



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΧΡΗΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ
ΔΙΑΚΟΠΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΣΤΟ DNA**

ΚΑΠΛΑΝΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΧΗΜΙΚΟΣ



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ**
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΑΘΗΝΑ

2014

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΧΡΗΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΙΑΚΟΠΤΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΣΤΟ DNA

ΚΑΠΛΑΝΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Χριστίνα-Άννα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Χριστίνα – Άννα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Γεώργιος Πιστόλης, Ερευνητής Α΄ ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ιωάννης Παπαευσταθίου, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Χριστίνα – Άννα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Δημόπουλος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Μεθενίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ιωάννης Παπαευσταθίου, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πατρίνα Παρασκευοπούλου, Λέκτορας ΕΚΠΑ

Γεώργιος Πιστόλης, Ερευνητής Α΄ ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Μαρία Παραβατού, Ερευνήτρια Β΄ ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 04 / 04 / 2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«ΧΡΗΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΙΑΚΟΠΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΣΤΟ DNA»

ΚΑΠΛΑΝΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

Στην παρούσα διατριβή ουσιαστικά επιχειρείται ο σχεδιασμός και η μελέτη νέων συμπλόκων ενώσεων, που μπορούν να δράσουν ως μοριακοί ανιχνευτές στο DNA και πιθανοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Για το σκοπό αυτό συντέθηκε μια σειρά νέων συμπλόκων και χαρακτηρίστηκαν πλήρως με φασματοσκοπία IR, NMR, UV-Vis, ενώ οι φωτοφυσικές τους ιδιότητες μελετήθηκαν με φασματοσκοπία εκπομπής. Παρουσιάζεται επίσης η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$. Η αλληλεπίδρασή τους με το DNA μελετήθηκε με διάφορες τεχνικές όπως CD, ιξωδομετρία, CV, T_m , τιτλοδότηση UV-Vis και εκπομπής. Επιπλέον, μελετήθηκε η φωτο-διασπαστική τους ικανότητα και η *in vitro* αντικαρκινική τους δράση έναντι τριών καρκινικών σειρών ανθρώπινης προέλευσης. Επιπλέον, μελετήθηκε η δράση τους έναντι του PAF και των ενζυματικών του διεργασιών.

Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων του τύπου $fac\text{-}[\text{Re}(\text{CO})_3(a\text{-diimine})\text{L}]^{0/+}$ με CT-DNA γίνεται κυρίως μέσω συναρμογής στην αύλακα, εκτός από το - υποκατεστημένο με δύο εστερομέδες - dpprz σύμπλοκο που η δέσμευση είναι παρεμβολικής φύσεως. Αν και το dpprz παράγωγο αλληλεπιδρά ισχυρότερα από τα υπόλοιπα σύμπλοκα του τύπου αυτού και συμπεριφέρεται ως μοριακός διακόπτης φωτός, εντούτοις είναι δύσκολο να προκαλέσει άμεση φωτοδιάσπαση του DNA. Τα υπόλοιπα διμινικά σύμπλοκα του Re(I) προκαλούν ικανοποιητική διάσπαση του ενός κλώνου του πλασμιδιακού pBR322 DNA. Μηχανιστικές μελέτες έδειξαν ότι τα pq σύμπλοκα διασπών του DNA μέσω παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου. Το φαινανθρολινικού τύπου σύμπλοκο προκαλεί φωτοδιάσπαση ανεξάρτητη από το οξυγόνο.

Οι DNA-δεσμευτικές μελέτες του νέου τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου $\{\text{H}_2\text{TPyP}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})]_4\} \cdot 4\text{PF}_6$ έδειξαν ισχυρή αλληλεπίδραση με την αύλακα του DNA. Η μιας τάξης μεγέθους μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης του με το DNA, συγκριτικά με τα μονομερή σύμπλοκα οφείλεται στις ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις

φωσφορικές ομάδες του σκελετού του DNA. Το πορφυρινικό αυτό παράγωγο επιδεικνύει περισσότερο αποτελεσματική φωτοδιάσπαση του πλασμιδίου pBR322, συγκριτικά με τα παραπάνω σύμπλοκα του τύπου $fac-[Re(CO)_3(a-diimine)L]^{0/+}$. Η μεταλλοπορφυρίνη (TPyP)GaCl δεσμεύεται εξωτερικά μέσω στοιβάγματος στο DNA. Η χαμηλή συγγένεια δέσμευσης, δεν επηρεάζει την ικανότητα του συμπλόκου να επάγει την διάσπαση και των δύο κλώνων του πλασμιδίου, μέσω μηχανισμού που περιλαμβάνει την παραγωγή μονήρους οξυγόνου.

Χρησιμοποιώντας την MTT μέθοδο, μελετήθηκε η *in vitro* κυτταροτοξική δράση των συμπλόκων έναντι τριών καρκινικών σειρών ανθρώπινης προέλευσης, μαστού (MCF-7), προστάτη (PC3) και γλοιοβλάστωμα (T98G). Η σύμπλεξη του Re(I) μειώνει σημαντικά την τοξικότητα του ελεύθερου υποκαταστάτη phendione. Αντίθετα, τα *rac* σύμπλοκα επιδεικνύουν ισχυρή τοξικότητα, συγκριτικά με τον ελεύθερο *rac* υποκαταστάτη που είναι μη τοξικός. Τα αποτελέσματα των συμπλόκων του τύπου $[Re(CO)_3(rac)(L)]^{0/+}$ (όπου L=Cl, MeCN, py), υποδεικνύουν την κρισιμότητα του αξονικού υποκαταστάτη και του φορτίου του συμπλόκου στην κυτταροτοξικότητα τους. Η πορφυρίνη του Ga(III) έδειξε ισχυρή τοξικότητα έναντι των MCF-7 και PC3 κυττάρων και μέτρια τοξικότητα έναντι των T98G κυττάρων.

Τα σύμπλοκα $[Re(CO)_3(phen)dione)Cl]$ και $[Re(CO)_3[dppz(COOEt)_2]Cl]$, αλλά κυρίως το πρόδρομο σύμπλοκο $[Re(CO)_5Cl]$ παρουσιάζουν ισχυρή αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF, σε αντίθεση με τους ελεύθερους υποκαταστάτες. Επιπλέον, τα σύμπλοκα επιδρούν στα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF, lyso-PAF-AT και PAF-CPT, ενώ το $[Re(CO)_3(phen)dione)Cl]$ αυξάνει τη δραστηριότητα του καταβολικού ενζύμου LP-PLA₂.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ: Μοριακοί ανιχνευτές για το DNA με πιθανή αντικαρκινική και αντι-φλεγμονώδη δράση.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Σύμπλοκα Re(I), Ga(III)-πορφυρίνη, DNA δεσμευτικές μελέτες, κυτταροτοξική δράση, PAF.

ABSTRACT

“METAL COMPLEXES AS MOLECULAR SWITCHES AND PROBES IN DNA”

KAPLANIS MICHAEL

In the current thesis, we describe the design of metal complexes acting as DNA probes and potential chemotherapeutic agents. A series of novel metal complexes was synthesized and characterized using IR, NMR, UV-Vis and emission spectroscopy. The crystal structure of the complex $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$ has been determined by X-ray diffraction methods. We also studied their DNA-binding properties with a range of techniques such as CD, CV, viscosity measurements, T_m , UV-Vis and emission titration. Their DNA photocleavage ability and the *in vitro* antitumor effect against human breast (MCF-7), prostate (PC3) and glioblastoma (T98G) cancer were also studied. Moreover, their ability to inhibit PAF and to modulate the PAF-basic metabolic enzymes was studied.

The complexes of the type *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(a\text{-diimine})\text{L}]^{0/+}$ interact with CT-DNA mainly *via* a groove binding mode, in contrast to the substituted dppz complex, which intercalates in the base pairs. Although the dppz complex interacts stronger than the other complexes and acts as a molecular light switch, it is difficult to promote the DNA photo-cleavage. The other *a*-diimine Re(I) complexes showed nicking of the plasmid pBR322 upon irradiation. Mechanistic studies revealed the necessity of the oxygen in the photocleavage ability of the pq complexes. The phendione complex cleaves the single strand through an independent oxygen mechanism.

The tetra-rhenium porphyrin complex $\{\text{H}_2\text{TPyP}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})]_4\} \cdot 4\text{PF}_6$ strongly interacts with the DNA grooves. Its strong DNA-binding affinity is due to the electrostatic interactions with the phosphate backbone. The porphyrin complex is photocatalytically more reactive than the monomeric complex. The Gallium(III) porphyrin complex binds to DNA with outside self-stacking. Despite the low DNA-binding affinity of the metalloporphyrin, it showed a double strand breaks *via* a mechanism that involves single oxygen generation.

In vitro cytotoxicity studies of the complexes against MCF-7, PC3 and T98G were determined using MTT assay. The coordination of the phendione with the Re(I) center

significantly reduces the toxicity presented by the ligand. In contrast, pq complexes exhibit strong toxicity compared with the nontoxic free pq ligand. The data reveal the crucial role of the axial ligand and the charge of the complex of type $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{L})]^{0/+}$ (L=Cl, MeCN, py), in the cytotoxicity properties. The Ga(III) metalloporphyrin showed strong toxicity against MCF-7 and PC3 cell lines, but moderate toxicity against T98G cells.

In contrast to the free ligands, complexes $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}]$, $[\text{Re}(\text{CO})_3[\text{dppz}(\text{COOEt})_2]\text{Cl}]$, and mainly the precursor molecule $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$ exhibit strong inhibition of PAF aggregation. Moreover, the complexes affect the PAF-biosynthetic enzymes, lyso-PAF-AT and PAF-CPT, whereas complex $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}]$ affect the PAF catabolism.

SUBJECT AREA: DNA molecular probes with potential antitumor and anti-inflammatory activity.

KEYWORDS: Re(I) complexes, Ga(III)-porphyrin, DNA binding, cytotoxicity studies, PAF.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε κατά βάση στο εργαστήριο Ανόργανης Χημείας και Τεχνολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Χ. Α. Μητσοπούλου. Θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω την κα Μητσοπούλου που με έκανε μέλος της ερευνητικής της ομάδας και για την επιστημονική της καθοδήγηση από το μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης μου ως τώρα. Η επιστημονική της καθοδήγηση με βοήθησε να μάθω πολλά καινούρια πράγματα.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Γ. Πιστόλη, Ερευνητή Α΄ του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, για τη βοήθεια του σε θέματα μελέτης φθορισμού, καθώς και τον κ. Ι. Παπαευσταθίου, Επίκουρο Καθηγητή ΕΚΠΑ, που με βοήθησε απεριόριστα με την εμπειρία του στη χημεία του γαλλίου. Αμφοτέρους ευχαριστώ ακόμα και για τη συμμετοχή τους στη συμβουλευτική επιτροπή και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους. Ευχαριστώ τον κ. Κ. Μεθενίτη, Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΚΠΑ και την κ. Π. Παρασκευοπούλου, Λέκτορα ΕΚΠΑ, για τη συμμετοχή τους στην επταμελή επιτροπή και τις συμβουλές τους σε θέματα αλληλεπίδρασης με DNA και κυκλικής βολταμετρίας, αντίστοιχα.

Τα *in vitro* αντικαρκινικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Ερευνών, Ενέργειας και Ασφάλειας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, υπό την καθοδήγηση της κ. Μ. Παραβατού, Ερευνήτριας Β΄. Της οφείλω ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη για το ενδιαφέρον της και τη βήμα προς βήμα καθοδήγηση της σε ένα εντελώς καινούριο για εμένα ερευνητικό πεδίο. Οι επιστημονικές συζητήσεις υπήρξαν πολύτιμες για εμένα και μου εμφύσησαν ένα βιολογικό τρόπο σκέψης.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Κ. Δημόπουλο, καθώς και την ερευνητική του ομάδα Γ. Σταματάκη και Β. Παπακωνσταντίνου για την πραγματοποίηση των βιολογικών πειραμάτων έναντι του PAF. Η επίλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης από τους Α. Κουτσολέλο και Π. Αγγαρίδη, τους οποίους και ευχαριστώ θερμά.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους φίλους και συναδέλφους μου Α. Ζαρκαδούλα, Χ. Κεφαλίδη, Ε. Κουτσούρη, και Κ. Κυπραίου, για τη βοήθεια τους σε οποιοδήποτε επιστημονικό πρόβλημα προέκυψε, αλλά και για την πραγματικά πολύ ευχάριστη παρέα εντός και εκτός εργαστηρίου. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας καθώς και τους συναδέλφους φοιτητές για την άριστη συνεργασία μας.

Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένεια μου για την ηθική τους συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA.....	5
1.1. Δομικά συστατικά του DNA	5
1.2. Δομή και διαμόρφωση του DNA. Το μοντέλο της διπλής έλικας.....	7
1.3. Τρόποι δέσμευσης στο DNA.....	12
1.3.1. Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.....	12
1.3.1.1. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (<i>electrostatic binding</i>).....	13
1.3.1.2. Δέσμευση στις αύλακες (<i>groove binding</i>).....	13
1.3.1.2. Παρεμβολή μορίων στη διπλή έλικα του DNA (<i>Intercalation</i>).....	14
1.3.2. Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΙ	
ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ ΤΟ DNA	18
2.1. Εισαγωγή – Ιστορική Αναδρομή.....	18
2.2. Σύμπλοκα Ru(II).....	20
2.2.1. Σύμπλοκα Ru(II) με dprz υποκαταστάτη.....	20
2.2.2. Η επίδραση του μοριακού διακόπτη φωτός (<i>molecular light switch effect</i>).....	21
2.2.3. Φωτο-αποικοδόμηση του DNA.....	21
2.2.4. Άλλα σύμπλοκα του Ru(II) με τύπου dprz υποκαταστάτες.....	23
2.3. Σύμπλοκα Re(I)	24
2.3.1. Παρεμβολικά μονομεταλλικά σύμπλοκα Re(I).....	24
2.3.2. Παρεμβολικά διμεταλλικά σύμπλοκα Re(I).....	25
2.3.3. Παρεμβολή και ομοιοπολική σύνδεση συμπλόκων του Re(I)	27
2.3.4. Σύμπλοκα Re(I) μέσω αλληλεπίδρασης στην αύλακα	29
2.4. Άλλα σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης	29
2.5. Αντιδράσεις α-διμινικών συμπλόκων με DNA	30
2.5.1. Υδρολυτική διάσπαση του κλώνου του DNA.....	31
2.5.2. Οξειδωτική διάσπαση του κλώνου. Αντιδράσεις με σάκχαρα	31
2.5.3. Οξειδωτικές αντιδράσεις με τις βάσεις του DNA	32
2.6. Κυτταρικές μελέτες συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης	33

2.6.1. Κυτταροτοξικότητα συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης.....	34
2.6.2. Φωτο-τοξικότητα συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ Re(I) ΜΕ α-ΔΙΙΜΙΝΙΚΟΥΣ	
ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ	37
3.1. Γενικά.....	37
3.2. Μέθοδοι σύνθεσης συμπλόκων του τύπου $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})L^{0/+}$	38
3.3. Φωτοφυσικές ιδιότητες συμπλόκων του τύπου $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})L^{0/+}$	40
3.3.1. UV-Vis φασματοσκοπία	41
3.3.2. IR φασματοσκοπία	41
3.3.3. Φωτοφυσικές ιδιότητες	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ	47
4.1. Εισαγωγή.....	47
4.2. Σύνθεση <i>meso</i> -υποκατεστημένων πορφυρινών	49
4.3. Χαρακτηριστικά φασμάτων απορρόφησης πορφυρινών	51
4.4. Η φωτοφυσική των πορφυρινών	51
4.5. Οι πορφυρίνες και η συγγένεια τους με το DNA	55
4.5.1. Εισαγωγή.....	55
4.5.2. Κατανοώντας τον τρόπο αλληλεπίδρασης των κατιοντικών πορφυρινών με το B-DNA	55
4.5.3. Μέθοδοι διερεύνησης του τρόπου αλληλεπίδρασης.....	58
4.6. Εξωτερική σύμπλεξη μετάλλων σε πορφυρίνες και το βιολογικό τους ενδιαφέρον	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΤΟ ΓΑΛΛΙΟ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ	66
5.1. Εισαγωγή.....	66
5.2. Χημεία υδατικών διαλυμάτων του Γαλλίου.....	66
5.3. Βιοχημική σύγκριση του Ga^{3+} με το Fe^{3+}	68
5.4. Μηχανισμός θεραπευτικής δράσης	69
5.5. Ενώσεις του Γαλλίου με θεραπευτική δράση	70
5.5.1. Νιτρικό γάλλιο και χλωριούχο γάλλιο	70
5.5.2. Τα σύμπλοκα Gallium 8-quinolinolate και Gallium maltolate	71
5.5.3. Άλλες ενώσεις του γαλλίου	72
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	79

6.1. Υλικά	79
6.2. Μέθοδοι χαρακτηρισμού συμπλόκων	79
6.3. Μελέτη αλληλεπίδρασης συμπλόκων με DNA (DNA binding studies)	80
6.3.1. Παρασκευή διαλύματος CT-DNA.....	80
6.3.2. Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων	81
6.3.3. Προσδιορισμός σημείων θερμικής μετουσίωσης, T_m	82
6.3.4. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού (CD)	83
6.3.5. Ξωδομετρία	83
6.3.6. Πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας (CV).....	84
6.3.7. Τίτλοδοτήση UV-Vis και εκπομπής (UV-Vis & Emission Titration).....	84
6.3.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη (Agarose gel electrophoresis)	85
6.4. Μελέτη κυττατοξικότητας υποκαταστατών και συμπλόκων	86
6.4.1. Κυτταρικές καλλιέργειες	86
6.4.2. Μελέτη κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT (MTT assay)	90

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ. 93

7.1. Ο υποκαταστάτης 2-(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνη, (pq)	93
7.1.1. Σύνθεση του υποκαταστάτη 2-(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνη	93
7.1.2. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 2-(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνη	94
7.2. Ο υποκαταστάτης 1,10-φαινανθρόλινο-5,6-διόνη, (phendione)	95
7.2.1. Σύνθεση του υποκαταστάτη 1,10-φαινανθρόλινο-5,6-διόνη	95
7.2.2. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 1,10-φαινανθρόλινο-5,6-διόνη.....	96
7.3. Ο υποκαταστάτης τετρα(4-πυριδυλ)πορφυρίνη, (H_2TPyP)	98
7.3.1. Σύνθεση του υποκαταστάτη τετρα(4-πυριδυλ)πορφυρίνη	98
7.3.2. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη τετρα(4-πυριδυλ)πορφυρίνη	99

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ..... 104

8.1. Το συμπλόκο <i>fac</i> - $Re(CO)_3(phendione)Cl$, [$Re(phendione)Cl$]	104
8.1.1. Σύνθεση του συμπλόκου <i>fac</i> - $Re(CO)_3(phendione)Cl$	104
8.1.2. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου <i>fac</i> - $Re(CO)_3(phendione)Cl$	105
8.2. Το σύμπλοκο <i>fac</i> - $Re(CO)_3(pq)Cl$, ($Repq-Cl$).....	109
8.2.1. Σύνθεση του συμπλόκου <i>fac</i> - $Re(CO)_3(pq)Cl$	109
8.2.2. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου <i>fac</i> - $Re(CO)_3(pq)Cl$	109
8.3. Τα σύμπλοκα <i>fac</i> - $[Re(CO)_3(pq)(MeCN)]PF_6$, ($Repq-MeCN$) και <i>fac</i> - $[Re(CO)_3(pq)(py)]PF_6$, ($Repq-py$)	112

8.3.1. Σύνθεση των συμπλόκων <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (pq)(MeCN)]PF ₆ και <i>fac</i> - [Re(CO) ₃ (pq)(py)]PF ₆	112
8.3.2. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (pq)(MeCN)]PF ₆ και <i>fac</i> - [Re(CO) ₃ (pq)(py)]PF ₆	114
8.4. Το τετρα-ρηγικό pq πορφυρινικό σύμπλοκο {H ₂ TPyP[Re(CO) ₃ (pq)] ₄ }·4PF ₆ , (H ₂ TPyP-4Re).....	130
8.4.1. Σύνθεση του πορφυρινικού συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re.....	130
8.4.2. Χαρακτηρισμός του πορφυρινικού συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re.....	132
8.5. Το χλωρο-γάλλιο(III) πυρφυρινάτο σύμπλοκο, [(TPyP)GaCl].....	140
8.5.1 Σύνθεση του χλωρο-γάλλιο(III) πυρφυρινάτο συμπλόκου.....	140
8.5.2. Χαρακτηρισμός του χλωρο-γάλλιο(III) πυρφυρινάτο συμπλόκου.....	141
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. DNA-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	149
9.1. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου Re(CO) ₃ Cl[dppz-3,6(COOEt) ₂] με DNA.....	149
9.1.1. Το σύμπλοκο Re(CO) ₃ Cl[dppz-3,6(COOEt) ₂].....	149
9.1.2. Πειράματα θερμικής μετουσίωσης, T _m	150
9.1.3. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD).....	152
9.1.4. Τιτλοδότηση ορατού-υπεριώδους (UV-Vis titration).....	153
9.1.5. Τιτλοδότηση εκπομπής (Emission titration).....	155
9.1.6. Πειράματα ιξωδομετρίας (Viscosity measurements).....	157
9.1.7. Πειράματα κυκλικής βολταμετρίας (CV experiments).....	159
9.1.8. Μελέτη Διάσπασης του DNA (DNA cleavage studies).....	160
9.1.9. Συζήτηση.....	162
9.2. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου Re(CO) ₃ (phendione)Cl με DNA.....	163
9.2.1. Πειράματα θερμικής μετουσίωσης, T _m	163
9.2.2. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD).....	164
9.2.3. Πειράματα ιξωδομετρίας (Viscosity measurements).....	165
9.2.4. Πειράματα κυκλικής βολταμετρίας (CV experiments).....	166
9.2.5. Τιτλοδότηση UV-Vis και Εκπομπής.....	167
9.2.6. Μελέτη Διάσπασης του DNA (DNA cleavage studies).....	169
9.2.7. Μηχανιστικές μελέτες (Mechanistic studies).....	169
9.2.8. Συζήτηση.....	170
9.3. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων [Re(CO) ₃ (pq)(MeCN)]PF ₆ και [Re(CO) ₃ (pq)(py)]PF ₆ με DNA.....	171
9.3.1. Πειράματα θερμικής μετουσίωσης, T _m	171

9.3.2. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD).....	173
9.3.3. Τιτλοδότηση UV-Vis και Εκπομπής	174
9.3.4. Πειράματα ιξωδομετρίας (Viscosity measurements)	178
9.3.5. Πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας (CV experiments).....	179
9.3.6. Μελέτη Διάσπασης του DNA (DNA cleavage studies)	181
9.3.7. Μηχανιστικές μελέτες (Mechanistic studies)	182
9.3.8. Συζήτηση	184
9.4. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου $\{H_2TPyP[Re(CO)_3(pq)]_4\} \cdot 4PF_6$ με DNA.....	185
9.4.1. Πειράματα θερμικής μετουσίωσης, T_m	185
9.4.2. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD).....	187
9.4.3. Τιτλοδότηση UV-Vis και Εκπομπής	188
9.4.4. Πειράματα ιξωδομετρίας (Viscosity measurements)	191
9.4.5. Μελέτη Διάσπασης του DNA (DNA cleavage studies)	192
9.4.6. Συζήτηση	193
9.5. Αλληλεπίδραση της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl με DNA	194
9.5.1. Πειράματα θερμικής μετουσίωσης, T_m	194
9.5.2. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD).....	196
9.5.3. Τιτλοδότηση UV-Vis και Εκπομπής	197
9.5.4. Πειράματα ιξωδομετρίας (Viscosity measurements)	199
9.5.5. Μελέτη Διάσπασης του DNA (DNA cleavage studies)	200
9.5.6. Μηχανιστικές μελέτες (Mechanistic studies)	201
9.5.7. Συζήτηση	202
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. <i>In Vitro</i> ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	204
10.1. Εισαγωγή	204
10.2. Κυτταροτοξική μελέτη των συμπλόκων $Re(CO)_3(phendione)Cl$, $Re(CO)_3Cl[dppz-3,6-(COOEt)_2]$ και των αντίστοιχων υποκαταστατών	205
10.3. Κυτταροτοξική μελέτη του υποκαταστάτη rq και των αντίστοιχων $Re(I)$ συμπλόκων	208
10.4. Κυτταροτοξική μελέτη του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου $H_2TPyP-4Re$	212
10.5. Κυτταροτοξική μελέτη της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl.....	212
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ PAF.....	215
11.1. Εισαγωγή	215

11.2. Επίδραση αναστολής των συμπλόκων στη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF	216
11.3. Επίδραση των συμπλόκων στη δραστικότητα των βασικών μεταβολικών ενζύμων του PAF.....	217
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	222
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	225
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	228

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. Κύριες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων.	5
Σχήμα 1.2. Τα σάκχαρα των νουκλεϊκών οξέων.	6
Σχήμα 1.3. Παραδείγματα νουκλεοσιδίων, η 2'-δεοξυαδενοσίνη (2'-dAdo) και η αδενοσίνη (Ado).	6
Σχήμα 1.4. Το νουκλεοτίδιο, 5'-φωσφορική δεοξυαδενοσίνη, και οι δεσμοί μεταξύ της φωσφορικής ομάδας, του σακχάρου και της αζωτούχου βάσης.	7
Σχήμα 1.5. Δομή ενός πολυνουκλεοτιδικού τμήματος DNA.	8
Σχήμα 1.6. Σκελετικό τμήμα της διπλής έλικας του DNA. Η δομή επαναλαμβάνεται κάθε 3.4 nm (ή 34Å) και αντιστοιχεί σε 10 κατάλοιπα της κάθε αλυσίδας.	10
Σχήμα 1.7. Τα ζεύγη βάσεων αδενίνη (A)-θυμίνη (T) (αριστερά) και γουανίνη (G)-κυτοσίνη (C) (δεξιά) του DNA και οι δεσμοί υδρογόνου. Σχηματισμός μεγάλης και μικρής αύλακας.	10
Σχήμα 1.8. Οικογένειες διαμορφώσεων του DNA.	11
Σχήμα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση της διπλής έλικας του B-DNA και η αρχή του αποκλεισμού των γειτονικών θέσεων ενός μορίου-παρεμβολέα (με μαύρο χρώμα).	15
Σχήμα 1.10. Δομές της anthramycin (a) και της tomaymicin (b) και ο προτεινόμενος μηχανισμός μέσω ιμινικού ενδιάμεσου.	16
Σχήμα 1.11. Ομοιοπολική σύνδεση του λευκοχρύσου με τα N7 της αδενοσίνης (Ado) και της γουανοσίνης (Guo). Η σύνδεση στο N7 της Guo είναι προτιμότερη λόγω δεσμών υδρογόνου της αμμωνίας με το O6 [15].	17
Σχήμα 2.1. Δομές διμινικών υποκαταστατών (και οι συντομογραφίες τους) που αναφέρονται στο παρών κεφάλαιο.	19
Σχήμα 2.2. Αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου μέσω της “flash-quench” τεχνικής, για την οξείδωση της γουανίνης από το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$	22
Σχήμα 2.3. Προτεινόμενος μηχανισμός της proton-coupled electron transfer (PCET) ανάμεσα στο $[\text{poly-d}(\text{GC})]_2$ και το διεγερμένο $[\text{Ru}(\text{tap})_2(\text{dppz})]^{2+}$	23
Σχήμα 2.4. Δομή συμπλόκων του Re(I) που δεσμεύονται μέσω παρεμβολής στο DNA. ..	24
Σχήμα 2.5. Η δομή του διμεταλλικού συμπλόκου $[\text{Re}(\text{dppz})(\text{CO})_3(\text{py}(\text{CH}_2)_3\text{py})\text{Re}(\text{dppz})(\text{CO})_3]^{2+}$ (αριστερά), και η UV-Vis καμπύλη τιτλοδότησης του (δεξιά). Η γραμμή δείχνει την πρώτη φαινομενική εκδήλωση κορεσμού.	26
Σχήμα 2.6. Δομές των συμπλόκων Rh(III), Ir(I), Re(I), η ομοιοπολική σύνδεση και η αλληλουχία του DNA που χρησιμοποιηθήκαν για την οξείδωση της γουανίνης. Βρέθηκε	

<p>ότι αν στη θέση πρόσδεσης του μετάλλου έχουμε ινοσίνη (I), αντί γουανίνη, αυξάνεται η απόδοση της μακρινής κλίμακας οξειδωτικής καταστροφής διαμέσου του DNA [49]......</p> <p>Σχήμα 2.7. Προτεινόμενος μηχανισμός για την οξείδωση της γουανίνης (G) από τα διεγερμένο σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py}')^+]$. Πριν τη διέγερση, στο σύστημα υπάρχει ισορροπία δύο καταστάσεων: η ανεπαρκώς συζευγμένη με τα ζεύγη βάσεων (poorly coupled) και η πολύ καλά συζευγμένη (well coupled). Η διέγερση του συμπλόκου μπορεί να ακολουθείται από φωταύγεια ($h\nu'$) ή από αποδιέγερση χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας (στο poorly coupled σύστημα) ή στο well coupled σύστημα, από έγχυση (injection) φορτίου προς σχηματισμό ανηγμένου συμπλόκου (Re^{red}) και κατιοντικής ρίζας γουανίνης (G^+). Εν συνεχεία μπορεί να συμβεί είτε οπισθομεταφορά ηλεκτρονίου [back electron transfer (BET)] είτε ο σχηματισμός μόνιμων προϊόντων οξείδωσης (G^{ox}) με αντίδραση με H_2O ή με O_2 [47]......</p>	28
Σχήμα 2.8. Δομές των διμεταλλικών συμπλόκων του Rh(II).	36
Σχήμα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων του τύπου $\text{fac-Re}(\text{CO})_3(\alpha\text{-διμίνη})\text{L}^{0/+}$. Αυτές οι δομικές μονάδες μπορούν να συνδεθούν με βιομόρια ή να ενσωματωθούν σε μοριακές διατάξεις μέσω του αξονικού υποκαταστάτη L, ή της $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ διμίνης [82].	38
Σχήμα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση της πορείας σύνθεσης του συμπλόκου $\text{fac}(\text{dppz})\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Cl}$. Αρχικά, η 1-10-φαινανθρολίνη-5,6-διόνη συμπλέκεται στο μεταλλικό κέντρο και εν συνεχεία αντιδρά, με μια αντίδραση συμπύκνωσης, με την ο-φαινυλενοδιαμίνη, δημιουργώντας τελικά τον dppz υποκαταστάτη.	39
Σχήμα 3.3. FTIR φάσμα του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})\text{Cl}$ σε MeCN και οι αντίστοιχες $\nu(\text{CO})$ δονήσεις.	42
Σχήμα 3.4. Ο χαρακτήρας των πιο συχνά απαντώμενων διεγερμένων καταστάσεων που συναντώνται στα σύμπλοκα του τύπου αυτού.	43
Σχήμα 4.1. Δομή πορφυρίνης, και η αρίθμηση για την περιφερειακή υποκατάσταση πορφυρινικών παραγώγων, όπως η φυσικώς απαντώμενη β -υποκατεστημένη protoporphyrin IX και η <i>meso</i> -υποκατεστημένη συνθετική πορφυρίνη τετραφαινυλοπορφυρίνη.	48
Σχήμα 4.2. Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης <i>meso</i> -υποκατεστημένων πορφυρινών. Με R παριστάνεται κάποια άρυλο-αλδεΐδη.....	50
Σχήμα 4.3. Μοριακά τροχιακά της πορφυρίνης και οι πιθανές μεταπτώσεις για μια τυχαία μεταλλοπορφυρίνη με d^6 μεταλλοίον.	52
Σχήμα 4.4. Ενεργειακό διάγραμμα Jablonski για μια κανονική πορφυρίνη.	53

