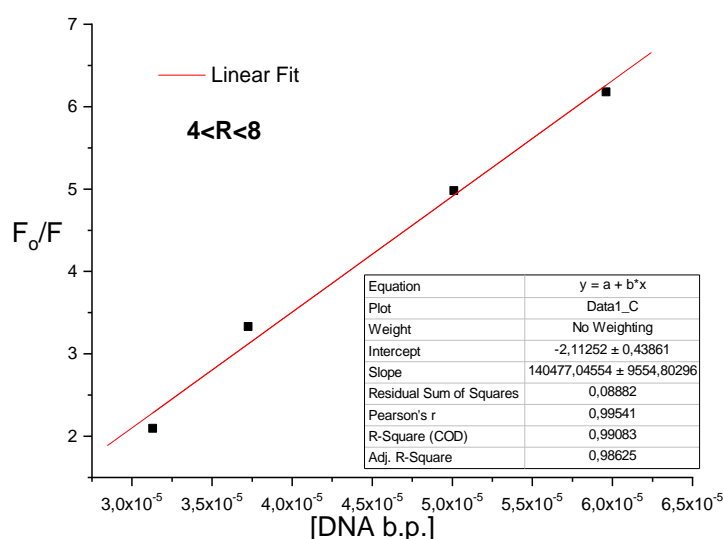


Σχήμα 10.12: Διάγραμμα μεταβολής του F_0/F σε συνάρτηση με τη [DNA b.p.] (387 nm)

Παρατηρούμε από το παραπάνω σχήμα ότι η απόσβεση της κορυφής στα 387 nm γίνεται γραμμικά με 2 διαφορετικούς τρόπους για λόγους $0 < R < 4$ και $4 < R < 8$. Αυτό υποδηλώνει 2 τρόπους απόσβεσης του φθορισμού του συμπλόκου παρουσία DNA ανάλογα με τον λόγο [DNA]/[cisRu-PDAM]. Έτσι, ενισχύεται η παρατήρηση ότι έχουμε δυο τρόπους (θέσεις) αλληλεπίδρασης συμπλόκου-DNA, κάτι που επιβεβαιώνεται στη συνέχεια του υποκεφαλαίου. Παρακάτω υπολογίζεται η K_{sv} για τις δύο περιοχές γραμμικότητας δηλαδή το παραπάνω εύρος λόγων R.



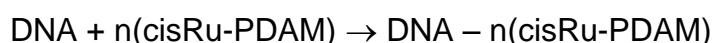
Σχήμα 10.13: Διάγραμμα μεταβολής του F_0/F σε συνάρτηση με τη [DNA b.p.] για λόγους $0 < R < 4$



Σχήμα 10.14: Διάγραμμα μεταβολής του F_0/F σε συνάρτηση με τη $[DNA_{b.p.}]$ για λόγους $4 < R < 8$

Με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω από τα διάγραμματα (σχήμα 10.11, 10.12) υπολογίζεται η σταθερά απόσβεσης για τις δύο περιοχές λόγων και είναι $K_{sv}=1,40 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ για $4 < R < 8$ και $K_{sv}=4,20 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ για $0 < R < 4$. Ο μέσος χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης απουσία αποσβέστη για το DNA είναι $\tau_0=10^{-8} \text{ s}$. Η φαινόμενη σταθερά απόσβεσης $K_q=K_{sv} \cdot \tau_0$ μπορεί να μας δώσει άμεσα πληροφορίες για τον τύπο της απόσβεσης. Εδώ βρέθηκε και στις δύο υπολογισμένες K_{sv} το K_q να είναι της τάξης $10^{12}-10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, μεγαλύτερη από τη μέγιστη αναμενόμενη τιμή της σταθεράς για μηχανισμό δυναμικής απόσβεσης ($10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) σε υδατικά διαλύματα. Οι υψηλότερες αυτές τιμές υποδεικνύουν ότι εμπλέκεται μηχανισμός στατικής αποδιέγερσης στην απόσβεση. Παρόλα αυτά, για να διακρίνουμε το είδος του μηχανισμού απόσβεσης, θα πρέπει να γίνει μελέτη σε διάφορες θερμοκρασίες. Η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer στην περίπτωση της δυναμικής απόσβεσης αυξάνει με τη θερμοκρασία, ενώ στη στατική μειώνεται.^[224, 227]

Τα αποτελέσματα της φθορισμομετρικής απόσβεσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της σταθεράς σύνδεσης (K_f) και του αριθμού των θέσεων σύνδεσης (n) του cisRu-PDAM με το DNA, στην ισορροπία:



και σύμφωνα με την εξίσωση:

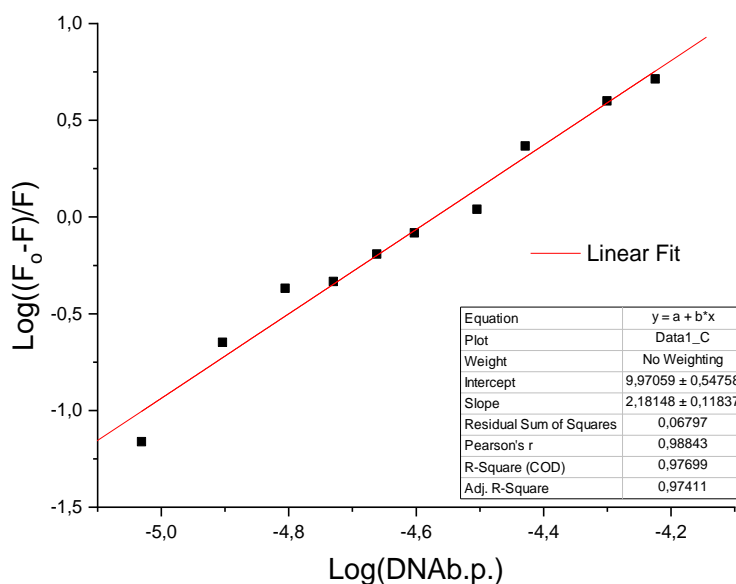
$$\log[(F_0-F)/F] = \log K_f + n \log [DNA]$$

Όπου:

F_0 : η ένταση του φθορισμού στο διάλυμα μόνο του cisRu-PDAM

F: η ένταση φθορισμού των διαλυμάτων (cisRu-PDAM)-(DNA) στους διάφορους λόγους.

Οι τιμές των (Kf) και (n) προσδιορίζονται από το διάγραμμα της μεταβολής του $\log[(F_0-F)/F]$ σε συνάρτηση με τον $\log[DNA_{p.p.}]$ (Σχήμα 10.13).^[226, 227]



Σχήμα 10.15: Διάγραμμα μεταβολής του $\log[(F_0-F)/F]$ σε συνάρτηση με τον $\log[DNA]$

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι $Kf = 9,3 \times 10^9 \text{ M}^{-2}$ και $n = 2,18$, δηλαδή ισχυρή σύνδεση και δύο θέσεις σύνδεσης με το DNA, όπως αναμένουμε.

10.4 Ιξωδομετρία

Η υδροδυναμική μέθοδο της ιξωδομετρίας είναι ίσως η πιο αξιόπιστη για την διερεύνηση του τρόπου αλληλεπίδρασης μικρών μορίων με το DNA. Το σχετικό ιξώδες των νουκλεϊνικών οξέων υπολογίζεται από τη σχέση:

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

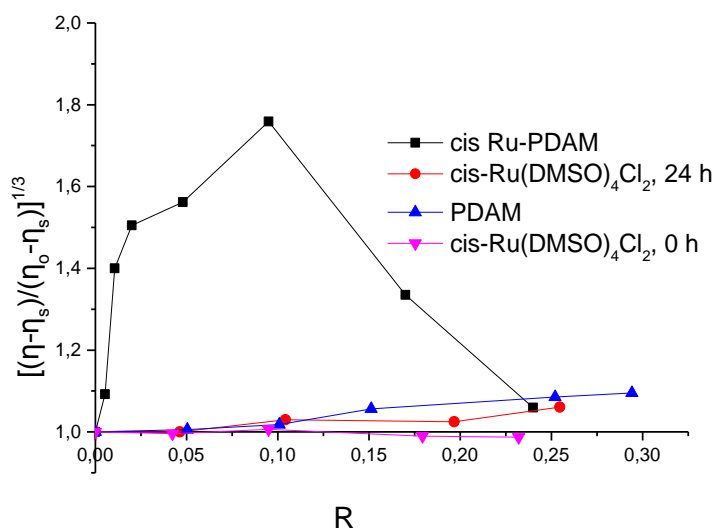
όπου t ο χρόνος (sec) ροής του κάθε διαλύματος και t_0 ο χρόνος του διαλύτη. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων γίνονται τρεις διαφορετικές μετρήσεις, οι οποίες δεν διαφέρουν περισσότερο από 0,3 sec και τελικός χρόνος λαμβάνεται ο μέσος όρος. Η αύξηση του περιμετρικού μήκους της έλικας του DNA υπολογίζεται από τα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με την προσεγγιστική σχέση:

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

όπου L , L_0 το περιμετρικό μήκος του ραβδόμορφου DNA, παρουσία και απουσία του φαρμάκου αντίστοιχα και η , η_0 τα εσωτερικά ιξώδη (για τις πολύ αραιές συγκεντρώσεις του πειράματος κατά προσέγγιση ίσα με τα ανηγμένα ιξώδη) παρουσία και απουσία του φαρμάκου. Επίσης, t , t_{DNA} και t_0 είναι οι χρόνοι ροής των διαλυμάτων DNA παρουσία του φαρμάκου, του διαλύματος DNA απουσία φαρμάκου και του διαλύτη (ρυθμιστικό διάλυμα), αντίστοιχα.

Από τα παραπάνω, μπορούμε να εξαγάγουμε άμεσα συμπεράσματα για την μεταβολή του περιστροφικού μήκους του DNA, άρα και την αλληλεπίδραση του μικρού μορίου με αυτό. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση μορίων που συνηθίζουν να αλληλεπιδρούν με τη διπλή έλικα του DNA παρεμβάλλοντας το σύστημα των δακτυλίων τους μεταξύ των ζευγών βάσεων του, διαχωρίζουν τα ζεύγη των βάσεων μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται κατά απόσταση περίπου ίση με το πάχος τους, αποελίσσοντας τοπικά τη διπλή έλικα. Έτσι, η θεωρούμενη ως κανονική περιστροφή των 36° μεταξύ δύο διαδοχικών ζευγών βάσεων μειώνεται, ανάλογα με τη στερεοχημική δομή του μορίου που παρεμβάλλεται. Γι'αυτό, κάθε μόριο παρεμβολέας αυξάνει το περιμετρικό μήκος του ραβδόμορφου DNA.^[228]

Στο Σχήμα 10.16 παρουσιάζονται τα ανηγμένα ιξώδη διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης DNA ($1 \cdot 10^{-5}$ M) και μεταβαλλόμενης συμπλόκου cisRu-PDAM. Επίσης, στο ίδιο διάγραμμα παρουσιάζονται τα ανηγμένα ιξώδη αντίστοιχων διαλυμάτων με PDAM, cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ (0h και 24h). (§7.3 (Γ))



Σχήμα 10.16: Διάγραμμα ιξωδομετρίας για cisRuPDAM, cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ 0h, 24h και PDAM

Από το σχήμα 10.14 παρατηρείται μεγάλη και απότομη αύξηση του ιξώδους του DNA κατά την προσθήκη διαλύματος του cisRu-PDAM για λόγους $R = [\text{cisRu-PDAM}]/[\text{DNA}]$ από 0 έως και 0,12. Η αύξηση αυτή του ιξώδους υποδηλώνει την αύξηση του περιμετρικού μήκους του DNA κατά την

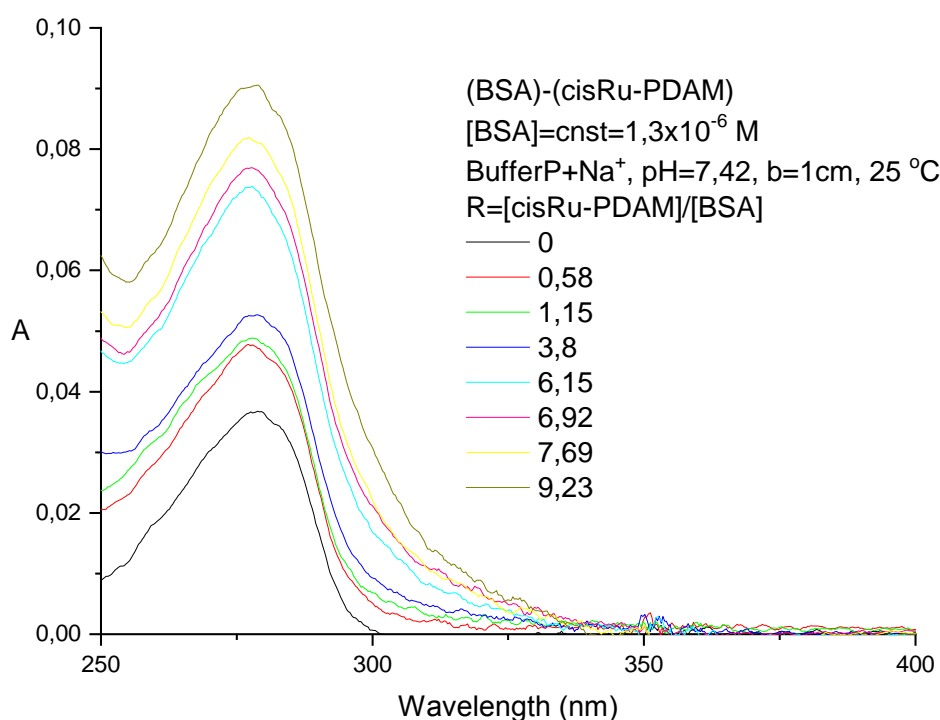
αλληλεπίδραση του με τό cisRu-PDAM, ισχυρή ένδειξη της αλληλεπίδρασης με παρεμβολή. Η μείωση του ιξώδους για τους λόγους 0,12 - 0,24 πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι το cisRuPDAM, μετά την ολοκλήρωση της παρεμβολής συνεχίζει να συνδέεται με τρόπο που να προκαλεί κάμψη του DNA. Η μεταβολή υποδεικνύει αλληλεπίδραση με περισσότερο από έναν τρόπους σε μεγαλύτερους λόγους R, κάτι που συμφωνεί με τα αποτελέσματα από τις προηγούμενες μελέτες (φασματοφωτομετρική και φθορισμομετρική τιτλοδότηση, κυκλικός διχρωισμός).^[70, 229]

Από τη μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων της επίδρασης στο ανηγμένο ιξώδες της PDAM, συμπεραίνεται η πολύ πιο ισχυρή επίδραση του συμπλόκου στο ανηγμένο ιξώδες του DNA. Στο διάγραμμα, επίσης, φαίνονται και οι μεταβολές του ανηγμένου ιξώδους του DNA των αντίστοιχων σειρών με cis-Ru(DMSO)₄Cl₂, όπου στην μία (24h), η προσθήκη του προδρόμου στα διαλύματα έγινε αφού είχε διαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα για 24 ώρες, ενώ στην άλλη (0h), κατευθείαν μόλις διαλύθηκε. Οι δυο σειρές αφέθηκαν ακόμα 24 ώρες για επώαση. Είναι χαρακτηριστική η μικρή αύξηση του ιξώδους με αύξηση του λόγου R για τα διαλύματα 24h, ενδεικτικό της σταδιακής αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA σε σχέση με την σειρά 0h, όπου δεν έχουμε μεταβολή του ιξώδους. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τις παρατηρήσεις στα φάσματα CD και μοιάζει επίσης αρκετά, με την αντίστοιχη συστήματος (trans-Ru(DMSO)₄Cl₂)-(DNA), κάτι που υποδηλώνει ενδεχομένως ίδιο τρόπο αλληλεπίδρασης με το DNA (παράρτημα).^[218]

Κεφάλαιο 11^ο : Μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου cisRu-PDAM με την πρωτεΐνη BSA

11.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

Στο σχήμα 11.1 παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis σειράς διαλυμάτων σταθερής συγκέντρωσης BSA ίσης με $1,3 \times 10^{-6}$ M και μεταβαλλόμενη συμπλόκου cisRu-PDAM, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών νατρίου 0,1 M και pH=7,42 (§7.3 (Δ)).

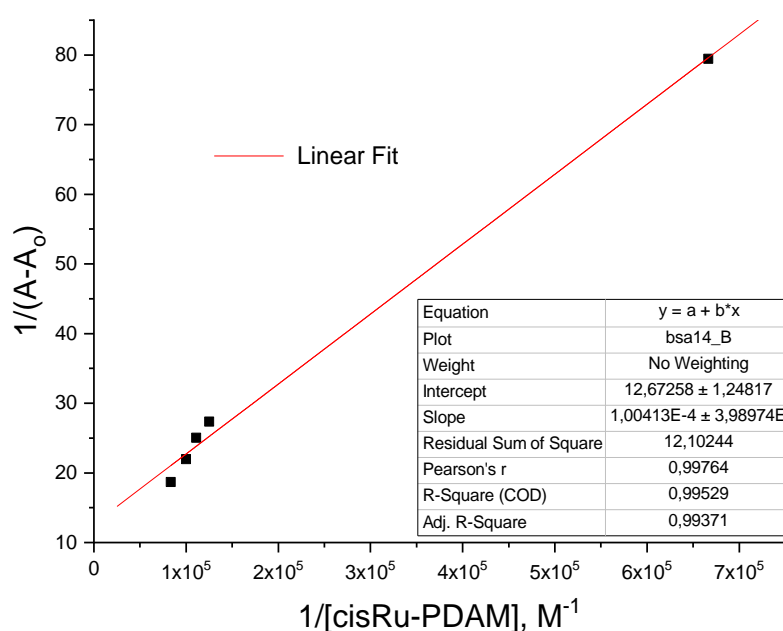


Σχήμα 11.1: Φάσματα UV-Vis της σειράς διαλυμάτων BSA-(cisRu-PDAM) (§7.3 (Δ))

Από τα φάσματα στο σχήμα 11.1 παρατηρούμε μια σταδιακή αύξηση της ταινίας απορρόφησης της BSA στα 278 nm με προσθήκη του συμπλόκου. Η αύξηση είναι μια πρώτη ένδειξη ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με την BSA προκαλώντας δομικές αλλαγές που ενισχύουν τις $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεις των αρωματικών δακτυλίων των αντίστοιχων αμινοξέων που υπάρχουν στην πρωτεΐνη (τρυπτοφάνη, τυροσίνη). Αυτό συμβαίνει λόγω αλλαγής της πολικότητας στο χώρο που βρίσκονται εκτεθειμένα αυτά τα αμινοξέα.