Σχήμα 4.5. Χημικός τύπος της <i>meso</i> -τέτρα-4-N-μεθυλπυριδιλ-πορφυρίνης (H ₂ TMPyP). Με M παριστάνεται κάποιο μεταλλικό ιόν και με X οι πιθανοί αξονικοί υποκαταστάτες του μεταλλικού κέντρου.	55
Σχήμα 4.6. Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων τρόπων αλληλεπίδρασης της μεταλλοπορφυρίνης Cu ^{II} TMPyP με τη διπλή έλικα του DNA. (Αριστερά) παρεμβολή του μορίου στη διπλή έλικα του DNA, (κέντρο) το μόριο προσανατολίζεται στη μεγάλη αύλακα, (δεξιά) εξωτερικό στοίβαγμα της πορφυρίνης [59].	56
Σχήμα 4.7. Δομές πορφυρινικών συμπλόκων του Re(I) [122,123].	60
Σχήμα 4.8. Δομές πορφυρινικών συμπλόκων του Ru(II) [124].	60
Σχήμα 4.9. Μηχανισμοί τύπου I και II στο σχηματισμό προϊόντων φωτο-οξειδωσης της dGuo, παρουσία του συμπλόκου [H ₂ (TPyP)Ru ₄] ⁴⁺	61
Σχήμα 4.10. Δομές φθόρο-υποκατεστημένων πορφυρινικών συμπλόκων του Ru(II) [129,133].	63
Σχήμα 4.11. Δομές αρένο-πορφυρινικών συμπλόκων του Ru(II) [136].	64
Σχήμα 5.1. Δομές του τρις(8-κινολινολάτο)γάλλιο(III) (Gallium 8-quinolinolate, αριστερά) και του τρις(μαλτολάτο)γάλλιο(III) (Gallium maltolate, δεξιά).	72
Σχήμα 5.2. Δομές των ⁴ N-υποκατεστημένων α-N-ετεροκυκλικών θειοημικαρβαζονικών υποκαταστατών και των αντίστοιχων συμπλόκων του Ga(III) και του Fe(III).	73
Σχήμα 5.3. Δομές της αιματοπορφυρίνης και του Ga(III)-παραγώγου της (ATX-70) που χρησιμοποιούνται στη sonodynamic θεραπεία του καρκίνου. Το Asp υποδηλώνει ένα κατάλοιπο του αμινοξέος ασπαρτικό οξύ.	74
Σχήμα 6.1. (A) Τετραγωνισμένο πλέγμα αντικειμενοφόρου πλάκας, (B) παρουσιάζεται σχηματικά ο τρόπος υπολογισμού των κυττάρων.	89
Σχήμα 6.2. Αντίδραση αναγωγής του άλατος τετραζολίου (MTT) σε φορμαζάνη παρουσία ενζύμων.	90
Σχήμα 7.1. Πορεία σύνθεσης του υποκαταστάτη 2-(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνη (pq).	93
Σχήμα 7.2. IR φάσμα του pq σε δισκίο KBr.	94
Σχήμα 7.3. Φάσμα ¹ H-NMR του pq σε διαλύτη CDCl ₃ , και η αρίθμηση των πρωτονίων.	95
Σχήμα 7.4. Πορεία σύνθεσης του υποκαταστάτη 1,10-φαινανθρόλινο-5,6-διόνη (phendione).	96
Σχήμα 7.5. IR φάσμα του υποκαταστάτη 1,10-φαινανθρόλίνη-5,6-διόνη.	97
Σχήμα 7.6. Φάσμα ¹ H-NMR της phendione σε διαλύτη DMSO-d ₆ , και η αρίθμηση των πρωτονίων.	97
Σχήμα 7.7. Πορεία σύνθεσης του υποκαταστάτη τετρα(4-πυριδυλ)πορφυρίνη, (H ₂ TPyP).	99
Σχήμα 7.8. Φάσμα IR της H ₂ TPyP σε δισκίο KBr.	100

Σχήμα 7.9. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της πορφυρίνης H_2TPyP σε διαλύτη CDCl_3	102
Σχήμα 7.10. Κανονικοποιημένο φάσμα ορατού της H_2TPyP σε CHCl_3 και HCl 1M. Στο ένθετο φαίνονται οι Q bands σε μεγέθυνση.	103
Σχήμα 8.1. Γενική πορεία σχηματισμού α -διμινικών συμπλόκων του τύπου <i>fac</i> - $\text{Re}(\text{CO})_3(\alpha\text{-diimine})\text{Cl}$. Με N-N συμβολίζεται η α -διμίνη.	104
Σχήμα 8.2. IR φάσμα του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ σε στερεά κατάσταση.	106
Σχήμα 8.3. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ σε DMSO-d_6	106
Σχήμα 8.4. Φάσματα UV-Vis του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ σε διαλύτες CH_2Cl_2 , MeCN , MeOH	107
Σχήμα 8.5. Κινητική μελέτη του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ σε μεθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{pH}=7$	108
Σχήμα 8.6. Πιθανή ισορροπία για την αντίδραση ενυδάτωσης του καρβονυλίου της <i>phendione</i>	109
Σχήμα 8.7. IR φάσμα του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})\text{Cl}$	110
Σχήμα 8.8. Η <i>cis</i> και η <i>trans</i> -διαμόρφωση του υποκαταστάτη <i>pq</i> . Φαίνεται η αρίθμηση των ατόμων αζώτου και άνθρακα.	111
Σχήμα 8.9. $^1\text{H-NMR}$ φάσμα του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})\text{Cl}$ σε CDCl_3	112
Σχήμα 8.10. Πορεία σύνθεσης των συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$	113
Σχήμα 8.11. Φάσματα IR των συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ (επάνω) και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$ (κάτω) σε δισκία KBr	115
Σχήμα 8.12. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των συμπλόκων Repq-MeCN (πάνω) και Repq-py (κάτω) σε διαλύτη CD_3OD	117
Σχήμα 8.13. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY NMR του συμπλόκου Repq-py σε διαλύτη CD_3OD	118
Σχήμα 8.14. Φάσματα UV-Vis των συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ (δεξιά) και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$ (αριστερά) σε CH_2Cl_2 , DMF , MeOH . Η συγκέντρωση όλων των διαλυμάτων είναι 30 μM και η θερμοκρασία 25 $^\circ\text{C}$	120
Σχήμα 8.15. Φάσματα διέγερσης (μαύρη γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]^+$ σε διαλύτες CH_2Cl_2 , DMF , MeOH	121
Σχήμα 8.16. Φάσματα διέγερσης (μαύρη γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]^+$ σε διαλύτες CH_2Cl_2 , DMF , MeOH	122
Σχήμα 8.17. Φάσματα εκπομπής του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]^+$ (30 μM) σε CH_2Cl_2 , DMF , MeOH . Φαίνεται χαρακτηριστικά η πολύ ασθενής φωταύγεια του συμπλόκου σε πολικούς εν συγκρίσει με άπολους διαλύτες.....	124

Σχήμα 8.18. Κυκλικό βολταμμογράφημα του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$, σε DMF και ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s.	125
Σχήμα 8.19. Κυκλικό βολταμμογράφημα του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$, σε DMF και ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s.	125
Σχήμα 8.20. Το ORTEP διάγραμμα του συμπλόκου <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$	127
Σχήμα 8.21. Πλάγια άποψη του συμπλόκου <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$, όπου διακρίνεται η επιπεδότητα του pq υποκαταστάτη και η διεδρη γωνία του αξονικού ως προς το ισημερινό επίπεδο.	128
Σχήμα 8.22. Πορεία σύνθεσης του τετρα-ρηνικού pq πορφυρινικού συμπλόκου ($\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$).	131
Σχήμα 8.23. IR φάσμα του πορφυρινικού συμπλόκου $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ σε δισκίο KBr.	133
Σχήμα 8.24. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ του πορφυρινικού συμπλόκου $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ σε Acetone- d_6	134
Σχήμα 8.25. $^1\text{H-}^1\text{H COSY NMR}$ του πορφυρινικού συμπλόκου $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ σε Acetone- d_6	134
Σχήμα 8.26. UV-Vis φάσματα του πορφυρινικού συμπλόκου $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ (5 μM) σε διαλύτες CH_2Cl_2 , MeOH και acetone. Στο ένθετο φαίνονται οι Q band της πορφυρίνης σε μεγέθυνση.	136
Σχήμα 8.27. Φάσμα εκπομπής της H_2TPyP (κόκκινη γραμμή) και του $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ (μαύρη γραμμή). Τα φάσματα ελήφθησαν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες, σε CH_2Cl_2 και μήκος κύματος διέγερσης $\lambda_{\text{ex}} = 415 \text{ nm}$. Η συγκέντρωση των δύο παραγώγων ήταν 0.1 μM	137
Σχήμα 8.28. Φάσματα διέγερσης (μαύρη γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) του συμπλόκου $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ (0.1 μM) σε διαλύτες CH_2Cl_2 (πάνω) και MeOH (κάτω).	139
Σχήμα 8.29. Πορεία σύνθεσης του χλωρο-Ga(III) πορφυρινάτο συμπλόκου $(\text{TPyP})\text{GaCl}$	140
Σχήμα 8.30. Το IR φάσμα της μεταλλοπορφυρίνης $(\text{TPyP})\text{GaCl}$ σε δισκίο KBr.	141
Σχήμα 8.31. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ της μεταλλοπορφυρίνης $(\text{TPyP})\text{GaCl}$ σε MeOD- d_4 (πάνω) και DMSO- d_6 (κάτω).	143
Σχήμα 8.32. $^1\text{H-}^1\text{H COSY NMR}$ της μεταλλοπορφυρίνης $(\text{TPyP})\text{GaCl}$ σε DMSO- d_6	144
Σχήμα 8.33. Φάσμα μάζας της μεταλλοπορφυρίνης $(\text{TPyP})\text{GaCl}$, μετά από θετικό ιονισμό.	145
Σχήμα 8.34. Φάσμα μάζας της μεταλλοπορφυρίνης $(\text{TPyP})\text{GaCl}$, μετά από αρνητικό ιονισμό.	145

Σχήμα 8.35. Φάσματα UV-Vis της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl (5 μ M) σε MeOH (μαύρη γραμμή) και DMSO (κόκκινη γραμμή). Στο ένθετο φαίνονται οι Q bands σε μεγέθυνση.....	147
Σχήμα 8.36. Φάσμα διέγερσης (μαύρη γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl (1 μ M) σε διαλύτη MeOH.....	148
Σχήμα 9.1. Δομή του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}[\text{dppz-3,6-(COOEt)}_2]$ και η πλάγια άποψη της κρυσταλλικής δομής. Διακρίνεται η επιπεδότητα του υποκαταστάτη και η κλίση του αξονικού ως προς το ισημερινό επίπεδο.	149
Σχήμα 9.2. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ με το DNA.	151
Σχήμα 9.3. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T.-DNA με το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$	153
Σχήμα 9.4. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ (10 μ M) με αυξανόμενη συγκέντρωση CT-DNA (5-180 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $\text{pH}=7.0$	154
Σχήμα 9.5. Καμπύλη μεταβολής του λόγου $10^8 \cdot [\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ συναρτήσει της συγκέντρωσης $[\text{DNA}] \cdot 10^5$ της τιτλοδότησης του $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ με DNA.	155
Σχήμα 9.6. Φάσματα εκπομπής του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ (15 μ M, $\lambda_{\text{ex}}=350$ nm) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε διάφορες συγκεντρώσεις DNA. Το βέλος δείχνει την αύξηση της έντασης αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA.	156
Σχήμα 9.7. Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ στο σχετικό ιξώδες του CT-DNA (15 μ M).	158
Σχήμα 9.8. CV του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία CT-DNA (κόκκινη γραμμή).	160
Σχήμα 9.9. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (100 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, $\text{pH} = 7.2$ και $\lambda_{\text{ir}} > 335$ nm. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA+200 μ M συμπλόκου στο σκοτάδι, Lane 3-6: DNA+σύμπλοκο σε 10, 50, 100, 200 μ M, αντίστοιχα, μετά από ακτινοβολήση.	161
Σχήμα 9.10. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ με το DNA.	163
Πίνακας 9.2. Δεδομένα θερμικής μετουσίωσης και κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ με το DNA.	164
Σχήμα 9.11. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T.-DNA με το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$	165

Σχήμα 9.12. Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων του συμπλόκου Re(phendione)Cl στο σχετικό ιξώδες του CT-DNA (100 μM).	166
Σχήμα 9.13. CV του συμπλόκου Re(phendione)Cl απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία CT-DNA (κόκκινη γραμμή).	167
Σχήμα 9.14. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης του συμπλόκου Re(phendione)Cl (20 μM) με αυξανόμενη συγκέντρωση CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Το ένθετο δείχνει τη γραφική παράσταση $-10^8 * [DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs. $[DNA] * 10^5$ και τη γραμμική προσαρμογή για την τιτλοδότηση απορρόφησης.	168
Σχήμα 9.15. Τιτλοδότηση εκπομπής του συμπλόκου Re(phendione)Cl με DNA. Οι εντάσεις I (παρουσία DNA) και I ₀ (απουσία DNA) αφορούν την κορυφή στα 442 nm... 168	168
Σχήμα 9.16. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (150 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου Re(phendione)Cl σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και $\lambda_{ir} > 335$ nm. Lane 1: DNA control, Lane 2-4: DNA+σύμπλοκο σε 10, 50, 100 μM, αντίστοιχα, παρουσία O ₂ , Lane 5: DNA+100 μM συμπλόκου στο σκοτάδι, Lane 6: DNA+100 μM συμπλόκου+DMSO (0.9 M), Lane 7: DNA+100 μM συμπλόκου υπό αργό.	169
Σχήμα 9.17. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων Repq-MeCN (αριστερά) και Repq-py (δεξιά) με το DNA.....	172
Σχήμα 9.18. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T.-DNA με τα σύμπλοκα Repq-MeCN (πάνω) και Repq-py (κάτω).	174
Σχήμα 9.19. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης του συμπλόκου Repq-MeCN (30 μM) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Το ένθετο δείχνει τη γραφική παράσταση $-10^8 * [DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA] * 10^5$ και τη γραμμική προσαρμογή για την τιτλοδότηση απορρόφησης.	175
Σχήμα 9.20. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης του συμπλόκου Repq-py (20 μM) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Το ένθετο δείχνει τη γραφική παράσταση $-10^8 * [DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA] * 10^5$ και τη γραμμική προσαρμογή για την τιτλοδότηση απορρόφησης.	176
Σχήμα 9.21. Καμπύλη δέσμευσης τιτλοδότησης UV-Vis των συμπλόκων Repq-MeCN (κόκκινη γραμμή) και Repq-py (μαύρη γραμμή) που παριστάνει τον κορεσμό δέσμευσης.	177
Σχήμα 9.22. Τιτλοδότηση εκπομπής των συμπλόκων Repq-MeCN (▲) και Repq-py (■) με το DNA. Οι εντάσεις I (παρουσία DNA) και I ₀ (απουσία DNA) αφορούν την κορυφή 655 και 660 nm, αντίστοιχα.....	177

Σχήμα 9.23. Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων των συμπλόκων Repq-MeCN (κόκκινη γραμμή) και Repq-py (μαύρη γραμμή) στο σχετικό ιξώδες του DNA.	178
Σχήμα 9.24. CV του συμπλόκου Repq-MeCN απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία (κόκκινη γραμμή) DNA.	179
Σχήμα 9.25. CV του συμπλόκου Repq-py απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία (κόκκινη γραμμή) DNA.....	180
Σχήμα 9.26. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (100 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου Repq-MeCN σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και $\lambda_{ir} > 335$ nm. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA+150 μ M συμπλόκου στο σκοτάδι, Lane 3-6: DNA+σύμπλοκο σε 20, 50, 100, 150 μ M, αντίστοιχα.	181
Σχήμα 9.27. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (100 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου Repq-py σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και $\lambda_{ir} > 335$ nm. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA+150 μ M συμπλόκου στο σκοτάδι, Lane 3-6: DNA+σύμπλοκο σε 20, 50, 100, 150 μ M, αντίστοιχα.	182
Σχήμα 9.28. Φωτο-διάσπαση του pBR322 DNA από 150 μ M του συμπλόκου Repq-MeCN παρουσία διαφόρων αναστολέων. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA επωασμένο με 150 μ M συμπλόκου, Lane 3: DNA επωασμένο με συμπλόκο υπό Ar, Lane 4: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 4 mM NaN ₃ , Lane 5: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 500 mM DMSO.	183
Σχήμα 9.29. Φωτο-διάσπαση του pBR322 DNA από 150 μ M του συμπλόκου Repq-py παρουσία διαφόρων αναστολέων. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA επωασμένο με 150 μ M συμπλόκου, Lane 3: DNA επωασμένο με συμπλόκο υπό Ar, Lane 4: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 4 mM NaN ₃ , Lane 5: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 500 mM DMSO.	183
Σχήμα 9.30. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re με το DNA.....	186
Σχήμα 9.31. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T.-DNA με το σύμπλοκο H ₂ TPyP-4Re.....	187
Σχήμα 9.32. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re (5 μ M) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Το ένθετο δείχνει τη γραφική παράσταση $-10^{10} * [DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA] * 10^6$ και τη γραμμική προσαρμογή για την τιτλοδότηση απορρόφησης.....	189
Σχήμα 9.33. Καμπύλη δέσμευσης τιτλοδότησης UV-Vis του συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re, που παριστάνει τον κορεσμό δέσμευσης.	190

Σχήμα 9.34. Αλλαγές φασμάτων εκπομπής του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re (5 μM) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA. Το ένθετο δείχνει την καμπύλη κορεσμού.	191
Σχήμα 9.35. Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων του συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re στο σχετικό ιξώδες του DNA.	191
Σχήμα 9.36. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (100 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και λ _{ir} >335 nm. Lane 1: DNA control, Lane 2-5: DNA+σύμπλοκο σε 10, 15, 20, 50 μM, αντίστοιχα.	192
Σχήμα 9.37. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl με το DNA.	195
Σχήμα 9.38. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T.-DNA με την μεταλλοπορφυρίνη (TPyP)GaCl. Τα βέλη δείχνουν τη σταδιακή μετατόπιση του φάσματος.	196
Σχήμα 9.39. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl (5 μM) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Το ένθετο δείχνει τη γραφική παράσταση $-10^{10} * [DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f) \text{ vs } [DNA] * 10^6$ και τη γραμμική προσαρμογή για την τιτλοδότηση απορρόφησης.	198
Σχήμα 9.40. Καμπύλη δέσμευσης τιτλοδότησης UV-Vis της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl, που παριστάνει τον κορεσμό δέσμευσης.	199
Σχήμα 9.41. Αλλαγές φασμάτων εκπομπής της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl (5 μM) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA.	199
Σχήμα 9.42. Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl στο σχετικό ιξώδες του DNA.	200
Σχήμα 9.43. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (100 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και λ _{ir} >335 nm. Lane 1: DNA control, Lane 2-5: DNA+σύμπλοκο σε 2, 5, 10, 20 μM, αντίστοιχα, Lane 6: DNA+20 μM συμπλόκου στο σκοτάδι.	201
Σχήμα 9.44. Φωτο-διάσπαση του pBR322 DNA από 20 μM της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl παρουσία διαφόρων αναστολέων. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA επωασμένο με 20 μM συμπλόκου, Lane 3: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 500 mM DMSO, Lane 4: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 4 mM NaN ₃	202
Σχήμα 10.1. Καμπύλες δόσης-απόκρισης του cisplatin έναντι των κυτταρικών σειρών T98G (μαύρο χρώμα), PC3 (κόκκινο χρώμα) και MCF-7 (μπλε χρώμα).	206

Σχήμα 10.2. Καμπύλες δόσης-απόκρισης των υποκαταστάτων phendione (αριστερά) και dppz (δεξιά) έναντι των κυτταρικών σειρών T98G, PC3 και MCF-7.	206
Σχήμα 10.3. Επίδραση της συγκέντρωσης 10 μM (πάνω) και 50 μM (κάτω) των παραγώγων $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$, $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ και dppz-ester στην % οπτική πυκνότητα MCF-7, PC3 και T98G. Ο αριθμός μέσα στις μπάρες δείχνει το % ποσοστό των ζωντανών κυττάρων παρουσία της υπό μελέτη ένωσης.	207
Σχήμα 10.4. Καμπύλες δόσης-απόκρισης του $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$, έναντι των T98G, PC3 και MCF-7 κυττάρων.	208
Σχήμα 10.5 Καμπύλες δόσης-απόκρισης του pq υποκαταστάτη, έναντι των T98G, PC3 και MCF-7 κυττάρων.	210
Σχήμα 10.6. Καμπύλες δόσης-απόκρισης του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})\text{Cl}$ (Repq-Cl) έναντι των κυτταρικών σειρών T98G, PC3 και MCF-7.	211
Σχήμα 10.7. Καμπύλες δόσης-απόκρισης των κατιοντικών συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]^{+}$ (Repq-MeCN) (αριστερά) και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]^{+}$ (Repq-py) (δεξιά) έναντι των κυτταρικών σειρών T98G, PC3 και MCF-7.	211
Σχήμα 10.8. Καμπύλες δόσης-απόκρισης της μεταλλοπορφυρίνης $(\text{TPyP})\text{GaCl}$ έναντι των κυτταρικών σειρών T98G, PC3 και MCF-7.	212
Σχήμα 10.9. Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού PC3 κυττάρων επωασμένων για 24h (Α) απουσία της μεταλλοπορφυρίνης και (Β) παρουσία 25 μM της μεταλλοπορφυρίνης $(\text{TPyP})\text{GaCl}$	214
Σχήμα 11.1. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT (\blacklozenge) και lyso-PAF-AT (\blacksquare).	218
Σχήμα 11.2. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA ₂	218
Σχήμα 11.3. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT (\blacklozenge) και lyso-PAF-AT (\blacksquare).	219
Σχήμα 11.4. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA ₂	219
Σχήμα 11.5. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT.	220
Σχήμα 11.6. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT.	220
Σχήμα 11.7. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα Lp-PLA ₂	220

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1. Κβαντικές αποδόσεις μονήρους οξυγόνου για πορφυρίνες, σε υδατικά διαλύματα [96].	54
Πίνακας 4.2. Χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης της $\text{Cu}^{\text{II}}\text{TMPyP}$ με DNA.	58
Πίνακας 4.3. Πορφυρινικά σύμπλοκα με πιθανή εφαρμογή στη PDT. Η αλληλεπίδραση με το DNA και οι κυτταρικές μελέτες.	64
Πίνακας 7.1. Χημικές μετατοπίσεις του pq σε CDCl_3 .	95
Πίνακας 7.2. Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) της phendione σε DMSO-d_6 .	98
Πίνακας 7.3. Δονήσεις υπερύθρου (σε cm^{-1}) της H_2TPyP και η απόδοση τους σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [176].	100
Πίνακας 7.4. Χημικές μετατοπίσεις (ppm) της H_2TPyP σε CDCl_3 και DCl . Σε παρένθεση φαίνεται ο αριθμός των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.	101
Πίνακας 7.5. Δεδομένα φασμάτων απορρόφησης ορατού της H_2TPyP και η απόδοση τους, σε διαλύτες CHCl_3 , CH_2Cl_2 , και HCl 1M. Σε παρένθεση φαίνονται οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας, ϵ σε $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.	103
Πίνακας 8.1. Χημικές μετατοπίσεις του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ και του ελεύθερου υποκαταστάτη σε διαλύτες CDCl_3 , DMSO-d_6 , CD_3CN .	106
Πίνακας 8.2. Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})\text{Cl}$ και του ελεύθερου υποκαταστάτη pq σε διαλύτη CDCl_3 . Η αρίθμηση των πρωτονίων φαίνεται στο Σχήμα 8.8.	112
Πίνακας 8.3. Χαρακτηριστικές συχνότητες δόνησης των τριών διαφορετικών pq συμπλόκων. Για την δόνηση τάσης $\nu(\text{CO})$ εμφανίζεται και η συμμετρία τους.	116
Πίνακας 8.4. Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των συμπλόκων Repq-MeCN και Repq-py . Σε παρένθεση φαίνεται ο αριθμός των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.	119
Πίνακας 8.5. Δεδομένα φασμάτων απορρόφησης των κατιοντικών κινιξαλινικών συμπλόκων και του πρόδρομου χλώρο-συμπλόκου.	120
Πίνακας 8.6. Μέγιστα μήκη κύματος φασμάτων εκπομπής, και η κβαντική απόδοση φθορισμού, των κατιοντικών κινιξαλινικών συμπλόκων του $\text{Re}(\text{I})$. Η διέγερση έγινε στην MLCT κορυφή του εκάστοτε συμπλόκου.	123
Πίνακας 8.7. Ηλεκτροχημικά δεδομένα για τα σύμπλοκα $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$ σε DMF.	126
Πίνακας 8.8. Κρυσταλλικά δεδομένα για το σύμπλοκο $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$.	129
Πίνακας 8.9. Επιλεγμένα μήκη δεσμού (\AA) και γωνίες δεσμού (deg) για το σύμπλοκο $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$.	130

Πίνακας 8.10. Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) του πορφυρινικού συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re. Σε παρένθεση φαίνεται ο αριθμός των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή. Η αρίθμηση των πρωτονίων είναι ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε παραπάνω.....	135
Πίνακας 8.11. UV-Vis φασματοσκοπικά δεδομένα της πορφυρίνης H ₂ TPyP, και του αντίστοιχου πορφυρινικού παραγώγου το Re(I) (H ₂ TPyP-4Re) και η απόδοση τους, σε διαλύτες CH ₂ Cl ₂ , MeOH και acetone. Σε παρένθεση φαίνονται οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας, ε σε M ⁻¹ cm ⁻¹	136
Πίνακας 8.12. Δεδομένα φασμάτων εκπομπής της ελεύθερης πορφυρίνης (H ₂ TPyP), του μονομερούς συμπλόκου (Rerq-py), και του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού παραγώγου H ₂ TPyP-4Re.....	139
Πίνακας 8.13. Χαρακτηριστικές δονήσεις (σε cm ⁻¹) της ελεύθερης πορφυρίνης (H ₂ TPyP) και της Ga(III) μεταλλοπορφυρίνης.....	142
Πίνακας 8.14. Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl σε MeOD-d ₄ και DMSO-d ₆ . Σε παρένθεση φαίνεται ο αριθμός των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.....	144
Πίνακας 8.15. Δεδομένα φάσματος μάζας της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl. Σε παρένθεση φαίνεται η % σχετική αφθονία.....	146
Πίνακας 8.16. UV-Vis φασματοσκοπικά δεδομένα της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl και η απόδοση τους, σε διαλύτες MeOD και DMSO. Σε παρένθεση φαίνονται οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας, ε σε M ⁻¹ cm ⁻¹	147
Πίνακας 9.1. Δεδομένα θερμικής μετουσίωσης και κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου Re(dppz-ester)Cl με το DNA.....	152
Πίνακας 9.2. Δεδομένα θερμικής μετουσίωσης και κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου Re(phendione)Cl με το DNA.....	164
Πίνακας 9.3. Δεδομένα πειραμάτων θερμικής μετουσίωσης (T _m) της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων Rerq-MeCN και Rerq-py με το DNA.....	172
Πίνακας 9.4. Δεδομένα πειραμάτων κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων Rerq-MeCN και Rerq-py με το DNA.....	173
Πίνακας 9.5. Ανοδικά και καθοδικά δυναμικά (σε mV) των συμπλόκων και η μετατόπιση των δυναμικών απουσία και παρουσία DNA.....	180
Σχήμα 9.30. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re με το DNA.....	186
Πίνακας 9.6. Δεδομένα θερμικής μετουσίωσης και κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του πορφυρινικού συμπλόκου H ₂ TPyP-4Re με το DNA.....	186

Πίνακας 9.7. Δεδομένα θερμικής μετουσίωσης και κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl με το DNA.	195
Πίνακας 10.1. Κυττατοξικές μελέτες των δοκιμασθέντων ενώσεων έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών T98G, PC3 και MCF-7. Οι τιμές IC ₅₀ (σε μM) παριστάνονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.	205
Πίνακας 11.1. Αναστολή του PAF σε WRPs για τις υπό μελέτη ενώσεις. Οι τιμές IC ₅₀ (μM) παριστάνονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.	216

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ

Η Ανόργανη Χημεία προσφέρει ένα ευρύ πεδίο εφαρμογής στο σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών παραγόντων, εξαιτίας της χημείας ένταξης και των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων του μεταλλικού κέντρου. Στην πραγματικότητα, μεγάλο μέρος της έρευνας στον τομέα αυτό έχει ξεκινήσει από την ανακάλυψη της αντικαρκινικής δράσης του cisplatin, και στην προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού δράσης του. Έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναπτυχθεί πλήθος συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης που έχουν ως στόχο το DNA, και μπορούν να δράσουν ως πιθανοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Από την άλλη πλευρά, ενώσεις του Ga(III) έχουν δείξει σημαντική αντικαρκινική δραστηριότητα, μέσω ενός μηχανισμού αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου που σχετίζεται με τη σύνθεση του DNA.

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι πολλές φορές η διεγερμένη κατάσταση των μεταλλικών συμπλόκων είναι αυτή που προκαλεί διάσπαση του DNA (φωτοδυναμική θεραπεία). Σχετικά πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την εμπλοκή του PAF με τον καρκίνο και τις παρενέργειες του αντικαρκινικού συμπλόκου cisplatin.

Τα τρικαρβόνυλο σύμπλοκα του Re(I) είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα στην προσπάθεια αυτή λόγω των μοναδικών φωτοχημικών και φωτοφυσικών ιδιοτήτων τους. Αλλάζοντας είτε τον διμινικό ή τον αξονικό υποκαταστάτη μπορούν να ελεγχθούν όχι μόνο οι φωτοφυσικές ιδιότητες τους αλλά και το είδος της αλληλεπίδρασης με το DNA. Συγκεκριμένα, μπορούν να δράσουν όχι μόνο ως μοριακοί ανιχνευτές και μοριακοί διακόπτες φωτός για το DNA, αλλά και να προκαλέσουν φωτο-διάσπασή του μετά από ακτινοβολήση. Το τελευταίο τα καθιστά πολύ ενδιαφέροντα στη χρήση τους ως φωτοευαίσθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Σε αυτό το πεδίο έρευνας εξαιρετικά ενδιαφέροντα μόρια είναι οι πορφυρίνες, λόγω της απορρόφησης τους στην περιοχή του κόκκινου και την ικανότητα τους να παράγουν δραστικά είδη οξυγόνου.

Στόχος λοιπόν, της παρούσας διατριβής είναι ο σχεδιασμός νέων συμπλόκων ενώσεων, που να στοχοποιούν το DNA και να μπορούν να δράσουν ως μοριακοί ανιχνευτές, πιθανοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, αλλά και ως φωτοευαίσθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα εργασία αφορά στη σύνθεση και χαρακτηρισμό νέων συμπλόκων ενώσεων του Re και του Ga και στην πλήρη μελέτη αλληλεπίδρασης τους με το DNA. Μελετάται επίσης η ικανότητα τους στη φωτο-επαγόμενη διάσπαση του νουκλεϊκού οξέος, ενώ γίνεται και μια προσπάθεια εύρεσης του

μηχανισμού οξειδωσης. Η *in vitro* αντικαρκινική τους δράση μελετάται έναντι τριών καρκινικών σειρών ανθρώπινης προέλευσης. Επιπλέον, είναι η πρώτη φορά που επιχειρείται η μελέτη της αντι-φλεγμονώδους δράσης συμπλόκων του Re(I), σε μια προσπάθεια σύνθεσης νέων ενώσεων με ταυτόχρονη αντι-καρκινική και αντι-PAF δράση, αφού στη βιβλιογραφία αποδεικνύεται η προστατευτική δράση των αναστολέων του PAF στις παρενέργειες των αντικαρκινικών παραγόντων. Έτσι λοιπόν, σύμπλοκα του Re(I) δοκιμάζονται ως προς τη δράση τους έναντι της συσσώρευσης του PAF και τη συμμετοχή τους στη μεταβολική του διαδικασία.

Οι υποκαταστάτες rhendione και dppz-ester επιλέχθηκαν λόγω της επιπεδότητας τους, αλλά και της ισχυρής κυτταροτοξικής δράσης των φαινανθρολινικών παραγώγων. Από την άλλη πλευρά ο κινολινοξυλικός υποκαταστάτης (pq) ήταν μια πρόκληση για εμάς, καθώς δεν έχει μελετηθεί καθόλου η βιολογική του δράση. Με τις παραπάνω διμίνες μελετήθηκε σε μοριακό και βιολογικό επίπεδο μια σειρά νέων συμπλόκων του τύπου $fac-[Re(CO)_3(a-diimine)L]^{0/+}$. Από την άλλη πλευρά, επιχειρήθηκε να συνδυαστούν οι εξαιρετικές φωτοφυσικές ιδιότητες των πορφυρινών με το βιολογικό ενδιαφέρον του γαλλίου, κάτι που τελικά οδήγησε στη σύνθεση και μελέτη ενός νέου γαλλιο-πορφυρινάτο συμπλόκου.

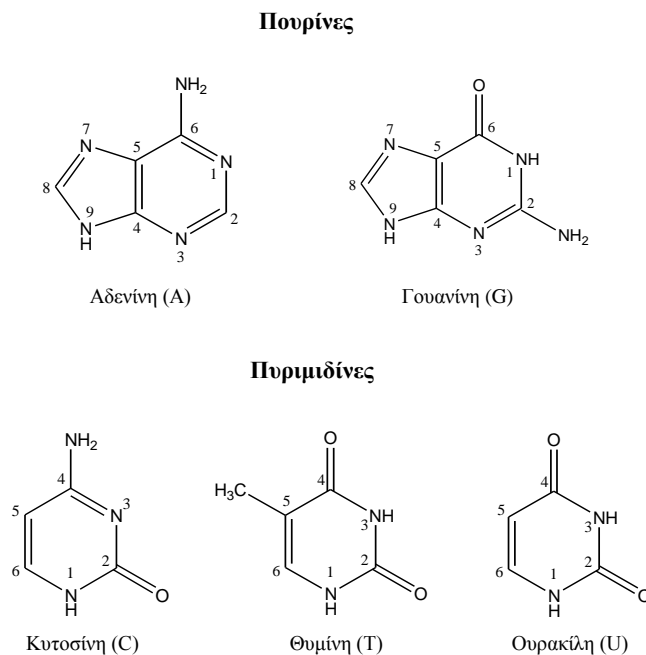
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA

1.1. Δομικά συστατικά του DNA [1,2]

Τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) αποθηκεύουν, εκφράζουν και μεταφέρουν από τη μια γενιά στην επόμενη τις πληροφορίες, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ζωής. Τα νουκλεϊκά οξέα είναι βιοπολυμερή που αποτελούνται από νουκλεοτίδια. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μια αζωτούχο βάση, ένα σάκχαρο και από μόρια φωσφορικού οξέος.

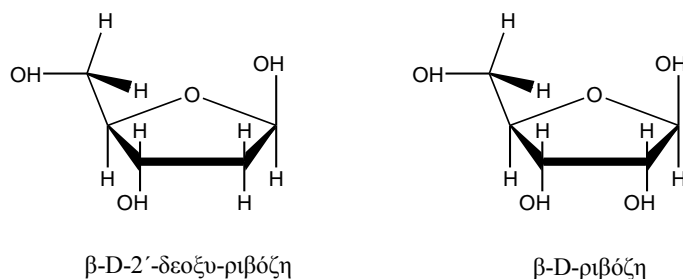
Οι αζωτούχες βάσεις μπορεί να είναι είτε πουρίνες είτε πυριμιδίνες (Σχήμα 1.1). Οι πουρίνες είναι δύο, η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) και οι πυριμιδίνες είναι τρεις, η κυτοσίνη (C), η θυμίνη (T) και η ουρακίλη (U). Η θυμίνη βρίσκεται μόνο στο DNA και η ουρακίλη μόνο στο RNA. Εκτός από αυτές, πιο σπάνια συναντώνται και άλλες βάσεις, όπως για παράδειγμα η 5-μεθυλοκυτοσίνη (DNA μερικών φυτών και βακτηρίων), 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (DNA βακτηρίων), η 2-θειουρακίλη (βακτηριακό tRNA).



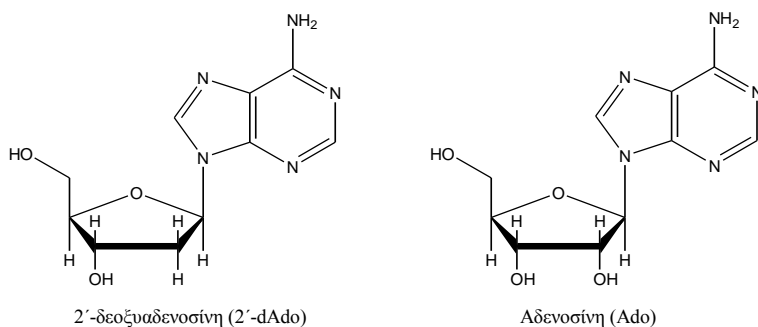
Σχήμα 1.1. Κύριες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων.

Το κύριο σακχαρικό συστατικό των νουκλεϊκών οξέων είναι η D-ριβόζη στο RNA και η 2'-δεοξυ-D-ριβόζη στο DNA. Και τα δύο αυτά σάκχαρα σε μια νουκλεοτιδική αλυσίδα βρίσκονται υπό τη μορφή της β-D-φουρανόζης (Σχήμα 1.2).

Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μία βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο. Τα νουκλεοσίδια, (αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη, ουριδίνη για το RNA και τα αντίστοιχα δεοξυ-παράγωγα για το DNA) σχηματίζονται με γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ του αζώτου 9 (N9) των πουρινών ή του N1 των πυριμιδινών με τον άνθρακα 1 (C1) του σακχάρου (D-ριβόζη, 2'-δεοξυ-D-ριβόζη). Η διαμόρφωση αυτού του N-γλυκοζιτικού δεσμού είναι μορφής β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.2. Τα σάκχαρα των νουκλεϊκών οξέων.

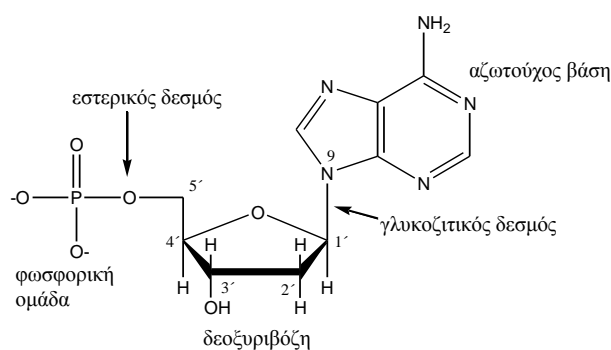


Σχήμα 1.3. Παραδείγματα νουκλεοσιδίων, η 2'-δεοξυαδενοσίνη (2'-dAdo) και η αδενοσίνη (Ado).

Τα νουκλεοτίδια είναι φωσφορυλιωμένοι νουκλεοζίτες (φωσφορικοί μονοεστέρες των νουκλεοζιτών) στη θέση 3' ή 5' (ή και 2' στα ριβονουκλεοσίδια). Ονομάζονται ως οξέα από το όνομα τις αντίστοιχης βάσης, δηλώνοντας σε παρένθεση τη θέση φωσφορυλίωσης (π.χ. δεοξυαδενυλικό (5') οξύ), ή ως υπακατεστημένο νουκλεοσίδιο (π.χ. 5'-φωσφορική δεοξυαδενοσίνη) (Σχήμα 1.4). Περαιτέρω φωσφορυλίωση οδηγεί σε δι- και τριφωσφορικούς εστέρες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πολύ σημαντικό νουκλεοτίδιο τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), που περιέχει την πουρινική βάση, αδερίνη.

Το ATP είναι ο φορέας ελεύθερης ενέργειας στα βιολογικά συστήματα. Η 5'-τριφωσφορική δεοξαδενοσίνη (dATP) είναι ένα ενεργοποιημένο πρόδρομο μόριο στη σύνθεση του DNA. Το σύμβολο d στο dATP δηλώνει ότι το σάκχαρο είναι δεοξυριβόζη.

Σε ένα νουκλεοτίδιο, τα άτομα της αζωτούχου βάσης αριθμούνται ως 1,2,3 κτλ. και τα μόρια των σακχάρων, είτε είναι δεοξυριβόζη (για το DNA) είτε ριβόζη (για το RNA), αριθμούνται 1',2',3' κτλ. Ο C1' ενώνεται με το N9 μιας πουρίνης ή με το N1 μιας πυριμιδίνης. Τα άτομα της σακχαρικής συνιστώσας των νουκλεοτιδίων είναι αυτά που αποτελούν τη σύνδεση μεταξύ της βάσης και της φωσφορικής ομάδας. Η φωσφορική ομάδα ενώνεται με τη δεοξυριβόζη με ένα εστερικό δεσμό μεταξύ μιας αρνητικά φορτισμένης οξυγον-ομάδας και του C5' της δεοξυριβόζης (Σχήμα 1.4).

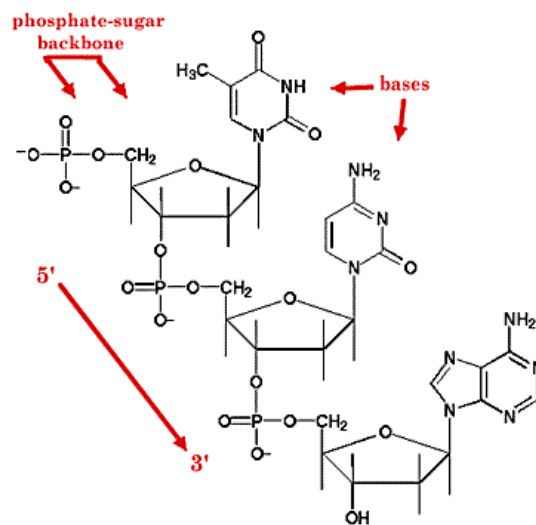


Σχήμα 1.4. Το νουκλεοτίδιο, 5'-φωσφορική δεοξαδενοσίνη, και οι δεσμοί μεταξύ της φωσφορικής ομάδας, του σακχάρου και της αζωτούχου βάσης.

1.2. Δομή και διαμόρφωση του DNA. Το μοντέλο της διπλής έλικας [1,2]

Τα νουκλεϊνικά οξέα είναι πολυμερή αποτελούμενα από νουκλεοτίδια συνδεδεμένα μέσω φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 3'-υδροξυλομάδας του ενός νουκλεοτιδίου και της 5'-υδροξυλομάδας του γειτονικού νουκλεοτιδίου (Σχήμα 1.5). Κάθε σάκχαρο, λοιπόν, έχει δύο εστερικούς δεσμούς στα άτομα 5'Ο και 3'Ο. Η αλυσίδα του DNA περιγράφεται έχοντας μια κατεύθυνση, που ορίζεται ως το σύνολο συνεχόμενων νουκλεοτιδίων αρχίζοντας στο 5'Ο και πηγαίνοντας στο 3'Ο (κατεύθυνση 5'→3'). Δηλαδή, το πρώτο νουκλεοτίδιο έχει ελεύθερη την 5' θέση (-OH ή φωσφορική ομάδα), ενώ το τελευταίο έχει ελεύθερη την 3' θέση. Αυτό, αποτελεί και τον κορμό (backbone) του DNA, ο οποίος δεν αλλάζει κατά μήκος του μορίου. Το μεταβλητό τμήμα είναι μία αλληλουχία τεσσάρων βάσεων (A, G, C, T) (πρωτοταγής δομή). Εν συντομία λοιπόν, το πολυνουκλεοτίδιο του Σχήματος 1.5 γράφεται pTrCpA ή TCA, όπου το αριστερό άκρο ονομάζεται 5' άκρο και το δεξί 3' άκρο.

Όλες οι κοινές βάσεις του DNA είναι αφόρτιστες σε ουδέτερο pH, σε αντίθεση με το φωσφορικό διεστέρα που είναι αρνητικά φορτισμένος.



Σχήμα 1.5. Δομή ενός πολυνουκλεοτιδικού τμήματος DNA.

Ανάλογα με την ιδιαίτερη βιολογική τους λειτουργία, είναι δυνατόν τα δύο είδη των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) να υπάρχουν, είτε στη μορφή ενός κλώνου ή δύο κλώνων μαζί, σχηματίζοντας δεξιόστροφη ελικοειδή δομή. Οι δύο κλώνοι (αλυσίδες) στην έλικα αυτή είναι τοποθετημένοι αντιπαράλληλα έτσι ώστε οι απέναντι, συμπληρωματικές, βάσεις να βρίσκονται σε αλληλεπίδραση χάρη στους δεσμούς υδρογόνου.

Το 1953 οι J. Watson και F. Crick [3] πρότειναν την τρισδιάστατη δομή του DNA. Αυτό το λαμπρό επίτευγμα είναι το πιο σημαντικό στην ιστορία της βιολογίας, γιατί οδήγησε στην κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων σε μοριακό επίπεδο. Οι Watson και Crick ανέλυσαν φωτογραφίες περίθλασης ακτίνων-X από ισχυρά εφυδατωμένες ίνες DNA των R. Franklin και M. Wilkins, και πρότειναν το **μοντέλο της διπλής έλικας του DNA**, τα κυριότερα χαρακτηριστικά του οποίου είναι:

- ο Το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες με αντίθετες κατευθύνσεις, που περιστρέφονται με δεξιόστροφη φορά γύρω από έναν κοινό άξονα σχηματίζοντας μία διπλή έλικα. Οι σκελετοί των δύο κλώνων τυλίγονται γύρω από την εσωτερική πλευρά των βάσεων σαν κάγκελα περιστρεφόμενης σκάλας (Σχήμα 1.6).
- ο Οι βάσεις, πουρίνες και πυριμιδίνες, είναι υδρόφοβες και βρίσκονται στο εσωτερικό της έλικας, ενώ τα φωσφορικά και οι μονάδες δεοξυριβόζης βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος της έλικας και είναι εκτεθειμένες σε υδατικό περιβάλλον. Το επίπεδο των

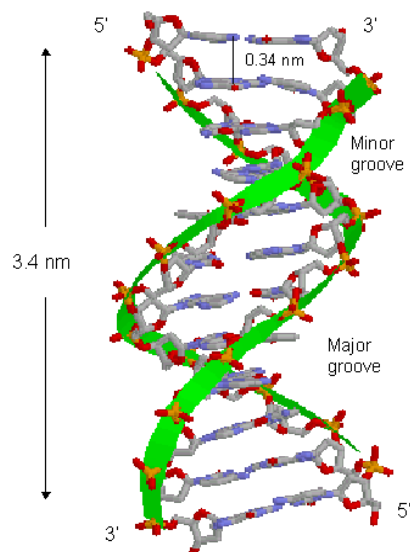
βάσεων είναι σχεδόν κάθετο προς τον άξονα της έλικας, ενώ το επίπεδο των σακχάρων είναι σχεδόν κάθετο σε αυτό των βάσεων.

- Η ακριβής διάμετρος της διπλής έλικας είναι 23.7 Å. Δύο διαδοχικές βάσεις απέχουν η μία από την άλλη 3.4 Å και η μεταξύ τους γωνία στροφής είναι 36°. Επομένως, η έλικα είναι δεξιόστροφη και έχει 10.4 ζεύγη βάσεων ανά στροφή (κατάλοιπα), δηλαδή ανά 34 Å επαναλαμβάνεται η ελικοειδής δομή και η απόσταση αυτή καλείται βήμα της έλικας (Σχήμα 1.6).
- Οι δύο αλυσίδες συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ζευγών βάσεων. Η αδενίνη ζευγαρώνει πάντοτε με τη θυμίνη, με δύο δεσμούς υδρογόνου και η γουανίνη πάντοτε με την κυτοσίνη με τρεις δεσμούς υδρογόνου (Σχήμα 1.7). Οι βάσεις είναι τοποθετημένες, έτσι ώστε να είναι δυνατή η αλληλεπίδραση των π-ηλεκτρονίων τους. Το στοίβαγμα των βάσεων (base stacking) σε κάθε αλυσίδα ενισχύεται από την αντίθετη περιστροφή των δύο βάσεων ενός ζεύγους γύρω από τον άξονα τους. Οι δεσμοί υδρογόνου και το στοίβαγμα των βάσεων σταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή του μορίου.
- Οι δύο αλυσίδες του μορίου DNA είναι συμπληρωματικές και αυτό υποδηλώνει ότι η αλληλουχία της μιας καθορίζει την αλληλουχία της άλλης. Επιπλέον, η αλληλουχία των βάσεων κατά μήκος της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας δεν έχει κανένα περιορισμό. Η ιδιότητα αυτή καθιστά το DNA το καταλληλότερο μόριο για τη διατήρηση και μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας, που πραγματοποιείται χάρη στην ακριβή αλληλουχία των βάσεών του.

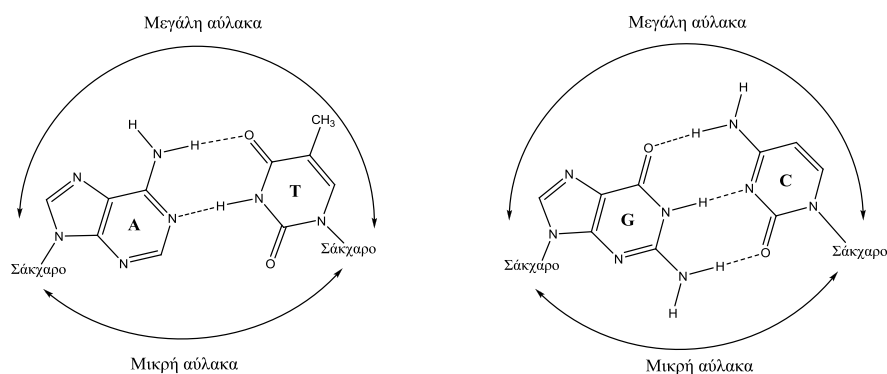
Η δομή που πρότειναν οι Watson και Crick είναι γνωστή ως η έλικα B-DNA και είναι η επικρατέστερη δομή σε φυσιολογικές συνθήκες (υψηλό ποσοστό υδάτωσης ~92% και μέτρια συγκέντρωση ηλεκτρολυτών) [4]. Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της έλικας B-DNA είναι η παρουσία δύο ειδών αυλακών, οι οποίες καλούνται μεγάλη αύλακα (major groove) και μικρή αύλακα (minor groove) (Σχήμα 1.6). Οι αύλακες αυτές προκύπτουν, επειδή οι γλυκοζιτικοί δεσμοί ενός ζεύγους βάσεων δεν βρίσκονται εκ διαμέτρου απέναντι ο ένας στον άλλον.

Η μικρή αύλακα έχει άνοιγμα μικρότερο από 180°, πλάτος 6 Å και βάθος 7.5 Å. Η μικρή αύλακα περιέχει το πυριμιδινικό O2 και το πουρινικό N3 του ζεύγους των βάσεων, ενώ η μεγάλη αύλακα βρίσκεται στην αντίθετη πλευρά του ζεύγους (Σχήμα 1.7). Στη μικρή αύλακα, το N3 της αδενίνης και της γουανίνης, και το O2 της θυμίνης και της κυτοσίνης μπορούν να δράσουν ως δέκτες υδρογόνου (να σχηματίσουν δεσμό υδρογόνου

με το υδρογόνο ενός άλλου μορίου) ενώ η αμινομάδα στον C2 της γουανίνης είναι δότης υδρογόνου.



Σχήμα 1.6. Σκελετικό τμήμα της διπλής έλικας του DNA. Η δομή επαναλαμβάνεται κάθε 3.4 nm (ή 34Å) και αντιστοιχεί σε 10 κατάλοιπα της κάθε αλυσίδας.



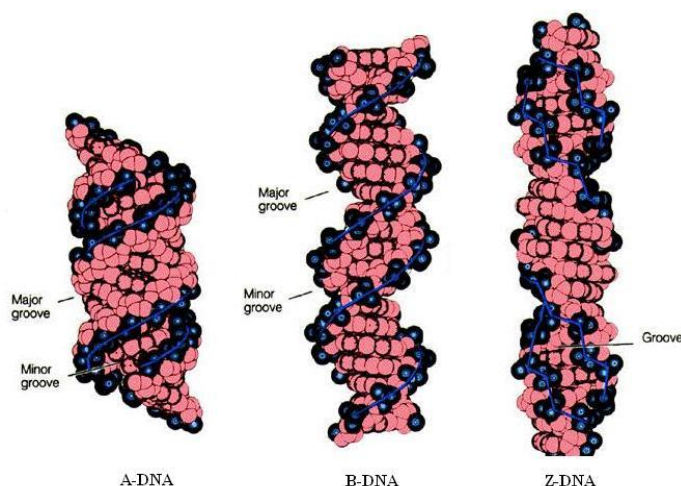
Σχήμα 1.7. Τα ζεύγη βάσεων αδενίνη (A)-θυμίνη (T) (αριστερά) και γουανίνη (G)-κυτοσίνη (C) (δεξιά) του DNA και οι δεσμοί υδρογόνου. Σχηματισμός μεγάλης και μικρής αύλακας.

Αντίστοιχα, η μεγάλη αύλακα έχει πλάτος 12 Å, άνοιγμα μεγαλύτερο από 180° και βάθος 8.5 Å. Στη μεγάλη αύλακα, το N7 της γουανίνης και της αδενίνης είναι αποτελεσματικός δέκτης, όπως επίσης το O4 της θυμίνης και το O6 της γουανίνης. Η αμινομάδα στον C6 της αδενίνης και στον C4 της κυτοσίνης μπορεί να λειτουργήσει ως δότης υδρογόνου. Να σημειωθεί, ότι η μεγάλη αύλακα εμφανίζει πιο ευδιάκριτα χαρακτηριστικά από ότι η μικρή αύλακα. Επίσης, το μεγαλύτερο μέγεθος της μεγάλης

αύλακας την κάνει πιο προσιτή για αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες οι οποίες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του DNA.

Ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων, το DNA μπορεί να λάβει διάφορες διαμορφώσεις κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Σε όλες αυτές τις διαμορφώσεις ισχύουν οι ίδιοι κανόνες για τα ζεύγη βάσεων. Οι μεταβολές δεν επηρεάζουν το περιεχόμενο των πληροφοριών του DNA, μπορούν όμως να επηρεάσουν τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων.

Η πιο κοινή διαμόρφωση και αυτή που ανακάλυψαν οι Watson και Crick, είναι η B-διαμόρφωση του DNA (B-DNA) (Σχήμα 1.8), την οποία λαμβάνει το DNA σε υψηλές τιμές υγρασίας και παρουσία περίσσειας άλατος. Τα χαρακτηριστικά της διαμόρφωσης αυτής περιγράφονται παραπάνω.



Σχήμα 1.8. Οικογένειες διαμορφώσεων του DNA.

Μελέτες με περίθλαση ακτίνων-X αφυδατωμένων ινιδίων του DNA αποκάλυψαν μια διαφορετική μορφή που ονομάζεται A-DNA, η οποία εμφανίζεται όταν η σχετική υγρασία μειώνεται κάτω από περίπου 75% [5]. Το A-DNA είναι μια δεξιόστροφη διπλή έλικα που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλες αλυσίδες συγκρατούμενες μεταξύ τους με ζεύγη βάσεων, σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Η έλικα A-DNA είναι πλατύτερη και κοντότερη από ότι η έλικα B-DNA. Τα ζεύγη βάσεων του A-DNA εμφανίζουν μια κλίση προς τον άξονα της έλικας, σε αντίθεση με το B-DNA που είναι συμμετρικά σε σχέση με τον άξονα της. Έτσι, στο A-DNA η μεγάλη αύλακα γίνεται στενότερη και βαθύτερη, ενώ η μικρή αύλακα γίνεται φαρδύτερη και πιο ρηχή (Σχήμα 1.8).

Μια άλλη διαμόρφωση του DNA που εμφανίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις κατιόντων είναι το Z-DNA. Η διπλή έλικα του Z-DNA είναι αριστερόστροφη, σε αντίθεση με τις έλικες του A- και B-DNA. Επιπλέον, τα φωσφορικά του σκελετού του μορίου έχουν διάταξη ζιγκ-ζαγκ. Μία τρίτη διαφορά είναι ότι το Z-DNA περιέχει μια μόνο βαθιά ελικοειδή αύλακα. Το Z-DNA είναι εφικτό από αλληλουχίες εναλλασσόμενων πυριμιδινών και πουρινών (GC). Στο Z-DNA η πυριμιδίνη είναι αντι- και η πουρίνη (G) είναι συν (Σχήμα 1.8).

Μια άλλη μορφή της διπλής έλικας του DNA είναι η C [6]. Και αυτή η διαμόρφωση είναι δεξιόστροφη και κάθε στροφή της έλικας περιέχει 9.3 ζεύγη βάσεων σύμφωνα με το πρωταρχικό μοντέλο. Παρουσιάζει μία απόκλιση 6° από την κάθετο στον άξονα της έλικας και μία ελαφρά στροφή των βάσεων. Στην πραγματικότητα, η C-διαμόρφωση είναι μία διαφοροποίηση της B μορφής. Διαφοροποιήσεις υπάρχουν και για την A όπως και για τη B μορφή. Έτσι, αυτές αντιπροσωπεύουν περισσότερο δομικές οικογένειες, παρά «μοναδικές εφικτές διαμορφώσεις» της διπλής έλικας.

1.3. Τρόποι δέσμευσης στο DNA [7,8]

Η μεγάλη ποικιλία των δομικών χαρακτηριστικών των νουκλεϊκών οξέων, καθώς και οι διάφορες κατηγορίες χημικών ομάδων (σάκχαρα, φωσφορικές ομάδες, αζωτούχες βάσεις) που υπάρχουν σε αυτά, τους δίνουν τη δυνατότητα να μπορούν να αλληλεπιδρούν με πολλές κατηγορίες μορίων, από πρωτεΐνες μέχρι μικρά οργανικά μόρια. Η δέσμευση των μορίων αυτών με το DNA μπορεί να είναι αντιστρεπτή ή μόνιμη, με την τελευταία περίπτωση να περιλαμβάνει συνήθως το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού. Η αντιστρεπτή δέσμευση περιλαμβάνει μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες είναι ασθενέστερες κατά τουλάχιστον μία τάξη μεγέθους από έναν τυπικό χημικό δεσμό, παρόλα αυτά όμως κυριαρχούν σε πολλές διεργασίες. Η σύμπλεξη με το DNA μπορεί να είναι, είτε εκλεκτική ως προς την εκάστοτε ακολουθία βάσεων (οι αντιδράσεις αυτές γίνονται αποκλειστικά σε ένα νουκλεοτίδιο ή σε πεπερασμένη ομάδα), είτε εντελώς ανεξάρτητη από την αλληλουχία των βάσεων (αυτές οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε οποιοδήποτε σημείο κατά μήκος του βιοπολυμερούς).