Από το παραπάνω φάσμα είναι δυνατόν να υπολογίσουμε την σταθερά σύνδεσης μεταξύ ενός μορίου του συμπλόκου και της BSA. Αυτή υπολογίζεται από την συνάρτηση $1/(A-A_0)=f(1/[X])$, όπου A είναι η απορρόφησης της συμπλεγμένης BSA σε κάθε διάλυμα και A₀ η απορρόφηση της ελεύθερης BSA

στα 278 nm. Για Χ αναφερόμαστε στο μικρό μόριο που αλληλεπιδρά με την BSA. Η παραπάνω συνάρτηση είναι γραμμική και η σταθερά σύνδεσης K_b βρίσκεται από τον λόγο της τεταγμένης της ευθείας προς την κλίση της. Στην περίπτωση του συμπλόκου cisRu-PDAM και με την βοήθεια του διαγράμματος που παρουσιάζεται στο σχήμα 11.2 υπολογίζεται η K_b και είναι ίση με $1,27 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.



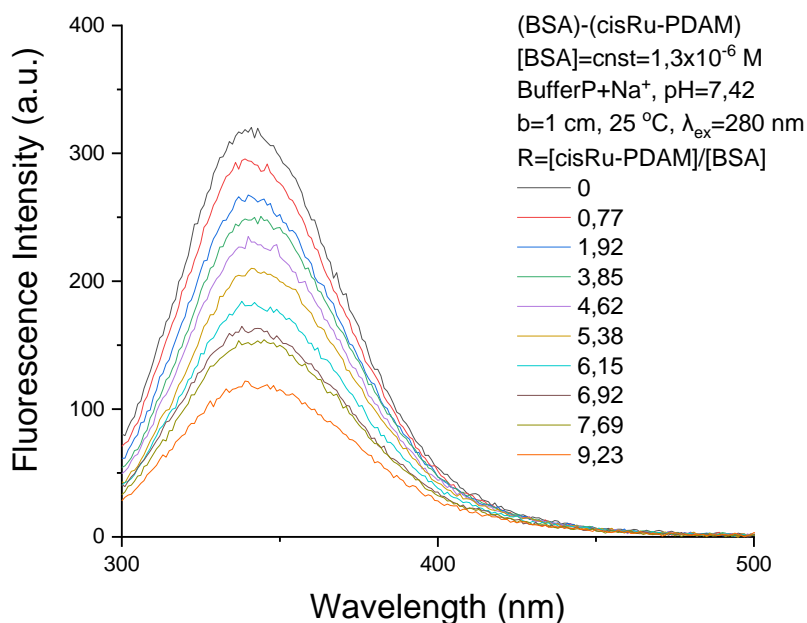
Σχήμα 11.2: Διάγραμμα μεταβολής του $1/(A-A_0)$ σε συνάρτηση με το $1/[\text{cisRu-PDAM}]$ για τον υπολογισμό της K_b

Η τιμή αυτή της σταθεράς σύνδεσης είναι πολύ σημαντική καθώς βρίσκεται ανάμεσα στο εύρος τιμών 10^4 - 10^6 M^{-1} , το οποίο είναι το επιθυμητό για ένα μεταφορέα φαρμάκου στο αίμα. Έτσι, από την τιμή αυτή μπορούμε να πούμε πως η BSA είναι ένας πολύ καλός μεταφορέας του συμπλόκου cisRu-PDAM, in vivo.^[230, 231]

11.2 Φθορισμομετρία

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με την BSA λήφθηκαν φάσματα εκπομπής με μήκος κύματος διέγερσης 280 nm, σειρά διαλυμάτων σταθερής BSA συγκέντρωσης $1,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ και μεταβαλλόμενης συμπλόκου cisRu-PDAM, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών νατρίου 0,1 M με Na^+ και $\text{pH}=7,42$ (§7.3 (Δ)). Αυτά παρουσιάζονται στο σχήμα 11.3. Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι με αυξανόμενη συγκέντρωση του συμπλόκου, παρατηρείται αξιοσημείωτη μείωση των εντάσεων φθορισμού του BSA, χωρίς σημαντική μετατόπιση στο μέγιστο μήκος κύματος της εκπομπής (340 nm). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με τη BSA προκαλώντας

δομικές αλλαγές που επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον των τρυπτοφανών της, ώστε τελικά να αποσβένει τον εγγενή φθορισμό της (που οφείλεται κυρίως στις τρυπτοφάνες).^[232]



Σχήμα 11.3: Φάσματα φθορισμού σειράς διαλυμάτων σταθερής BSA συγκέντρωσης $1,3 \times 10^{-6}$ M και μεταβαλλόμενης συμπλόκου cisRu-PDAM (§7.3 (Δ)), $\lambda_{ex} = 280$ nm

Γνωρίζοντας την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 340 nm μπορούμε να υπολογίσουμε την σταθερά απόσβεσης K_{sv} από την σχέση^[210, 233] :

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

Όπου,

F_0 : η ένταση του φθορισμού στο διάλυμα μόνο της cisRu-PDAM ($R=0$),

F : η ένταση φθορισμού των διαλυμάτων (cisRu-PDAM)-(BSA) στους διάφορους λόγους R ,

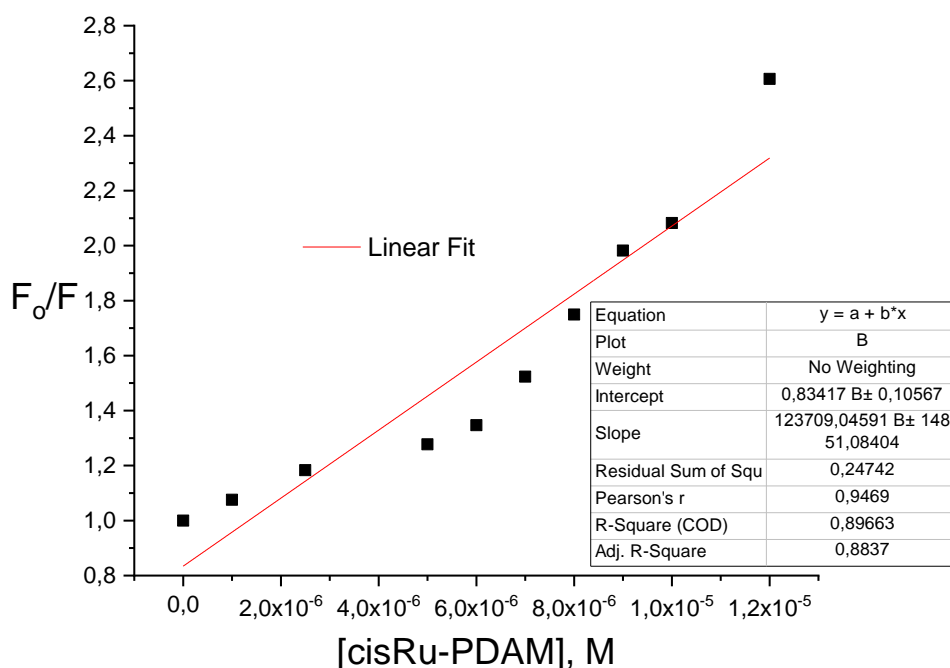
Q : η συγκέντρωση του cisRu-PDAM σε κάθε διάλυμα,

τ_0 : ο μέσος χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης του φθοροφόρου (BSA) απουσία αποσβέστη, ίσος με 2×10^{-8} s για την ελεύθερη BSA

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

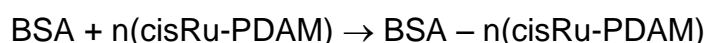
K_q : η σταθερά απόσβεσης

Στο σχήμα 11.4 παρουσιάζεται το διάγραμμα της μεταβολής του λόγου (F_0/F) σε συνάρτηση του $[cisRu-PDAM]$. Από αυτό και την σχέση (1) μπορούμε να υπολογίσουμε την K_{sv} και την σταθερά απόσβεσης K_q . Αυτές είναι ίσες με $1,24 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ και $2,48 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, αντίστοιχα.



Σχήμα 11.4: Διάγραμμα μεταβολής του F_0/F σε συνάρτηση με τη [cisRu-PDAM]

Όταν ένα μικρό μόριο αλληλεπιδρά ανεξαρτήτως θέσης με ένα μακρομόριο μπορεί να προσδιοριστεί η σταθερά σύνδεσης (K_f) και ο αριθμός των θέσεων σύνδεσης (n) σε αυτό, από τα φάσματα φθορισμομετρικής τιτλοδότησης του μακρομορίου με το μικρό μόριο. Στην περίπτωση του συμπλόκου cisRu-PDAM με την BSA, στην ισορροπία έχουμε:



και ισχύει η εξίσωση:

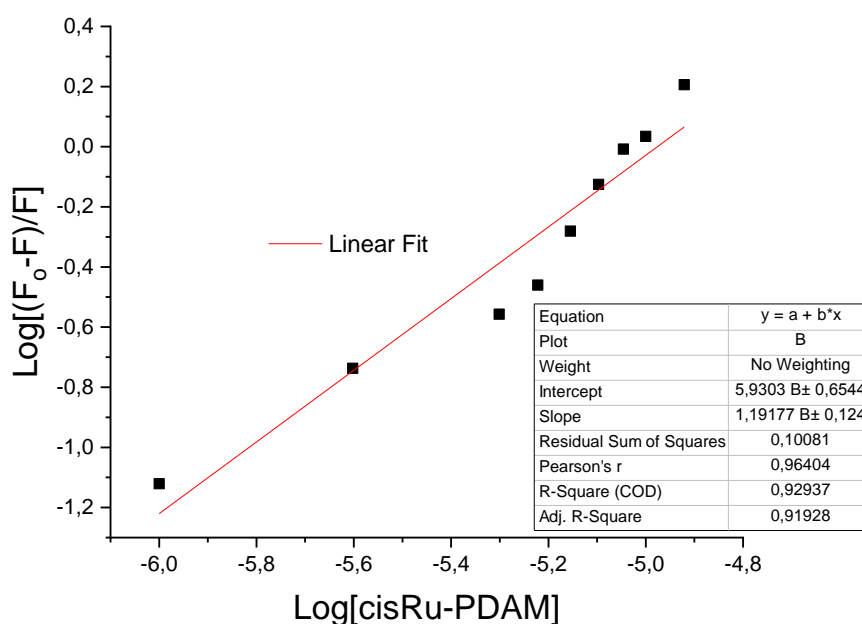
$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_f + n \log[BSA]$$

Όπου:

F_0 : η ένταση του φθορισμού στο διάλυμα μόνο του cisRu-PDAM

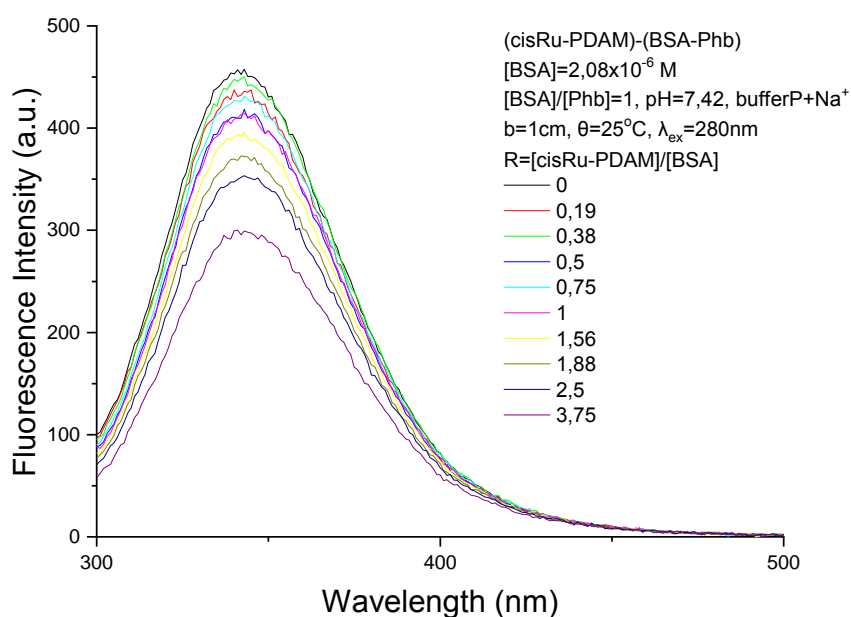
F : η ένταση φθορισμού των διαλυμάτων (cisRu-PDAM)-(BSA) στους διάφορους λόγους

Στο σχήμα 11.5 παρουσιάζεται το διάγραμμα μεταβολής του $\log[(F_0 - F)/F]$ σε συνάρτηση με τον $\log[\text{cisRu-PDAM}]$, στα 340 nm. Από το διάγραμμα αυτό υπολογίζεται η K_f και είναι ίση με $K_f = 8,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ και $n = 1,19$, υποδεικνύοντας μία θέση αλληλεπίδρασης στην BSA. Η τιμή της K_f έχει ίδια τάξη μεγέθους σε σχέση με την ήδη υπολογισμένη K_b και μέσα στα όρια ώστε να μπορεί να λειτουργήσει η BSA σαν μεταφορέας του συμπλόκου.^[210, 230, 231, 233, 234]



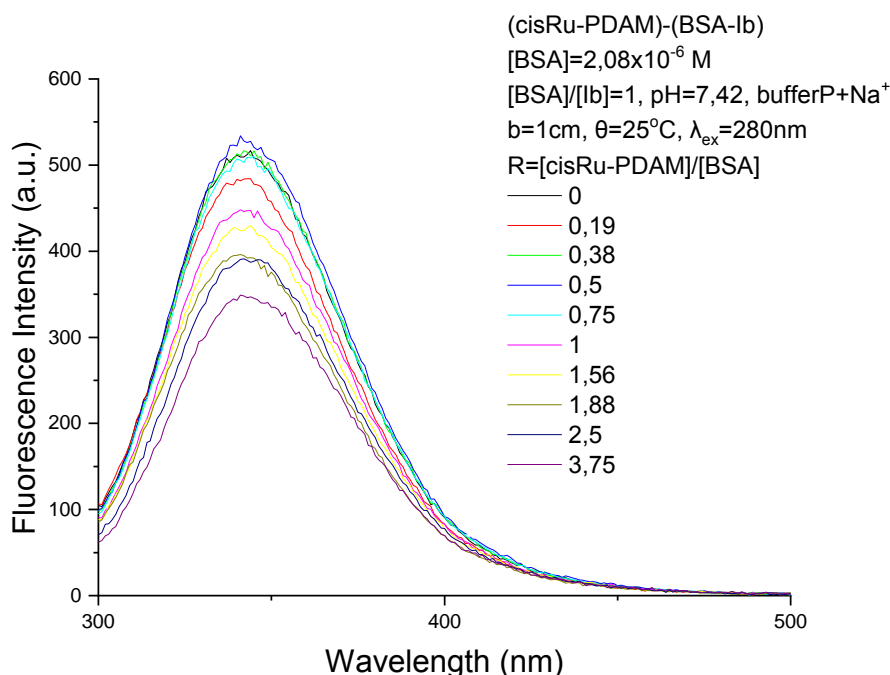
Σχήμα 11.5: Διάγραμμα μεταβολής του $\log[(F_0-F)/F]$ σε συνάρτηση με τον $\log[\text{cisRu-PDAM}]$

Ένας πολύ δημοφιλής τρόπος ανίχνευσης του σημείου αλληλεπίδρασης ενός μικρού μορίου με τις SAs είναι η μελέτη ανταγωνιστικής δράσης με φάρμακα που είναι ήδη γνωστό ότι δεσμεύονται στα σημεία Sudlow I ή II. Εδώ εξετάζονται τα φάρμακα rhenylbutazone (που δεσμεύεται στο σημείο I) και ibuprofen (που δεσμεύεται στο σημείο II).



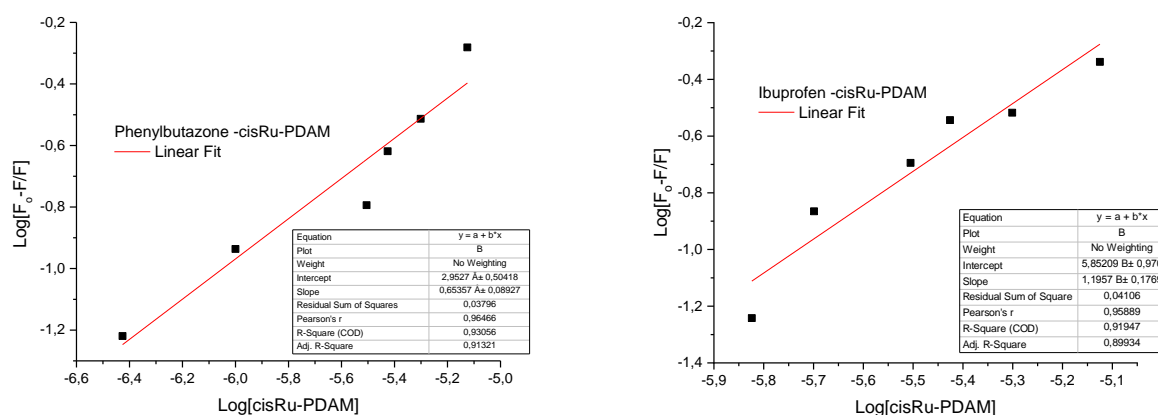
Σχήμα 11.6: Φάσματα φθορισμού σειράς διαλυμάτων (BSA-Phb)-(cisRu-PDAM) (§7.3 (Δ))

Στα σχήματα 11.6 και 11.7 παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού σειράς διαλυμάτων (BSA-drug)-(cisRu-PDAM) σταθερής συγκέντρωσης [BSA] και ίσης με $[drug]=[phenylbutazone]=[ibuprofen]=2,08 \times 10^{-6}$ M. Το μήκος κύματος διέγερσης επιλέχθηκε 280 nm.



Σχήμα 11.7: Φάσματα φθορισμού σειράς διαλυμάτων (BSA-Ib)-(cisRu-PDAM) (§7.3 (Δ))

Με όμοιο τρόπο υπολογισμού της σταθεράς σύνδεσης K_f , όπως στα διαλύματα σταθερής συγκέντρωσης BSA και μεταβαλλόμενης συμπλόκου (σχέση (1)), υπολογίζουμε τις αντιστοιχες σταθερές σύνδεσης για το σύμπλοκο παρουσία κάθε φαρμάκου. Στη περίπτωση του BSA-phenylbutazone, $K_f=8,9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ και του BSA-Ibuprofen, $K_f=7,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (σχήμα 11.8).

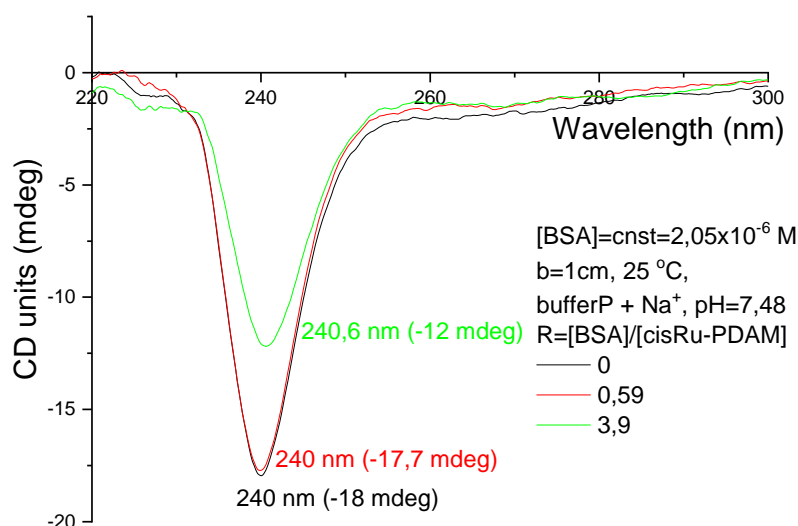


Σχήμα 11.8: Διαγράμματα F_0/F προς $\log[\text{cisRu-PDAM}]$ σειρών (BSA-PhB)-(cisRu-PDAM) και (BSA-Ib)-(cisRu-PDAM)

Αν συγκρίνουμε τις σταθερές σύνδεσης του συμπλόκου στην BSA απουσία φαρμάκου, με αυτές που βρέθηκαν παρουσία ibuprofen και phenylbutazone μπορούμε εύκολα να διαπιστώσουμε ότι η σταθερά σύνδεσης (BSA)-(cisRu-PDAM) μειώνεται σχεδόν κατά 3 τάξεις μεγέθους παρουσία phenylbutazone. Η παρατήρηση αυτή μας δείχνει ισχυρή ανταγωνιστική δράση του συμπλόκου με το phenylbutazone στην θέση Sudlow I, όπου αυτό εισέρχεται. Αντίθετα, η σταθερά σύνδεσης (BSA)-(cisRu-PDAM) φαίνεται να μην μεταβάλλεται παρουσία ibuprofen, δείχνοντας ότι το σύμπλοκο δεν δρα ανταγωνιστικά στο σημείο Sudlow II, όπου και αυτή δεσμεύεται. (§11.4).^[210, 233, 235]

11.3 Κυκλικός διχρωϊσμός

Στο σχήμα 11.7 παρουσιάζονται τα φάσματα CD της ελεύθερης BSA με συγκέντρωση $2,04 \times 10^{-6}$ M και των διαλυμάτων BSA ίδιας συγκέντρωσης παρουσία συμπλόκου cisRu-PDAM (§7.3 (Δ)).



Σχήμα 11.9: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού BSA και BSA-(cisRu-PDAM) για λόγους $R=0,59$ και $3,9$

Από τα παραπάνω φάσματα παρατηρούμε ότι με προσθήκη του συμπλόκου στην BSA έχουμε μείωση του αρνητικού φαινομένου Cotton της BSA στα 240 nm (υποχρωμία) πηγαίνοντας από λόγο $R=0$ σε λόγο $R=3,9$ και ελάχιστη μετατόπιση της κορυφής αυτής σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (red shift). Η κορυφή αυτή οφείλεται σε $n \rightarrow \pi^*$ ηλεκτρονικές μεταπτώσεις της α -έλικας της πρωτεΐνης. Έτσι, οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν σημαντικές αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της BSA με μερική καταστροφή της α -έλικας

της, λόγω διατάραξης των υδρογονικών δεσμών της. Σε τέτοια περίπτωση, ίσως να μετατρέπεται σε ένα βαθμό, σε μια μη οργανωμένη περιέλιξη (random coil). Το φαινόμενο αυτό άλλωστε, όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, μπορεί να συμβεί όταν ένα φάρμακο αλληλεπιδρά στα σημεία Sudlow της BSA.^[123, 236, 237]

11.4 Υπολογισμός ενέργειας FRET

Η ενέργεια FRET (Förster resonance energy transfer), σύμφωνα με τον Förster, είναι ένας μηχανισμός μεταφοράς ενέργειας μεταξύ δύο χρωμοφώρων. Όταν έχουμε αλληλεπίδραση μιας πρωτεΐνης με σύμπλοκο ή υποκαταστάτες η ενέργεια στη διεγερμένη κατάσταση μεταφέρεται από τον δότη (BSA) στον αποδέκτη (σύμπλοκο) ώστε ο δότης τελικά να μην παρουσιάζει εκπομπή. Αυτός είναι και ο λόγος της μεγάλης απόσβεσης στο φάσμα φθορισμού της BSA, παρουσία συμπλόκου. Οι απαραίτητες συνθήκες για να γίνει η μεταφορά αυτή έχουν ως εξής :

- Το μόριο δότης να φθορίζει
- Το φάσμα εκπομπής του δότη να αλληλεπικαλύπτεται με την απορρόφηση του δέκτη
- Η απόσταση μεταξύ του δότη και του δέκτη να είναι λιγότερο των 8 nm

Από την θεωρία για την ενέργεια FRET, η ποσότητα της ενέργειας μεταφοράς μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 - r^6} \quad (1)$$

Όπου,

F και F₀ είναι οι εντάσεις φθορισμού του δότη (BSA) πριν και μετά την δέσμευση του δέκτη (cisRu-PDAM) σε αυτόν, r είναι η απόσταση μεταξύ του δότη και του δέκτη και R₀ είναι η κρίσιμη απόσταση όταν E = 50% και υπολογίζεται από τις σχέσεις :

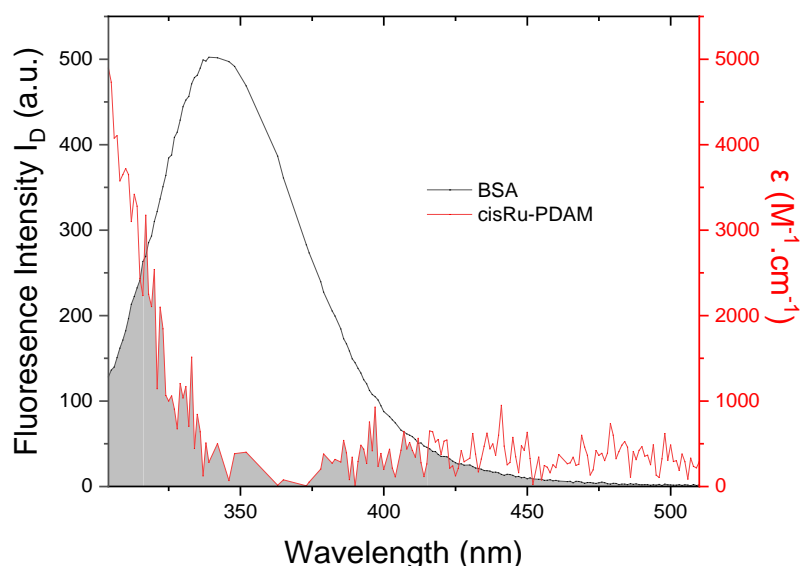
$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} \cdot k^2 \cdot N^{-4} \cdot \Phi \cdot J \quad (2)$$

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad (3)$$

όπου το k² είναι ο παράγοντας χωρικού προσανατολισμού του διπόλου, το N είναι ο δείκτης διάθλασης του μέσου και το Φ αντιπροσωπεύει την κβαντική απόδοση φθορισμού του BSA. Το J υποδηλώνει την ολοκλήρωση αλληλεπικάλυψης του φάσματος εκπομπών φθορισμού της BSA και του φάσματος απορρόφησης της cisRu-PDAM, όπως φαίνεται στο σχήμα 11.10.

$F(\lambda)$ είναι η ένταση φθορισμού της BSA στα 340 nm (διέγερση στα 280 nm) και $\epsilon(\lambda)$ ο συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του φάσματος UV-Vis στο αντίστοιχο λ . Τέλος, για την BSA είναι $k^2 = 2/3$, $N = 1.336$, και $\Phi = 0.15$.

Από το σχήμα 11.8 υπολογίστηκε το $J=1,275 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L}$. Η υπολογιζόμενη τιμή E , R_0 , and r είναι 0,153, 1.81 nm και 2.40 nm, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι έχουμε μη ακτινοβολούσα μεταφορά φορτίου από την BSA στο σύμπλοκο (non radiative decay) γιατί $r < 8 \text{ nm}$ και $r > R_0$. Ο μηχανισμός απόσβεσης της BSA είναι στατικός. Ακόμα, η τιμή του r είναι $0.5R_0 < r < 1.5R_0$, κάτι που επιβεβαιώνει ότι φτιάχνεται σύμπλοκο (cisRu-PDAM)-BSA στην θεμελιώδη κατάσταση και όχι στη διεγερμένη. Τέλος, η τιμή του r είναι μικρότερη του 10 nm και δείχνει ότι η μεταφορά ενέργειας γίνεται με μεγάλη πιθανότητα. Τέτοια απόσταση r παρατηρείτε συχνά όταν το σύμπλοκο εισέρχεται στην υδροφοβική κοιλότητα Sudlow I (όπου βρίσκεται η Trp-212).^[210, 231, 238-240]

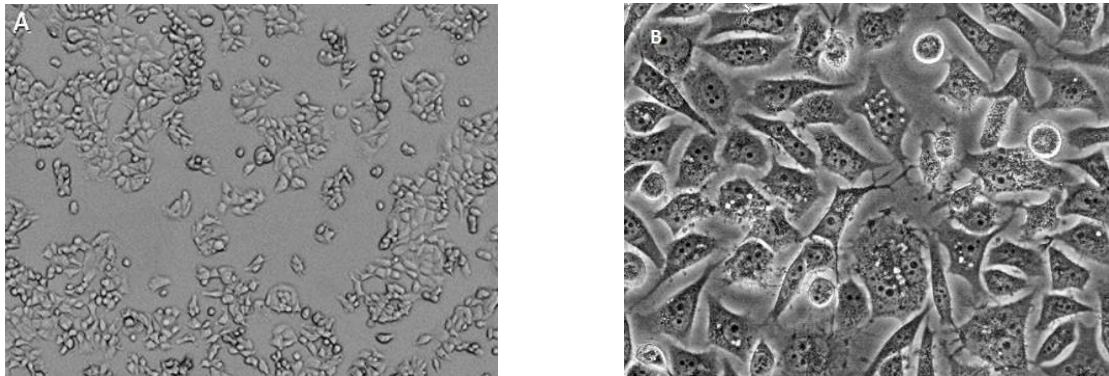


Σχήμα 11.10: Αλληλεπικάλυψη μεταξύ του φάσματος απορρόφησης του συμπλόκου ($c=2 \times 10^{-6} \text{ M}$) και εκπομπής της BSA ($c=2 \times 10^{-6} \text{ M}$) με διέγερση στα 280 nm, σε ρυθμιστικό διάλυμα (§7.3 (Δ))

Κεφάλαιο 12° : Μελέτη της κυτταροτοξικότητας του συμπλόκου cisRu-PDAM

12.1 In vitro αξιολόγηση

Για τη βιολογική αξιολόγηση του cisRu-PDAM, του προδρόμου συμπλόκου και της PDAM, διερευνήθηκε η κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7 (γυναικείου μαστού) και PC-3 (προστάτη). Τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν στο ερευνητικό κέντρο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Ερευνών, Ενέργειας και Ασφάλειας, από την Ερευνήτρια Β', κ. Μαρία Παραβατού και τη Δρ. Βαρβάρας Μαυροειδή με τη δοκιμασία MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium). Στην εικόνα 2 παρουσιάζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 2: Μορφολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7(A)^[<https://www.moleculardevices.com/applications/cell-counting/cell-counter-mcf-7-cells#graf>] και PC-3(B)^{[[Wikipedia](#)]} σε οπτικό μικροσκόπιο

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

12.2 Πειραματική διαδικασία - Υλικά και όργανα

Η in vitro βιολογική αξιολόγηση των ενώσεων έγινε με αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας στις καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού MCF-7 και προστάτη PC-3. Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε D-MEM θρεπτικό μέσο

ανάπτυξης εμπλουτισμένο με 10% FBS, 100 U/ml πενικιλίνης, 100 µg/mL στρεπτομυκίνης και 2 mM γλουταμίνη. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες και αναπτύχθηκαν στους 37 °C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5 % CO₂. Τα υποσυρρέοντα κύτταρα αποκολλήθηκαν με 0,05 % θρυψίνη-EDTA. Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώνονται σε κλίβανο αποστείρωσης πριν την χρήση τους και τα πειράματα έλαβαν χώρα μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής με βάση το πρωτόκολλο αποφυγής μολύνσεων.

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

12.3 Διατήρηση – Ανάπτυξη κυττάρων

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

12.4 Κατάψυξη – Απόψυξη κυττάρων

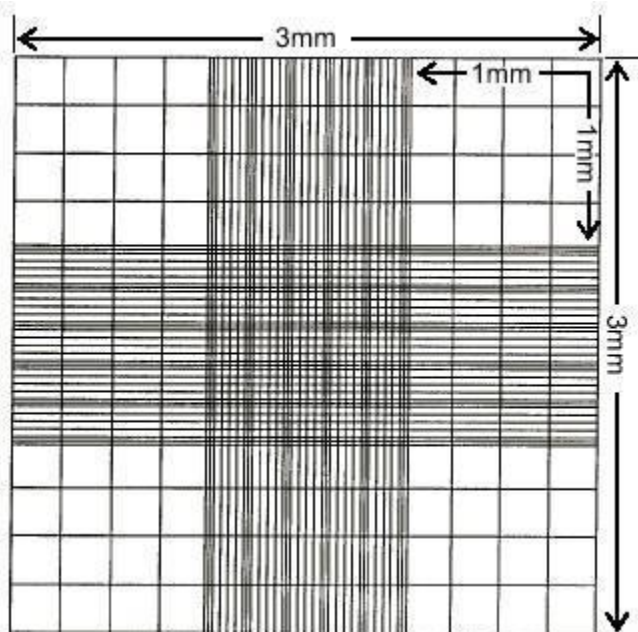
Για την κατάψυξη των κυττάρων, το ίζημα μετά την θρυψινοποίηση επαναιωρείται σε διάλυμα 10% DMSO σε FBS και κατανέμεται σε κρυοφιαλίδια. Παρουσία του DMSO αποφεύγεται η διάλυση της κυτταρικής μεμβράνης που

επέρχεται από την αύξηση του κυτταρικού όγκου κατά τον σχηματισμό των παγοκρυστάλλων κατά την κυτταρική ψύξη. Η ψύξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά με διαδοχική τοποθέτηση των φιαλιδίων με τα κύτταρα για 30 λεπτά στους 4 °C, 1 h στους -20 °C, 16-20 h στους -80 °C και τελικά μεταφορά σε ειδικές φιάλες αζώτου (-196°C). Κατά την απόψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα αποψύχονται ταχύτατα με τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C, φυγοκεντρούνται στις 1200 rpm για 10 min και εν συνεχεία το ίζημα των κυττάρων επανεωρείται προσεκτικά σε εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό και μεταφέρεται σε νέες φλάσκες καλλιέργειας.

12.5 Μέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έγινε με τη χρήση αιματοκυτταρομέτρου (πλάκα Neubauer). Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες. Η κάθε επιφάνεια αποτελείται από εννέα μεγάλα τετράγωνα σε μορφή πλέγματος (σχ. 12.1). Κάθε ένα από τα τέσσερα τετράγωνα στις γωνίες χωρίζεται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα. Κάθε μεγάλο τετράγωνο έχει επιφάνεια 1mm².

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



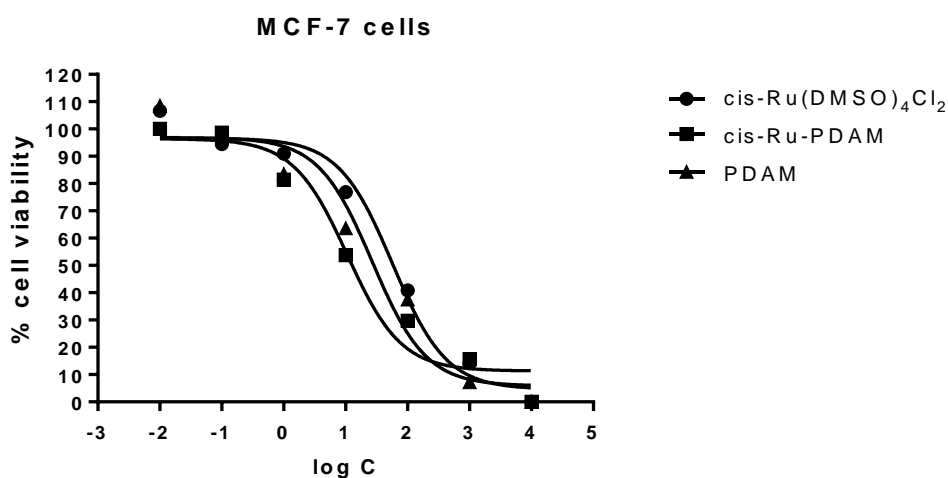
Σχήμα 12.1: Αιματοκυττόμετρο

12.6 Προσδιορισμός βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT

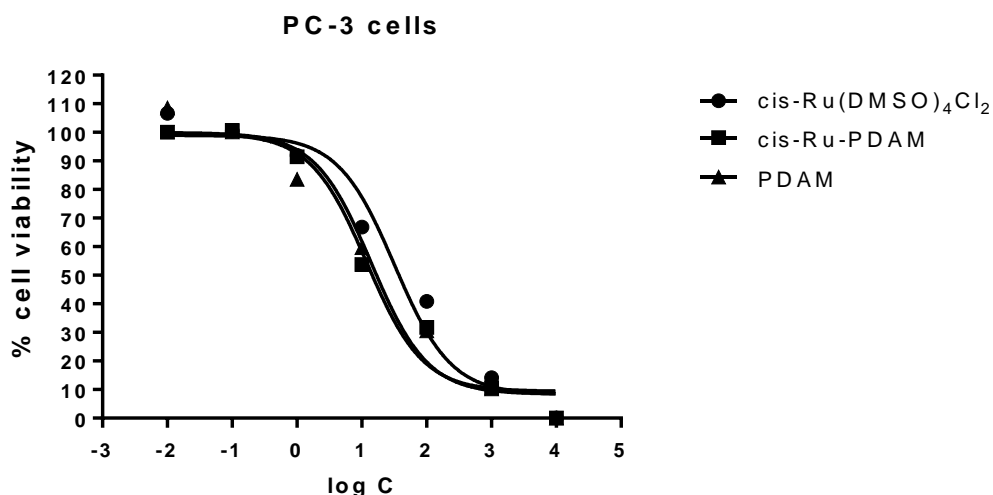
Η αρχή της μεθόδου αναφέρεται στο θεωρητικό μέρος (§ 6.3).