1.3.1. Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις διαφόρων ανόργανων ή οργανικών μορίων είναι άκρως σημαντικές, κυρίως, γιατί βοηθούν στη μοριακή αναγνώριση των νουκλεϊκών

οξέων. Τα άτομα των βάσεων και οι ανιοντικές φωσφορικές ομάδες μετέχουν στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, δεσμών Van der Waals, υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, π-π αλληλεπιδράσεων και ετεροπολικών αλληλεπιδράσεων. Σε πρώτη φάση, υπάρχουν τρεις τρόποι αντιστρεπτής δέσμησης με τη διπλή έλικα του DNA: (1) η εξωτερική ηλεκτροστατική δέσμηση (electrostatic binding) με το φωσφορικό σκελετό του DNA, (2) οι αλληλεπιδράσεις με τις αύλακες (groove binding) του DNA, και (3) η παρεμβολή (intercalation) μεταξύ των ζευγών βάσεων.

1.3.1.1. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (electrostatic binding)

Αυτός ο τρόπος συναρμογής είναι κυρίως ηλεκτροστατικής φύσης και περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ θετικά φοτισμένων ομάδων με τις αρνητικά φοτισμένες φωσφορικές ομάδες του ολιγονουκλεοτιδίου. Απαραίτητη προϋπόθεση, λοιπόν, για την εξωτερική συναρμογή είναι η ύπαρξη θετικού φορτίου στην ένωση. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως οι φωσφορικές ομάδες της αλυσίδας αντιδρούν ηλεκτροστατικά με κατιόντα, όπως Na^+ ή Mg^{2+} , με αποτέλεσμα να σταθεροποιούν τη δομή της έλικας του βιοπολυμερούς.

Τέτοιου είδους ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι γενικά ασθενείς κάτω από φυσιολογικές συνθήκες για μονοκατιοντικά μόρια με σχετικά μικρό ποσοστό παρεμβολής ή δέσμησης στις αύλακες. Όμως, τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις συνεισφέρουν σημαντικά στην ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης ισχυρά φοτισμένων μορίων στο DNA, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών. Γενικά, μικρά μόρια τα οποία συνδέονται ισχυρά με το DNA, πάντα περιέχουν φοτισμένες ομάδες στη δομή τους.

1.3.1.2. Δέσμηση στις αύλακες (groove binding)

Ένα μόριο μπορεί να αλληλεπιδράσει με το DNA, είτε μέσω της μεγάλης, είτε μέσω της μικρής αύλακας της Β-διαμόρφωσης του DNA. Συνήθως, τα πρωτεϊνικά μόρια μεγάλου μοριακού βάρους δεσμεύονται στην μεγάλη αύλακα, ενώ τα μικρά οργανικά αρωματικά μόρια με μικρό μοριακό βάρος ($M.B. < 1000$) δεσμεύονται κυρίως στην μικρή αύλακα, που είναι περισσότερο εκτεθειμένη. Ένα πλήθος από φυσικές ουσίες, αλλά και μεταλλικά σύμπλοκα, αλληλεπιδρούν με τον τρόπο αυτό με τη διπλή έλικα, όπως για παράδειγμα τα φάρμακα distamycin, netropsin, anthramycin. Το αντιβιοτικό netropsin, για παράδειγμα, ήταν το πρώτο που αναφέρθηκε ως ένωση που αλληλεπιδρά με το DNA με συναρμογή στην αύλακα και μάλιστα με επιλεκτικότητα σε περιοχές πλούσιες στην ακολουθία AT.

Το μοντέλο συναρμογής στην αύλακα περιλαμβάνει δύο στάδια. Πρώτα λαμβάνει χώρα υδρόφοβη μετακίνηση του υποκαταστάτη από το διάλυμα προς την έλικα και στη συνέχεια αναπτύσσονται μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμοί υδρογόνου με τα ζεύγη βάσεων και δεσμοί Van der Waals με τα τοιχώματα της αύλακας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δέσμευση στην αύλακα επιτρέπει αλλά δεν απαιτεί εκτεταμένες αλλαγές στη διαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA. Για παράδειγμα η distamycin A επιφέρει αμελητέα αλλαγή στο διπλόκλωνο DNA, σε αντίθεση με τις πολυσθενείς κατιοντικές πολυαμίνες (όπως η spermine) που μπορούν να επιφέρουν κάμψη της έλικας.

1.3.1.2. Παρεμβολή μορίων στη διπλή έλικα του DNA (Intercalation)

Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός μη ομοιοπολικής πρόσδεσης μορίων, είναι η παρεμβολή (intercalation) των μορίων αυτών στα ζεύγη βάσεων του DNA. Η παρεμβολή αυτή, που προτάθηκε για πρώτη φορά το 1961 από τον Lerman [9], λαμβάνει χώρα όταν ένα αρωματικό συνήθως μόριο βρεθεί ανάμεσα στα στοιβαγμένα ζεύγη βάσεων του DNA.

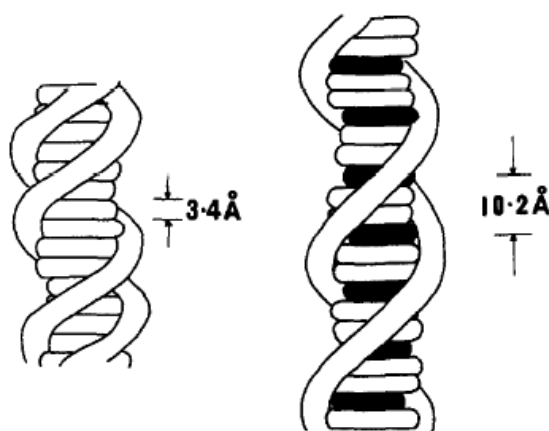
Μεγάλη ποικιλία μορίων, όπως το βρωμίδιο του αιθιδίου (ethidium bromide) και μικρά φάρμακα, όπως η actinomycin D και η daunomycin, έχει βρεθεί ότι μπορούν να διεισδύσουν ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Όσον αφορά τα μεταλλικά σύμπλοκα το ρόλο του παρεμβολέα παίζει συνήθως ο υποκαταστάτης του συμπλόκου, που είναι ένας επίπεδος ετεροκυκλικός αρωματικός υποκαταστάτης. Για σύμπλοκα που είναι επίπεδα τετραγωνικά, όπως για παράδειγμα του Pt(II) ή του Pd(II), υπάρχει το ενδεχόμενο ολόκληρο το μόριο να παίζει το ρόλο του παρεμβολέα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί το $[Pt(terpy)Cl]^+$ (όπου terpy = 2,2',2''-terpyridine) που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων της διπλής έλικας του DNA [10,11].

Η παρεμβολή περιορίζεται από την αρχή του αποκλεισμού των γειτονικών θέσεων (**neighbor exclusive principle**) [12], η οποία αναφέρει ότι τα μόρια του φαρμάκου δεν μπορούν να καταλάβουν δύο διαδοχικές θέσεις (Σχήμα 1.9). Δηλαδή η παρεμβολή ενός μορίου ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA, αποκλείει τη σύνδεση άλλου μορίου σε γειτονικές θέσεις.

Αν και υπάρχουν πολλά κρυσταλλογραφικά δεδομένα, η φύση της παρεμβολής δεν είναι πλήρως κατανοητή. Η παρεμβολή πιστεύεται, ότι γίνεται με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει τρία στάδια. Αρχικά, το DNA υφίσταται μια αλλαγή στη διαμόρφωση του, διαχωρίζονται τα ζεύγη των βάσεων του, αποελίσσονται οι κλώνοι του και δημιουργείται μια κοιλότητα, όπου αποτελεί το σημείο της παρεμβολής. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται η

διαδικασία της υδρόφοβης μεταφοράς του μη πολικού επίπεδου αρωματικού συστήματος στο σημείο της παρεμβολής μέσα στη διπλή έλικα. Στο τρίτο στάδιο, λαμβάνουν χώρα μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (συνήθως δυνάμεις van der Waals) και η δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Αύξηση της σταθερότητας του συστήματος παρατηρείται όταν το μόριο παρεμβολέας είναι θετικά φορτισμένος.

Πολλές φορές, προκαλούνται δομικές αλλαγές στην έλικα του βιοπολυμερούς, με σκοπό να σταθεροποιηθεί το μόριο ανάμεσα στα στοιβαγμένα ζεύγη βάσεων. Αυτές οι δομικές αλλαγές οδηγούν πολλές φορές σε μερικό ξετύλιγμα της έλικας και επιμήκυνση του μορίου, με συνέπεια να προκαλούνται εμφανείς αλλαγές στην υδροδυναμική συμπεριφορά του πολυμερούς, όπως μεταβολή του ιξώδους και αλλαγή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (§1.2-μοντέλο διπλής έλικας), η στροφή της B διαμόρφωσης του DNA είναι 36° , προκειμένου όμως, να εισχωρήσει ένα μόριο παρεμβολέας, παρατηρείται μια μείωση της γωνίας περιστροφής. Για παράδειγμα, η παρεμβολή του βρωμιδίου του αιθιδίου, επιφέρει μείωση της περιστροφής έως και 10° [7]. Η παρεμβολή οδηγεί επίσης και σε θερμική σταθεροποίηση της δομής.



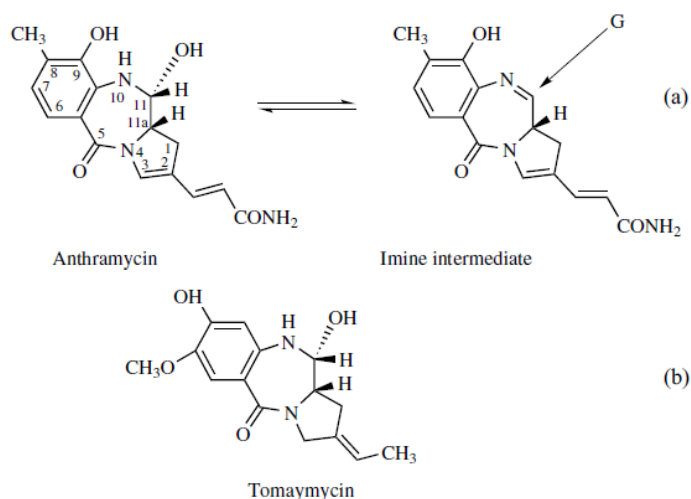
Σχήμα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση τις διπλής έλικας του B-DNA και η αρχή του αποκλεισμού των γειτονικών θέσεων ενός μορίου-παρεμβολέα (με μαύρο χρώμα).

1.3.2. Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

Τα νουκλεϊκά οξέα συμμετέχουν σε χημικές αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την ομοιοπολική τροποποίηση των δομών τους, λόγω κάποιας αλκυλίωσης. Τα μόρια αυτά, που οδηγούν σε τροποποιήσεις του DNA, είναι συνήθως εκλεκτικά ως προς την ακολουθία των βάσεων. Τέτοια μόρια, πολλές φορές, έχουν θεραπευτικές ιδιότητες. Αντικαρκινικά φάρμακα που συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA, όπως η anthramycin, η mitomycin, η

aflatoxin B1, και η karumimycin A3, είναι συνήθως οργανικά μόρια κατάλληλης δομής, που προκαλούν σημαντικές δομικές και βιολογικές αλλαγές στο DNA. Τα μόρια αυτά δημιουργούν ένα δραστικό ηλεκτρονιόφιλο σύστημα, όπου αλκυλιώνει τα πυρηνόφιλα άτομα N των βάσεων του DNA, γι' αυτό πολλές φορές καλούνται και αλκυλιωτικοί παράγοντες [7].

Για παράδειγμα, η anthramycin και η tomaymycin, είναι γνωστοί αντιβιοτικοί παράγοντες, που ανήκουν στην οικογένεια των πυρρολο[1,4]-βενζοδιαζεπινών, με σημαντική αντικαρκινική δράση. Αυτά σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ του C11 άνθρακα τους με την εξωκυκλική NH₂ ομάδα της γουανίνης στη μικρή αύλακα του DNA. Η αντίδραση είναι αργή και γίνεται μέσω του σχηματισμού ενός ιμινικού ενδιάμεσου (Σχήμα 1.10).

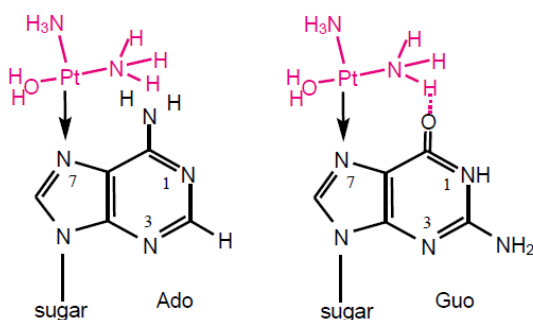


Σχήμα 1.10. Δομές της anthramycin (a) και της tomaymycin (b) και ο προτεινόμενος μηχανισμός μέσω ιμινικού ενδιάμεσου.

Ο συνδυασμός παρεμβολής και αλκυλίωσης αποτελεί ακόμη έναν από τους τρόπους αλληλεπίδρασης μορίων με το DNA. Οι αλτρομυκίνες (αντιβιοτικά/αντικαρκινικά) αποτελούν χαρακτηριστικούς εκπροσώπους του συγκεκριμένου τρόπου αλληλεπίδρασης [7]. Συγκεκριμένα, τα φάρμακα παρεμβάλλονται στο DNA, ενώ η θέση του εποξειδικού δακτυλίου στη μεγάλη αύλακα κοντά στο N7 της γουανίνης προσφέρει την ικανότητα στο μόριο να αλκυλιώνει το N7(G) μέσω πυρηνόφιλης προσβολής.

Εκτός από την αλκυλίωση των νουκλεϊκών οξέων, η σύμπλεξη μεταλλικών ιόντων με DNA μπορεί να θεωρηθεί και αυτή μία τροποποίηση. Εκτός από την αλληλεπίδραση των αλκαλίων και αλκαλικών γαιών με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες, πολλά

από τα μεταλλικά ιόντα των στοιχείων μετάπτωσης έχουν την τάση να συμπλέκονται με τις βάσεις του DNA. Αν και οι θέσεις κάποιων νουκλεοβάσεων δεν είναι προσιτές, λόγω της θέσης τους στην έλικα του Watson-Crick, κάποιες είναι αρκετά διαθέσιμες και λειτουργικές κατά την επίδραση μετάλλων σε αυτές. Για παράδειγμα, το αντικαρκινικό φάρμακο cisplatin ($cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$) συμπλέκεται με τα N7 δύο γουανινών (ή και σε μικρότερο ποσοστό με μία G και μία A). Οι δύο χλώρο-υποκαταστάτες υδρολύονται και αντικαθίστανται από τα άτομα N7 γουανίνης (ή αδενίνης), σχηματίζοντας Pt–N δεσμούς. Η NH_3 δημιουργεί με τη σειρά της δεσμούς υδρογόνου με το O6 μιας γειτονικής G (όχι όμως και με την A, Σχήμα 1.11) σταθεροποιώντας έτσι το τελικό σύμπλεγμα DNA-cisplatin, αλλά και συμβάλλοντας στην κυτταροτοξική δράση. Παρατηρείται, λοιπόν, ένα τοπικό ξετύλιγμα της έλικας και τοπική κάμψη (kink) της σπονδυλικής στήλης-σκελετού του DNA γύρω από την περιοχή της μεγάλης αύλακας. Η παραμόρφωση αυτή φαίνεται ότι καθιστά το μόριο του DNA μη λειτουργικό, γεγονός που οδηγεί στο θάνατο του κυττάρου [13,14].



Σχήμα 1.11. Ομοιοπολική σύνδεση του λευκοχρόσου με τα N7 της αδενοσίνης (Ado) και της γουανοσίνης (Guo). Η σύνδεση στο N7 της Guo είναι προτιμότερη λόγω δεσμών υδρογόνου της αμμωνίας με το O6 [15].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΩΣ

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ ΤΟ DNA

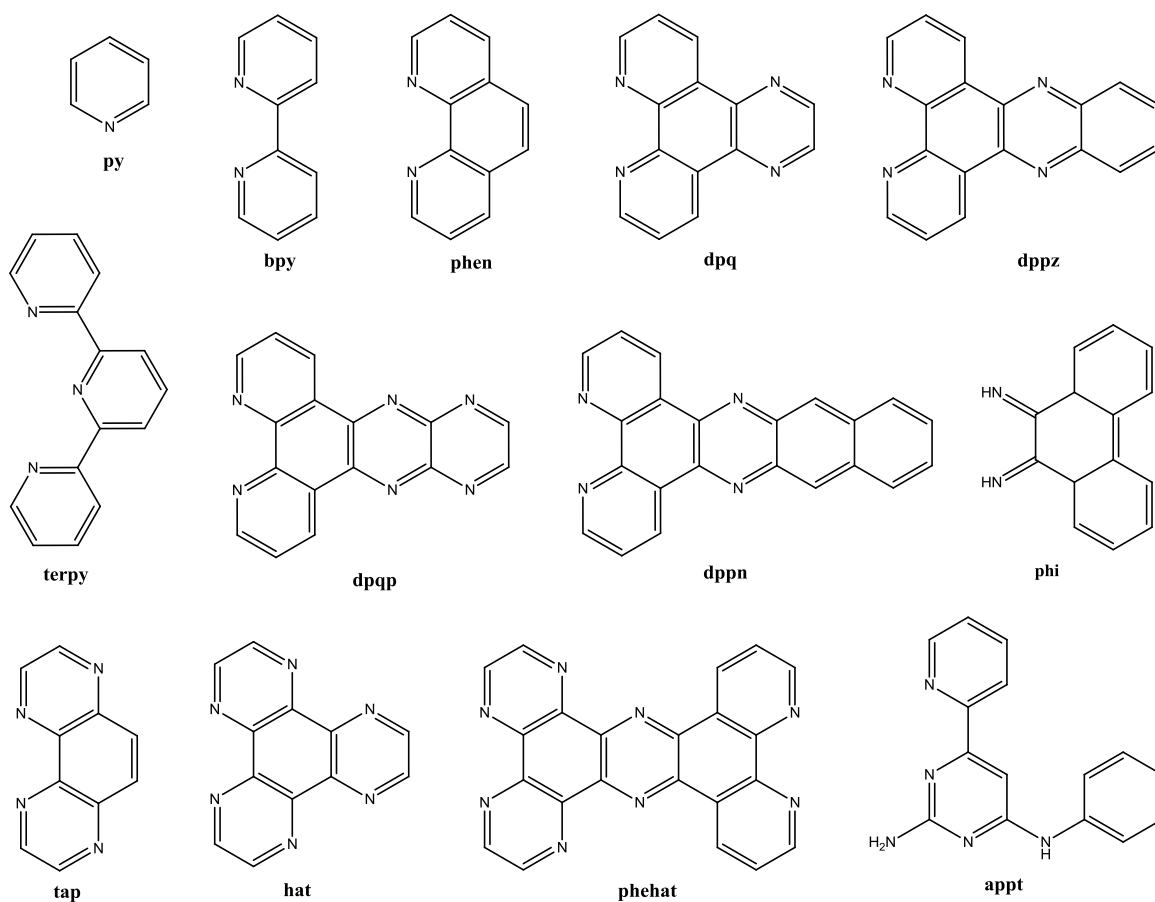
2.1. Εισαγωγή – Ιστορική Αναδρομή

Ο σχεδιασμός μικρών μορίων, που μπορούν να συνδέονται και να αντιδρούν με το DNA σε ειδικές αλληλουχίες, είναι σημαντικός καθώς μπορεί να απεικονιστεί σε μοριακό επίπεδο ο τρόπος που εκφράζονται οι γενετικές πληροφορίες. Μία περισσότερο ολοκληρωμένη κατανόηση του τρόπου που στοχοποιούνται οι περιοχές του DNA με εκλεκτικότητα, θα οδηγούσε όχι μόνο σε πρωτότυπα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αλλά θα έδινε και τη δυνατότητα στους χημικούς να σχεδιάσουν μοριακούς ανιχνευτές DNA, αλλά και περισσότερο ευαίσθητους διαγνωστικούς παράγοντες.

Τα σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης είναι πολύ χρήσιμα στην προσπάθεια αυτή, όχι μόνο επειδή έχουν καλώς χαρακτηρισμένη γεωμετρία, αλλά έχουν επίσης και σαφείς ηλεκτροχημικές και φωτοφυσικές ιδιότητες, αυξάνοντας έτσι τη λειτουργικότητα των δεσμευτικών παραγόντων. Αλλάζοντας το μεταλλικό κέντρο, μπορεί να τροποποιηθεί η γεωμετρία του συμπλόκου (επίπεδη τετραγωνική, τετραεδρική, οκταεδρική), αλλά και οι φωτοφυσικές του ιδιότητες. Επιπλέον, με κατάλληλη επιλογή υποκαταστατών (Σχήμα 2.1) μπορούν επίσης να τροποποιηθούν οι φωτοφυσικές ιδιότητες, αλλά και να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA, εξαιτίας των διαφορετικών τρόπων σύνδεσης (όπως συζητήσαμε στην § 1.3). Οι σταθερές σύνδεσης που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης με DNA κυμαίνονται από $1 \cdot 10^3$ έως $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Οι μοναδικές φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες αυτών των συμπλόκων, τα καθιστούν πολλά υποσχόμενους μοριακούς ανιχνευτές για το DNA, εξαιτίας της έντονης MLCT φωταύγειας και των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων της διεγερμένης κατάστασης τους. Οι MLCT μεταπτώσεις μπορούν να αξιοποιηθούν προκειμένου να ξεκινήσουν αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου, δεδομένου ότι πολλά σύμπλοκα γίνονται ισχυροί οξειδωτικοί ή αναγωγικοί παράγοντες μετά από οπτική διέγερση. Επίσης, πλήθος ερευνών έχει αναφερθεί και στην ικανότητά τους να εκπέμπουν φωταύγεια μετά από δέσμευση τους

στο DNA, μια ιδιότητα που καλείται επίδραση μοριακού «διακόπτη φωτός» (“light switch” effect) (§ 2.2) [16-22].



Σχήμα 2.1. Δομές διμινικών υποκαταστατών (και οι συντομογραφίες τους) που αναφέρονται στο παρόν κεφάλαιο.

Μεγάλο μέρος της δουλειάς που έχει γίνει στην ερευνητική αυτή περιοχή, έχει ξεκινήσει από την έρευνα των συμπλόκων του Pt(II) που χρησιμοποιήθηκαν σε μια προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού δράσης του cisplatin και άλλων χημειοθεραπευτικών φορέων. Εντούτοις, η πρόσφατη εκρηκτική ανάπτυξη οφείλεται στην αναγνώριση ότι πλήθος συμπλόκων του Ru(II), Rh(III), Os(II), Re(I), Cu(I) με πολυπυρηνικούς αρωματικούς υποκαταστάτες αλληλεπιδρούν ισχυρά με το DNA και παρέχουν ένα πλήθος φυσικοχημικών εργαλείων για την ανίχνευση και αλλαγή της δομής των νουκλεϊκών οξέων.

Σχεδόν 40 χρόνια πριν, ο S. J. Lippard και οι συνεργάτες του [10], πρώτοι ανακάλυψαν ότι επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα του Pt(II) και του Pd(II) που περιέχουν terpy ως

υποκαταστάτη (βλ. Σχήμα 2.1 για δομή), μπορούν να συνδέονται με το διπλόκλωνο DNA μέσω παρεμβολής, με τη σταθερά σύνδεσης, K_b , να είναι περίπου 10^5 M^{-1} .

2.2. Σύμπλοκα Ru(II)

Από τις αρχές τις δεκαετίας του '80, οι έρευνες σχετικά με την αλληλεπίδραση οκταεδρικών συμπλόκων με DNA είναι σε εξέλιξη, με τις αρχικές μελέτες να επικεντρώνονται στο $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$.

Με τη βοήθεια NMR και φασματοσκοπικών μελετών η J. K. Barton και οι συνεργάτες της [23] πρότειναν ότι το παραπάνω σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το DNA μέσω υδροφοβικών επιδράσεων με τη μεγάλη αύλακα, και ότι ο ένας phen (1,10-φαινανθρολίνη) υποκαταστάτης παρεμβάλλεται στα ζεύγη βάσεων. Αυτά τα πρωταρχικά πειράματα έδειξαν την προτίμηση του δεξιόστροφου Δ-ισομερούς του εν λόγω συμπλόκου στην παρεμβολή, αντίθετα για το Λ-ισομερές προτάθηκε διαφορετικός τρόπος σύνδεσης. Ο τρόπος της παρεμβολής αναθεωρήθηκε μια για πάντα, όταν πειράματα ιξωδομετρίας έδειξαν σαφώς, ότι το σύμπλοκο δεν δεσμεύεται με το DNA μέσω παρεμβολής [24]. Μεταγενέστερες φασματοσκοπικές μελέτες και πειράματα μοντελοποίησης έδειξαν ότι το Λ-ισομερές του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ δεσμεύεται στη μεγάλη αύλακα του DNA, έχοντας έναν phen υποκαταστάτη σχεδόν παράλληλα στο επίπεδο των ζευγών βάσεων. Αντίθετα, για το Δ-ισομερές τα πράγματα είναι πιο πολύπλοκα και η δέσμευση εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συμπλόκου [25]. Παρόλα αυτά, κανένας τρόπος δέσμευσης δεν περιλαμβάνει παρεμβολή ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων.

2.2.1. Σύμπλοκα Ru(II) με dpprz υποκαταστάτη

Αυξάνοντας την επιφάνεια του διμινικού υποκαταστάτη, (εισάγοντας για παράδειγμα έναν dpprz (dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine) υποκαταστάτη, Σχήμα 2.1), σε σύμπλοκα του παραπάνω τύπου, θα ήταν δυνατόν να επιτευχθεί η παρεμβολή του επιπέδου υποκαταστάτη ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA. Έτσι λοιπόν συντέθηκαν και μελετήθηκαν τα εξής σύμπλοκα $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dpprz})]^{2+}$ (όπου bpy=2,2'-διπυριδίνη) και $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dpprz})]^{2+}$ [26,27]. Πράγματι, τα δύο σύμπλοκα συνδέονται μέσω παρεμβολής του dpprz υποκαταστάτη στα ζεύγη βάσεων του DNA, κάτι που επιβεβαιώθηκε και με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, από τις ομάδες της J. K. Barton [28] και τους C. J. Cardin - J. M. Kelly [29], αντίστοιχα. Η σταθερά σύνδεσης των συμπλόκων αυτών με το CT-DNA βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη από 10^6 M^{-1} .

Αναλυτικότερα, οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το Λ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ συνδέεται μέσω παρεμβολής, κάθετα στην αλληλουχία TA του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου d(CCGGTACCGG)₂, άλλα όχι στην AT του d(CCGGATCCGG)₂. Ένα δεύτερο σύμπλοκο συνδέεται στην τερματική αλληλουχία GG/CC, του κάθε ολιγονουκλεοτιδίου, με παρεμβολή υπό γωνία (angled intercalation), ούτε παράλληλα ούτε κάθετα. Αυτή η υπό γωνία παρεμβολή μπορεί να προκαλέσει ένα άλλο είδος αλληλεπίδρασης: την ημι-παρεμβολή (semi-intercalation) ενός phen υποκαταστάτη στην G₃G₄/C₇C₈ αλληλουχία [29]. Κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε και για το Λ -ισομερές του συμπλόκου [Ru(tap)₂(dppz)]²⁺ (όπου tap=1,4,5,8-tetra-aza-phenanthrene, Σχήμα 2.1), στο δίκλωνο δεκανουκλεοτίδιο d(TCGGCGCCGA)₂, όπου ένας tap υποκαταστάτης δεσμεύεται με ημι-παρεμβολή, προκαλώντας σημαντική στρέβλωση (kink) του κλώνου του DNA [30].

2.2.2. Η επίδραση του μοριακού διακόπτη φωτός (molecular light switch effect)

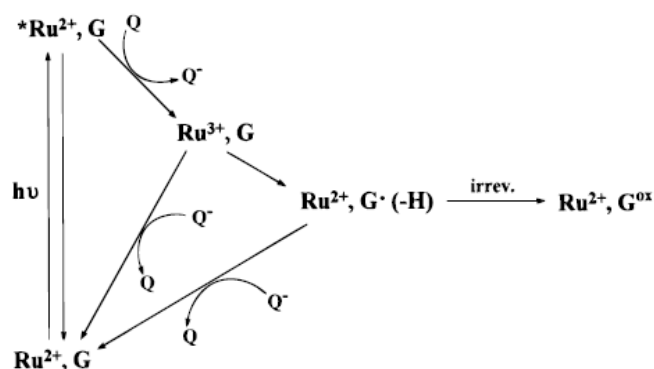
Οι φωτοφυσικές μελέτες των δύο προαναφερθέντων συμπλόκων έδειξαν ότι η μεταφορά φορτίου κατευθύνεται από το μέταλλο προς τον φαιναζινικό δακτύλιο του dppz υποκαταστάτη. Σε άπολους διαλύτες, όπως CHCl₃, CH₂Cl₂ τα σύμπλοκα παρουσιάζουν φωταύγεια. Αντίθετα, σε υδατικό διάλυμα ή σε πρωτικούς διαλύτες η φωταύγεια αποσβένεται εξαιτίας της ικανότητας του νερού να απενεργοποιεί τη διεγερμένη κατάσταση μέσω δεσμών υδρογόνου με τα άζωτα του φαιναζινικού δακτυλίου. Με προσθήκη DNA σε υδατικό διάλυμα των συμπλόκων, παρατηρείται φωταύγεια, υποδεικνύοντας ότι τα άζωτα του δακτυλίου του dppz προστατεύονται από το διαλύτη. Μάλιστα, στην περίπτωση του [Ru(phen)₂dppz]²⁺ συνδεδεμένο με το DNA, βρέθηκε ότι ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης είναι περίπου 200 ns, ενώ ελεύθερο σε υδατικό διάλυμα, ο χρόνος ζωής είναι μόνο 200 ps [31,32].

Αυτό υποδηλώνει ότι ο dppz υποκαταστάτης παρεμβάλλεται βαθιά μέσα στο π σύστημα και συμπεριφέρεται σαν να βρίσκεται σε έναν υδρόφοβο διαλύτη. Αυτό το φαινόμενο έχει ονομαστεί «επίδραση μοριακού διακόπτη φωτός» (“molecular light switch effect”), και έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμο στην διερεύνηση της αλληλεπίδρασης.