➤ Αποτελέσματα

Οι καμπύλες κυτταροτοξικότητας που προέκυψαν και για τις 2 κυτταρικές σειρές παρουσιάζονται στο σχήμα 12.2 και 12.3. Στον άξονα x φαίνεται ο λογάριθμος της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος.



Σχήμα 12.2: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας των PDAM, cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ και cisRu-PDAM σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού MCF-7



Σχήμα 12.3: Καμπύλες κυτταροτοξικότητας των PDAM, cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ και cisRu-PDAM σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη PC-3

Η τοξικότητα του συμπλόκου που καταγράφηκε και στις δύο καρκινικές σειρές είναι αρκετά υψηλή και είναι εμφανές ότι η κυτταρική επιβίωση μειώνεται, αυξανόμενης της συγκέντρωσης των ενώσεων (δοσοεξαρτώμενο τρόπο - dose depended manner). Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ (συγκέντρωση που αναστέλλει το 50% της ανάπτυξης των κυττάρων) μετά από 48 h επώασης στα κύτταρα. Οι τιμές αυτές παρουσιάζονται ως η μέση τιμή IC₅₀ (μΜ) ± την τυπική απόκλιση και είναι αποτελέσματα από 3 ανεξάρτητα πειράματα, όπου η κάθε συνθήκη επαναλαμβανόταν εις τετραπλούν.

Πίνακας 12: Τιμές IC₅₀ (μΜ)± την τυπική απόκλιση, των υπό αξιολόγηση ενώσεων σε κύτταρα MCF-7, PC-3 και η βιβλιογραφική τιμή του cis-platin στις αντίστοιχες σειρές

Ένωση υπό αξιολόγηση	MCF-7	PC-3
cis-Ru(DMSO)₄Cl₂	48,09 ± 3,22	36,49 ± 6,81
cis-Ru-PDAM	12,76 ± 5,97	10,98 ± 3,03
PDAM	21,79 ± 5,41	15,23 ± 3,68

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα επιβεβαιώνεται η υψηλή τοξικότητα του συμπλόκου εναντίον των κυτταρικών σειρών που μάλιστα είναι αρκετά κοντά (όμοια) με αυτή του cis-platin, σύμφωνα με την βιβλιογραφία (στο βαθμό που μπορούμε να συγκρίνουμε).^[71, 241] Κατόπιν, οι ληφθείσες τιμές IC₅₀ για το σύμπλοκο είναι αισθητά μεγαλύτερες από αυτές του προδρόμου συμπλόκου και του υποκαταστάτη (στη κυτταρική σειρά MCF-7).

Σε αρκετά σύμπλοκα του ρουθηνίου η κυτταροτοξικότητα είναι σχετικά χαμηλή, παρόλο το μεγάλο ενδιαφέρον τους ως πιθανά αντικαρκινικά. Η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων, της συγγένειας δέσμευσης του DNA και της σταθερότητας της υδρόλυσης υποδηλώνει ότι οι διαφορές στην κυτταρική πρόσληψη και στους επιπρόσθετους βιολογικούς στόχους μπορεί να διαδραματίζουν ακόμη σημαντικότερο ρόλο στην αντικαρκινική τους δράση. Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, μεγάλης σημασίας είναι οι βιολογικές εφαρμογές φαινανθρολινικών συμπλόκων Ru(II), όπως [Ru(Me₄phen)₃]²⁺, [Ru(phen)₃]²⁺, σε σχέση με αντιβακτηριακούς ή και αντικαρκινικούς παράγοντες. Η αλληλεπίδραση με DNA ή και τις βακτηριακές μεμβράνες είναι ο πρωταρχικός μηχανισμός δράσης που συνδέεται με την αντιβακτηριακή δράση, ενώ η αντικαρκινική δραστηριότητα προσδιορίζεται κυρίως με την αλληλεπίδραση με το DNA ή και με την παραγωγή ROS. Επίσης, η σύμπλεξη του ρουθηνίου με πολυπυριδιλικούς υποκαταστάτες ενισχύει την δράση τέτοιων συμπλόκων στην φωτοδυναμική θεραπεία. Παρά τον τεράστιο αριθμό πιθανών αντιμικροβιακών

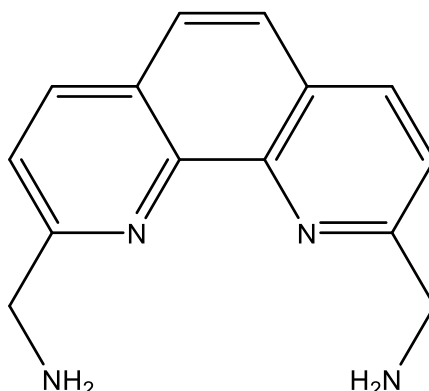
ή αντικαρκινικών παραγόντων, πολλά παρουσιάζουν δραστηριότητα μόνο εναντίον ενός τύπου βακτηρίων, ενώ παράλληλα παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα έναντι υγιών ευκαρυωτικών κυττάρων. Επίσης, πολλά σύμπλοκα απορρίπτονται λόγω κακής διαλυτότητας στο νερό, της θερμικής αστάθειας ή χαμηλής πρόσληψης κυττάρων.

Συμπερασματικά, η σύνθεση πολυπυριδιλικών συμπλόκων Ru(II) με βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως καλύτερη διαπερατότητα από την κυτταρική μεμβράνη, υψηλότερη διαλυτότητα και χαμηλή τοξικότητα έναντι υγιών κυττάρων αποτελεί πρόκληση για τους επιστήμονες και προϋποθέτει συνεργασία πολλών ειδικοτήτων (νανοιατρική, χημεία, βιολογία κλπ.).^[242, 243]

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του παραγώγου της 1,10-φαινανθρολίνης (PDAM), του *cis*-Ru[(DMSO)₄Cl₂], του συμπλόκου του Ru(II) με την PDAM (*cis*Ru-PDAM), καθώς και διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το CT-DNA και την BSA (και του προδρόμου με CT-DNA). Επίσης, διερευνήθηκε η κυτταροτοξικότητα υποκαταστάτη, συμπλόκου και προδρόμου, στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7 και PC-3. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τις παραπάνω μελέτες ήταν οι φασματοσκοπίες UV-Vis, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR (¹H-¹H COSY, ¹³C-¹H HSQC), κυκλικού διχρωϊσμού (CD) και φθορισμομετρία, η φασματομετρία MS και η μέθοδος της ιξωδομετρία. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε συνδυασμό με τις πληροφορίες από την βιβλιογραφία προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Ο ελεύθερος υποκαταστάτης χαρακτηρίστηκε με τις μεθόδους UV-Vis, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR (¹H-¹H COSY), MS και φθορισμομετρία και βρέθηκε να έχει δομή:



2. Το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπίες UV-Vis, IR, CD, φθορισμομετρία και ¹H-NMR. Προτείνεται ο σχηματισμός ενός συμπλόκου στοιχειομετρίας Ru(II):PDAM=1:3. Η σύμπλεξη της PDAM με το Ru(II) γίνεται μέσω των φαινανθρολικών αζώτων (N) της. Η σταθερά σχηματισμού ($K_f = 4,6(\pm 0,6) \times 10^{14} \text{ M}^{-3}$) του συμπλόκου είναι ενδεικτική της ισχυρής δισχιδής σύμπλεξης τριών μορίων (παραγώγων φαινανθρολίνης) στο μέταλλο. Επιπλέον, το σύμπλοκο έχει αριθμό συναρμογής ίσο με 6 και έτσι προτείνεται η δομή ενός οκταεδρικού συμπλόκου. Τέλος, η σύνθεση του συμπλόκου από το *cis*-Ru(DMSO)₄Cl₂ παρουσιάζει αυξημένη εκλεκτικότητα στη σύνθεση του ενός εναντιομερούς συμπλόκου (Λ)-*cis*Ru-PDAM.

3. Το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το CT-DNA. Από την φασμαφωτομετρική τιτλοδότηση προσδιορίστηκε η σταθερά σύνδεσης K_b που υπολογίστηκε ίση με $1,61 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Από την μελέτη ανταγωνιστικής δράσης με το EtBr, διαπιστώθηκε ότι το σύμπλοκο δρά ανταγωνιστικά και υπολογίστηκε η K_{app} ίση με $3,12 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Κατόπιν, με την τεχνική της φθορισμομετρίας

διαπιστώθηκε ότι το σύμπλοκο προσδένεται ισχυρά ($K_f=9,3 \times 10^9 \text{ M}^{-2}$) στο DNA με δύο θέσεις σύνδεσης, ενώ η απόσβεση δεν γίνεται με καθαρά δυναμικό τρόπο. Στα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA προκαλεί μετατροπή της B δομής σε A. Τα πειράματα θερμικής μετουσίωσης έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου επιφέρει σταθεροποίηση του δίκλωνου DNA με $\Delta T_m=13 \text{ }^\circ\text{C}$. Κατόπιν, το σύμπλοκο φαίνεται να μην δρά ανταγωνιστικά με την distamycin A για θέσεις σύνδεση μέσω της μικρής αύλακας. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν αλληλεπίδραση του συμπλόκου μέσω κλασσικής παρεμβολής για λόγους $R<0,2$, ενώ για λόγους $R>0,2$ εμφανίζεται και ένας επιπλέον τρόπος αλληλεπίδρασης. Από την υδροδυναμική μέθοδο της ιξωδομετρία επιβεβαιώνεται η αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής για λόγους μέχρι περίπου 0,2. Για μεγαλύτερους λόγους, όπου εμφανίζεται μεγάλη μείωση του ανηγμένου ιξώδους, έχουμε πιθανώς ως δεύτερο τρόπο αλληλεπίδρασης, στοίβαγμα του συμπλόκου εξωτερικά του DNA με τρόπο που του προκαλεί κάμψη, ώστε να δικαιολογεί την μείωση αυτή. Τέλος, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ με το DNA και παρατηρήθηκαν μικρή μείωση τόσο του θετικού, όσο και του αρνητικού Cotton, στα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού, καθώς και η ελάχιστη αύξηση του ιξώδους. Έτσι, προτείνεται η αλληλεπίδραση του μεταλλικού κέντρου με το N7 της γουανίνης και ασθενέστερα με το N1 της αδενίνης.

4. Το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με την BSA με τιμή σταθεράς σύνδεσης της τάξης του 10^5 M^{-1} ($K_b=1,27 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), εντός των τιμών 10^4 - 10^6 , ώστε η πρωτεΐνη να είναι καλός μεταφορέας του φαρμάκου. Η απόσταση του συμπλόκου από τις τρυπτοφάνες (φθοροφόρα) είναι πολύ μικρή ($r=2.40 \text{ nm}$), ενώ η απόσβεση που προκαλεί το σύμπλοκο στην BSA είναι πολύ ισχυρή ($K_q=2,48 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$), υποδηλώνοντας αλληλεπίδραση στην υδροφοβική κοιλότητα του σημείου Sudlow I, της πρωτεΐνης. Η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώνεται από τα πειράματα ανταγωνιστικής δράσης, έναντι του φαρμάκου phenylbutazone που εισέρχεται στο σημείο Sudlow I ($K_f=8,9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$). Αντίθετα, το σύμπλοκο από την φθορισμομετρική τιτλοδότηση, έδειξε ίδια σταθερά σύνδεσης αλληλεπίδρασης με την BSA παρουσία ($K_f=7,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) και απουσία ($K_f=8,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) του φαρμάκου ibuprofen, αποκλείοντας την αλληλεπίδραση στο σημείο Sudlow II, όπου και εισέρχεται η ibuprofen.

5. Οι κυτταροτοξικότητες που καταγράφηκαν για τον ελεύθερο υποκαταστάτη και το σύμπλοκο cisRu-PDAM παρουσιάζουν εξαιρετικά αποτελέσματα με το σύμπλοκο να προσεγγίζει τα αντίστοιχα συμπλόκων με αποδεδειγμένες αντικαρκινικές ιδιότητες, όπως το cis-platin. Οι παρατηρήσεις αυτές αφορούν και τις δύο κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν (MCF-7 και PC-3). Τέλος, το πρόδρομο cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ παρουσιάζει αρκετά μειωμένη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με το cisRu-PDAM και την PDAM.

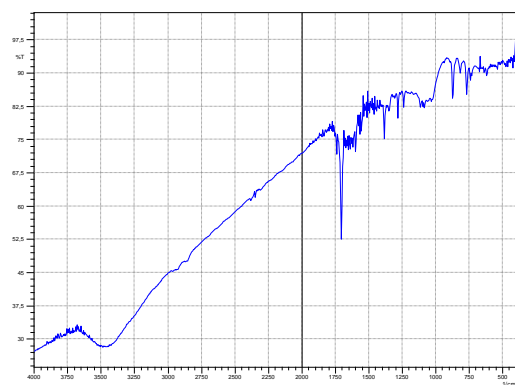
Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

CD	Circular Dichroism
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
UV-Vis	Ultra Violet-Visible
FT-IR	Fourier Transfer-Infrared
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
COSY	Correlation Spectroscopy
MS	Mass Spectrometry
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid
A-T	Adenine-Thymine
G-C	Guanine-Cytocine
DMSO	Dimethylsulfoxide
BSA	Bovine Serume Albumin
PhB	Phenylbutazone
Ib	Ibuprofen
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
Trp	Tryptophan
Cys	Cysteine
Phe	Phenylalanine
Tyr	Tyrosine
THF	Tetrahydrofurane
KBr	Potassium bromide
PDALD	2,9-dicarboxaldehyde-1,10-Phenanthroline
PDOX	2,9-dialdoxime-1,10-Phenanthroline
PDAM	2,9-diaminomethyl-1,10-phenanthroline
BufferP	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (Na ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄) 0,1M
BufferP+Na ⁺	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών Νατρίου 0,1 M + 137 mM NaCl (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O- NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)
CT-DNA	Calf Thymous-Deoxyribonucleic Acid
EtBr	Ethidium Bromide
Dis A	Distamycin A
EtOH	Ethanol
MeOH	Methanol
MTT	Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium
FBS	Fetal Bovine Serum
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid

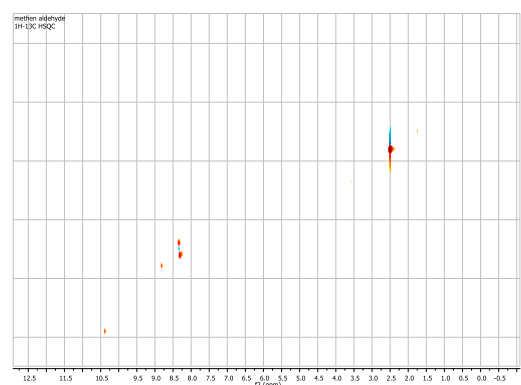
Παράρτημα

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τα φάσματα NMR είναι *d6*-DMSO και για τα φάσματα MS, μεθανόλη. Η θερμοκρασία σε όλες τις μετρήσεις είναι ίση με 25 °C. Για τα φάσματα IR παρασκευάστηκαν παστίλιες με KBr υπό πίεση 10 τόνων.

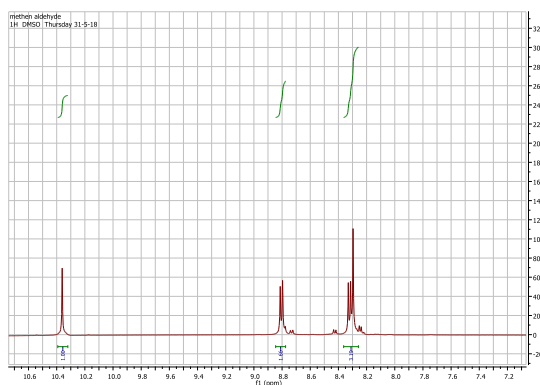
➤ PDALD IR



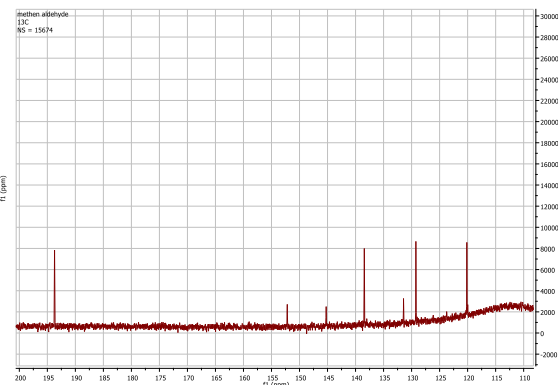
¹H-¹³C HSQC



¹H-NMR

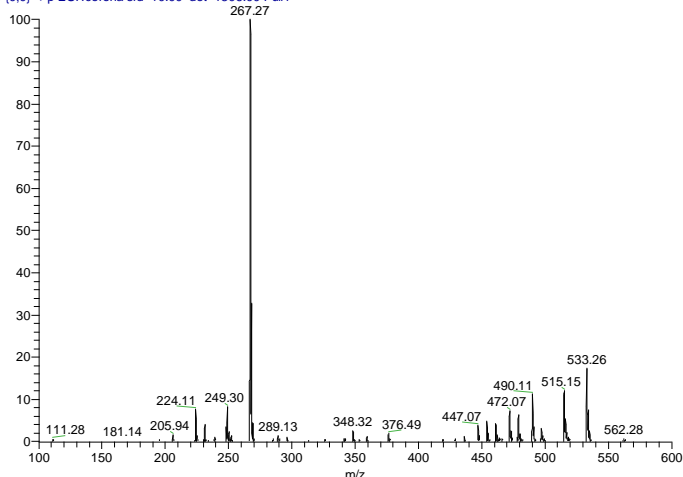


¹³C-NMR

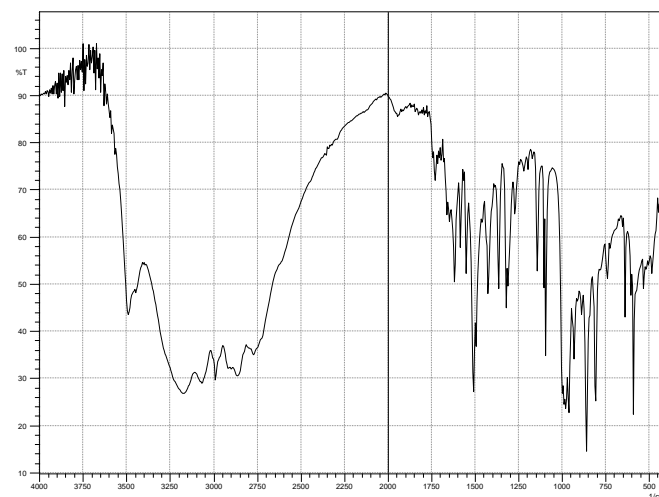


➤ PDOX MS

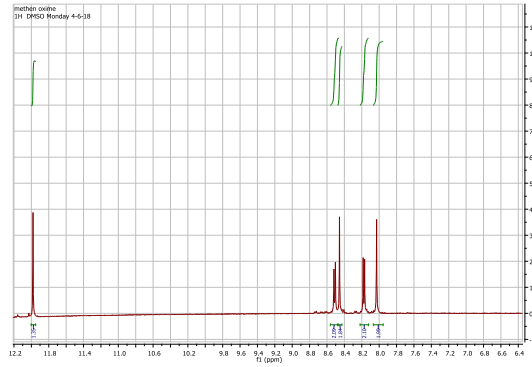
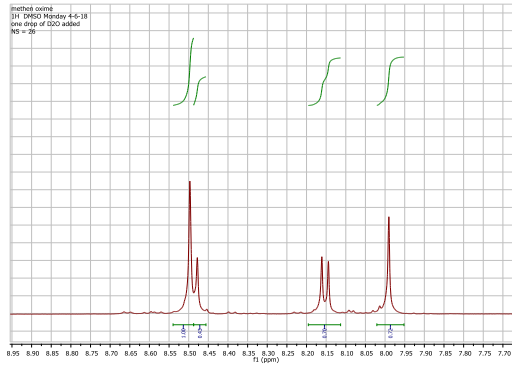
PDOX_ESI+10 #1-16 RT: 0.00-0.51 AV: 16 NL: 1.90E6
T: (0,0) +p ESI |corona.sid=10.00 det=1306.00 Full r



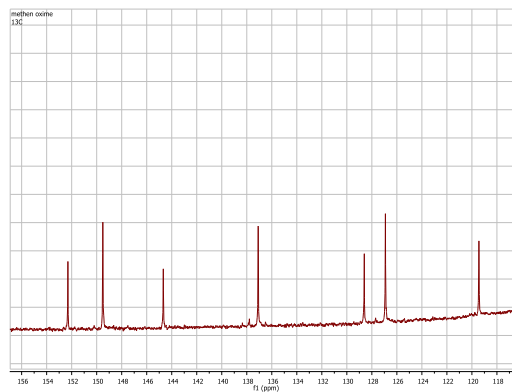
IR



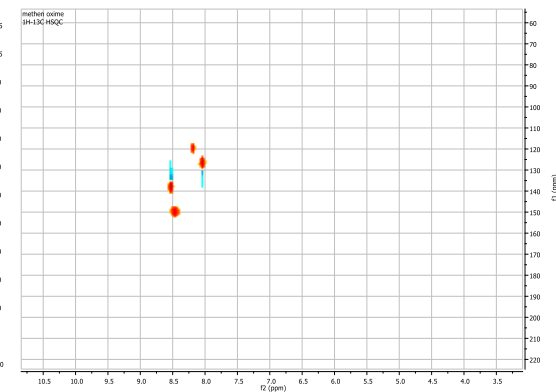
¹H-NMR



¹³C-NMR



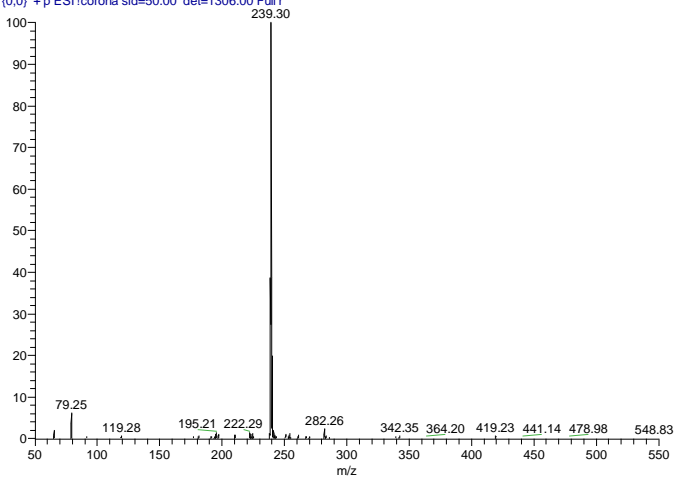
¹H-¹³C-HSQC



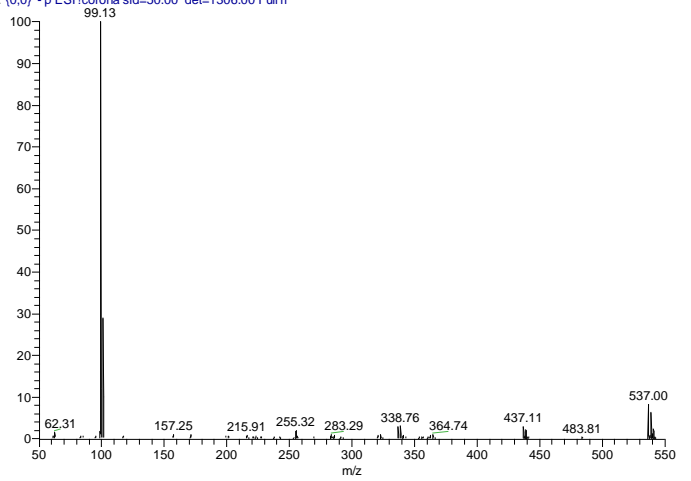
➤ **PDAMsalt**

MS

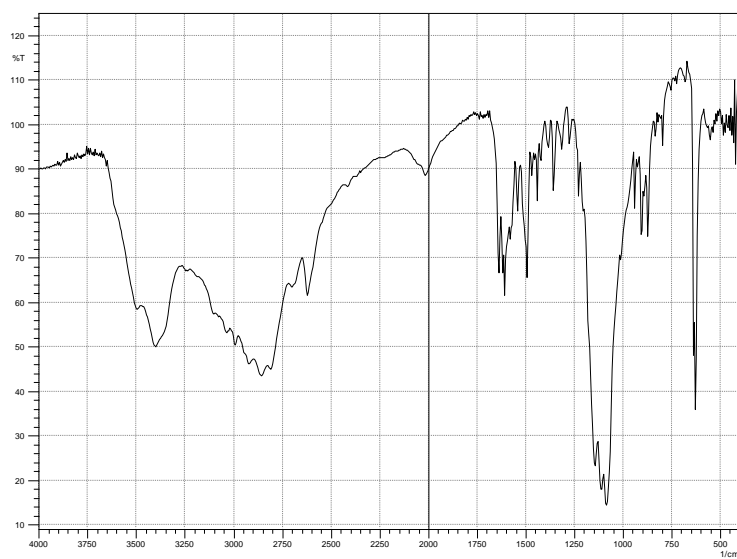
PDAM_salt_ESI+50 #1-20 RT: 0.00-0.64 AV: 20 NL: 1.66E6
 T: (0,0) +p ESI !corona sid=50.00 det=1306.00 Full r



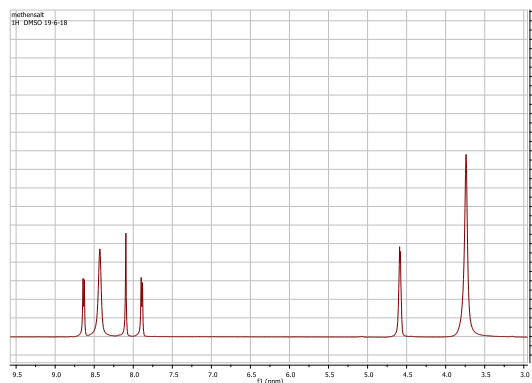
PDAM_salt_ESI_50 #1-17 RT: 0.00-0.54 AV: 17 NL: 1.72E5
 T: (0,0) -p ESI !corona sid=50.00 det=1306.00 Full r



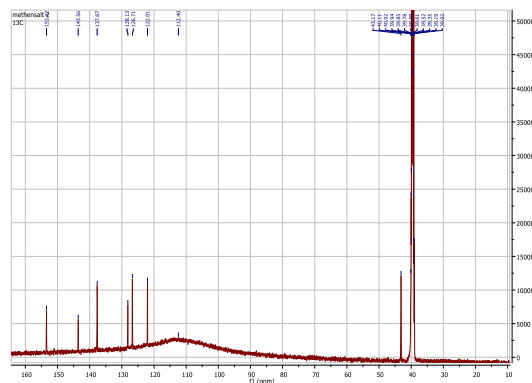
IR



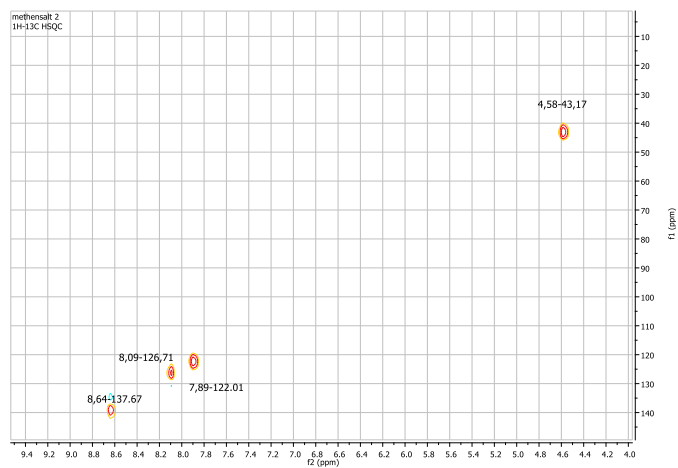
¹H-NMR



¹³C-NMR

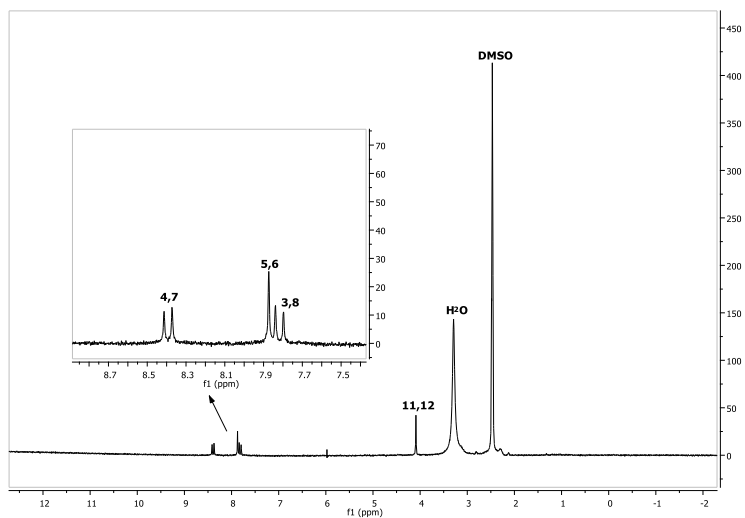


¹H-¹³C - HSQC

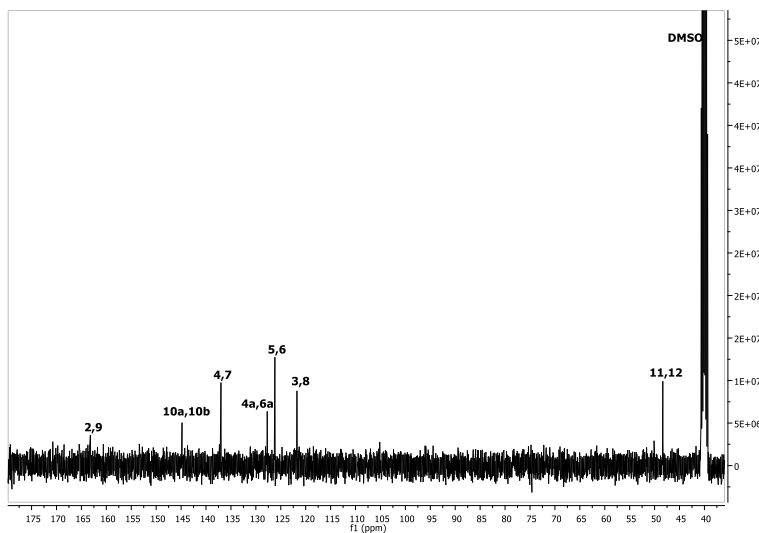


➤ PDAM

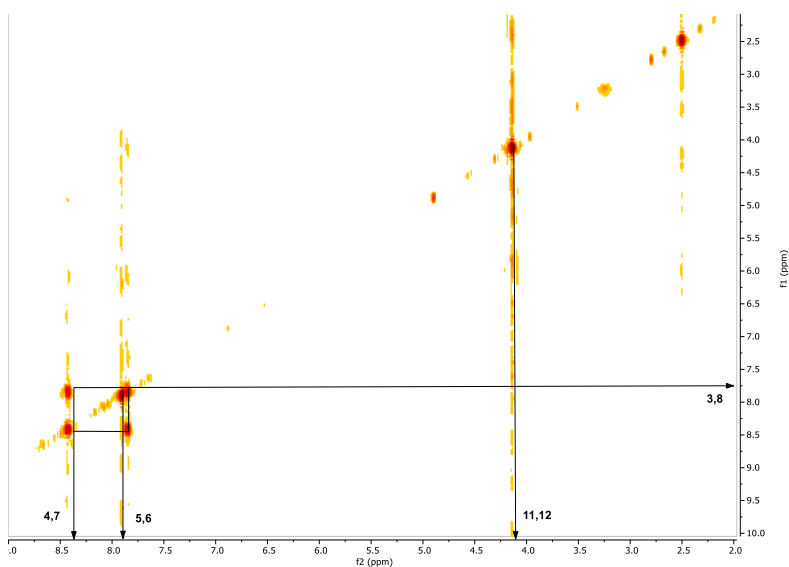
¹H-NMR



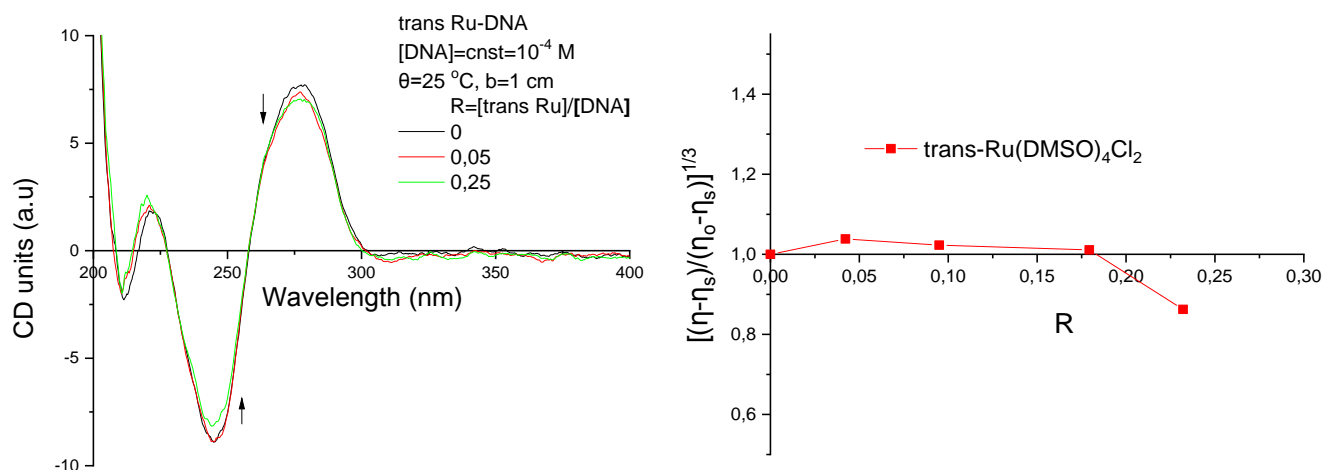
¹³C-NMR



¹H-¹H-COSY

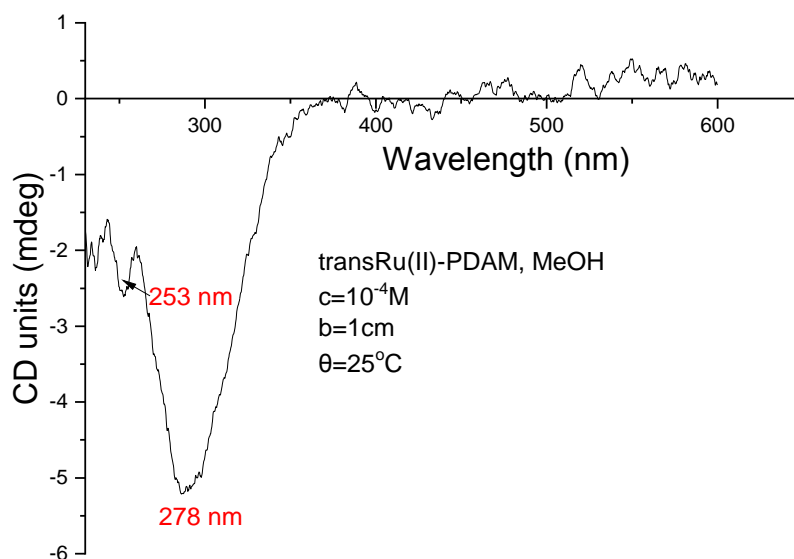


➤ **(trans-Ru(DMSO)₄Cl₂)-(DNA)**



Αριστερά : Φάσματα CD , **Δεξιά:** Μεταβολές ιξώδους DNA σειράς διαλυμάτων με σταθερή συγκέντρωση DNA και μεταβαλλόμενη συμπλόκου trans-Ru(DMSO)₄Cl₂ (R=[transRu]/[DNA])

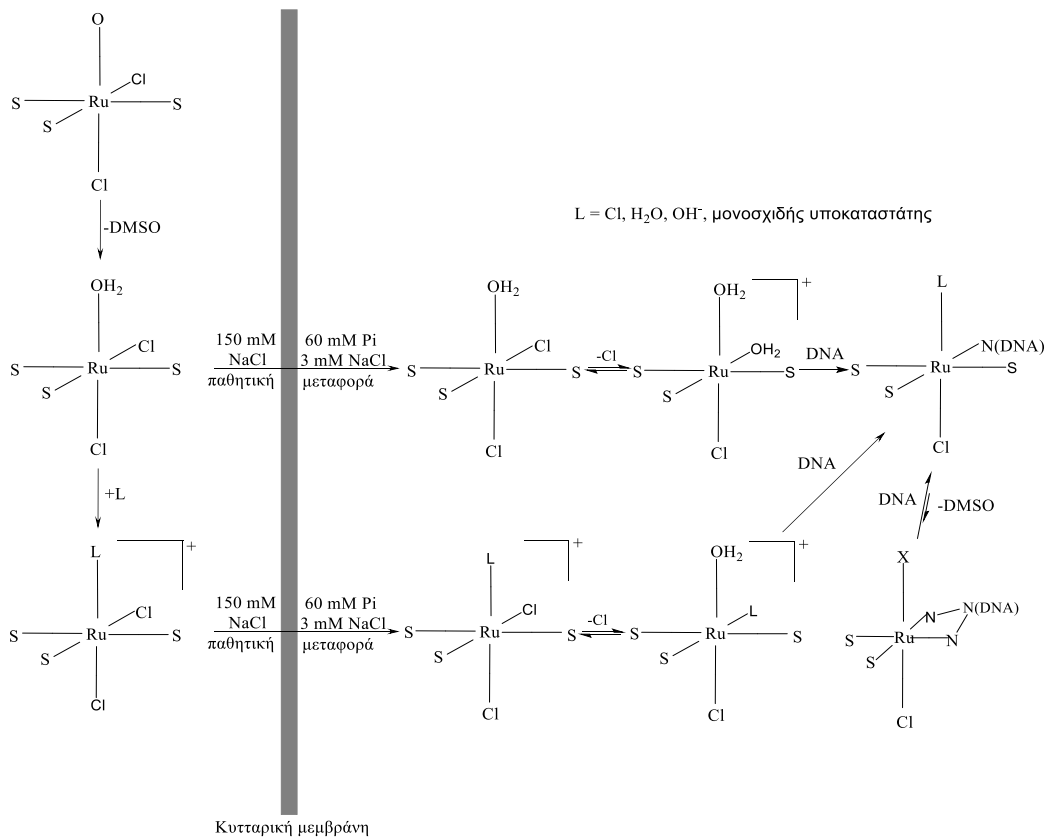
➤ **transRu(II)-PDAM**



Φάσμα CD συμπλόκου transRu(II)-PDAM (σύνθεση από το πρόδρομο trans-Ru(DMSO)₄Cl₂)

➤ **cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ in vivo**

Ο μηχανισμός δράσης in vivo που προτείνεται για το cis-Ru(DMSO)₄Cl₂ αναπαρίσταται στο παρακάτω σχήμα.



Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του συμπλόκου $cis\text{-Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$ *in vivo*

Το κυρίαρχο σωματίδιο στον εξωκυττάριο χώρο είναι το ουδέτρο μονο-ύδατο παράγωγο. Το σωματίδιο αυτό αντιδρά εύκολα με υποκαταστάτες που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο δίνοντας συντακτικώς κορεσμένα σωματίδια. Τα μόρια νερού που δεσμεύονται στο σύμπλοκο είναι ευκίνητα, λόγω όμως της *cis* ισομέρειας, το $cis\text{-Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$ έχει μια θέση αλληλεπίδρασης λιγότερη σε σχέση με το *trans*. Το μονο-υδατοπαράγωγο λόγω της σχετικής του αδράνειας θα έχει την δυνατότητα να πλησιάσει την κυτταρική μεμβράνη σε σχετικά μεγάλες ποσότητες και αν την διαπεράσει, πιθανώς με ένα μηχανισμό παθητικής μεταφοράς. Έχοντας το σύμπλοκο διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη απελευθερώνει ένα ανιόν χλωρίου και συγχρόνως αλληλεπιδρά με το DNA, με μια όμως λιγότερη θέση σε σχέση με το *trans* ισομερές. Η αλληλεπίδραση είναι ομοιοπολική με το N7 της γουανίνης και λιγότερο με το N1 της αδενίνης. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψιν την μεγαλύτερη στερεοχημική παρεμπόδιση που παρουσιάζει το *cis* σε σχέση με το $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2]$, η πιθανότητα σχηματισμού δισχιδών προϊόντων προσθήκης είναι μικρότερη, χωρίς να αποκλείεται όμως, παρουσία περίσσειας γουανινών. Σύμφωνα με τα παραπάνω, περιμένουμε το *trans* ισομερές να είναι δραστικότερο σε σχέση με το *cis* τόσο εξωκυτταρικά, όσο και ενδοκυτταρικά. Η παρατήρηση αυτή αντικατοπτρίζεται στα αποτελέσματα αντινεοπλασματικής δράσης, έναντι καρκινικών σειρών (π.χ. LLC line). Τέλος, το σύμπλοκο μέσα στο κύτταρο μπορεί να αντιδράσει και με μόρια του άλλα παρόντα συστατικά, όπως ανόργανα φωσφορικά.^[76, 185, 218]

Βιβλιογραφία

1. Jon A. McCleverty, T.J.M., *Comprehensive Coordination Chemistry II*. 2nd ed. C.R. Luman, F.N. Castellano, ed. P. Ligands. Vol. 1. 2003: Elsevier Ltd.
2. Kermack, B.E.H.W.O., *43. Attempts to find new antimalarials. Part XXIV. Derivatives of o-phenanthroline (7 : 8 : 3' : 2'-pyridoquinoline)*". J. Chem. Soc, 1946. **0**(0): p. 155-157.
3. Bencini, A. and V. Lippolis, *1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes*. Coordination Chemistry Reviews, 2010. **254**(17-18): p. 2096-2180.
4. Villar-Garcia I. J., A.A., Chebude, Y., Inorg. Chem. Commun., 2012. **19**(1).
5. Kellett, A., et al., *Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper(II) complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(3): p. 564-76.
6. Zheng Y.-J., L.X.-W., Li Y.-T., Wu Z.-Y., Yan C.-W., J. Photochem. Photobiol. B : Biology, 2012. **27**: p. 114.
7. Pazderski, L., et al., *¹H NMR assignment corrections and ¹H, ¹³C, (⁵N NMR coordination shifts structural correlations in Fe(II), Ru(II) and Os(II) cationic complexes with 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline* Magn Reson Chem, 2010. **48**(6): p. 450-7.
8. Helio G. Bonacorso, R.A., Clarissa P. Frizzo, Nilo Zanatta and Marcos A. P. Martins, *Recent Advances In The Chemistry Of 1,10-Phenanthrolines And Their Metal Complex Derivatives: Synthesis And Promising Applications In Medicine, Technology, And Catalysis*. 2016: Societa Chimica Italiana.
9. Hima S. Joshi, R.J., and Yitzhak Tor, *Conjugated 1,10-Phenanthrolines as Tunable Fluorophores*. Angew. Chem. Int. Ed., 1999. **38**,(18).
10. B.G. Que, K.M.D., A.G. So, Biochemistry, 1980. **19**: p. 5687.
11. Alreja, P. and N. Kaur, *DNA and copper (II) governed fluorescence tuning of phenanthroline possessing Ru(II) complex. Interplay of electrostatic interactions*. Inorganic Chemistry Communications, 2017. **77**: p. 51-54.
12. Current Protocols in Protein Science () A.3A.1-A.3A.4, Paul T. Wingfield, *Current Protocols in Protein Science Use of Protein Folding Reagents*. Vol. Appendix A.3A.1-A.3A.4. 1995: John Wiley & Sons, Inc.
13. R.T., G., *The highly preorganized ligand 2, 9-bis(hydroxymethyl)-1,10-Phenanthroline, and its complexation properties with metal ions*. 2006, Wilmington: University of North Carolina.
14. N.J. Wheate, C.R.B., J.G. Collins, S. Kemp, J.R. Aldrich-Wright, *DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis*. Mini Rev. Med. Chem., 2007. **7**: p. 627.
15. Saeidifar, M. and H. Mansouri-Torshizi, *Investigation of the interaction between human serum albumin and antitumor palladium(II) complex containing 1,10-phenanthroline and dithiocarbamate ligands*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2015. **34**(1): p. 16-32.

16. Aramesh-Boroujeni, Z., et al., *Computational and experimental study on the interaction of three novel rare earth complexes containing 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline with human serum albumin*. Journal of the Iranian Chemical Society, 2018. **15**(7): p. 1581-1591.
17. Luzuriaga, L. and M.F. Cerdá, *Analysis of the interaction between [Ru(phenanthroline)₃]²⁺ and bovine serum albumin*. Advances in Biological Chemistry, 2012. **02**(03): p. 262-267.
18. C.R. Brodie, J.G.C., J.R. Aldrich-Wright, *DNA binding and biological activity of some platinum(II) intercalating compounds containing methyl-substituted 1,10-phenanthrolines*. Dalton Transactions, 2004: p. 1145–1152.
19. Mansouri-Torshizi, H., et al., *DNA Binding and Antitumor Activity of alpha-Diimineplatinum(II) and Palladium(II) Dithiocarbamate Complexes*. Bioinorg Chem Appl, 2011. **2011**: p. 394506.
20. Ng, N.S., et al., *The antimicrobial efficacy and DNA binding activity of the copper(II) complexes of 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline, 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline and 1,2-diaminocyclohexane*. J Inorg Biochem, 2016. **162**: p. 62-72.
21. Wesselinova, D., et al., *Antitumour activity of novel 1,10-phenanthroline and 5-amino-1,10-phenanthroline derivatives*. Eur J Med Chem, 2009. **44**(6): p. 2720-3.
22. 2016, *Studies On The Interaction Between Triptolide And Bovine Serum Albumin (BSA) By Spectroscopic And Molecular Modeling Methods*. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med., Haidong Wang, Hailang Shi, Jie Pang, Xingfa Song, Caiyun Xu, Zengxian Sun. **13**(6): p. 121-129.
23. Uma Maheswari, P. and M. Palaniandavar, *DNA binding and cleavage properties of certain tetrammine ruthenium(II) complexes of modified 1,10-phenanthrolines--effect of hydrogen-bonding on DNA-binding affinity*. J Inorg Biochem, 2004. **98**(2): p. 219-30.
24. Roy, S., et al., *DNA photocleavage and anticancer activity of terpyridine copper(II) complexes having phenanthroline bases*. Polyhedron, 2010. **29**(14): p. 2787-2794.
25. Liu, W., et al., *Arylsulfanyl groups - Suitable side chains for 5-substituted 1,10-phenanthroline and nickel complexes as G4 ligands and telomerase inhibitors*. J Inorg Biochem, 2017. **173**: p. 12-20.
26. Loganathan, R., et al., *DNA and protein binding, double-strand DNA cleavage and cytotoxicity of mixed ligand copper(II) complexes of the antibacterial drug nalidixic acid*. J Inorg Biochem, 2017. **174**: p. 1-13.
27. Al Matarneh, C.M., et al., *Synthesis, structure, antimycobacterial and anticancer evaluation of new pyrrolo-phenanthroline derivatives*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2016. **31**(3): p. 470-80.
28. Abebe, A., et al., *Synthesis of organic salts from 1,10-phenanthroline for biological applications*. Cogent Chemistry, 2018. **4**(1).
29. Habibi Juybari, M., H. Pordeli, and S. Mikaeili, *Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Some New Neocuproine Schiff Bases*. Medical Laboratory Journal, 2019. **13**(3): p. 35-39.

30. Kuckova, L., et al., *Synthesis, crystal structure, spectroscopic properties and potential biological activities of salicylateneocuproine ternary copper(II) complexes*. *Molecules*, 2015. **20**(2): p. 2115-37.
31. Pitie, M., et al., *Cytostatic activity of 1,10-phenanthroline derivatives generated by the clip-phen strategy*. *Chembiochem*, 2005. **6**(4): p. 686-91.
32. F.A Cotton, G.W., *Advanced Inorganic Chemistry*. 5th ed. Vol. Chapters 18, 19. 1998, New York: Willey Interscience.
33. Δ. Κατάκης, Κ.Μ., Χ. Μητσοπούλου, Γ. Πνευματικάκης, *Ανόργανη Χημεία : Τα στοιχεία*. 2002, Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση.
34. Sahu, A.K., Dash, D. K., Mishra, K., Mishra, S. P., Yadav, R., & Kashyap, P., *Noble and Precious Metals - Properties, Nanoscale Effects and Applications*. *Properties and Applications of Ruthenium*. Vol. Chapter 17. 2018: IntechOpen.
35. R. W. Powell, R.P.T., Margaret J. Woodman, *Thermal Conductivities and Electrical Resistivities of the Platinum Metals*. *Platinum Metals Rev*, 1962. **6**(41): p. 138-143.
36. G., W.R.W., *Crustal Structures*. 2nd ed. Vol. Chapter 1. 1963, New York: Interscience Publishers. 7-83.
37. Greenwood, E., 1997. 2nd ed. Vol. Chapter 25. *Chemistry of the Elements*: Elsevier.
38. Emsley, J., *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*. New ed. 2002, England: Oxford University Press.
39. Railsback, L.B., *An Earth Scientist's Periodic Table of the Elements and Their Ions* *Geology*, 2003. **31**(9): p. 737-740.
40. Egon Wiberg, N.W., Arnold Frederick Holleman *Inorganic chemistry*. 2001: Academic Press.
41. Catherine E. Housecroft, A.G.S., *Ανόργανη Χημεία*. 3η ed. 2014, Ελλάδα: Εκδόσεις Νικόλαος Χατζηλιάδης.
42. W., G.M., "2006 Minerals Yearbook: Platinum-Group Metals" 2008, Geological Survey USGS: United States
43. Lide, D.R., *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 86th ed. The elements. 2005, Boca Raton: CRC Press.
44. Samsonov, G.V., *Handbook of the physicochemical properties of the elements*. *Mechanical Properties of the Elements*. 1968, New York: IFI-Plenum. .
45. Hulm, J.K. and B.B. Goodman, *Superconducting Properties of Rhenium, Ruthenium, and Osmium*. *Physical Review*, 1957. **106**(4): p. 659-671.
46. Urashima, Y., *Ruthenium, a new mineral from Horokanai, Hokkaido, Japan*. *Minerological*, 1974. **7**(5): p. 438-444.
47. Michael Fleischer, J.A.M., *New Mineral Names*. *American Mineralogis*, 1975. **60**: p. 946.
48. Michael- Fleischer, A.P., J. A. Mandarino, George Y. Chao., Louis J. Cabri, *New MIneral Names*. *American Mineralogist* 1976. **61**: p. 177.
49. Γ. Πνευματικάκης, Χ.Μ., Κ. Μεθενίτης, *Βασικές Αρχές Ανόργανης Χημείας*. 2006, Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη.
50. Aghazada, S. and M. Nazeeruddin, *Ruthenium Complexes as Sensitizers in Dye-Sensitized Solar Cells*. *Inorganics*, 2018. **6**(2): p. 52.

51. Sun, B., et al., *Synthesis, isomerisation and biological properties of mononuclear ruthenium complexes containing the bis[4(4'-methyl-2,2'-bipyridyl)]-1,7-heptane ligand*. Dalton Trans, 2018. **47**(7): p. 2422-2434.
52. Motswainyana, W.M. and P.A. Ajibade, *Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium(II) Coordination Complexes*. Advances in Chemistry, 2015. **2015**: p. 1-21.
53. A. M. Pyle, J.P.R., R. Meshoyrer, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton, *Mixed-Ligand Complexes of Ruthenium(II): Factors Governing Binding to DNA*. J. Am. Chem. Soc., 1989. **111**: p. 3051-3058.
54. Brabec, V. and J. Kasparkova, *Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents*. Coordination Chemistry Reviews, 2018. **376**: p. 75-94.
55. database, F. *Showing Compound Ruthenium (ID FDB030039)*. 2018; Available from: <http://foodb.ca/compounds/FDB030039>.
56. Tv., Z., *Accumulation of radioactive isotopes of strontium, ruthenium, cesium and cerium by some bacteria*. Mikrobiologija, 1961. **30**: p. 871-876.
57. Company, L. *Chemical properties of ruthenium - Health effects of ruthenium - Environmental effects of ruthenium*. Available from: <https://www.lenntech.com/periodic/elements/ru.htm#ixzz60kUlj7Jk>.
58. J., E., *The Elements*. 1989, Oxford University Press: Oxford, U.K.
59. Medicine, I.o., *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*. 2006: National Academies Press.
60. Allardyce, C.S., *Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects*. Platinum Metals Rev., 2001 **45**(2): p. 62.
61. Malécot C. O., B.V., Argibay J.A., *Ruthenium red as an effective blocker of calcium and sodium currents in guinea-pig isolated ventricular heart cells*. British Journal of Pharmacology, 1998. **124**: p. 465-472.
62. R., R., *Acute and Chronic Arsenic Toxicity*. Postgraduate Medical Journal, 2003. **79**(933): p. 391-396.
63. MedlinePlus. *Lead Poisoning*. 2016; Available from: <https://medlineplus.gov/leadpoisoning.html>.
64. Bernhoft, R.A., *Mercury toxicity and treatment: a review of the literature*. J Environ Public Health, 2012. **2012**: p. 460508.
65. Ronconi, L. and P.J. Sadler, *Using coordination chemistry to design new medicines*. Coordination Chemistry Reviews, 2007. **251**(13-14): p. 1633-1648.
66. Xu, Z.-h., et al., *Synthesis, characterization, DNA interaction and antibacterial activities of two tetranuclear cobalt(II) and nickel(II) complexes with salicylaldehyde 2-phenylquinoline-4-carboxylhydrazone*. Inorganic Chemistry Communications, 2011. **14**(10): p. 1569-1573.
67. Palanimuthu, D., et al., *In vitro and in vivo anticancer activity of copper bis(thiosemicarbazone) complexes*. J Med Chem, 2013. **56**(3): p. 722-34.
68. Levina, A., A. Mitra, and P.A. Lay, *Recent developments in ruthenium anticancer drugs*. Metallomics, 2009. **1**(6): p. 458-70.
69. Thota, S., et al., *Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics?* J Med Chem, 2018. **61**(14): p. 5805-5821.