2.2.3. Φωτο-αποικοδόμηση του DNA

Αν και το σύμπλοκο [Ru(bpy)₂(dppz)]²⁺ συνδέεται πολύ ισχυρά με το DNA και λειτουργεί σαν πραγματικός διακόπτης φωτός, εντούτοις είναι δύσκολο να προκαλέσει

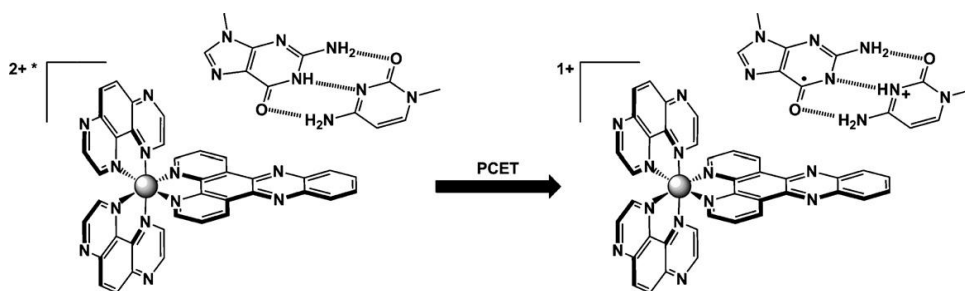
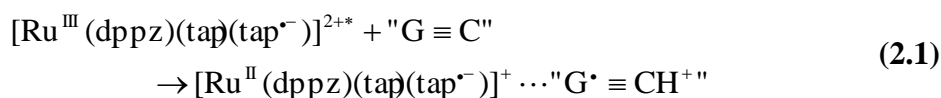
φωτοδιάσπαση του DNA, εξαιτίας του μικρού χρόνου ζωής και της χαμηλής οξειδωτικής ικανότητας της διεγερμένης του κατάστασης [33]. Στην περίπτωση που το σύμπλοκο δεν είναι αρκετά ισχυρός οξειδωτικός ή αναγωγικός παράγοντας, για να προκαλέσει την επιθυμητή χημεία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η “flash-quench” τεχνική. Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί για το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$, που βρέθηκε ότι συνδεδεμένο με το πολυνουκλεοτίδιο poly-d(GC) μπορεί να σχηματίσει ρίζες γουανίνης (G), μετά από διέγερση με ορατό φως, χρησιμοποιώντας ποικιλία οξειδωτικών αποσβετών (quencher), όπως methyl viologen MV^{2+} , $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ και $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}^{2+}$. Το διεγερμένο σύμπλοκο $^*\text{Ru}(\text{II})$ αποσβένεται από ένα δέκτη ηλεκτρονίων (Q) σχηματίζοντας $\text{Ru}(\text{III})$, το οποίο μπορεί να αναχθεί σε $\text{Ru}(\text{II})$ είτε με διαμοριακό ανασυνδυασμό με το ανηγμένο Q^- , είτε με μεταφορά ηλεκτρονίου από μία γειτονική βάση G, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2. Η οξειδωμένη ρίζα γουανίνης (G^\cdot), που σχηματίζεται, μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω αντιδράσεις σχηματίζοντας προϊόντα οξείδωσης (G^{ox}) [34].



Σχήμα 2.2. Αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου μέσω της “flash-quench” τεχνικής, για την οξείδωση της γουανίνης από το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$.

Χρησιμοποιώντας υποκαταστάτες όπως οι hat, tap (Σχήμα 2.1), η A. Kirsch-De Mesmaeker και οι συνεργάτες της βρήκαν ότι σύμπλοκα του τύπου $[\text{Ru}(\text{bpy})_m(\text{tap})_{3-m}]^{2+}$ και $[\text{Ru}(\text{bpy})_m(\text{hat})_{3-m}]^{2+}$ (όπου $m=0, 1, 2$, hat=1,4,5,8,9,12-hexaazatriphenylene) είναι πολύ ισχυρά οξειδωτικά στη διεγερμένη τους κατάσταση. Έτσι λοιπόν, θα μπορούσαν να αποσπώνουν ηλεκτρόνια από τις βάσεις του DNA [35]. Η διάσπαση του DNA ξεκινά με μια διαδικασία που περιλαμβάνει μια φωτο-επαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίου. Όμως, η σχετικά χαμηλές συγγένειες πρόσδεσης αυτών των συμπλόκων, περιορίζει τη χρήση τους ως αποτελεσματικούς DNA φωτο-παράγοντες. Επομένως, το επόμενο βήμα θα ήταν ο συνδυασμός των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των μορίων αυτών (hat, tap) με την ιδιότητα του dppz να παρεμβάλλεται ισχυρά στα ζεύγη βάσεων.

Πράγματι, πρόσφατα έχει συντεθεί το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{tap})_2(\text{dppz})]^{2+}$ που έχει παρόμοια οξειδοαναγωγική χημεία με ανάλογα σύμπλοκα $\text{Ru}(\text{II})$ με tap , αλλά αντίθετα το συγκεκριμένο σύμπλοκο συνδέεται ισχυρά με το DNA μέσω παρεμβολής, ενώ εκπέμπει ισχυρό φθορισμό ακόμα και σε νερό [36]. Μάλιστα, όταν το σύμπλοκο φωτιστεί παρουσία του δίκλωνου πολυνουκλεοτιδίου $[\text{poly-d}(\text{GC})]_2$, παρατηρείται οξείδωση της γουανίνης και ταυτόχρονη πρωτονίωση της γειτονικής κυτοσίνης (μεταφορά του ιμινο-πρωτονίου της γουανίνης παράγοντας πρωτονιομένη κυτοσίνη), πιθανόν μέσω ταυτόχρονης μεταφοράς ηλεκτρονίου-πρωτονίου (proton-coupled electron transfer), όπως φαίνεται στην ισορροπία (2.1) και το Σχήμα 2.3 [37].



Σχήμα 2.3. Προτεινόμενος μηχανισμός της proton-coupled electron transfer (PCET) ανάμεσα στο $[\text{poly-d}(\text{GC})]_2$ και το διεγερμένο $[\text{Ru}(\text{tap})_2(\text{dppz})]^{2+}$.

2.2.4. Άλλα σύμπλοκα του $\text{Ru}(\text{II})$ με τύπου dppz υποκαταστάτες

Ένας μεγάλος αριθμός συμπλόκων με παράγωγα του dppz υποκαταστάτη, έχουν σχεδιαστεί [17,20,35], προκειμένου να αξιοποιηθεί η ισχυρή ικανότητα παρεμβολής του συγκεκριμένου υποκαταστάτη. Πολλά από αυτά, αλλά όχι όλα, εμφανίζουν επίδραση μοριακού διακόπτη φωτός. Ιδιαίτερης σημασίας είναι τα σύμπλοκα με υποκαταστάτη 1,10-phenanthroline[5,6-b]-1,4,5,8,9,12-hexaazatriphenylene (pheat, βλ. Σχήμα 2.1 για δομή). Συγκεκριμένα, το $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{pheat}]^{2+}$ βρέθηκε ότι έχει επίδραση διακόπτη φωτός, αν και εμφανίζει ασθενέστερη φωταύγεια όταν συνδέεται στο CT-DNA [38], σε σχέση με το $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$. Αντίθετα, το $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hat}]^{2+}$, παρουσιάζει φωταύγεια ακόμα και σε υδατικό διάλυμα, αλλά αυτή αυξάνεται ελαφρώς παρουσία DNA [33].

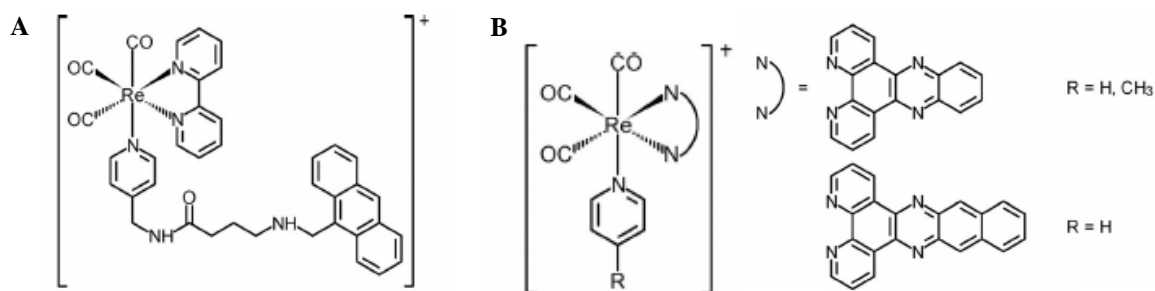
Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$, όπου $\text{dppz}=\text{pyrazino}[2',3':5,6]\text{pyrazino}-[2,3\text{-f}][1,10]\text{phenanthroline}$ (βλ. Σχήμα 2.1), διαφέρει από τα παραδοσιακά συστήματα διακόπτη φωτός, αφού εκπέμπει φωταύγεια σε υδατικό διάλυμα [39]. Φασματοσκοπικά

πειράματα έχουν αποκαλύψει ότι κατέχει μια $^3\text{MLCT}$ διεγερμένη κατάσταση με χρόνο ζωής πάνω από 620 ns, ικανή να ξεκινήσει φωτοδιάσπαση μέσω παραγωγής μονήρους οξυγόνου ($^1\text{O}_2$), με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από το ανάλογο dppz σύμπλοκο. Παρόμοια αποτελεσματική φωτοδιάσπαση επιτεύχθηκε και με το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppn})]^{2+}$, όπου dppn= βενζο[ι]διπυριδο[3,2-a:2'3'-c]φαιναζίνη [40].

2.3. Σύμπλοκα Re(I)

2.3.1. Παρεμβολικά μονομεταλλικά σύμπλοκα Re(I)

Οι περισσότερες από τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τρικαρβόνυλο πολυπυριδινικών συμπλόκων του ρηνίου(I) και της διπλής έλικας του DNA, που έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα, είναι παρεμβολικής φύσεως. Τα σύμπλοκα αυτά είτε συνδέονται με ένα επίπεδο αρωματικό μόριο μέσω μιας γέφυρας (spacer), ή συμπλέκονται άμεσα με έναν εκτεταμένο επίπεδο αρωματικό διμινικό υποκαταστάτη, όπως τον dppz. Στην πρώτη περίπτωση ένα μόριο ανθρακενίου έχει συμπλεχθεί ομοιοπολικά μέσω γέφυρας στο μεταλλικό κέντρο (Σχήμα 2.4A). Το σύμπλοκο δεσμεύεται μέσω παρεμβολής του μορίου αυτού στα ζεύγη βάσεων του DNA, με σταθερά σύνδεσης $4.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία φθορισμού [41].

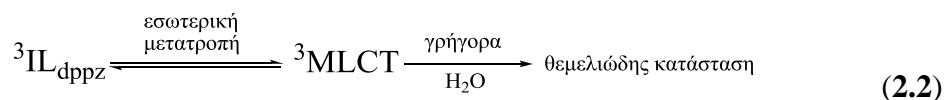


Σχήμα 2.4. Δομή συμπλόκων του Re(I) που δεσμεύονται μέσω παρεμβολής στο DNA.

Συμπλέκοντας άμεσα στο Re(I) έναν εκτεταμένο επίπεδο υποκαταστάτη αντί της bpy, μπορεί πλέον αυτός να δράσει ως παρεμβολέας στο DNA. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα $[\text{Re}(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{CO})_3(\text{py-R})]^+$ (όπου $\text{N}^{\wedge}\text{N}=\text{dppz}$, dppn , και $\text{R}=\text{H}$, Me , Σχήμα 2.4B), που λειτουργούν ως παρεμβολείς στο DNA [42-44]. Μελέτες με φασματοσκοπία εκπομπής δείχνουν ότι τα σύμπλοκα με dppz και dppn σε CH_2Cl_2 έχουν μια $^3\text{IL}(\pi-\pi^*)$ κατάσταση. Η παρεμβολή αυτών των συμπλόκων στο CT-DNA αλλά και σε συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια επιφέρει αύξηση της εκπομπής και του χρόνου ζωής της διεγερμένης

κατάστασης [42,43]. Η συμπεριφορά αυτή επιτρέπει τη χρήση των παραπάνω συμπλόκων ως συστήματα διακόπτη φωτός, ανάλογα με εκείνα των συμπλόκων του Ru(II) με dppz.

Συγκεκριμένα, η χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{dppz})(\text{CO})_3(\text{py-Me})]^+$, έχει χαρακτήρα τριπλής ενδομοριακής κατάστασης βασισμένης στον dppz (${}^3\text{I}_{\text{dppz}}$) και εκδηλώνει φωταύγεια σε διαλυτές MeCN και CH_2Cl_2 . Όμως, σε υδατικά διαλύματα, αυτή η κατάσταση βρίσκεται πολύ κοντά ενεργειακά με την τριπλή MLCT κατάσταση, η οποία αποδιεγείρεται θερμικά. Επίσης, έχει βρεθεί ότι σε διαλύτες με μεγάλη πολικότητα, συντελείται εσωτερική μετατροπή από την I_{dppz} στην MLCT κατάσταση. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η ${}^3\text{MLCT}$ κατάσταση έχει πολύ μικρό χρόνο ζωής στο H_2O , εξαιτίας της μεταφοράς πρωτονίου, η χαμηλότερη ${}^3\text{I}_{\text{dppz}}$ διεγερμένη κατάσταση απενεργοποιείται ταχέως (ισορροπία **2.2**). Έτσι, στο H_2O το σύμπλοκο δεν παρουσιάζει φωταύγεια. Αντίθετα, όταν το σύμπλοκο συνδεθεί με το DNA, αυξάνεται η ενέργεια της ${}^3\text{MLCT}$ σε σύγκριση με την ${}^3\text{I}_{\text{dppz}}$ και η εσωτερική μετατροπή επιβραδύνεται, λόγω της μικρότερης επαφής του συμπλόκου με το νερό και του λιγότερο πολικού περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα να εκδηλώνεται τελικά φωταύγεια και μάλιστα, τόσο εντονότερη, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του DNA [42].

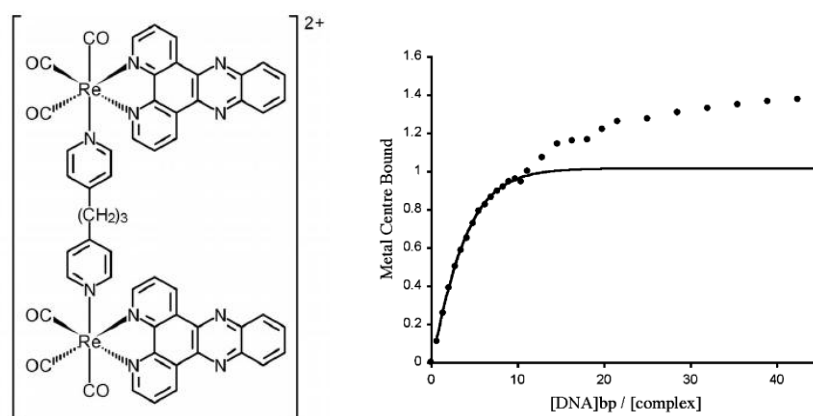


Επιπλέον, η επώαση των παραπάνω συμπλόκων με το πλασμίδιο pBR322 οδηγεί σε φωτοδιάσπαση (photocleavage) του βιομορίου μετά από ακτινοβολήση με ορατό φως [44]. Μια σειρά πειραμάτων ηλεκτροφόρησης, απέδειξαν ότι στην περίπτωση του dppz συμπλόκου πραγματοποιείται άμεση οξείδωση του DNA από το διεγερμένο σύμπλοκο, χωρίς να εμπλέκεται το οξυγόνο στην φωτοκαταλυτική διάσπαση. Αντίθετα, για το σύμπλοκο με dppz βρέθηκε, ότι τα δραστικά είδη που είναι υπεύθυνα για τη διάσπαση του πλασμιδίου είναι οι υπερυπεροξειδικές και οι υδροξυλικές ρίζες.

2.3.2. Παρεμβολικά διμεταλλικά σύμπλοκα Re(I)

Το σύμπλοκο του Re(I)-dppz έχει περαιτέρω τροποποιηθεί με σύμπλεξη με μεταλλικό κέντρο, μέσω ενός γεφυρωτικού υποκαταστάτη, αποδίδοντας το ομοπυρηνικό σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{dppz})(\text{CO})_3(\text{py}(\text{CH}_2)_3\text{py})\text{Re}(\text{dppz})(\text{CO})_3]^{2+}$ [45] (Σχήμα 2.5) και το ετεροπυρηνικό σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{tmp})(\text{dppz})(\text{py}(\text{CH}_2)_5\text{py})\text{Re}(\text{dppz})(\text{CO})_3]^{3+}$, όπου tmp = tris(1-pyrazoyl)methane [46]. Και τα δύο σύμπλοκα έχουν μελετηθεί με τιτλοδότηση UV-Vis παρουσία DNA.

Η καμπύλη τιτλοδότησης του ομοπυρηνικού συμπλόκου του Re(I) δείχνει μια πιο πολύπλοκη συμπεριφορά, σε σχέση με τα μονομερή συστήματα που αναφερθήκαν προηγουμένως (Σχήμα 2.4B). Ενώ τα μονομερή σύμπλοκα φτάνουν σε κορεσμό σε λόγους [DNA]/[Re] περίπου 10:1, το διμεταλλικό σύμπλοκο εμφανίζει *φαινομενικό* κορεσμό στην ίδια αναλογία. Όμως, με επιπλέον προσθήκη DNA παρατηρείται επιπλέον υποχρωμισμός, ακόμα και σε υψηλότερες αναλογίες. Ο φαινομενικός κορεσμός στην πρώτη δέσμευση του διμεταλλικού συμπλόκου συμβαίνει όταν ο υποχρωμισμός είναι ο μισός σε σχέση με τα μονομερή συστήματα. Αυτό υποδηλώνει ότι οι δύο Re(I)-dpprz μονάδες δεν μπορούν να παρεμβάλλονται στην ίδια έλικα του DNA, λόγω του ανεπαρκούς μεγέθους της γέφυρας προπανίου που τις συνδέει [45]. Ωστόσο, το δεύτερο κέντρο ρηνίου είναι ελεύθερο να αλληλεπιδράσει με ένα άλλο μόριο διπλόκλωνου DNA, όπως αντανακλάται από τη δεύτερη δεσμευτική περίπτωση του πειράματος τιτλοδότησης, που φαίνεται στο Σχήμα 2.5. Να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο σύμπλοκο δεν εκπέμπει φθορισμό ούτε σε οργανικούς διαλύτες ούτε σε υδατικό διάλυμα, αντίθετα με τα μονομερή σύμπλοκα [45].



Σχήμα 2.5. Η δομή του διμεταλλικού συμπλόκου $[\text{Re}(\text{dpprz})(\text{CO})_3(\text{py}(\text{CH}_2)_3\text{py})\text{Re}(\text{dpprz})(\text{CO})_3]^{2+}$ (αριστερά), και η UV-Vis καμπύλη τιτλοδότησης του (δεξιά). Η γραμμή δείχνει την πρώτη φαινομενική εκδήλωση κορεσμού.

Το ετεροδιμεταλλικό σύμπλοκο Ru(II)-Re(I) εμφανίζει απλές ^1IL απορροφήσεις στα 277 και 315 nm, και $^1\text{MLCT}$ απορρόφηση με μήκος κύματος μεγαλύτερο από 320 nm. Η διέγερση του συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας $^3\text{MLCT}$ $[\text{d}\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{dpprz})]$ εκπομπής στα 680 nm σε MeCN. Η απουσία $^3\text{MLCT}$ $[\text{d}\pi(\text{Re}) \rightarrow \pi^*(\text{dpprz})]$ εκπομπής έχει αποδοθεί σε μεταφορά ενέργειας από το Re(I) στο Ru(II) [46]. Το ετερομεταλλικό σύμπλοκο, σε αντίθεση με το ομοπυρηνικό, συμπεριφέρεται ως μοριακός διακόπτης φωτός, όταν παρεμβάλλεται στο DNA. Η

παρεμβολή του συμπλόκου επιβεβαιώθηκε και με πειράματα ιξωδομετρίας. Επιπροσθέτως, το σύμπλοκο προκαλεί φωτοδιάσπαση του DNA, όπως παρατηρήθηκε με πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή.

2.3.3. Παρεμβολή και ομοιοπολική σύνδεση συμπλόκων του Re(I)

Πρόσφατα, από τις ομάδες της J. K. Batron και A. Vlček [47], παρουσιάστηκε ένα σύμπλοκο του Re(I) με dppz και αξονικό υποκαταστάτη μια py, τροποποιημένη με κάποιο μορίου καρβοξυλικού οξέος που επιτρέπει την ομοιοπολική σύνδεση με το 5' τελικό άκρο του ενός κλώνου DNA, μέσω μιας C₇ άλκυλο αλυσίδας. Το σύμπλοκο [Re(CO)₃(dppz)(py')]⁺ (όπου py' = 3-(pyridin-4-yl)-propanoic acid), που συνδέεται μέσω παρεμβολής του dppz στα ζεύγη βάσεων και με πεπτιδικό δεσμό σε ένα πολυνουκλεοτίδιο (Σχήμα 2.6), προκαλεί οξειδωτική διάσπαση με μεταφορά ηλεκτρονίου διαμέσου του DNA (DNA-mediated charge transport). Με transient absorption φασματοσκοπία, time resolved IR (TRIR) και φασματοηλεκτροχημεία (spectroelectrochemistry) παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ρίζας γουανίνης και προϊόντων μόνιμης οξείδωσης. Στο Σχήμα 2.7 φαίνεται ο προτεινόμενος μηχανισμός οξείδωσης της γουανίνης, διαμέσου του DNA. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τα σύμπλοκα [Rh(phi)₂(bpy')]³⁺ (όπου phi=9,10-phenanthrenequinone και bpy'=4-methyl-4'-(butyric acid)-2,2'-bipyridine), και [Ir(ppy)₂(dppz')]⁺ (όπου ppy=2-phenylpyridine και dppz' = 6-(dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazin-11-yl)hex-5-ynoic acid), οι δομές των οποίων φαίνονται στο Σχήμα 2.6. Και τα τρία σύμπλοκα οξειδώνουν τη γουανίνη μέσω μακρινής κλίμακας μεταφοράς φορτίου με την εξής αποτελεσματικότητα Rh>Re>Ir [48,49].

Όπως έγινε κατανοητό από τις έως τώρα περιγραφές, μπορεί να προκύψει πληθώρα συμπλόκων Re(I) με dppz υποκαταστάτη, τροποποιώντας απλά και μόνο την συμπλεγμένη πυριδίνη. Έχουν αναφερθεί αρκετές τέτοιες τροποποιήσεις, ξεκινώντας από απλές πυριδίνες [50,51] και φτάνοντας μέχρι και σε μόρια βιοτίνης [52] τα οποία έχουν συμπλεχθεί στην py. Η τροποποίηση αυτή δεν θα άλλαζε τον παρεμβολικό τρόπο αλληλεπίδρασης με τα ζεύγη βάσεων του DNA, αλλά θα μπορούσε να παρουσιάσει μεγάλο ενδιαφέρον ως προς την επίδραση (ή εξάρτηση) του αξονικού υποκαταστάτη στην DNA-φωτοδιασπαστική συμπεριφορά.

2.3.4. Σύμπλοκα Re(I) μέσω αλληλεπίδρασης στην αύλακα

Εκτός από την παρεμβολή έχουν παρατηρηθεί και άλλοι τρόποι σύνδεσης με το DNA, όπως συμβαίνει με το σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{arpt})(\text{CO})_3\text{Cl}]$ (βλ. Σχήμα 2.1 για τη δομή του $\text{arpt}=2\text{-amino-4-phenylamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine}$) [53]. Η προσθήκη DNA σε αυτό το σύμπλοκο προκαλεί αύξηση στο T_m του DNA, μέτριο υποχρωμισμό της απορρόφησης στα 376 και 450 nm, αλλά καμία μετατόπιση στα μέγιστα των μηκών κύματος και καμία αύξηση του σχετικού ιξώδους του DNA. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με πειράματα χρήσης συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων $[\text{poly}(\text{dA-dT})_2$ και $\text{poly}(\text{dG-dC})_2$], και μελέτες μοντελοποίησης αποκαλύπτουν μια προτίμηση δέσμευσης σε αλληλουχίες AT και σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA. Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε και για το ανάλογο σύμπλοκο του Ru(II) [53].

2.4. Άλλα σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης

Εκτός από το Ru(II) με διμινικούς υποκαταστάτες, που έχει λάβει το μεγαλύτερο μερίδιο στο ερευνητικό πεδίο, έχουν αναφερθεί πολλά αλλά οκταεδρικά χειραλικά (chiral) σύμπλοκα του τύπου $[\text{M}(\text{diimine})_3]^{n+}$, και κυρίως τα ετεροληπτικά σύμπλοκα $[\text{M}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+/3+}$, όπου $\text{M} = \text{Os}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Co}^{3+}, \text{Cr}^{3+}, \text{Fe}^{2+}$. Τα περισσότερο μελετημένα και πιο ενδιαφέροντα είναι αυτά του Os(II) αλλά και του Cr(III) [16,20].

Λόγω της παρόμοιας χημικής συμπεριφοράς του Os(II) με το Ru(II), έχει ερευνηθεί μια ποικιλία συμπλόκων του Os(II) με α -διμινικούς υποκαταστάτες, και παρουσιάζουν υψηλές δεσμευτικές συγγένειες με το DNA και συμπεριφέρονται ως μοριακοί διακόπτες (εκπομπή ερυθράς φωταύγειας με χρόνο ζωής περί τα 10 ns). Όμως, έχουν σημαντικά χαμηλότερα οξειδωτικά δυναμικά διεγερμένης κατάστασης σε σχέση με τα ανάλογα του Ru(II), γεγονός το οποίο εμποδίζει την άμεση φωτοοξειδωτική τους ικανότητα [20]. Σε αντίθεση με τα ανάλογα σύμπλοκα του Os(II) και του Ru(II), το $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{3+}$ μπορεί να δράσει ως *αντίστροφος* διακόπτης φωτός (reverse light-switch), καθώς η εκπομπή του συμπλόκου αποσβένεται παρουσία DNA. Παρόλα αυτά, είναι πιο ισχυρό φωτο-οξειδωτικό από το ανάλογο σύμπλοκο του Ru(II). Πράγματι, πειράματα ηλεκτροφόρησης έδειξαν αποτελεσματικότερη διάσπαση του πλασμιδιακού DNA απουσία οξυγόνου [20].

Σημαντική αναφορά έχει γίνει και για τα διμεταλλικά σύμπλοκα του Rh(II) με dppz, όπως τα $\text{cis-}[\text{Rh}_2(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{dppz})(\eta^1\text{-O}_2\text{CCH}_3)(\text{CH}_3\text{OH})]^+$ και $\text{cis-}[\text{Rh}_2(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{dppz})_2]^{2+}$, που προκαλούν άμεση φωτοδιάσπαση του πλασμιδίου pUC18 με ακτινοβολία με ορατό φως, τόσο μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από το οξυγόνο όσο

και μη εξαρτώμενου από αυτό [54]. Φασματοσκοπικές μελέτες που έγιναν για τα ανάλογα σύμπλοκα του δι-ροδίου με $dppn$ υποκαταστάτη, αποκάλυψαν την ύπαρξη μη-εκπέμπουσας (non-emissive) $^3\pi^*(dppn)$ διεγερμένης κατάστασης. Αυτά τα σύμπλοκα επάγουν την DNA φωτοδιάσπαση, μέσω παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου [55].

Μια άλλη κατηγορία συμπλόκων με ενδιαφέρουσες ιδιότητες είναι αυτή των δι-διμινικών συμπλόκων του Cu(I), με πρωτοπόρο το $[Cu(phen)_2]^+$, που βρέθηκε ότι συνδέεται στη μικρή αύλακα του DNA και μπορεί να δράσει ως τεχνητή νουκλεάση (artificial nuclease) [56]. Η διάσπαση του DNA παρατηρείται παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την απόσπαση υδρογόνου από το σάκχαρο (κεφ. 2.5.2). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι όταν το σύμπλοκο αντιδρά με το Z-DNA, μια διαμόρφωση χωρίς μικρή αύλακα, δεν παρατηρείται καμία διάσπαση [57].

Σε αντίθεση με τα σύμπλοκα του Ru(II) και του Re(I) που συζητήσαμε παραπάνω, οι φωτοφυσικές ιδιότητες αυτών του Cu(I), φαίνεται, να εξαρτώνται από στερεοχημικές παρεμπόδισεις. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι υποκαταστάτες που προκαλούν στερεοχημική παρεμπόδιση γύρω από το κέντρο του χαλκού αυξάνουν πολύ το χρόνο ζωής της διεγερμένης κατάστασης [58,59].

2.5. Αντιδράσεις α -διμινικών συμπλόκων με DNA

Όπως σχολιάσαμε εκτεταμένα προηγουμένως, τα μεταλλικά σύμπλοκα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί ανιχνευτές σε βιολογικά συστήματα, και αυτό συγκεντρώνει όλο και μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Ωστόσο, σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης έχουν τη δυνατότητα να προσφέρουν μια πλούσια δραστηριότητα, ιδιαίτερα στο πλαίσιο της οξειδοαναγωγικής χημείας. Η χημεία αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί, ώστε να προκύψει ένας θησαυρός αντιδράσεων του DNA με μέταλλα παρεμβολείς (metallointercalator). Στην πραγματικότητα, αυτή η δραστηριότητα είναι που βοήθησε στην καθιέρωση πολλών τέτοιων συμπλόκων στο συγκεκριμένο χώρο έρευνας.

Πράγματι, τα σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης, λόγω της ποικιλίας στο συμπλεγμένο περιβάλλον τους και των «ευέλικτων» οξειδοαναγωγικών και φασματοσκοπικών ιδιοτήτων τους, είναι πολύ χρήσιμα μόρια στη διάσπαση του DNA, τόσο με οξειδωτικό, όσο και με υδρολυτικό τρόπο [16,57,60]. Η υδρολυτική διάσπαση προϋποθέτει την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων που είναι ισχυρά οξέα κατά Lewis, παρουσιάζουν εύκολη υδρολυτική διάσπαση του DNA, μοντελοποιώντας έτσι τη δραστηριότητα των περιοριστικών ενζύμων [60]. Σε αντίθεση, η οξειδωτική διάσπαση

(cleavage) επιφέρει αποσύνθεση του DNA, εξαιτίας είτε της απόσπασης ενός ατόμου υδρογόνου από το σάκχαρο, είτε εξαιτίας της οξειδωσης των βάσεων του DNA [16,57].

2.5.1. Υδρολυτική διάσπαση του κλώνου του DNA [60]

Η υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού ξεκινά με τη νουκλεόφιλη προσβολή του φωσφόρου από ένα οξυγόνο νερού, δίνοντας ένα πεντα-υποκατεστημένο φωσφορικό ενδιάμεσο. Η επακόλουθη διάσπαση είτε του P-O3' είτε του P-O5' (εξαρτάται από το καταλυτικό σύστημα), επιφέρει το σπάσιμο του κλώνου παράγοντας R-OH και R-O-PO₃H₂ άκρα. Τα πιο ικανά συστήματα είναι κάποια ειδικά ένζυμα (ενδονουκλεάσες) που δρουν είτε εσωτερικά είτε στα άκρα του DNA. Η ανακάλυψη περιοριστικών ενδονουκλεασών, που να προάγουν την υδρόλυση και στις δύο έλικες του DNA, προσελκύει το ενδιαφέρον των επιστημόνων που θέλουν να βρουν μεθόδους διάσπασης του DNA σε συγκεκριμένες θέσεις.

Η υδρόλυση απαιτεί ένα μεταλλικό συμπράγοντα ικανό να συνδέεται ισχυρά με άτομα οξυγόνου, πολώνοντας το δεσμό (κατά Lewis οξύτητα), και γρήγορους υποκαταστάτες να προωθούν τον καταλυτικό κύκλο. Η οξύτητα κατά Lewis κατιόντων μετάλλων, όπως ο Cu²⁺ και ο Zn²⁺, όχι μόνο μπορεί να ενεργοποιήσει το φωσφοδιεστερικό δεσμό για νουκλεόφιλη προσβολή, αλλά και να χαμηλώσει το pKa του συμπλεγμένου νερού, παράγοντας έτσι υδροξείδια ενωμένα με το μέταλλο κοντά στο φυσικό pH.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα διμινικού συμπλόκου μετάλλου που προκαλεί υδρολυτική διάσπαση κλώνου DNA, είναι το σύμπλοκο [Rh(phi)₂bpy']³⁺, που είδαμε προηγουμένως (§ 2.3.2, Σχήμα 2.6), μόνο που αυτή τη φορά το σύμπλοκο είναι συνδεδεμένο με ένα πεπτίδιο, μέσω του bpy υποκαταστάτη. Στο πεπτίδιο έχει συμπλεχθεί ένα ιόν Zn²⁺ με δύο ιστιδίνες. Το Zn²⁺-πεπτίδιο έχει την τάση να μεταφέρεται προς το σκελετό του DNA για υδρολυτική αντίδραση [61].

2.5.2. Οξειδωτική διάσπαση του κλώνου. Αντιδράσεις με σάκχαρο [57]

Πολλοί DNA-δεσμευτικοί παράγοντες αποσυνθέτουν το DNA μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από τη δεοξυριβόζη, παράγοντας ρίζες σακχάρων στον άνθρακα που είναι ενωμένο το άτομο υδρογόνου. Αυτές οι ρίζες μπορούν να αναδιατάσσονται πετυχαίνοντας τη διαίρεση του κλώνου των νουκλειικών οξέων. Μόρια, όπως Fe(II)·μπλεομυκίνη, μεταλλοπορφυρίνες και το [Cu(rhen)₂]⁺ που αναφέραμε προηγουμένως, έχει βρεθεί ότι συνδέονται στη μικρή αύλακα και προκαλούν

διάσπαση του κλώνου του DNA, με απόσπαση των H-1', H-4' και H-5' ατόμων υδρογόνου του δακτυλίου της δεοξυριβόζης.

Τα H-2', H-3' άτομα υδρογόνου είναι προσιτά για προσβολή από σύμπλοκα που συνδέονται στη μεγάλη αύλακα. Μία ομάδα συμπλόκων του Rh(III) έχουν σχεδιαστεί να διασπών το DNA μέσω απόσπασης του H-3'. Τα σύμπλοκα $[\text{Rh}(\text{phen})_2\text{phi}]^{3+}$, $[\text{Rh}(\text{phi})_2\text{bpy}(\text{phen})]^{3+}$ συνδέονται μέσω παρεμβολής στη μεγάλη αύλακα του DNA και παράγουν θραύσματα του κλώνου, παρουσία φωτός. Το O_2 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική διάσπαση, καθώς παράγονται διαφορετικά προϊόντα διάσπασης [16].

2.5.3. Οξειδωτικές αντιδράσεις με τις βάσεις του DNA

Η οξειδωτική διάσπαση των βάσεων του DNA, γενικά, συμβαίνει στη γουανίνη, η οποία έχει το χαμηλότερο οξειδωτικό δυναμικό από όλες τις βάσεις του DNA. Η οξειδωτική διάσπαση στη βάση της γουανίνης μπορεί να προκληθεί με έναν από τους παρακάτω τέσσερις μηχανισμούς: [16,21,22]

- Με άμεση μεταφορά ηλεκτρονίου από τη γουανίνη σε ένα δεσμευμένο μεταλλικό σύμπλοκο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της κατηγορίας αυτής αποτελούν τα ισχυρά φωτο-οξειδωτικά σύμπλοκα του Ru(II) με hat, tap, όπως συζητήσαμε στην § 2.2.3.
- Με μεταφορά οξυγόνου. Άμεση οξείδωση των βάσεων του DNA μέσω αυτού του μηχανισμού, συμβαίνει με το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{dppz})\text{O}]^{2+}$ [62].
- Ως αποτέλεσμα της αντίδρασης με οξυγόνο στην απλή του κατάσταση (singlet oxygen, $^1\text{O}_2$), το οποίο σχηματίζεται μετά από ευαισθητοποίηση ενός συμπλόκου δεσμευμένου στο DNA. Μεταλλικά σύμπλοκα μπορούν να δημιουργήσουν $^1\text{O}_2$, με μεταφορά ενέργειας από μια τριπλή διεγερμένη κατάσταση του συμπλόκου στο $^3\text{O}_2$. Τέτοια σύμπλοκα, που προσκαλούν διάσπαση DNA μέσω $^1\text{O}_2$, σαν και αυτά που σχολιάσαμε εκτεταμένα σε προηγούμενες παραγράφους, είναι ενδιαφέροντα στην φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου.
- Με μακρινής κλίμακας μεταφορά ηλεκτρονίου δια μέσου του DNA (Long range DNA-mediated electron transfer) [21]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της κατηγορίας αυτής αναφέρθηκε αναλυτικά στην § 2.3.2 (Σχήμα 2.7).

2.6. Κυτταρικές μελέτες συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης

Όπως είδαμε προηγουμένως, τέτοια σύμπλοκα μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές DNA, όμως για την εφαρμογή τους ως θεραπευτικών και διαγνωστικών παραγόντων, είναι πολύ σημαντικό να αποκτήσουμε πληροφορίες που αφορούν την κυτταρική πρόσληψη τους (cellular uptake). Αν και, όλο και περισσότερα σύμπλοκα έχουν βρει εφαρμογή σε βιολογικά συστήματα, εντούτοις οι ιδιότητες πρόσληψης τους από τα κύτταρα είναι ακόμα πολύ λίγο ανεπτυγμένες [63]. Ακόμα δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός ο τρόπος (ή οι κανόνες) σχεδιασμού τέτοιων ενώσεων που να εισέρχονται στον πυρήνα. Αρκετές ομάδες προτείνουν ότι η πρόσληψη των συμπλόκων στα κύτταρα είναι μια συνάρτηση της λιποφιλικότητας (lipophilicity) των βοηθητικών υποκαταστατών [64]. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι σύμπλοκα με τη μεγαλύτερη λιποφιλικότητα εμφανίζουν τη μεγαλύτερη κυτταρική πρόσληψη [65].

Όσον αφορά τα τρικαρβόνυλο σύμπλοκα του Re(I) με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες, οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις επιπτώσεις του φορτίου και της λιποφιλικότητας των συμπλόκων στην κυτταρική τους πρόσληψη, τον εντοπισμό (cellular localisation) και την κυτταροτοξική τους δράση. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscopy) έδειξαν ότι τα περισσότερα από τα καντιονικά σύμπλοκα εισέρχονται σε κύτταρα θηλαστικών (mammalian cells) με παθητική διάχυση (passive diffusion) [18]. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα σύμπλοκα δεσμεύονται στο γλυκοκάλυκα (glycocalyx) και δεν μπορούν να εισέλθουν στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Ειδικότερα, κατιοντικά λιποφιλικά σύμπλοκα του Re(I) εντοπίζονται στις υδρόφοβες μεμβράνες των οργανιδίων, ενώ κατιοντικά ηλεκτροφιλικά σύμπλοκα εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια. Ανιοντικά σύμπλοκα του Re(I) συσσωρεύονται στην εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης ή δεν παρουσιάζουν καμία πρόσληψη ακόμα και αν έχουν πολύ λιπόφιλες ομάδες [18].

Δεδομένου λοιπόν, ότι η κυτταρική πρόσληψη αυτών των συμπλόκων είναι άμεσα συνδεδεμένη με το φορτίο και τη λιποφιλικότητα τους, οι δομικές και φωτοφυσικές ιδιότητες μπορούν να ελεγχθούν μέσω της χρήσης από ένα ευρύ φάσμα διμινικών και μονο-δοντικών υποκαταστατών, κάτι το οποίο θα επηρεάσει την απόδοση της κυτταρικής πρόσληψης και ενδεχομένως την εξειδίκευση.

2.6.1. Κυτταροτοξικότητα συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης

Η ανακάλυψη του cisplatin στη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών. Όμως η τοξικότητα του cisplatin και άλλων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων είναι ανεπιθύμητη για την ασθένεια, κάτι που ώθησε τους χημικούς στη σύνθεση νέων DNA-δεσμευτικών παραγώγων.

Συγκεκριμένα, σύμπλοκα παρεμβολείς στο DNA βασισμένα στο Pt(II) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία του καρκίνου με καλά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, σύμπλοκα Pt(II) που περιέχουν υποκατεστημένους φαινανθρολινικούς υποκαταστάτες, είναι ενδιαφέροντα, εξαιτίας της πιθανής χρήσης τους ενάντια στον καρκίνο και των βακτηριακών και μυκητιακών λοιμώξεων [66,67]. Σε αντίθεση με το cisplatin, αυτοί οι υποκαταστάτες και τα αντίστοιχα μεταλλικά σύμπλοκα τους, αλληλεπιδρούν με το DNA με αρωματικό π-στοίβαγμα ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων. Επιπλέον, η 1,10-φαινανθρολίνη-5,6-διόνη (phendione), τόσο σε ελεύθερη μορφή (χωρίς μέταλλο) όσο και ως υποκαταστάτης (συμπλεγμένη με μέταλλο), επιδεικνύει σημαντική αντικαρκινική αλλά και αντιβακτηριακή δραστηριότητα. Πρόσφατα, έχει μελετηθεί η αντικαρκινική δραστηριότητα της phendione και μια σειρά συμπλόκων της με Cu(II), Ag(I), Mn(II) [68-70]. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, αυτά τα σύμπλοκα παρουσιάζουν εξαιρετική βιολογική δραστηριότητα και αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία ενώσεων DNA-στόχων, ικανών να αναστείλουν τη σύνθεση νουκλεοτιδίων.

Επιπλέον, σύμπλοκα του ρουθηνίου είναι ευρύτατα διαδεδομένα στη θεραπεία του καρκίνου και πιθανόν να υπερέχουν σε αριθμό, μόνο αυτά του λευκοχρύσου που έχουν αναφερθεί πάρα πολλά. Για τα σύμπλοκα του τύπου $[(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{L})(\text{pp})]^{n+}$ με $\text{pp} = \text{dprq}$, dpprz , dpprn [όπου για $\text{L} = \text{Cl}$, $n=1$, και για $\text{L} = (\text{NH}_2)_2\text{CS}$, $n=2$, και $\text{dprq} = \text{dipyrido}[3,2\text{-d}:2',3'\text{-f}]\text{quinoxaline}$, (βλ. Σχήμα 2.1 για δομή υποκαταστατών)] έχουν μελετηθεί οι κυτταροτοξικές τους ιδιότητες ως προς τα ανθρώπινα κύτταρα HT-29 (colon cancer) και MCF-7 (καρκίνος του μαστού) και βρέθηκε ότι είναι ισχυρά εξαρτώμενες από την επιφάνεια του αρωματικού συστήματος. Για παράδειγμα, στα χλώρο-σύμπλοκα, η τιμή IC_{50} ελαττώνεται για τα κύτταρα MCF-7 καθώς το μέγεθος του πολυπυριδινικού υποκαταστάτη μεγαλώνει κατά σειρά $\text{dprq} < \text{dpprz} < \text{dpprn}$ [71].

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της επιφάνειας του υποκαταστάτη στην κυτταρική απόπτωση και κυτταροτοξικότητα, μελετήθηκαν τα σύμπλοκα $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pp})]\text{Cl}_2$, $\text{pp} = \text{dpy}$, phen , dprq , dpprz και dpprn , ως προς τα ανθρώπινα κύτταρα HT-29, MCF-7. Η αποδοτικότητα της κυτταρικής απόπτωσης και η κυτταροτοξικότητα βρέθηκε να

αυξάνεται με το μέγεθος του πολυπυριδινικού υκοκαταστάτη, αλλά παρόλα αυτά μόνο το dppr σύμπλοκο βρέθηκε να έχει παρόμοια IC₅₀ με το cisplatin [72].

2.6.2. Φωτο-τοξικότητα συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης

Οι μοναδικές φωτοφυσικές και οξειδοαναγωγικές ιδιότητες της διεγερμένης κατάστασης των ανωτέρω συμπλόκων μπορούν να προκαλέσουν πολύ ενδιαφέρουσες φωτοχημικές αντιδράσεις, καθιστώντας τα εξαιρετικά ενδιαφέροντα στη χρήση τους ως φωτοευαίσθητοποιητών στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου (PDT).

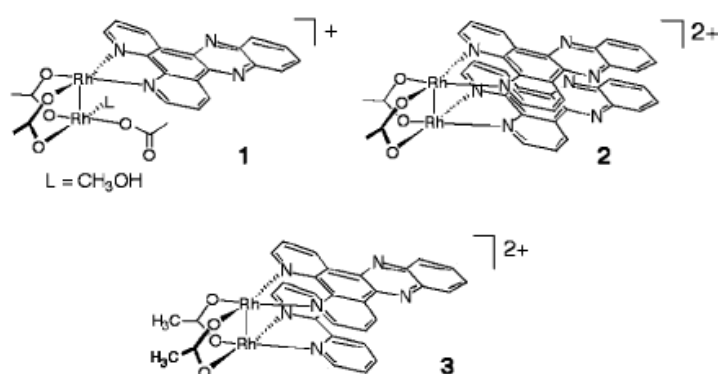
Πράγματι, για τα σύμπλοκα [Ru(bpy)₃]²⁺ και [Ru(phen)₃]²⁺ βρέθηκε ότι αν και σε συνθήκες σκότους δεν μπορούν να περάσουν ανέπαφα την κυτταρική μεμβράνη, υπό ακτινοβολήση με ορατό φως παρατηρείται απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης (membrane integrity), και μάλιστα μέσω μηχανισμού που περιλαμβάνει την παραγωγή μονήρους οξυγόνου (μηχανισμός τύπου II) [73]. Ο φωτο-επαγόμενος κυτταρικός θάνατος παρατηρήθηκε για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0.2 mM και ακτινοβολήση στα 457 nm.

Ο A. R. Chakravarty με την ομάδα του [74], διερεύνησαν μια σειρά φαινανθρολινικού τύπου (phen, dpq, dppz) συμπλόκων του Fe(III) ως νέα φωτο-δραστικά είδη, έχοντας μια λιπόφιλη ομάδα τριτοταγούς βουτηλίου (2-bis-[3,5-di(*tert*-butyl)-2-hydroxybenzyl]aminoacetic acid). Το dppz παράγωγο, το οποίο είναι μη τοξικό στο σκοτάδι (dark IC₅₀>100 μM), γίνεται εξαιρετικά τοξικό κατά την ακτινοβολήση τόσο με ορατό (IC₅₀=3.59 μM) όσο και με UV-A φως (IC₅₀=0.25 μM) στα HeLa και στα HaCaT κύτταρα.

Πολύ πρόσφατα, ο ίδιος παρουσίασε την φωτο-τοξικότητα μιας σειράς συμπλόκων του οξοβαναδίου(IV) με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες [75,76]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι μόνο τα παράγωγα με dppz έδειξαν έντονη PDT δραστικότητα, αφού η κυτταροτοξικότητα τους αυξήθηκε κατά την φωτο-διέγερση με ορατό φως. Επιπλέον, πειράματα χρώσης με propidium iodide έδειξαν ότι η απόπτωση είναι ο βασικός μηχανισμός κυτταρικού θανάτου.

Επιπλέον, έχουν μελετηθεί πολλά σύμπλοκα δι-ροδίου(II) ως προς την φωτο-τοξικότητα τους σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές, με πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα [77,78]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η τοξικότητα του *cis*-[Rh₂(μ-O₂CCH₃)₂(dppz)(*n*¹-O₂CCH₃)(CH₃OH)]⁺ (σύμπλοκο **1** στο Σχήμα 2.8) ως προς τα Hs-27 ανθρώπινα επιδερμικά κύτταρα (human skin cells) είναι όμοια και στο σκοτάδι, αλλά και μετά από

ακτινοβόληση. Αντίθετα, για το cis - $[Rh_2(\mu-O_2CCH_3)_2(dppz)_2]^{2+}$ (σύμπλοκο **2** Σχήματος 2.8) παρατηρείται αύξηση της τοξικότητας μετά από ακτινοβόληση (από 135 μ M στο σκοτάδι σε 39 μ M) [54]. Αν και η διαφορά της τοξικότητας για το **2** μετά από φωτόλυση είναι αρκετά μεγάλη, απαιτείται ακόμα μεγαλύτερη για μια ένωση υποψηφία για την PDT. Κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε για το σύμπλοκο cis - $[Rh_2(\mu-O_2CCH_3)_2(bpy)(dppz)]^{2+}$ (**3**) με το IC_{50} να είναι 208 μ M στο σκοτάδι και 44 μ M υπό ακτινοβόληση (έκθεση 30 min, 400-700 nm), δηλαδή παρατηρήθηκε αύξηση της τοξικότητας κατά 79 %. Ανάλογη αύξηση (82 %) παρατηρήθηκε και για την αιματοπορφυρίνη, που είναι το κύριο συστατικό ενός ήδη χρησιμοποιούμενου PDT φαρμάκου του Photofrin [79].



Σχήμα 2.8. Δομές των διμεταλλικών συμπλόκων του Rh(II).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ Re(I) ΜΕ α -ΔΙΙΜΙΝΙΚΟΥΣ

ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ

3.1. Γενικά

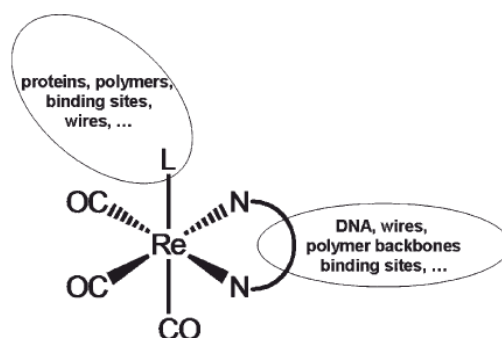
Τα τρικαρβονυλικά σύμπλοκα του Re(I) με α -διιμινικούς υποκαταστάτες του τύπου *fac*-Re(CO)₃(α -διιμίνη)L^{0/+}, όπου L είναι κάποιος αξονικός υποκαταστάτης ουδέτερος ή φορτισμένος, αποτελούν το επίκεντρο του ενδιαφέροντος για πολλά χρόνια, εξαιτίας κυρίως των μοναδικών φωτοφυσικών και φωτοχημικών ιδιοτήτων τους. Ο υποκαταστάτης L μπορεί να είναι κάποιο αλογονίδιο, ή οργανικός υποκαταστάτης (όπως πυριδίνη), ή ακόμα και μεταλλικό μόριο (όπως Ph₃Sn). Τα σύμπλοκα του Re(I) μπορεί να είναι ουδέτερα ή θετικά φορτισμένα, όταν ο αξονικός υποκαταστάτης L είναι ανιόν ή ουδέτερος, αντίστοιχα (Σχήμα 3.1) [80-82].

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο χαρακτήρας της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης των συμπλόκων του τύπου αυτού μπορεί να μεταβάλλεται από MLCT έως και IL, ανάλογα με το είδος της διιμίνης και του αξονικού υποκαταστάτη L. Για παράδειγμα, στις περιπτώσεις όπου η διιμίνη είναι η bpy ή η phen και ο L είναι κάποιος ηλεκτρονιοδοτικός υποκαταστάτης, η χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση έχει χαρακτήρα MLCT, ενώ για σύμπλοκα όπου ο L είναι ένας εύκολα οξειδούμενος υποκαταστάτης, η LLCT (L \rightarrow π^* διιμίνη) διεγερμένη κατάσταση είναι η χαμηλότερα κείμενη [80].

Ο συνδυασμός ποικίλης και ελεγχόμενης φωτοδραστικότητας με τη χημική σταθερότητα και με τη συνθετική ευελιξία των συμπλόκων του τύπου αυτού, κάνουν τα σύμπλοκα αυτά πολύ ελκυστικά ως φωτο-ευαισθητοποιητές και ανιχνευτές βιομορίων (Σχήμα 3.1) [80,82]. Μπορούν να προσκολληθούν σε πρωτεΐνες, να ενσωματωθούν σε αγώγιμα πολυμερή, μοριακά καλώδια (molecular wire), σε υγρούς κρυστάλλους, στο DNA, ή να συνδεθούν με ειδικές δεσμευτικές μονάδες υποστρωμάτων, είτε μέσω του αξονικού υποκαταστάτη L, είτε μέσω τροποποίησης της α -διιμίνης.

Η δυνατότητα που υπάρχει να τροποποιούνται ελεγχόμενα οι ιδιότητες και ο χαρακτήρας της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης των συμπλόκων αυτών με τη μεταβολή του αξονικού υποκαταστάτη L, αποτελεί το βασικότερο πλεονέκτημα της χρήσης τους ως φωτο-ευαισθητοποιητές. Η ανακάλυψη ότι το σύμπλοκο Re(CO)₃(bpy)Cl

μπορεί να δράσει και ως φωτο-ευαισθητοποιητής και ως ένας ομογενής καταλύτης στην αναγωγή του CO₂ [83], έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας σειράς συμπλόκων του τύπου *fac*-Re(CO)₃(α -διμίνη)L^{0/+}, τα όποια απορροφούν και εκπέμπουν σε σχετικά υψηλές ενέργειες σε σχέση με τα ανάλογα σύμπλοκα του Ru(II) και του Os(II). Επιπλέον, η *cis/trans* φωτο-επαγόμενη ισομερίωση των συμπλόκων *fac*-Re(CO)₃(α -διμίνη)L^{0/+} ως προς τον υποκαταστάτη L ανοίγει το πεδίο για τη χρήση τους ως φωτοδιακόπτες [84]. Το πιο πρόσφατο, όμως, ενδιαφέρον των συμπλόκων αυτών, είναι η εφαρμογή τους ως μοριακοί και βιολογικοί ανιχνευτές και μοριακοί διακόπτες φωτός για το DNA και άλλα βιομόρια [18] (έχουμε αναφερθεί διεξοδικά σε προηγούμενο κεφάλαιο), καθώς και ως διαγνωστικά και θεραπευτικά ραδιοφάρμακα [85,86].



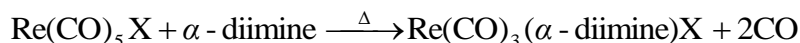
Σχήμα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων του τύπου *fac*-Re(CO)₃(α -διμίνη)L^{0/+}. Αυτές οι δομικές μονάδες μπορούν να συνδεθούν με βιομόρια ή να ενσωματωθούν σε μοριακές διατάξεις μέσω του αζονικού υποκαταστάτη L, ή της N[^]N διμίνης [82].

3.2. Μέθοδοι σύνθεσης συμπλόκων του τύπου *fac*-Re(CO)₃(α -διμίνη)L^{0/+}

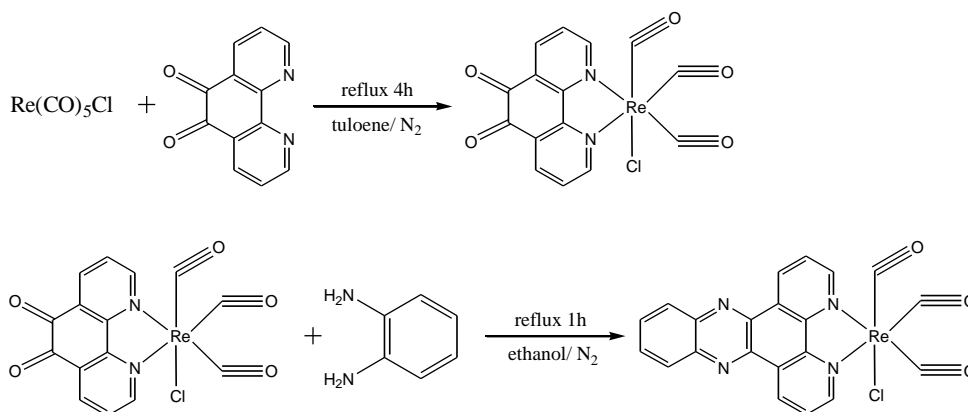
Ένα από τα πλεονεκτήματα των συμπλόκων του τύπου *fac*-Re(CO)₃(α -διμίνη)L^{0/+}, που ευνοεί τη διερεύνηση των ιδιοτήτων τους και την ανάπτυξη των εφαρμογών τους σε διάφορους τομείς, είναι η μεγάλη ευελιξία στη σύνθεσή τους [80-81]. Έτσι, βρίσκουμε στη βιβλιογραφία πολλά διαφορετικά σύμπλοκα της παραπάνω κατηγορίας με μια ποικιλία υποκαταστατών στη θέση του αζονικού L, από ανιοντικούς υποκαταστάτες, όπως άτομα αλογόνου ή το -CN⁻, έως ουδέτερους υποκαταστάτες, όπως φωσφίνες, παράγωγα πυριδινών, ισονιτρίλια, αλκύλια ή μεταλλικά τμήματα, όπως π.χ. Ph₃Sn, M(CO)₅ (με M: Re, Mn) κτλ. Όσον αφορά την ταυτότητα της διμίνης, και εκεί οι δυνατότητες είναι πολύ μεγάλες.

Η γενική μέθοδος παρασκευής των συμπλόκων *fac*-Re(CO)₃(α -διμίνη)X (όπου X: F, Cl, Br, I), περιλαμβάνει μια απλή αντίδραση υποκατάστασης μεταξύ του εμπορικά

λαμβανομένου αντίστοιχου συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_5\text{X}$ και της επιθυμητής διμίνης σε συνθήκες που συνήθως περιλαμβάνουν βρασμό με αναρροή και υπό Ar , όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση [80,87]:

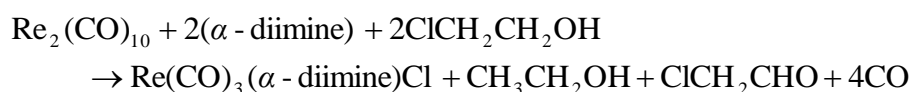


Στην περίπτωση που η διμίνη είναι δύσκολο να παρασκευαστεί ξεχωριστά, η στρατηγική που ακολουθείται περιλαμβάνει αρχικά την αντίδραση ενός πρόδρομου μορίου της επιθυμητής διμίνης με το $\text{Re}(\text{CO})_5\text{X}$ και στη συνέχεια την αντίδραση ενός δεύτερου πρόδρομου οργανικού μορίου με το συμπλεγμένο υποκαταστάτη, με αποτέλεσμα η επιθυμητή διμίνη να συντίθεται, ενώ ένα τμήμα της είναι ήδη συμπλεγμένο, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})\text{Cl}$ (Σχήμα 3.2) [42].



Σχήμα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση της πορείας σύνθεσης του συμπλόκου $\text{fac}-(\text{dppz})\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3\text{Cl}$. Αρχικά, η 1-10-φαινανθρολίνη-5,6-διόνη συμπλέκεται στο μεταλλικό κέντρο και εν συνεχεία αντιδρά, με μια αντίδραση συμπύκνωσης, με την ο-φαινυλενοδιαμίνη, δημιουργώντας τελικά τον dppz υποκαταστάτη.

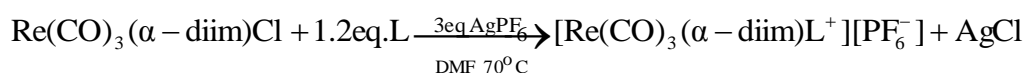
Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ένας διαφορετικός τρόπος σύνθεσης συμπλόκων του τύπου αυτού και αφορά την αντίδραση του $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$ με Cl_2 και την αντίστοιχη διμίνη σε 2-χλωροαιθανόλη και βρασμό υπό αναρροή για 24h, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση [88]:



Ο μηχανισμός της αντίδρασης αυτής δεν έχει διερευνηθεί ακόμα, είναι όμως πιθανό να παράγεται αρχικά το αντίστοιχο διμερές $[\text{Re}(\text{CO})_3(\alpha\text{-diimine})]_2$. Η ίδια αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε 1-πεντανόλη παρουσία CO_2 και HCl .