70. Δ. Κεσίσογλου, Γ.Ψ., *Βιοανόργανη Χημεία*. 2015, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ΖΗΤΗ.
71. Pathak, R.K., et al., *A Prodrug of Two Approved Drugs, Cisplatin and Chlorambucil, for Chemo War Against Cancer*. *Mol Cancer Ther*, 2017. **16**(4): p. 625-636.
72. Rocha, C.R.R., et al., *DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2018. **73**(suppl 1): p. e478s.
73. B.K. Keppler, *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*. Vol. Chapters 1,2,4,7,8, 9. 1993, New York: VCH publ.
74. J.E. Huheey, E.A.K., R.L. Keiter., *Ανόργανη Χημεία: Αρχές Δομής και Δραστηκότητας*. 4th ed. Vol. Κεφάλαια 12 & 14. 2013: Ίων Μακεδονικές Εκδόσεις.
75. Clarke, M.J., *Coord. Chem. Rev.*, 2002. **69**.: p. 232.
76. E. Alessio, G.M., G. Nardin, W. M. Attia, M. Calligaris, G. Sava, S. Zorzet, *Cis-and trans-Dihalotetrakis (dimethyl sulfoxide) ruthenium(II) Complexes (RuX₂(DMSO)₄, X = Cl, Br): Synthesis, Structure, and Antitumor Activity*. *Inorg. Chem. Commun.*, 1988. **27**(23): p. 4099-4106.
77. Suzanne Leijen, S.A.B., Paul Baas, Dick Pluim, Matthijs Tibben, Erik van Werkhoven, Enzo Alessio, Gianni Sava, Jos H Beijnen, Jan H M Schellens, *Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy". *Investigational New Drugs*. 2015. **33**(1): p. 201–14*
78. Jacqueline K. Barton, A.T.D., Jonathan M. Goldberg, *Tris(phenanthroline)ruthenium(II): Stereoselectivity in binding to DNA*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1984. **106**: p. 2172-2176.
79. Dreyse, P., et al., *Effect of free rotation in polypyridinic ligands of Ru(II) complexes applied in light-emitting electrochemical cells*. *Dalton Trans*, 2013. **42**(43): p. 15502-13.
80. G. A. Crosby, W.G.P., D. M. Klassen J. , *Luminescence from Transition Metal Complexes: Tris(2,2'bipyridine) and Tris(1,10phenanthroline)Ruthenium(II)*. *Chem. Phys.*, 1965. **43**: p. 1498
81. Berg M. Jeremy, T.L.J., Lubert Stryer, *Βιοχημεία*. 2η ed. 2015, Ηράκλειο, Κρήτη: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
82. Robert, C., *Biological Inorganic Chemistry : A New Introduction to Molecular Structure and Function*. 2nd ed. 2012, Amsterdam: Elsevier.
83. Κόκοτος, Γ., *Σημειώσεις για το μάθημα της φαρμακοχημείας*. 2018, Αθήνα Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας.
84. Kostova, I., *Gold coordination complexes as anticancer agents*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006. **6**(1): p. 19-32.
85. Metcalfe, C. and J.A. Thomas, *Kinetically inert transition metal complexes that reversibly bind to DNA*. *Chemical Society Reviews*, 2003. **32**(4): p. 215.
86. Kazuo Nakamoto, M.T., Gary D. Strahan, *Drug–DNA interactions structures and spectra*. 2008, Hoboken, New Jersey: Wiley.
87. V. Bloomfield, D.C., I. Jr. Tinoco, *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions*. 2000, USA: University Science Books
88. Nick Hadjiliadis, E.S., *Metal Complex–DNA Interactions*. 1st ed. 2009: Wiley.

89. Barone, G., et al., *DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: Structure–affinity relationships*. Coordination Chemistry Reviews, 2013. **257**(19-20): p. 2848-2862.
90. Biver, T., F. Secco, and M. Venturini, *Mechanistic aspects of the interaction of intercalating metal complexes with nucleic acids*. Coordination Chemistry Reviews, 2008. **252**(10-11): p. 1163-1177.
91. McKeever, C., M. Kaiser, and I. Rozas, *Aminoalkyl derivatives of guanidine diaromatic minor groove binders with antiprotozoal activity*. J Med Chem, 2013. **56**(3): p. 700-11.
92. Bhat, S.S., et al., *Synthesis, electronic structure, DNA and protein binding, DNA cleavage, and anticancer activity of fluorophore-labeled copper(II) complexes*. Inorg Chem, 2011. **50**(2): p. 545-58.
93. James M. Benevides, G.J.T., Jr., *Local Conformational Changes Induced in B-DNA by Ethidium Intercalation*. Biochemistry, 2005. **44**: p. 2993-2999.
94. Kessisoglou, D., *Bioinorganic chemistry An inorganic perspective of life*. 1st ed. Series C : Mathematical and Physical Science, ed. N. ASI. Vol. 459. 1995, Rhodes Greece: Springer Science & Business Media.
95. Bailis, J.M., et al., *Rhodium metalloinsertor binding generates a lesion with selective cytotoxicity for mismatch repair-deficient cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(27): p. 6948-6953.
96. Komeda, S., et al., *A third mode of DNA binding: Phosphate clamps by a polynuclear platinum complex*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(50): p. 16092-103.
97. Molphy, Z., et al., *Copper phenanthrene oxidative chemical nucleases*. Inorg Chem, 2014. **53**(10): p. 5392-404.
98. Yang, H., K.L. Metera, and H.F. Sleiman, *DNA modified with metal complexes: Applications in the construction of higher order metal–DNA nanostructures*. Coordination Chemistry Reviews, 2010. **254**(19-20): p. 2403-2415.
99. Liu, S., et al., *Binding of Organometallic Ruthenium Anticancer Complexes to DNA: Thermodynamic Base and Sequence Selectivity*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(7).
100. Neva Bešker, C.C., Alessandro Marrone, Nazzareno Re, *Binding of Antitumor Ruthenium Complexes to DNA and Proteins: A Theoretical Approach*. J. Phys. Chem. B., 2007. **111**(33): p. 9955-9964.
101. Artner, C., et al., *Characterizing activation mechanisms and binding preferences of ruthenium metallo-prodrugs by a competitive binding assay*. J Inorg Biochem, 2017. **177**: p. 322-327.
102. Maksymilian Chruszcz, P.J.P., Wlodek Minor, Katarzyna Mikolajczak, Nicholas Mank, Karolina A. Majorek, *Serum albumins—Unusual allergens*. Biochimica et Biophysica Acta 2013. **1830**: p. 5375-5381.
103. Editors of encyclopedia : Marco Sampaolo, G.Y., Yamini Chauhan, Surabhi Sinha, Gloria Latha, Shiveta Singh. *Albumin protein*. 2019; Available from: <https://www.britannica.com/science/albumin>.
104. Carter, D.C. and J.X. Ho, *Structure of Serum Albumin*. 1994. **45**: p. 153-203.
105. Anand, U. and S. Mukherjee, *Binding, unfolding and refolding dynamics of serum albumins*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(12): p. 5394-404.

106. Arques, S., *Human serum albumin in cardiovascular diseases*. Eur J Intern Med, 2018. **52**: p. 8-12.
107. Howland WS, S.O., Ragasa J, Jascott D., *Colloid oncotic pressure and levels of albumin and total protein during major surgical procedures*. Surg Gynecol Obstet., 1976. **143**(4): p. 592-596.
108. Hoogenboezem, E.N. and C.L. Duvall, *Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies*. Adv Drug Deliv Rev, 2018. **130**: p. 73-89.
109. Keishi Yamasaki, V.T.G.C., Toru Maruyama, Masaki Otagiri *Albumin–drug interaction and its clinical implication*. Biochimica et Biophysica Acta 2013. **1830**: p. 5435–5443.
110. Donald M. McDonald, P.B., *Significance of Blood Vessel Leakiness in Cancer*. Cancer research 2002. **62**: p. 5381-5385.
111. Fanali, G., et al., *Human serum albumin: from bench to bedside*. Mol Aspects Med, 2012. **33**(3): p. 209-90.
112. Acton, Q.A., *Advances in Serum Albumin Research and Application*. 1st ed. 2012 Scholarly Editions.
113. Kragh-Hansen, U., *Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin-ligand complexes*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(12): p. 5535-44.
114. T., P., *All About Albumin : Biochemistry, Genetics, and Medical applications*. 1st ed. 1995: Elsevier.
115. Xiao Min He, D.C.C., *Atomic structure and chemistry of human serum albumin*. Nature, 1992. **358** (16).
116. T Johnny R. Olivieri , A.F.C., *The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering*. Eur. Biophys. J. , 1995. **24**: p. 77-84.
117. Guizado, T.R., *Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin*. J Mol Model, 2014. **20**(10): p. 2450.
118. Bujacz, A., *Structures of bovine, equine and leporine serum albumin*. Acta Crystallographica Section D, 2012. **68**(10): p. 1278-1289.
119. Jacinto Steinhardt, J.K., Joan G. Leidy, *Differences between Bovine and Human Serum Albumins: Binding Isotherms, Optical Rotatory Dispersion, Viscosity, Hydrogen Ion Titration, and Fluorescence Effects*. Biochemistry, 1971. **10**(22).
120. Sułkowska, A., *Interaction of drugs with bovine and human serum albumin*. Journal of Molecular Structure 2002 **614** p. 227-232.
121. Koch-Weser J., S.E.M., *Binding of Drugs to Serum Albumin*. New England Journal of Medicine, 1976. **294**(6): p. 311-316.
122. Ghuman, J., et al., *Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin*. J Mol Biol, 2005. **353**(1): p. 38-52.
123. Yu, J., et al., *Conductance Changes in Bovine Serum Albumin Caused by Drug-Binding Triggered Structural Transitions*. Materials (Basel), 2019. **12**(7).
124. Joshi, R., et al., *Is the Sudlow site I of human serum albumin more generous to adopt prospective anti-cancer bioorganic compound than that of bovine: A combined spectroscopic and docking simulation approach*. Bioorg Chem, 2017. **75**: p. 332-346.

125. Meti, M.D., et al., *Multi-spectral characterization & effect of metal ions on the binding of bovine serum albumin upon interaction with a lincosamide antibiotic drug, clindamycin phosphate*. J Photochem Photobiol B, 2014. **138**: p. 324-30.
126. Zhdanova, N.G., et al., *Tyrosine fluorescence probing of conformational changes in tryptophan-lacking domain of albumins*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2017. **174**: p. 223-229.
127. Yang, Y., et al., *Multispectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of bile acids with bovine serum albumin (BSA)*. Journal of Molecular Structure, 2019. **1180**: p. 89-99.
128. Zunszain, P.A., et al., *Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha*. J Mol Biol, 2008. **381**(2): p. 394-406.
129. Arthur A. Spector, K.J., and John E. Fletcher, *Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin*. Journal of Lipid Research 1969. **10**: p. 56-67.
130. Fasano, M., et al., *The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin*. IUBMB Life, 2005. **57**(12): p. 787-96.
131. James A. Hamilton, S.E., Shastri P. Bhamidipati, Roberta G. Greed, *Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty*. Proc. Nad. Acad. Sci, 1991. **88**: p. 2051-2054.
132. Margaret J. Hunter, S.L.C., *Interactions of Neutral Amino Acids with Human Serum Albumin and 7-Globulin1* J. Am. Chem. Soc., 1955. **77**: p. 4857-4859.
133. Paradela-Dobarro, B., et al., *Inflammatory effects of in vivo glycated albumin from cardiovascular patients*. Biomed Pharmacother, 2019. **113**: p. 108763.
134. Shcharbin, D., et al., *Serum albumins have five sites for binding of cationic dendrimers*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1774**(7): p. 946-51.
135. Hein, K.L., et al., *Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin*. J Struct Biol, 2010. **171**(3): p. 353-60.
136. Mishra, S.S., *Effect Of Chaotropic Reagents On Bovine Serum Albumin (BSA) - A Fluorescence Study*. Master of Science in Chemistry. 2011, Orissa: National Institute Of Technology, Rourkela.
137. Topala, T., et al., *Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes*. Clujul Med, 2014. **87**(4): p. 215-9.
138. Bal, W., et al., *Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(12): p. 5444-55.
139. Charlews, C., *Competitive binding of calcium and magnesium with serum albumin*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955. **89**(4): p. 546-549.
140. A. Klinger, D.S., D. Kohavi, M. N. Sela, *Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro, KLINGER ET AL*. J. Biomed. Mater. Res. , 1997. **36**(3): p. 387-392.
141. Breno Pannia Esposito, R.N., *Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with Albumin*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. **232**: p. 137-149.

142. Sun, J., et al., *Ruthenium (II) complexes interact with human serum albumin and induce apoptosis of tumor cells*. Biol Trace Elem Res, 2015. **163**(1-2): p. 266-74.
143. Rilak Simović, A., et al., *Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure*. Coordination Chemistry Reviews, 2019. **398**: p. 113011.
144. Klein, D., *Organic Chemistry*. 2nd ed. 2001, Ελλάδα: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
145. NMR lab, I.o.C. NMR. Available from: <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/contactus.htm>.
146. Mehta, A. *Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy - Principle*. Analytical Chemistry 2011; Available from: <https://pharmaxchange.info/2011/12/ultraviolet-visible-uv-vis-spectroscopy-principle/>.
147. Dedon, P.C., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. Vol. Chapters 8.1.1 - 8.1.13. 2000: John Wiley & Sons Inc.
148. Dongchul Suh, J.B.C., *Criteria for the Mode of Binding of DNA Binding Agents*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 1995. **3**(6): p. 723-728.
149. Symon, K., *Mechanics*. 3d ed. 1971: Addison-Wesley.
150. Selvakumar, B., et al., *Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: the novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage*. J Inorg Biochem, 2006. **100**(3): p. 316-30.
151. Douglas A. Skoog, F.J.H., Stanley R. Crouch, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. 6η ed. 2007, Ελλάδα: Εκδόσεις Κωσταράκη.
152. Χρίστος, Κ., *Φθορισμομετρία*. 1η ed. 2015, Πάτρα: Πανεπιστήμιο Πατρών.
153. Prateek Pandya, M.M.I., G Suresh Kumar, B Jayaram, Surat Kumar *DNA minor groove binding of small molecules: Experimental and computational evidence* J. Chem. Sci., 2010. **122**(2): p. 247-257.
154. K. Nakanishi, N.B., W. Woody, *Circular Dichroism: Principles and Application*. 1994, New York: VCH.
155. Ch. Zimmer, G.L., H. Thrum, Ch. Pitra, Eur. J. Biochem., 1972. **26** p. 81-89.
156. Choi, J.K., et al., *Interactions of very long-chain saturated fatty acids with serum albumin*. J Lipid Res, 2002. **43**(7): p. 1000-10.
157. Jattinagoudar, L., et al., *Evaluation of the binding interaction between bovine serum albumin and dimethyl fumarate, an anti-inflammatory drug by multispectroscopic methods*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2016. **156**: p. 164-71.
158. Pan, D.Q., et al., *Combined spectroscopies and molecular docking approach to characterizing the binding interaction of enalapril with bovine serum albumin*. Luminescence, 2017. **32**(4): p. 481-490.
159. Yue, Q., et al., *Study on the Interaction of Bovine Serum Albumin with Ceftriaxone and the Inhibition Effect of Zinc (II)*. International Journal of Spectroscopy, 2012. **2012**: p. 1-9.
160. Krishnamoorthy, P., et al., *Nickel and cobalt complexes of benzoic acid (2-hydroxy-benzylidene)-hydrazide ligand: synthesis, structure and*

- comparative in vitro evaluations of biological perspectives*. RSC Advances, 2012. **2**(32): p. 12190.
161. Ni, Y., S. Su, and S. Kokot, *Spectrofluorimetric studies on the binding of salicylic acid to bovine serum albumin using warfarin and ibuprofen as site markers with the aid of parallel factor analysis*. Anal Chim Acta, 2006. **580**(2): p. 206-15.
 162. Irwin W. Sizer, A.C.P., *The Ultraviolet Absorption Serum Albumin And Of Its Constituent Amino Acids As A Function Of PH*. J. Biol. Chem., 1947. **171**: p. 767-777.
 163. Wani, T.A., et al., *Spectrophotometric and molecular modelling studies on in vitro interaction of tyrosine kinase inhibitor linifanib with bovine serum albumin*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0176015.
 164. Xu, H., et al., *Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(7): p. 14185-203.
 165. Chudzik, M., et al., *Spectroscopic Studies on the Molecular Ageing of Serum Albumin*. Molecules, 2016. **22**(1).
 166. Wani, T.A., et al., *Study of Interactions of an Anticancer Drug Neratinib With Bovine Serum Albumin: Spectroscopic and Molecular Docking Approach*. Front Chem, 2018. **6**: p. 47.
 167. Lian, W., et al., *Investigation of the binding sites and orientation of Norfloxacin on bovine serum albumin by surface enhanced Raman scattering and molecular docking*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2019. **207**: p. 307-312.
 168. Jiao, Q., et al., *Study on the interaction between active components from traditional Chinese medicine and plasma proteins*. Chem Cent J, 2018. **12**(1): p. 48.
 169. Α. Χ. Μαργαρίτης, Β.Κ.Γ., Κ. Ε. Κεραμάρης, Ε. Σ. Μαρίνος, Ι. Σ. Παπασιδέρη, Δ. Ι. Στραβοπόδης, Ι. Π. Τρουγκάκος, , *Βιολογία κυττάρου*. 4η ed. 2004, Ελλάδα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
 170. Charles Wiener, D.L.K., Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, Larry Jameson, J., Joseph Loscalzo, Cynthia Brown, Brain Houston, *Harrison's principles of internal medicine self-assessment and board review*. 15th ed. Gas gangrene, antibiotic associated colitis, and other Clostridial infection. Vol. 922-927. 2001, New York: McGraw-Hill Education / Medical Pub. Division.
 171. Wong, R.S., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2011. **30**(87): p. 1-14.
 172. Hanahan D., W.R., *The hallmarks of cancer*. Cell. Jan 7;():, 2000 **100**(1): p. 57-70.
 173. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
 174. Abhishek K. Jain, D.S., Kavita Dubey, Renuka Maurya, Sandeep Mittal, Alok K. Pandey, *In Vitro Toxicology*. Models and Methods for In Vitro Toxicity. Vol. Chapter 3. 2018.
 175. C.J. Chandler, L.W.D., J.A. Reiss, *Synthesis of Some 2,9-Disubstituted-1,10-Phenanthrolines*. J. Heterocycl. Chem., 1981. **18**: p. 599–601.

176. M. A. Ayedi, Y.L.B., H. Ammar, S. Abid, R. El Gharbi, M. Delmas *Simple Novel Synthesis of Furfurylamine from Furfural by One-Pot Reductive Amination in Water Using Zinc Metal*. J. la Société Chim. Tunisie, 2012. **14**: p. 13–20.
177. C. F. Winans, H.A., *The Preparation of Amines by Catalytic Hydrogenation of Derivatives of Aldehydes and Ketones*. J. Am. Chem. Soc., 1933. **55**(5): p. 2051–2058.
178. Boone, L.L., *The Highly Preorganized Ligands 1,10-Phenanthroline-2,9-Dialdoxime And Bis-1,10-Phenanthroline, And Their Complexing Properties With Metal Ions* in Department of Chemistry 2006, University of North Carolina Wilmington: North Carolina.
179. R., P., *Synthesis and characterization of 1,10-phenanthroline derivative PDAM and its complex with Ru(II). Study of their interaction with CT-DNA. In vitro evaluation of their biological activity*, in Department of Chemistry. 2019, University of Athens: Athens.
180. Field L.D., S.S., Kalman J.R., H.L.Li, Magill A.M., *Προσδιορισμός της δομής οργανικών ενώσεων με φασματοσκοπικές μεθόδους*. 5η Αγγλική - 1η Ελληνική ed. 2017, Αθήνα: Utopia.
181. Samira Shabaan, B.L., Nasim Esmati, Abbas Shafiee, Alireza Foroumadi, *Synthesis and Characterization of 1,10-Phenanthroline-2,9-dicarbaldehyde-bis-(thiosemicarbazone)*. Asian Journal of Chemistry, 2012. **24**(6): p. 2819-2820
182. Soheila Kashanian, M.M.K., Fahimeh Kheirdoosh, *In vitro DNA binding studies of Aspartame, an artificial sweetener*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2013. **120**: p. 104-110.
183. Pulimamidi Rabindra Reddy, S.R., Battu Satyanarayana, *Synthesis, Characterization of New Copper (II) Schiff Base and 1,10 Phenanthroline Complexes and Study of Their Bioproperties*. J Photochem Photobiol B., 2016. **160**: p. 217-24.
184. Ariane Angeloff, J.-C.D., Jean Bernadou, Bernard Meunier, *The Ligand 1,10-Phenanthroline-2,9-dicarbaldehyde Dioxime can Act Both as a Tridentate and as a Tetradentate Ligand – Synthesis, Characterization and Crystal Structures of its Transition Metal Complexes*. Eur. J. Inorg. Chem., 2000: p. 1985-1996
185. Μενιδιάτης, Κ., *Synthesis and structural characterization of metal complexes with the biological interest anticancer-antibiotic drug Mitomycin C: study of the interaction of the formed complexes with natural DNA: in vitro biological activity*, in Τμήμα Χημείας. 2008, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών: Αθήνα.
186. Lever, A.B.P., *INORGANIC ELECTRONIC SPECTROSCOPY*. 2nd Ed. ed. 1984, New York: Elsevier.
187. Alberto Marini, A.M.o.-L., Alessandro Biancardi, Benedetta Mennucci, *What is Solvatochromism?* J. Phys. Chem. B, 2010. **114**: p. 17128–17135
188. Anuja P.K., P.P., *Luminescent anticancer Ru(II)-arenebipyridine and phenanthroline complexes: Synthesis, characterization, DFT studies, biological interactions and cellular imaging application*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2020. **208**: p. 111099.

189. Μαρκόπουλος Ι., Μ.Χ., Καραλιώτα Α., Μεθενίτης Κ., Παπαρηγοπούλου Μ., Σταμπάκη Δ., Ψαρουδάκης Ν., Καλατζής Γ., Κυρίτσης Π., *Εργαστηριακές ασκήσεις γενικής και ανόργανης χημείας*. 2005, Αθήνα: Σταμούλη.
190. Satish S. Bhat, A.S.K., Neeraja Purandare, Ayesha Khan, Günter Grampp, Peter Lönnecke, Evamarie Hey-Hawkins, Ruchi Dixit, Kumar Vanka, *Tris-heteroleptic ruthenium(II) polypyridyl complexes: Synthesis, structural characterization, photophysical, electrochemistry and biological properties*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2020. **203**: p. 110903.
191. Jacob M. Mayers, R.W.L., *Photophysical study of [Ru(2,2'-bipyridine)₃]²⁺ and [Ru(1,10-phenanthroline)₃]²⁺ encapsulated in the UiO-66-NH₂ metal organic framework*. *Polyhedron*, 2019. **171**: p. 382-388.
192. M.Kamel, R., *Facile luminescent sensing trace levels of pesticides azinphos ethyl, diazinon, chlorfenviphos and isofenphos*. *Inorganic Chemistry Communications*, 2020. **111**: p. 107662.
193. Eduardo Muñoz, J.P.-P., Javier Román, Víctor Rojas, Rodrigo Henríquez, Paula Greza, Ricardo Schrebler, Ricardo Córdova, Emilio Navarrete, *Interaction between nitroxyl radicals and CdTe quantum dots: Determination of fluorescence-quenching mechanisms in aqueous solution*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2019. **383**: p. 112024.
194. H.M. Suresh Kumar, R.S.K., J.S. Biradar, N.N. Math, J.S. Kadadevarmath, S.R. Inamdar, *Analysis of fluorescence quenching of new indole derivative by aniline using Stern–Volmer plots*. *J. of Luminesc.*, 2006. **116**: p. 35–42.
195. K. Zamojć, W.W., B. Zaborowski, D. Jacewicz, L. Chmurzyński, *Fluorescence quenching of 7-amino-4-methylcoumarin by different TEMPO derivatives*. *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 2015. **136**: p. 1875–1880.
196. R.M. Melavanki, R.A.K., J.S. Kadadevarmath, M.V. Kulakarni, *Quenching mechanisms of 5BAMC by aniline in different solvents using Stern–Volmer plots*. *J. of Luminesc.*, 2009. **129**: p. 1298–1303.
197. B. Pan, B.X., W. Liu, G. Xing, S. Tao, *Investigating interactions of phenanthrene with dissolved organic matter: Limitations of Stern–Volmer plot*. *Chemosph.*, 2007. **69**: p. 1555–1562.
198. D. Forcha, K.J.B., Z. Assefa, *Luminescence, absorption, and Stern–Volmer studies of cerium chloride and nitrate compounds in acidic and neutral aqueous, and non-aqueous solutions*. *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 2013. **103**: p. 90-95.
199. J.S. Kadadevarmath, G.H.M., R.M. Melavanki, N.R. Patil, *Static and dynamic model fluorescence quenching of laser dye by carbon tetrachloride in binary mixtures*. *Spectrochim. Acta Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.*, 2014. **117**: p. 630–634.
200. S.-P. Wu, Z.-M.H., S.-R. Liu, P. Kun Chung, *A Pyrene-based Highly Selective Turn-on Fluorescent Sensor for Copper(II) Ion and its Application in Live Cell Imaging*. *J. Fluoresc.*, 2012. **22**: p. 253–259.

201. B. Naik, L.R.N., J.S. Kadadevarmath, H. Pal, V. Jayathirtha Rao, *Fluorescence quenching of anthrylvinyl acetate by carbon tetrachloride*. J. of Photochem. and Photobiol. A: Chem., 2010. **214**: p. 145–151.
202. H.A. Benesi, J.H.H., *A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons*. J. Am Chem Soc, 1949. **71**: p. 2703–2707.
203. Tatiana P. Gerasimova, S.A.K., *Bipyridine and phenanthroline IR-spectral bands as indicators of metal spin state in hexacoordinated complexes of Fe(II), Ni(II) and Co(II)*. Dalton Trans., 2013. **42**: p. 1787
204. David A. Thornton, G.M.W., *The Infrared Spectra (4000–50 cm⁻¹) of Complexes of 2,2'-Bipyridine, 1,10-Phenanthroline and their Perdeuterated Analogues with Metal(II) Perchlorates of the First Transition Series*. Journal of Coordination Chemistry, 1992. **25**: p. 299–315
205. Shabana, A.A., et al., *DNA interaction and anticancer evaluation of new palladium(II), platinum(II) and silver(I) complexes based on (Δ)- and (Λ)-1,2-bis-(1H-benzimidazol-2-yl)-1,2-ethanediol enantiomers*. Polyhedron, 2018. **154**: p. 156–172.
206. M. Chavarot, S.M., O. Hamelin, F. Charnay, J. Pécaut, M. Fontecave, *“Chiral-at-Metal” Octahedral Ruthenium(II) Complexes with Achiral Ligands: A New Type of Enantioselective Catalyst*. Inorg. Chem., 2003. **42**(16): p. 4810–4816.
207. S. Satyanarayana, J.C. D., Jonathan B. Chaires, *Tris(phenanthroline)ruthenium(II) Enantiomer Interactions with DNA: Mode and Specificity of Binding*. Biochemistry 1993. **32**(10): p. 2573–2584
208. Gonuguntla, S., et al., *Rational design of Ru(II)-phenanthroline complex embedded porous TiO₂ photocatalyst for efficient hydrogen production*. Renewable Energy, 2020. **159**: p. 1–9.
209. Qi-Xiong Zhen, B.-H.Y., Jin-Gang Liu, Qian-Ling Zhang, Liang-Nian Ji, Lei Wang *Synthesis, characterization and DNA-binding properties of [Ru(phen)₂tapt]²⁺ and [Ru(phen)₂dptatp]²⁺*. Inorganica Chimica Acta 2000. **303** p. 141–147.
210. Alinaghi M., K.K., Shahpiri A., Kasemi nasab A., Abbas A., Borojeni-Momtazi, Abdollahi E., Lipkowski J., *A Pd(II) complex derived from pyridine-2-carbaldehyde oxime ligand: Synthesis, characterization, DNA and BSA interaction studies and in vitro anticancer activity*. J. Molecular Structure, 2020. **1219**: p. 128479.
211. Matteo Cusumano, M.L.D.P., Antonino Giannetto, *DNA Interaction of Platinum(II) Complexes with 1,10-Phenanthroline and Extended Phenanthrolines*. Inorg. Chem. , 2006. **45**(1): p. 230–235.
212. Guang-Bin Jiang, W.-Y.Z., Miao He, Yi-Ying Gu, Lan Bai, Yang-Jie Wang, Qiao-Yan Yi, Fan Du *Development of four ruthenium polypyridyl complexes as antitumor agents: Design, biological evaluation and mechanism investigation*. J. Inorganic Biochemistry, 2020. **208**: p. 111104.
213. Mavroidi B., S.M., Stamatakis K., Paravatou-Petsotas M., Pelecanou M., Methenitis C. , *Palladium(II) and platinum(II) complexes of derivatives of*

- 2-(4'-aminophenyl)benzothiazole as potential anticancer agents. *Inorg Chim. Acta*, 2016. **444**: p. 63–75.
214. Dimitris Matiadis, B.M., Angeliki Panagiotopoulou, Constantinos Methenitis, and M.S. Maria Pelecanou, (E)-(1-(4-Ethoxycarbonylphenyl)-5-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxystyryl)-2-pyrazoline: Synthesis, Characterization, DNA-Interaction, and Evaluation of Activity Against Drug-Resistant Cell Lines. *Molbank* 2020, 2020. **M1114**
215. Nikolaos Nikolis, C.M., George Pneumatikakis, *Studies on the interaction of altromycin B and its platinum(II) and palladium(II) metal complexes with calf thymus DNA and nucleotides*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003. **95**: p. 177–193.
216. Fangfang Wang, S.M., Yongdeng Feng, Xiaohua Liu, Lifeng Tanc, *Binding properties of two Ru(II) polypyridyl complexes containing dppz units and fluorine groups with poly(U)·poly(A) * poly(U) triplex*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2019. **197**: p. 110705.
217. Priyaranjan Kumar, R.J.B., Ashis K. Patra, *Ternary Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes containing dipyrrophenazine and saccharin: Structures, reactivity, binding interactions with biomolecules and DNA damage activity*. *Inorganica Chimica Acta* 2020. **506** p. 119532.
218. Jelders M. Davey, K.L.M., Stephen F. Ralph, Roger Kanitz, Margaret M. Sheil, *Comparison of the reactivity of cis-[RuCl₂(DMSO)₄] and trans-[RuCl₂(DMSO)₄] towards nucleosides*. *Inorganica Chimica Acta*, 1998. **281**(1): p. 10-17
219. Παπαδανιήλ, Α., *Μελέτη της αλληλεπίδρασης της Distamycin A και του συμπλόκου {trans-Ru(DMSO)₄Cl₂-Distamycin A} με CT-DNA*, in *Τμήμα Χημείας*. 2007, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών: Αθήνα.
220. Koen Uytterhoeven, J.S., Luc Van Meervelt, *Two 1 : 1 binding modes for distamycin in the minor groove of d(GGCCAATTGG)*. *Eur. J. Biochem.* , 2002. **269**: p. 2868–2877.
221. R. Smolkova, V.I.Z., R. Gyepew, D. Sabolova, N. Imrichova, D. Hudecova, L. Smolko, *Synthesis, Characterization, DNA binding, Topoisomerase I Inhibition and Antimicrobial Activity of Four Novel Zinc(II) Fenamates*. *Polyhedron*, 2018. **141**: p. 230-238.
222. J. Zhu, L.C., Y. Dong, J. Li, X. Liu. , *Spectroscopic and Molecular Modeling Methods to Investigate the Interaction between 5-Hydroxymethyl-2-Furfural and Calf Thymus DNA Using Ethidium Bromide as a Probe*. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2014. **124**: p. 78–83.
223. Payal Srivastava, R.M., Madhu Verma, Sri Sivakumar, Ashis K. Patra, *Cytotoxic ruthenium(II) polypyridyl complexes with naproxen as NSAID: Synthesis, biological interactions and antioxidant activity*. *Polyhedron*, 2019. **172**: p. 132-140.
224. Qiang Wei, J.D., Peiran Zhao, Manman Li, Fengling Cheng, Jinming Kong, Lianzhi Li, *DNA binding, BSA interaction and SOD activity of two new nickel(II) complexes with glutamine Schiff base ligands*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 2016. **161**: p. 355–367.

225. Sundaravadivel, E., *Synthesis, Characterization and Electrochemical Studies of Acyclic End-Off Copper(II) and Nickel(II) Complexes: Nuclease Activity*. Journal of Advanced Chemical Sciences, 2016. **2**(4): p. 390–393.
226. P. Sathyadevi, P.K., M. Alagesan, K. Thanigaimani, P. Thomas Muthiah, N. Dharmaraj, *Synthesis, crystal structure, electrochemistry and studies on protein binding, antioxidant and biocidal activities of Ni(II) and Co(II) hydrazone complexes*. Polyhedron, 2012. **31**(1): p. 294–306.
227. Masoumeh Ashrafi Khajeh, G.D., Siavoush Dastmalchi, and M.I. Masoomesh Shaghghi, *Spectroscopic profiling and computational study of the binding of tschimgine: A natural monoterpene derivative, with calf thymus DNA*. Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2018. **192**: p. 384–392.
228. Μεθενίτης, Κ., *Σημειώσεις μαθήματος «Ειδικά Κεφάλαια Ανόργανης Χημείας», Μέταλλα στην Ιατρική*. 2017, Αθήνα: ΕΚΠΑ.
229. T. T. C. Ting, K.A.C., H. Ahmad, *Synthesis, Characterization and DNA Binding Studies of [Ruthenium(II)(bpy)2L]²⁺ where L are Derivatives of imidazo[4,5-f]-1,10-phenanthrolines*. Sains Malaysiana, 2015. **44**(4): p. 619–628.
230. Lucie Trnková, I.B., Vladimír Kubíček, Jaroslav Dršata, *Binding of naturally occurring hydroxycinnamic acids to bovine serum albumin*. Natural Science, 2010. **2**(6): p. 563-570.
231. Marzieh Anjomshoa, H.H., MasoudTorkzadeh-Mahani, Seyed Jamilaldin Fatemi, Mahboubeh Adeli-Sardou, Hadi Amiri Rudbari, Viviana Mollica Nardoe, *A mononuclear Cu(II) complex with 5,6-diphenyl-3-(2-pyridyl)-1,2,4-triazine: Synthesis, crystal structure, DNA- and BSA-binding, molecular modeling, and anticancer activity against MCF-7, A-549, and HT-29 cell lines*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015. **96**: p. 66-82.
232. Aleksandra V. Protas, E.A.P., Olga V. Mikolaichuk, Yuri B. Porozov, Arif R. Mehtiev, Ingo Ott, Georgii V. Alekseev, Nina A. Kasyanenko, Rostislav E. Trifonov, *Synthesis, DNA and BSA binding of Pd(II) and Pt(II) complexes featuring tetrazolylacetic acids and their esters*. Inorganica Chimica Acta, 2018. **473**: p. 133-144.
233. Priti Sengupta, U.P., Prasenjit Mondal, Adity Bose, *Multi-spectroscopic and computational evaluation on the binding of sinapic acid and its Cu(II) complex with bovine serum albumin*. Food Chemistry, 2019. **301**: p. 125254.
234. Milica Medjedovic, A.R.S., Dušan Cocic, Milan Milutinovic, Laura Senft, Stefan Blagojevic, Nevena Milivojevic, Biljana Petrovic, *Dinuclear ruthenium(II) polypyridyl complexes: Mechanistic study with biomolecules, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity*. Polyhedron, 2020. **178**,: p. 114334.
235. Bao-Li Wang, S.-B.K., Zhen-Yi Lin, Jie-Hua Shi, *Investigation on the binding behavior between BSA and lenvatinib with the help of various spectroscopic and in silico methods*. Journal of Molecular Structure, 2020. **1204**: p. 127521.
236. Xiaoqing Lei, Y.Z., Xiaoyu Wang, Pengtao Zhao, Pei Liu, Qianting Zhang, Tongguo Chen, Huanhuan Yuan, Yurong Guo, *Wine*

- polysaccharides modulating astringency through the interference on interaction of flavan-3-ols and BSA in model wine*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **139**: p. 896-903.
237. Leila Zarei, Z.A., Michal Dusek, Vaclav Eigner, *Homodinuclear Ni (II) and Cu (II) Schiff base complexes derived from Ovanillin with a pyrazole bridge: Preparation, crystal structures, DNA and protein (BSA) binding, DNA cleavage, molecular docking and cytotoxicity study*. Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry 2019. **374**: p. 145–160.
238. Mohamed F. AlAjmi, M.T.R., Rais Ahmad Khan, Meraj A. Khanc, Ghazala Muteeb, and O.M.N. Mohd. Shahnawaz Khan, Ali Alsalmeh, Afzal Hussain *Understanding the interaction between α -1-acid glycoprotein (AGP) and potential Cu/Zn metallo-drugs of benzimidazole derived organic motifs: A multi-spectroscopic and molecular docking study*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020. **225**: p. 117457.
239. Bao-Li, W.D.-Q., Pan Song-Bo, Kou Zhen-Yi, Lin Jie-Hua Shi, *Exploring the binding interaction between bovine serum albumin and perindopril as well as influence of metal ions using multi-spectroscopic, molecular docking and DFT calculation*. Chemical Physics, 2020. **530**: p. 110641.
240. Liang Xu, Y.-X.H., Yan-Cheng Li, Yu-Feng Liu, Li Zhang, Hai-Xin Ai, Hong-Sheng Liu *Study on the interaction of paeoniflorin with human serum albumin (HSA) by spectroscopic and molecular docking techniques*. Chemistry Central Journal, 2017. **11**(116).
241. John O. Suberu, I.R.-C., Neil Sullivan, Alexei A Lapkin, Guy C Barker, *Comparative Cytotoxicity of Artemisinin and Cisplatin and Their Interactions with Chlorogenic Acids in MCF7 Breast Cancer Cells*. Chem. Med. Chem., 2014. **9**(12): p. 2791–2797
242. M. Mital, Z.Z., *Biological Applications of Ru(II) Polypyridyl Complexes*. Coord. Chem. Rev. , 2018. **375**: p. 434–458.
243. Leli Zeng, P.G., Yanglu Chen, Enju Wang, Liangnian Ji, Hui Chao, Zhe-Sheng Chen, *The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials*. Chem. Soc. Rev. , 2017. **46**(19): p. 5771–5804.