Τα σύμπλοκα του τύπου $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})L^{0/+}$, όπου L είναι οποιοσδήποτε υποκαταστάτης εκτός αλογόνου (συνήθως σ-δότης, π-δέκτης όπως το ανιόν CN^- ή κάποιο νιτρίλιο ή κάποιο παράγωγο πυριδίνης), μπορούν να παρασκευαστούν με την άμεση μετατροπή του $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})Cl$ στο τελικό σύμπλοκο με τον επιθυμητό υποκαταστάτη L. Έως τώρα, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι σύνθεσης συμπλόκων $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})L^{0/+}$, με πρόδρομο μόριο το $Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})Cl$.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε από τον K. S. Schanze [81], περιλαμβάνει την άμεση αντίδραση του χλώρο συμπλόκου με μικρή περίσσεια του μονοσχιδούς υποκαταστάτη L παρουσία περίσσειας $AgPF_6$, αποδίδοντας δυσδιάλυτο λευκό στερεό $AgCl$, σύμφωνα με την αντίδραση:



Γενικά, οι αποδόσεις αυτής της αντίδρασης κυμαίνονται από 20 έως 50%, ενώ η αντίδραση μπορεί εύκολα να παρακολουθηθεί με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), με διαλύτη έκλουσης 5% $MeOH/CH_2Cl_2$ σε silica gel ή 20% $MeCN/CH_2Cl_2$ σε alumina.

Μια άλλη μέθοδος περιλαμβάνει την παρασκευή και απομόνωση του ενδιάμεσου συμπλόκου $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})(CF_3SO_3)$ (από την αντίδραση του αντίστοιχου χλώρο συμπλόκου με $AgCF_3SO_3$), το οποίο εν συνεχεία αντιδρά με περίπου ένα ισοδύναμο του υποκαταστάτη L, με βρασμό υπό αναροή σε $EtOH$ ή THF . Ένα πρόβλημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι η αντίδραση δεν μπορεί να παρακολουθηθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), γιατί το άμεσο προϊόν της αντίδρασης, το $[Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})L^+][CF_3SO_3^-]$, είναι ένα τριφθορομεθανικό σουλφονικό άλας, που έχει $RF=0$ σε alumina ή silica gel [80].

Εναλλακτικά, αντί του $Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})(CF_3SO_3)$ ενδιάμεσου, χρησιμοποιείται άλλη αποχωρούσα ομάδα, όπως το $MeCN$ ή το $DMSO$ [89], με διαφορετικά αντισταθμιστικά ιόντα, όπως το PF_6^- , BF_4^- , κάνοντας τη μέθοδο πιο ευέλικτη και αποτελεσματική.

3.3. Φωτοφυσικές ιδιότητες συμπλόκων του τύπου $fac-Re(CO)_3(\alpha\text{-διιμίνη})L^{0/+}$ [80-82]

Οι ιδιότητες των διεγερμένων καταστάσεων των τρικαρβόνυλο συμπλόκων του $Re(I)$ που περιέχουν δισχιδώς συνδεδεμένες α -διιμίνες, μελετήθηκαν αρχικά στα μέσα του 1970 από τους Wrighton και Morse [87] και έκτοτε η φασματοσκοπική, η φωτοχημική και η

φωτοφυσική συμπεριφορά των συμπλόκων αυτών συνεχίζουν να προσελκύουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον.

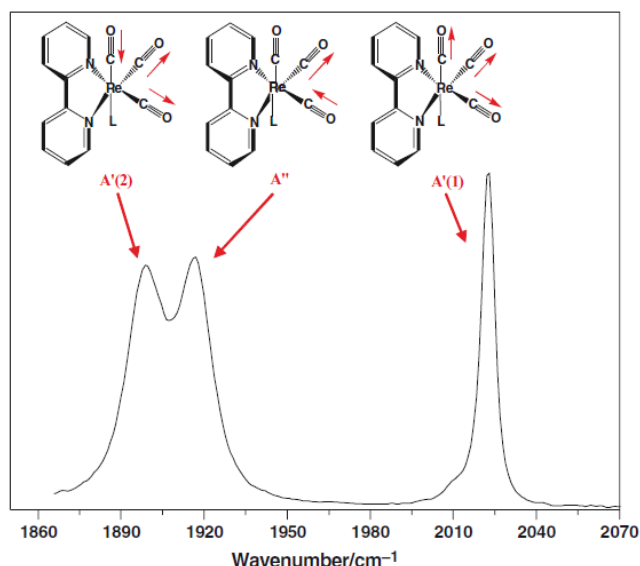
3.3.1. UV-Vis φασματοσκοπία [90]

Τα φάσματα απορρόφησης των συμπλόκων αυτών εμφανίζουν ταινίες στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους, που αντιστοιχούν σε MLCT, μικτή MLCT/LLCT (γενικά καλούνται MLLCT) και $\Pi_{(\alpha\text{-διμίνης})}$ μεταπτώσεις. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οι ταινίες μεταφοράς φορτίου (CT) βρίσκονται σε σχετικά μεγαλύτερο μήκος κύματος (330-400 nm, με $\epsilon \sim 2000\text{-}5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), από τις ισχυρότερης έντασης Π ταινίες, που εμφανίζονται στα 320 nm για διμινικό υποκαταστάτη την bry. Αρκετές φορές μάλιστα, έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο η μεταφοράς φορτίου ταινία να επικαλύπτεται από την ουρά της ισχυρής σε ένταση Π κορυφής. Η MLCT μετάπτωση παρουσιάζει διαλυτοχρωμισμό και μετατοπίζεται συνήθως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (μικρότερη ενέργεια) καθώς ελαττώνεται η πολικότητα του διαλύτη.

Η χαμηλότερη επιτρεπτή μετάπτωση έχει συμμετρία A' , και συνήθως είναι η δεύτερη απλή διεγερμένη κατάσταση. Μεταπτώσεις στη χαμηλότερη απλή κατάσταση έχουν αμελητέα ισχύ ταλάντωσης (oscillator strength). Για $L=$ παράγωγα πυριδίνης, οι δύο χαμηλότερες απλές καταστάσεις έχουν κυρίως $\text{Re}(\text{CO})_3 \rightarrow (\alpha\text{-διμίνης})$ MLCT χαρακτήρα, ενώ η μικτή MLCT/LLCT (συχνά καλείται MLLCT) επικρατεί για $L=$ αλογονίδιο ή NCS.

3.3.2. IR φασματοσκοπία [90]

Τα φάσματα IR των συμπλόκων του τύπου αυτού έχουν τρεις ταινίες εξαιτίας της δόνησης τάσης του $\text{C}\equiv\text{O}$, $\nu(\text{CO})$ στην περιοχή $\sim 1900 - 2040 \text{ cm}^{-1}$, οι οποίες αναπαριστάνονται στο Σχήμα 3.3. Η ταινία υψηλότερης ενέργειας αντιστοιχεί σε μια απόλυτα συμμετρική εντός επιπέδου (in-phase) $\nu(\text{CO})$ δόνηση, αποδιδόμενη ως $A'(1)$. Οι δύο χαμηλότερες ταινίες οφείλονται στην εκτός επιπέδου (out of phase) συμμετρική δόνηση $A'(2)$ και την ασύμμετρη δόνηση των ισημερινών CO υποκαταστατών, A'' . Αυτές οι δύο δονήσεις εμφανίζονται σε παρόμοιες ενέργειες και ο διαχωρισμός των αντίστοιχων ταινιών εξαρτάται από τον αξονικό υποκαταστάτη L. Δύο καλώς διαχωριζόμενες ταινίες εμφανίζονται σε σύμπλοκα όταν ο υποκαταστάτης είναι κάποιο αλογονίδιο, O-, ή P-coordinated. Αντίθετα, οι ταινίες $A'(2)$ και A'' συγχωνεύονται σε μία ευρεία ταινία αν ο L είναι N-coordinated, όπως πυριδίνη, ιμιδαζόλιο, ή NCS.



Σχήμα 3.3. FTIR φάσμα του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})\text{Cl}$ σε MeCN και οι αντίστοιχες $\nu(\text{CO})$ δονήσεις.

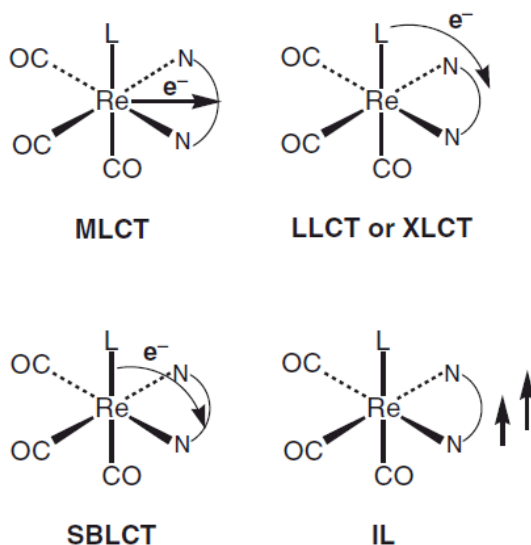
Αυτή η υψηλή ευαισθησία των $\nu(\text{CO})$ δονητικών ενεργειών στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα, θα παρείχε λεπτομερείς πληροφορίες για το χαρακτήρα της χαμηλότερα κείμενης διεγερμένης κατάστασης, αν μετά από διέγερση του συμπλόκου μελετούσαμε τις μετατοπίσεις των ζωνών IR. Ποιοτικά, μειώνοντας την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του μορίου $\text{Re}(\text{CO})_3$ μετατοπίζονται οι ταινίες $\nu(\text{CO})$ σε μεγαλύτερη ενέργεια (αύξηση $\nu(\text{CO})$ συχνότητας) εξαιτίας της $\text{Re} \rightarrow \text{CO}$ π οπισθοσύνδεσης. Η αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο $\text{Re}(\text{I})$ επιφέρει το αντίθετο αποτέλεσμα. Εν ολίγης, η μερική οξειδωση και αναγωγή του ατόμου του Re μετατοπίζει τις $\nu(\text{CO})$ δονήσεις σε υψηλότερη και χαμηλότερη ενέργεια, αντίστοιχα. Οι $\nu(\text{CO})$ ενέργειες είναι αρκετά ευαίσθητες για να ανιχνεύσουν ακόμα και μικρές αλλαγές της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην περιοχή του μορίου $\text{Re}(\text{CO})_3$ όπως αυτές των $\pi \rightarrow \pi^*$ διεγέρσεων της α -διμίνης. Πάνω σε αυτό το θέμα έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες από τον M. W. George και την ομάδα του χρησιμοποιώντας picosecond και nanosecond time-resolved IR φασματοσκοπία, και έχουν εξαχθεί χρήσιμα συμπεράσματα [91,92].

3.3.3. Φωτοφυσικές ιδιότητες [80-82,90]

Είναι φανερό ότι οι φωτοχημικές και οι φωτοφυσικές ιδιότητες των $\text{fac-Re}(\text{CO})_3(\alpha\text{-διμίνη})\text{L}^{0/+}$ εξαρτώνται άμεσα από τη φύση τόσο της διμίνης, όσο και του αξονικού υποκαταστάτη, καθιστώντας αυτά τα σύμπλοκα πολύ ικανά φωτοδραστικά υλικά που θα μπορούσαν να συμμετέχουν σε διάφορες φωτο-προκαλούμενες διαδικασίες. Στην πλειονότητα των φωτοχημικών διαδικασιών περιλαμβάνεται μεταφορά ηλεκτρονίου, με

τις πρώτες μελέτες να δείχνουν ότι η διεγερμένη κατάσταση των συμπλόκων αυτών είναι τόσο ισχυρά αναγωγική όσο και οξειδωτική. Οι διεγερμένες καταστάσεις, των συμπλόκων αυτού του τύπου, έχουν συνήθως αρκετά μεγάλο χρόνο ζωής (ns–μs) και μπορούν να εμπλακούν σε γρήγορες αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου ή ενέργειας, παρόμοιες με εκείνες της γνωστής οικογένειας $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ και παρόμοιων πολυπυριδινικών συμπλόκων.

Η φωτοφυσική συμπεριφορά τους καθορίζεται από το χαρακτήρα της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης. Καταρχήν, η παρουσία μιας ηλεκτρονικά δεκτικής α-διμίνης στη σφαίρα ένταξης του συμπλόκου επιτρέπει ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μεταφοράς φορτίου που εστιάζονται στον διμινικό υποκαταστάτη, ενώ η προέλευση του διεγερμένου ηλεκτρονίου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του αξονικού υποκαταστάτη. Έχει δειχθεί ότι η συμπεριφορά αυτών των συμπλόκων μπορεί ουσιαστικά να χωριστεί σε τέσσερις κατηγορίες ως προς τη φύση των διεγερμένων καταστάσεων, που φαίνονται σχηματικά στο Σχήμα 3.4.



Σχήμα 3.4. Ο χαρακτήρας των πιο συχνά απαντώμενων διεγερμένων καταστάσεων που συναντώνται στα σύμπλοκα του τύπου αυτού.

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

Στα περισσότερα σύμπλοκα αυτού του τύπου η χαμηλότερα κείμενη διεγερμένη κατάσταση αποδίδεται ως $d\pi(\text{Re}) \rightarrow \pi^*$ (α-διμίνη) MLCT. Ο αξονικός υποκαταστάτης L μπορεί να είναι π-δέκτης, π-ουδέτερος, ή πολύ ασθενής π-δότης. Όμως, όσο αυξάνεται η π-δεκτική ικανότητα του L, τόσο μετατοπίζεται η MLCT απορρόφηση και εκπομπή σε

υψηλότερες ενέργειες και μεγαλώνει ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης. Η αύξηση της ενέργειας της MLCT κατάστασης μπορεί να ελαχιστοποιήσει την ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στην MLCT και την IL διεγερμένη κατάσταση που βρίσκεται υψηλότερα.

L→α-διμίνη υποκαταστάτης προς υποκαταστάτη μεταφορά φορτίου (LLCT)

Μία διεγερμένη κατάσταση τύπου LLCT (μερικές φορές αναφέρεται σαν XLCT αν ο L είναι κάποιο αλογονίδιο) συμβαίνει σε σύμπλοκα που ο αξονικός υποκαταστάτης φέρει ένα αναγωγικό κομμάτι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})(\text{py-PTZ})]^+$ [93], όπου $\text{py-PTZ}=10\text{-}(4\text{-πικολυνο})\text{-φαινοθιαζίνη}$. Με διέγερση του συμπλόκου, συμβαίνει πρώτα μία ($\text{Re} \rightarrow \text{bpy}$) MLCT μετάπτωση, ενώ εν συνεχεία παρατηρείται μεταφορά ηλεκτρονίου από το py-PTZ στο Re^{II} . Το μόριο που παράγεται μπορεί να δώσει μία $\text{py-PTZ} \rightarrow \text{bpy}$ LLCT διεγερμένη κατάσταση. Αυτή η LLCT κατάσταση μεταπίπτει στη θεμελιώδη με μια άλλη ενδομοριακή μεταφορά ηλεκτρονίου $\text{bpy}^- \rightarrow \text{py-PTZ}^+$. Η άμεση $\text{py-PTZ} \rightarrow \text{bpy}$ LLCT μετάπτωση είναι εξαιρετικά ασθενής. Να σημειωθεί ότι ο οξειδωμένος L^+ μπορεί να υποστεί χημικές αντιδράσεις, που μπορούν να οδηγήσουν σε συνθετική ή καταλυτική χρήση.

Στις MLCT μεταπτώσεις συζητήσαμε την επίδραση των ισχυρά π-δεκτικών αξονικών υποκαταστατών. Όμως, οι π-δοτικοί υποκαταστάτες επηρεάζουν τη φύση των διεγερμένων καταστάσεων. Έτσι, η αύξηση της π-δοτικής ικανότητας ενός αξονικού υποκαταστάτη μας επιτρέπει τη ρύθμιση της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης από MLCT σε LLCT, μέσω της μίξης των κατειλημμένων dπ τροχιακών του μετάλλου και των ρπ τροχιακών του αξονικού υποκαταστάτη. Αυτό παρατηρείται άμεσα στα σύμπλοκα όπου ο αξονικός υποκαταστάτης είναι κάποιο αλογονίδιο. Συγκεκριμένα, για τα σύμπλοκα *fac-Re(CO)₃(α-διμίνη)Cl* τα HOMO τροχιακά έχουν κυρίως dπ χαρακτήρα μετάλλου, κάτι που οδηγεί σε μία $\text{Re} \rightarrow \pi^*(\alpha\text{-διμίνη})$ MLCT μετάπτωση, ενώ για τα αντίστοιχα ιώδο-σύμπλοκα τα HOMO τροχιακά έχουν κυρίως χαρακτήρα ρπ, που οδηγεί σε μία $\text{L} \rightarrow \pi^*(\alpha\text{-διμίνη})$ LLCT μετάπτωση [94].

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

Σύμπλοκα με αξονικούς υποκαταστάτες που έχουν ένα υψηλά κείμενο ενεργειακό τροχιακό, όπως είναι τα αλκυλικά, τα βενζυλικά, ή τα μεταλλικά τμήματα σχηματίζουν ομοιοπολικούς σ-δεσμούς M-L. Το αντίστοιχο κατειλημμένο σ-δεσμικό τροχιακό συχνά βρίσκεται ενεργειακά υψηλότερα από τα dπ τροχιακά του μετάλλου και ως εκ τούτου οδηγεί σε μια $\sigma \rightarrow \pi^*$ χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση. Αυτός ο τύπος μετάπτωσης

μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετική φωτοχημική δραστηριότητα, εξαιτίας της ομόλυσης του δεσμού M–L, παράγοντας ρίζα L[•].

Ενδομοριακές ππ* μεταπτώσεις στο εσωτερικό της α-διμίνης (IL)

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

Τα σύμπλοκα του τύπου [Re(α-διμίνη)(CO)₃Cl] (όπου α-διμίνη = phen, bpy) είναι γνωστό ότι κατέχουν μια MLCT ως τη χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση. Όμως, η ένταξη ενός εκτεταμένου και απεντοπισμένου π αρωματικού συστήματος, όπως ο dppz, έχει ως αποτέλεσμα περισσότερο πολύπλοκες και πολλαπλές διεγερμένες καταστάσεις, και η απόδοση της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης αυτών των συμπλόκων είναι λιγότερο ξεκάθαρη. Αυτές οι καταστάσεις μπορούν να θεωρηθούν ότι είναι: IL(π→π*), φαινανθρολινικού χαρακτήρα MLCT [MLCT(phen)] και φαιναζινικού χαρακτήρα MLCT [MLCT(phz)] [92,95]. Οι δύο MLCT δείχνουν να έχουν τελείως διαφορετικές κβαντικές αποδόσεις εκπομπής. Η MLCT(phen) εκπέμπει φωταύγεια (emissive MLCT), ενώ η MLCT(phz) όχι, για το λόγο αυτό καλείται «σκοτεινή» κατάσταση (dark state).

Η φύση της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης των συμπλόκων με τέτοιους υποκαταστάτες (όπως ο dppz) θα καθοριστεί από τις σχετικές ενέργειες των καταστάσεων μεταφοράς φορτίου και των IL καταστάσεων, οι οποίες εξαρτώνται, όχι μόνο από τη διμίνη, αλλά και από τον αξονικό υποκαταστάτη ή ακόμα και από το διαλύτη ή τη θερμοκρασία [92]. Γενικά, ο IL χαρακτήρας της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης ενισχύεται παρουσία ασθενών σ-δοτικών και ισχυρών π-δεκτικών αξονικών υποκαταστατών, όπως οι φωσφίνες, τα νιτρίλια ή τα ισονιτρίλια, τα οποία μετατοπίζουν τις καταστάσεις μεταφοράς φορτίου σε υψηλότερη ενέργεια. Όμως, σύμπλοκα με π-ουδέτερους ή π-δοτικούς αξονικούς υποκαταστάτες μπορεί να έχουν περισσότερο αμφιλεγόμενη φωτοφυσική συμπεριφορά.

Πρόσφατα, έχει μελετηθεί μια σειρά συμπλόκων *fac*-[ReCl(CO)₃(11,12-X₂-dppz)] (όπου X= H, CH₃, Cl, F, CF₃) με φασματοσκοπία εκπομπής, μετρήσεις TRIR (time-resolved infrared spectroscopy) και DFT (density functional theory) υπολογισμούς [92]. Σε όλα τα σύμπλοκα, το LUMO τροχιακό έχει φαιναζινικό χαρακτήρα. Βρέθηκε ότι σχηματίζονται τρεις διαφορετικές διεγερμένες καταστάσεις ³IL(π→π*), ³MLCT(phen) και ³MLCT(phz) που εξαρτώνται από την υποκατάσταση του dppz, αλλά και από τη φύση των διαλυτών. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει η δυνατότητα να συντονιστεί με ακρίβεια η ενέργεια και η

φύση της MLCT(phz) και της MLCT(phen) κατάστασης, είτε εισάγοντας ομάδες με διαφορετική δοτική/ δεκτική ικανότητα, είτε αλλάζοντας την πολικότητα του διαλύτη [92].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ

4.1. Εισαγωγή

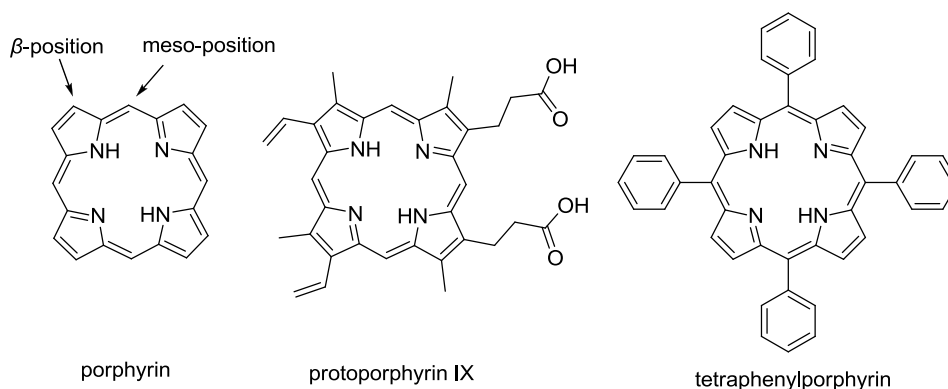
Οι πορφυρίνες, σε συνδυασμό με πρωτεΐνες συμμετέχουν σε διάφορες βιοχημικές διεργασίες στη φύση. Βρίσκονται στο ενεργό κέντρο πολλών πρωτεϊνών, η χημεία των οποίων αφορά τη μεταφορά και την αποθήκευση οξυγόνου (αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη), τη μεταφορά ηλεκτρονίου (κυτόχρωμα C), τη μετατροπή ενέργειας (χλωροφύλλη) [96,97].

Όμως, το ενδιαφέρον των ενώσεων αυτών δεν περιορίζεται μόνο στο βιολογικό επίπεδο, αλλά είναι εξίσου σημαντικές από χημικής, βιομηχανικής και τεχνολογικής άποψης. Οι συνθετικές πορφυρίνες, έχουν ευρέως διερευνηθεί στο πεδίο της κατάλυσης, στη χημεία υλικών και τη νανοτεχνολογία (π.χ. molecular-scale electronics, optoelectronic devices, sensors). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σαν βιομιμητικά μοντέλα ενζύμων όπως η καταλάση, οι υπεροξειδάσες ή τα κυτοχρώματα, καθώς και σαν ανιχνευτές για το DNA ή ως παράγοντες διάσπασης του.

Ίσως, το σημαντικότερο και πιο ενδιαφέρον πεδίο διερεύνησης των πορφυρινών, είναι η εφαρμογή τους στη φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) του καρκίνου. Οι εξαιρετικές φωτοφυσικές ιδιότητες των πορφυρινών, η απορρόφηση τους στην περιοχή του κόκκινου ή του εγγύς υπερόθρου (δηλαδή στα μήκη κύματος που διαπερνούν τον ανθρώπινο ιστό αποτελεσματικά) και η ικανότητα τους να παράγουν δραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), τις καθιστούν εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ως φωτοευαίσθητοποιητές [98,99]. Άλλωστε, πρώτος εκπρόσωπος στην PDT είναι το Photofrin[®], ένα παράγωγο της αιματοπορφυρίνης, που χρησιμοποιείται στον καρκίνο του οισοφάγου. Έκτοτε, έχουν αναπτυχθεί πολλές πορφυρινοειδής ενώσεις, όπως το Foscan[®] (*meso*-tetra-hydroxyphenyl-chlorin), που το 2001 εγκρίθηκε στην Ευρωπαϊκή Ένωση για τη θεραπεία προχωρημένου επιθηλιακού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου. Μέχρι αυτή τη στιγμή δύο τετραπυρρολικά χρωμοφόρα με μεταλλικό ιόν στο κέντρο τους βρίσκονται σε κλινικές μελέτες, το Sn^{II} tin ethyl etiopurpurin (Puryltin) και το motexafin lutetium (Lutex) [100].

Ένας κρίσιμος παράγοντας για τη βιολογική δραστηριότητα και εκλεκτικότητα των πορφυρινών και των αναλόγων της σε ζώντες οργανισμούς, είναι η συμμετοχή μεταλλικού ιόντος στη σφαίρα ένταξης της, που χρησιμεύει ως το κέντρο για τις βιοχημικές

διεργασίες. Μικρές αλλαγές στο κεντρικό μεταλλικό άτομο ή στο μακρο-κυκλικό περιβάλλον, μπορεί να προκαλέσει διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις. Η αιμοσφαιρίνη, για παράδειγμα, είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη που δρα ως μεταφορέας, του O_2 από του πνεύμονες προς τους ιστούς και του CO_2 από τους ιστούς στους πνεύμονες. Στην αιμοσφαιρίνη είναι συνδεδεμένες τέσσερις ομάδες αίμης. Η αίμη είναι σύμπλοκο του $Fe(II)$ με μια πορφυρίνη, την πρωτοπορφυρίνη IX (Σχήμα 4.1). Η αίμη συνδέεται μέσω του $Fe(II)$ με το άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου μιας ιστιδίνης που αποτελεί το σύνδεσμο με το υπόλοιπο πρωτεϊνικό τμήμα της αιμοσφαιρίνης. Στους πνεύμονες το μοριακό οξυγόνο συνδέεται με τον σίδηρο, παρέχοντας οξυαιμοσφαιρίνη. Στους ιστούς αποδίδεται το O_2 και προσδένεται το CO_2 , σχηματίζοντας την καρβαμνοαιμοσφαιρίνη (ή ανθρακοαιμοσφαιρίνη).



Σχήμα 4.1. Δομή πορφυρίνης, και η αρίθμηση για την περιφερειακή υποκατάσταση πορφυρινικών παραγώγων, όπως η φυσικώς απαντώμενη β -υποκατεστημένη protoporphyrin IX και η *meso*-υποκατεστημένη συνθετική πορφυρίνη τετραφαινυλοπορφυρίνη.

Η βασική μονάδα της πορφυρίνης αποτελείται από τέσσερις μονάδες πυρρολίου συνδεδεμένες με τέσσερις γέφυρες μεθυλενίου ($=CH-$, methine bridges). Οι πορφυρίνες βασικά χωρίζονται σε δύο τύπους: (α) μια σειρά από πορφυρίνες που υπάρχουν στη φύση με δύο ή περισσότερες υποκαταστάσεις στον πυρρολικό δακτύλιο και (β) μια σειρά από συνθετικές πορφυρίνες με υποκατάσταση στη γέφυρα του μεθυλενίου (*meso*-υποκατεστημένες πορφυρίνες) (Σχήμα 4.1). Το πλέον χαρακτηριστικό παράδειγμα φυσικών πορφυρινών είναι η πρωτοπορφυρίνη IX, που αναφέρθηκε προηγουμένως. Τυπικό παράδειγμα της δεύτερης κατηγορίας είναι η *meso*-τετρα-(φαινυλ)πορφυρίνη (TPP) και παράγωγα της. Στη συγκεκριμένη εργασία θα ασχοληθούμε κυρίως με την δεύτερη κατηγορία πορφυρινών.

Οι πορφυρίνες με υδρογονομένη μια πυρρολική μονάδα (αναγωγή ενός πυρρολικού δακτυλίου) καλούνται χλωρίνες (chlorins), ενώ εκείνες με δύο υδρογονομένους δακτυλίους, σε αντίθετες κατευθύνσεις, καλούνται βακτηριοχλωρίνες (bacteriochlorins). Η χλωρίνη είναι το μητρικό μόριο του συστήματος της χλωροφύλλης α, ενώ η βακτηριοχλωρίνη βρίσκεται σε φωτοσυνθετικά βακτήρια. Το μεταβολικό πρόδρομο της πορφυρίνης και της χρωστικής των φυτών είναι τα πορφυρινογόνα (porphyrinogens), με ανηγμένες τις γέφυρες μεθυλενίου (ανηγμένη μορφή πορφυρίνης) [96].

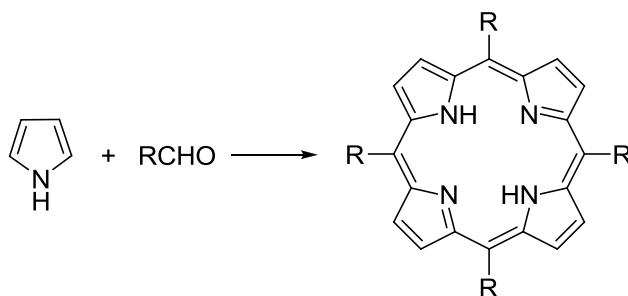
Ο πορφυρινικός υποκαταστάτης παρέχει μια κενή θέση στο κέντρο του, εξαιτίας των δύο εξαιρετικά ασθενώς όξινων πρωτονίων των κεντρικών αζώτων, που ταιριάζει ιδανικά η σύμπλεξη κάποιου μεταλλικού ιόντος (**μεταλλοπορφυρίνη**). Με πολύ λίγες εξαιρέσεις το διανιόν της πορφυρίνης δρα ως τετραδοντικός υποκαταστάτης. Για τετραενταγμένα μεταλλικά ιόντα (επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία), παρατηρείται ουσιαστικά μια επιπεδότητα του πορφυρινικού δακτυλίου. Αριθμός ένταξης μεγαλύτερος του τέσσερα είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μέσω αξονικών υποκαταστατών συμπλεγμένων με το μεταλλικό ιόν. Τα πενταενταγμένα σύμπλοκα έχουν γενικά επίπεδη τετραγωνική πυραμιδική γεωμετρία, με τον μοναδικό αξονικό υποκαταστάτη να καταλαμβάνει την κορυφή της τετραγωνικής πυραμίδας. Οι δύο αξονικοί υποκαταστάτες των εξαενταγμένων συμπλόκων βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές του πορφυρινικού επιπέδου, αποδίδοντας σύμπλοκα με οκταεδρική γεωμετρία. Μέχρι τώρα σχεδόν όλα τα μέταλλα και κάποια ημιμέταλλα έχουν ενσωματωθεί στο κέντρο της πορφυρίνης [96,101].

4.2. Σύνθεση *meso*-υποκατεστημένων πορφυρινών

Αν και οι αποδόσεις των πορφυρινών είναι σχετικά χαμηλές και αυτό κάπως καθυστερεί την εκτεταμένη χρήση τους στην τεχνολογία και την ιατρική, εντούτοις ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι *meso*-υποκατεστημένες πορφυρίνες συγκριτικά με τις φυσικώς απαντώμενες, εξαιτίας της άμεσης αντίδρασης του πυρρολίου με την κατάλληλη αλδεύδη, αποφεύγοντας έτσι περίπλοκες συνθέσεις β -υποκατεστημένων πυρρολίων. Βέβαια, λόγω της μεγάλης ποικιλίας των συγκεκριμένων πορφυρινών έχουν αναπτυχθεί και πολλοί τρόποι σύνθεσης τους [102,103].

Η μέθοδος σύνθεσης *meso*-υποκατεστημένων πορφυρινών είναι αρκετά απλή και περιλαμβάνει την συμπύκνωση πυρρολίου με μία ακεταλδεύδη σε προπιονικό οξύ (ή οξικό οξύ) με βρασμό υπό αναρρόη, συνήθως για 30 min στον αέρα. Αυτή η συνθετική μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Adler – Longo γύρω στο 1960 [104], η οποία αποτελεί βελτίωση της μεθόδου Rathemund [105], που απαιτούσε αντίδραση σε πυριδίνη, μεγαλύτερη

θερμοκρασία και σφραγισμένο σωλήνα (sealed tube). Η αντίδραση, που φαίνεται στο Σχήμα 4.2, πραγματοποιείται στο σημείο βρασμού του διαλύτη. Έχει βρεθεί ότι η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το χρόνο βρασμού, με μεγαλύτερες αποδόσεις να παρατηρούνται στους ~140 °C. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ο ρυθμός σχηματισμού της πορφυρίνης είναι χαμηλός, ενώ σε υψηλότερες ο ρυθμός οξειδωσης των σχηματιζόμενων πορφυρινών είναι πολύ υψηλός [102]. Επιπλέον, μεγαλύτερος χρόνος βρασμού δεν επιφέρει βελτίωση της απόδοσης αλλά στην πραγματικότητα μειώνει την καθαρότητα του προϊόντος [106]. Η βέλτιστη συγκέντρωση των αντιδρώντων στο μείγμα είναι περίπου 0.2-0.4 mol/L. Πρέπει να σημειωθεί ότι από την αντίδραση σε όξινο περιβάλλον, μαζί με την πορφυρίνη, παράγεται και η αντίστοιχη χλωρίνη και μάλιστα σε μερικές περιπτώσεις σε μεγαλύτερη απόδοση [102].



Σχήμα 4.2. Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης *meso*-υπκατεστημένων πορφυρινών. Με R παριστάνεται κάποια άρυλο-αλδεΐδη.

Η μέθοδος Adler είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στη σύνθεση πορφυρινών με σχετικά σταθερές αλδεΐδες, με τις αποδόσεις να κυμαίνονται περίπου στο 20 %. Η χρήση της μεθόδου όμως είναι περιορισμένη στην περίπτωση αλδευδών που είναι ασταθείς σε όξινο περιβάλλον και σε υψηλές θερμοκρασίες.

Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα προτάθηκε αρκετά πρόσφατα μια καινούρια μέθοδος (Lindsey method) [107], όπου περιλαμβάνει ηπιότερες συνθήκες, όπως αντίδραση σε διχλωρομεθάνιο παρουσία τριφθοροοξικού οξέος (TFA) υπό αδρανή ατμόσφαιρα στους 25 °C. Το πορφυρινογόνο που σχηματίζεται οξειδώνεται, συνήθως με 2,3-δίχλωρο-5,6-δικύανο-1,4-βενζοκυνόνη (DDQ), για να προκύψει η αντίστοιχη πορφυρίνη.

4.3. Χαρακτηριστικά φασμάτων απορρόφησης πορφυρινών [96]

Το φάσμα απορρόφησης μιας κανονικής (regular) πορφυρίνης και μεταλλοπορφυρίνης, εξαρτάται από τα π ηλεκτρόνια του πορφυρινικού δακτυλίου με μικρή διατάραξη από το κεντρικό μεταλλοϊόν και παρουσιάζει τις ακόλουθες ταινίες:

- **Ταινίες Q (Q bands):** Στις μεταλλοπορφυρίνες υπάρχουν δύο ορατές ταινίες στην περιοχή 500 – 600 nm, διαχωριζόμενες ενεργειακά κατά 1250 cm^{-1} . Η ταινία με τη μικρότερη ενέργεια (Q(0,0)) προέρχεται από την χαμηλότερης ενέργειας απλή διεγερμένη κατάσταση. Η άλλη ταινία αποδίδεται ως Q(1,0) και είναι η δονητική υπέρτονος της πρώτης. Η παρουσία δύο πρωτονίων στην ελεύθερη πορφυρίνη οδηγεί σε σπάσιμο της συμμετρίας (συμμετρία D_{2h}) σε σχέση με το σύμπλοκο, όπου η συμμετρία είναι μεγαλύτερη (συμμετρία D_{4h}). Αυτό έχει ως συνέπεια την εμφάνιση τεσσάρων αντί δύο Q ταινιών.
- **Ταινία B (B ή Soret band):** Είναι μια ταινία πολύ μεγάλης έντασης στην περιοχή 380 – 430 nm. Αυτή η ταινία προκύπτει από την μετάπτωση στη δεύτερη απλή διεγερμένη κατάσταση και έχει συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας (ϵ), της τάξης του $(2-4) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
- **Ταινίες N, L, M (N, L, M bands):** Διάφορες ταινίες μικρότερης έντασης και σε χαμηλότερα μήκη κύματος καλούνται N, L, M, με την N περίπου στα 325 nm, την M στα 215 nm και την L οπουδήποτε ανάμεσα στις M και N.

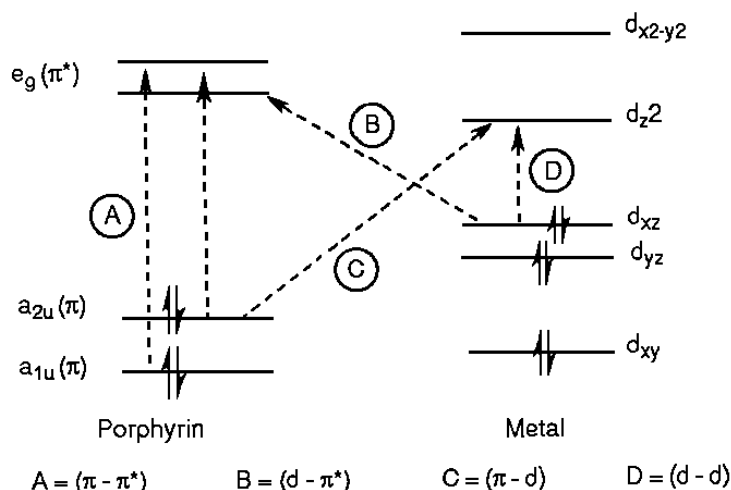
Η εισαγωγή περιφερειακών υποκαταστατών στην πορφυρινικό δακτύλιο συνήθως επιφέρει μια μικρή μετατόπιση στο μήκος κύματος και στην ένταση των ταινιών. Στις μεταλλοπορφυρίνες, όμως, λόγω των εξωτερικών υποκαταστάσεων, εξαρτάται από την έκταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μεταλλικού ιόντος και του πορφυρινικού υποκαταστάτη.

4.4. Η φωτοφυσική των πορφυρινών [96]

Ένα διδακτικό μοντέλο που εξηγεί τις διάφορες ηλεκτρονικές καταστάσεις, τα φάσματα και τις φωτοφυσικές ιδιότητες των πορφυρινών είναι το μοντέλο των τεσσάρων τροχιακών, που προτάθηκε από τον Gouterman [108]. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό οι μεταπτώσεις που λαμβάνουν χώρα στον πορφυρινικό δακτύλιο προέρχονται από δύο HOMO [$a_{2u}(\pi)$ και $a_{1u}(\pi)$] και δύο LUMO [$e_g(\pi^*)$] τροχιακά. Στην περίπτωση των μεταλλοπορφυρινών η εικόνα αλλάζει, ανάλογα με την έκταση της αλληλεπίδρασης των τροχιακών του μετάλλου με τα τροχιακά του πορφυρινικού δακτυλίου, ενώ τα LUMO

τροχιακά είναι αυστηρά εκφυλισμένα, λόγω συμμετρίας D_{4h} . Στις ελεύθερες πορφυρίνες, τα δύο κεντρικά πρωτόνια άρουν τον εκφυλισμό των $e_g(\pi^*)$ τροχιακών, προκαλώντας έτσι το διαχωρισμό των $Q(0,0)$ ταινιών.

Για πορφυρίνες ελεύθερες μετάλλου ή με μέταλλα με συμπληρωμένη τη d^{10} στοιβάδα (Zn^{2+}) ο χαρακτήρας της μετάπτωσης είναι $\pi-\pi^*$. Παρουσία μετάλλου με μη συμπληρωμένη στοιβάδα, μπορούν να παρατηρηθούν επιπλέον μεταπτώσεις: (i) εκείνες ανάμεσα στο υψηλότερο κατειλημμένο d τροχιακό του μετάλλου και το κενό $e_g(\pi^*)$ τροχιακό της πορφυρίνης (d- π^* ή MLCT μετάπτωση), (ii) d-d μεταπτώσεις μεταξύ των d τροχιακών του μετάλλου, και (iii) από το HOMO τροχιακό της πορφυρίνης σε κενά d τροχιακά του μετάλλου (π -d ή LMCT μετάπτωση). Στο Σχήμα 4.3 φαίνονται τα τροχιακά του πορφυρινικού δακτυλίου και οι μεταπτώσεις για μια τυχαία μεταλλοπορφυρίνη με d^6 μεταλλοίον. Η $Q(0,0)$ της μεταλλοπορφυρίνης χωρίζεται σε $Q_x(0,0)$ $Q_y(0,0)$, με κάθε μία να έχει τη δονητική υπέρτονο της.

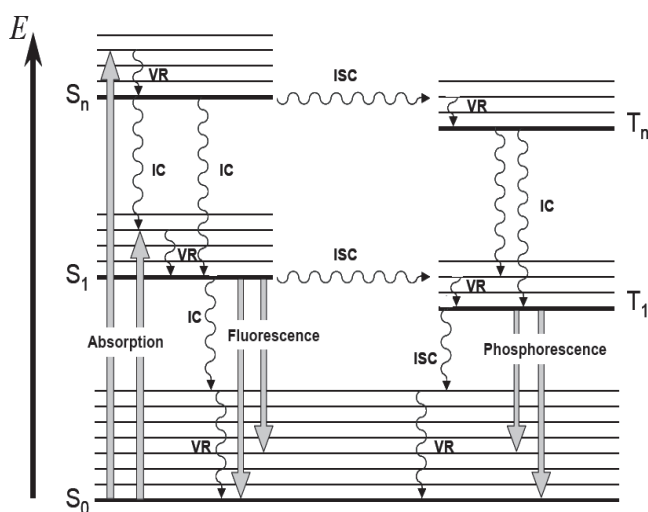


Σχήμα 4.3. Μοριακά τροχιακά της πορφυρίνης και οι πιθανές μεταπτώσεις για μια τυχαία μεταλλοπορφυρίνη με d^6 μεταλλοίον.

Στο Σχήμα 4.4 φαίνεται το διάγραμμα Jablonski που εφαρμόζεται στις πορφυρίνες με μια απλή θεμελιώδη κατάσταση και μια σειρά από $\pi-\pi^*$ διεγερμένες καταστάσεις. Ένα μόριο που βρίσκεται σε μια οποιαδήποτε διεγερμένη S_n κατάσταση θα μεταπέσει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της κατάστασης αυτής μέσω δονητικής αποδιέγερσης (VR). Η αποδιέγερση προς την πρώτη απλή διεγερμένη κατάσταση (S_1) γίνεται μέσω εσωτερικής μετατροπής (IC). Από την S_1 το σύστημα μπορεί να επιστρέψει στη θεμελιώδη κατάσταση (S_0) είτε με εκπομπή ακτινοβολίας (φθορισμός) είτε χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας (internal

conversion – IC), ή ακόμα, το σύστημα μέσω ενδοσυστηματικής διασταύρωσης (intersystem crossing – ISC) μπορεί να μεταπέσει σε μια τριπλή κατάσταση (T_1). Από την T_1 κατάσταση, το σύστημα θα επιστρέψει στη βασική είτε μέσω εκπομπής ακτινοβολίας (φωσφορισμός), είτε χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας.

Οι κανονικές πορφυρίνες παρουσιάζουν τόσο φθορισμό όσο και φωσφορισμό. Φθορισμός παρατηρείται γενικά από την πρώτη απλή διεγερμένη κατάσταση ($S_1 \rightarrow S_0$), ενώ είναι δυνατόν να παρατηρηθεί και από την δεύτερη απλή διεγερμένη κατάσταση (S_2). Ο φωσφορισμός είναι μάλλον ασθενής ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στις μεταλλοπορφυρίνες, έχει παρατηρηθεί ότι, η κβαντική απόδοση και ο χρόνος ζωής του φθορισμού ελαττώνεται με αύξηση του ατομικού αριθμού του κεντρικού μεταλλοϊόντος.



Σχήμα 4.4. Ενεργειακό διάγραμμα Jablonski για μια κανονική πορφυρίνη.

Η απλή και τριπλή διεγερμένη κατάσταση των πορφυρινών έχουν επαρκώς μεγάλη διάρκεια ζωής και μπορούν να συμμετέχουν σε πολλές χημικές αντιδράσεις, παρουσία άλλων χημικών μορίων στο διάλυμα, όπως το οξυγόνο. Η απόσβεση της διεγερμένης κατάστασης μιας μεταλλοπορφυρίνης μπορεί να γίνει είτε με μεταφορά ενέργειας (energy transfer) είτε με μεταφορά ηλεκτρονίου (electron transfer). Το ποιος μηχανισμός απόσβεσης θα προτιμηθεί έχει να κάνει με θερμοδυναμικά μεγέθη, όπως για παράδειγμα τα δυναμικά οξειδοαναγωγής. Σε περιπτώσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου, οι πορφυρίνες μπορούν να δράσουν ως δότες (οξειδωτική απόσβεση) ή ως δέκτες (αναγωγική απόσβεση) ηλεκτρονίου.

Το μοριακό οξυγόνο πιστεύεται ότι παίζει έναν μεσολαβητικό, άλλα πολύ σημαντικό ρόλο στις φωτοχημικές αντιδράσεις στα βιολογικά συστήματα. Μπορεί να είναι ένα αποτελεσματικό αποσβεστικό μόριο (quencher) της τριπλής κατάστασης των πορφυρινών. Έχουν προταθεί δύο ειδών μηχανισμοί, ο μηχανισμός τύπου I (ή μηχανισμός ελευθέρων ριζών), που γίνεται με μεταφορά ηλεκτρονίου (electron transfer), και ο μηχανισμός τύπου II, που γίνεται με μεταφορά ενέργειας (energy transfer). Στον μηχανισμό τύπου I, η τριπλή διεγερμένη κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή PS* (πορφυρίνη) ανάγει το μοριακό οξυγόνο σε υπερυπεροξειδικά ανιόντα (superoxide anion, O₂⁻) ή σε συγγενικές ελεύθερες ρίζες (εξίσωση 4.1). Εναλλακτικά, στο μηχανισμό τύπου II, μπορεί να μεταφερθεί ενέργεια από την τριπλή κατάσταση της πορφυρίνης στο μοριακό οξυγόνο (³O₂), παράγοντας μονήρες οξυγόνο (singlet oxygen, ¹O₂), όπου έχει βραχύβιο χρόνο ζωής αλλά είναι εξαιρετικά δραστικό (εξίσωση 4.2).



Στον Πίνακα 4.1 φαίνονται οι κβαντικές αποδόσεις για το μονήρες οξυγόνο, που παρατηρούνται από την απόσβεση της τριπλής διεγερμένης κατάστασης της υδατοδιαλυτής πορφυρίνης, *meso*-τέτρα-4-N-μεθυλπυριδιλ-πορφυρίνη (στο εξής θα αποκαλείται H₂TMPyP, Σχήμα 4.5) και οι αντίστοιχες μεταλλοπορφυρίνες της [M(II)TMPyP, όπου M(II): κάποιο μεταλλικό ιόν στην οξειδωτική κατάσταση δύο]. Οι κβαντικές αποδόσεις του μονήρους οξυγόνου είναι αρκετά υψηλές για μια σειρά πορφυρινών.

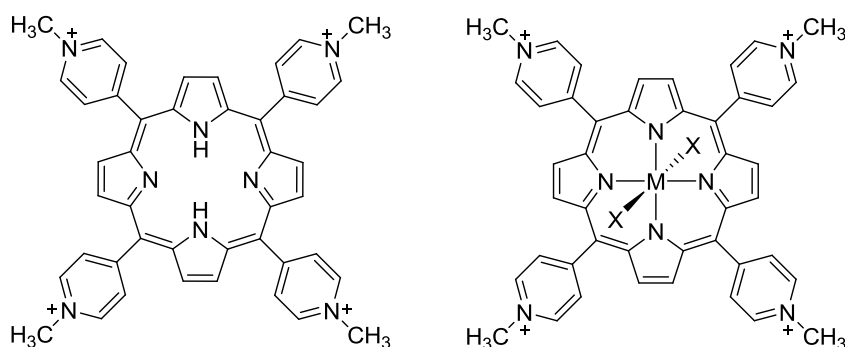
Πίνακας 4.1. Κβαντικές αποδόσεις μονήρους οξυγόνου για πορφυρίνες, σε υδατικά διαλύματα [96].

Πορφυρίνη	φ (¹ O ₂)
H ₂ TMPyP	0.74
Zn(II)TMPyP	0.88
Mg(II)TMPyP	0.69
Cd(II)TMPyP	0.75

4.5. Οι πορφυρίνες και η συγγένειά τους με το DNA

4.5.1. Εισαγωγή

Κατά τα τελευταία χρόνια μεγάλη προσοχή έχει επικεντρωθεί στη μελέτη αλληλεπίδρασης πορφυρινών με DNA, λόγω της σημασίας τους ως ανιχνευτών DNA και τη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Μεγαλύτερη προσοχή έχουν λάβει οι υδατοδιαλυτές κατιοντικές πορφυρίνες H_2TMPyP και οι αντίστοιχες μεταλλοπορφυρίνες $MTMPyP$ (Σχήμα 4.5) [109]. Αρχικά, ο Fiel και οι συνεργάτες του [110] απέδειξαν ότι η H_2TMPyP έχει υψηλή συγγένεια με το DNA. Μεταγενέστερες έρευνες έδειξαν ότι οι κατιοντικές πορφυρίνες έχουν την τάση να συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια, ενώ έχει βρεθεί ότι δρουν ως αναστολείς της τελομεράσης, ενός ενζύμου που έχει σημαντική επίδραση στην μακροζωία του όγκου. Επίσης, υπάρχουν αναφορές για αντι-ικκή και αντικαρκινική δράση αυτών των πορφυρινών [111].



Σχήμα 4.5. Χημικός τύπος της *meso*-τέτρα-4-N-μεθυλπυριδιλ-πορφυρίνης (H_2TMPyP). Με M παριστάνεται κάποιο μεταλλικό ιόν και με X οι πιθανοί αξονικοί υποκαταστάτες του μεταλλικού κέντρου.

4.5.2. Κατανοώντας τον τρόπο αλληλεπίδρασης των κατιοντικών πορφυρινών με το B-DNA

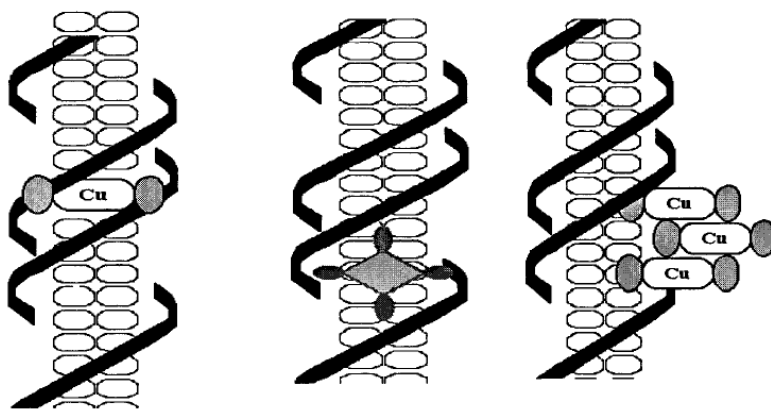
Ως υποκαταστάτες σύνδεσης με το DNA, οι πορφυρίνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA με τρεις δεσμευτικούς τρόπους:

- (i) την παρεμβολή (intercalation),
- (ii) τη δέσμευση στις αύλακες (groove binding),
- (iii) την εξωτερική σύνδεση με αυτο-στοίβαγμα (self-stacking) κατά μήκος της έλικας του DNA.

Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η παρεμβολή απαιτεί τουλάχιστον προσωρινή ύπαρξη επίπεδης διαμόρφωσης του μορίου της πορφυρίνης. Η δέσμευση στις αύλακες είναι τυπική

για πορφυρίνες με ογκώδεις περιφερειακούς υποκαταστάτες, ή αξονικούς υποκαταστάτες στο κεντρικό μεταλλικό ιόν. Στην περίπτωση αυτή ο δακτύλιος της πορφυρίνης τοποθετείται στην μικρή ή μεγάλη αύλακα του DNA, ενώ το μόριο σταθεροποιείται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων και των θετικά φορτισμένων πυριδινικών ομάδων της περιφέρειας της πορφυρίνης. Στο Σχήμα 4.6 παριστάνονται σχηματικά οι διάφοροι τρόποι αλληλεπίδρασης με το DNA.

Ο Fiel και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι η H_2TMPyP δεσμεύεται με το DNA με πολλούς τρόπους. Για παράδειγμα, υψηλή συγκέντρωση της πορφυρίνης οδηγεί σε στοίβαγμα του μορίου κατά μήκος του σκελετού του DNA. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, και ειδικά σε περιοχές που είναι πλούσιες σε ζεύγη αδενίνης – θυμίνης, το μόριο της πορφυρίνης μπορεί να συνδεθεί με το DNA εξωτερικά στην αύλακα. Ο τρίτος τρόπος σύνδεσης είναι η παρεμβολή του μορίου ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων και κατά προτίμηση στην ακολουθία γουανίνη – κυτοσίνη, με σταθερά σύνδεσης γύρω στο $10^6 M^{-1}$ [112]. Μελέτες με NMR [113] έδειξαν, ότι η αλληλουχία των βάσεων είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας στον προσδιορισμό του τρόπου δέσμευσης. Συγκεκριμένα, προτάθηκε ότι η H_2TMPyP παρεμβάλλεται μόνο ανάμεσα σε 5'-CG-3'. Αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται σε στερεοχημικές παρεμποδίσεις των μέθυλο ομάδων του πορφυρινικού δακτυλίου με τις θυμίνες στη μεγάλη αύλακα.



Σχήμα 4.6. Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων τρόπων αλληλεπίδρασης της μεταλλοπορφυρίνης $Cu^{II}TMPyP$ με τη διπλή έλικα του DNA. (Αριστερά) παρεμβολή του μορίου στη διπλή έλικα του DNA, (κέντρο) το μόριο προσανατολίζεται στη μεγάλη αύλακα, (δεξιά) εξωτερικό στοίβαγμα της πορφυρίνης [59].

Αυτές οι στερεοχημικές επιδράσεις φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στον τρόπο δέσμευσης της πορφυρίνης με το DNA, καθώς οι δι-κατιοντικές πορφυρίνες, έχοντας λιγότερους ογκώδεις υποκαταστάτες στην περιφέρεια, φαίνεται να παρεμβάλλονται στο B-DNA, ανεξάρτητα της σύνθεσης των βάσεων [114,115]. Γενικά, οι έρευνες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι μόνο οι πορφυρίνες που έχουν N-αλκυλιωμένες πυριδουλ- ομάδες παρεμβάλλονται στο DNA και μάλιστα σε περιοχές πλούσιες σε GC. Αντίθετα, πορφυρίνες που είναι όμοιες σε μέγεθος και σχήμα με τις προαναφερθείσες, αλλά δεν περιέχουν N-αλκυλιωμένες πυριδουλ- ομάδες, προτιμούν τις εξωτερικές συνδέσεις, με ή χωρίς αυτό-στοίβαγμα [116].

Η εισαγωγή ενός μεταλλικού ιόντος στο κέντρο της πορφυρίνης μπορεί να αλλάξει τον τρόπο δέσμευσης της στο DNA εξαιτίας των αξονικών υποκαταστατών. Η ύπαρξη αξονικών υποκαταστατών (Σχήμα 4.5), όπως συμβαίνει στις μεταλλοπορφυρίνες του Zn(II), Co(III), Mn(III), Fe(III) [109], διαταράσσει την επιπεδότητα του πορφυρινικού δακτυλίου, καθιστώντας τες, ανίκανες να δράσουν ως παρεμβολείς. Έτσι λοιπόν, προτιμάται η δέσμευση στις αύλακες και μάλιστα σε περιοχές πλούσιες σε ζεύγη AT.

Αντίθετα, οι μεταλλοπορφυρίνες με Cu(II), Pt(II), ή άλλο μεταλλικό κέντρο που δεν απαιτούνται αξονικοί υποκαταστάτες, είναι ικανές να παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών βάσεων. Πράγματι, με κρυσταλλογραφία ακτίνων X βρέθηκε ότι η μεταλλοπορφυρίνη Cu^{II}TMPyP παρεμβάλλεται ανάμεσα στη C και τη G του εξαμερούς [d(CGATCG)]₂ [117]. Οι δύο πυριδουλ δακτύλιοι βρίσκονται σε κάθε αύλακα του DNA. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των θετικά φορτισμένων N των πυριδουλο ομάδων και των αρνητικά φορτισμένων ατόμων O των φωσφορικών ομάδων του DNA, υπερिशχύουν των στερεοχημικών συγκρούσεων που συμβαίνουν μεταξύ των πυριδουλο ομάδων και του φωσφορικού σκελετού.

Βέβαια, η ύπαρξη μεταλλικού κέντρου χωρίς αξονικούς υποκαταστάτες δεν σημαίνει απαραίτητα και παρεμβολή του πορφυρινικού δακτυλίου στο DNA. Κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε, με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, για την μεταλλοπορφυρίνη Ni^{II}TMPyP, από τους M. Bennett et al. [118]. Τα δύο ζεύγη των πυρρολικών ομάδων έχουν στραφεί προς αντίθετες κατευθύνσεις, δημιουργώντας έτσι ένα σχήμα σέλας (saddle shape). Με αποτέλεσμα, το κέντρο της πορφυρίνης που περιέχει το ιόν νικελίου να περιορίζεται αναγκαστικά στην κοιλότητα της μικρής αύλακας της διπλόκλωνης αλληλουχίας 5'-d(CCTAGG).

4.5.3. Μέθοδοι διερεύνησης του τρόπου αλληλεπίδρασης

Για την διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω, έχουν αναπτυχθεί διάφορες φυσικές μέθοδοι, που παρέχουν εξαιρετικά χρήσιμες πληροφορίες. Όμως, η UV-Vis τεχνική προσφέρει μοναδικές γνώσεις σχετικά με την επίδραση που προκαλείται στο π σύστημα της πορφυρίνης. Η παρεμβολή προκαλεί σημαντική βαθοχρωμική μετατόπιση (red shift) στο μέγιστο της Soret band κατά 10-15 nm και υποχρωμισμό (hypochromism) που υπερβαίνει το 30%. Αντίθετα, οι εξωτερικές συνδέσεις επιφέρουν μέτρια επίδραση στην π-π* απορρόφηση με ασθενή υποχρωμισμό ή ακόμα και υπερχρωμισμό και μια μικρή βαθοχρωμική μετατόπιση του μεγίστου της Soret band κατά 4-5 nm [119]. Επίσης, η εξωτερική δέσμευση επιφέρει ένα σήμα κυκλικού διχρωισμού (CD) με θετική ένταση στη Soret περιοχή (για δέσμευση στις αύλακες $\Delta\epsilon \sim +35 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), ενώ η παρεμβολή προκαλεί αρνητικό CD σήμα ($\Delta\epsilon \sim -25 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [120].

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η παρεμβολή επιφέρει μετατόπιση σε χαμηλότερα πεδία στην κορυφή του φωσφόρου στο φάσμα $^{31}\text{P-NMR}$, αλλά και μια σημαντική αύξηση του σχετικού ιξώδους του μακρομορίου. Σε αντίθεση με την παρεμβολή, η δέσμευση στις αύλακες δεν επηρεάζει σημαντικά το σχετικό ιξώδες, και δεν επιφέρει αξιόλογες διαταραχές στο φάσμα $^{31}\text{P-NMR}$ [119].

Πίνακας 4.2. Χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης της $\text{Cu}^{\text{II}}\text{TMPyP}$ με DNA.

Ιδιότητα	groove binding	intercalation
Μετατόπιση Soret band	+4 nm	+10 nm
% υποχρωμισμός	± 5	30
CD (Soret) ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$\Delta\epsilon > 0$	$\Delta\epsilon < 0$
Σχετικό ιξώδες (η/η_0)	–	αύξηση
π-π* εκπομπή	ασθενής	σημαντική αύξηση
$^{31}\text{P-NMR}$	μερική διεύρυνση	κορυφή σε χαμηλά πεδία

Στη φασματοσκοπία εκπομπής τα πράγματα δεν είναι τόσο ξεκάθαρα όσον αφορά τη διερεύνηση του τρόπου αλληλεπίδρασης με το DNA. Για παράδειγμα η εξωτερική σύνδεση της H_2TMPyP σε ζεύγη A-T αυξάνει την ένταση εκπομπής, συγκριτικά με την αδέσμευτη μορφή. Αντίθετα, η παρεμβολή σε ζεύγη βάσεων G-C προκαλεί ασθενέστερο φθορισμό, πιθανόν λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίου από τη γουανίνη, τη βάση με το χαμηλότερο δυναμικό οξειδώσεως. Η παρουσία δισθενούς χαλκού στο κέντρο της παραπάνω πορφυρίνης προκαλεί διαφορετική συμπεριφορά, καθώς μόνο η

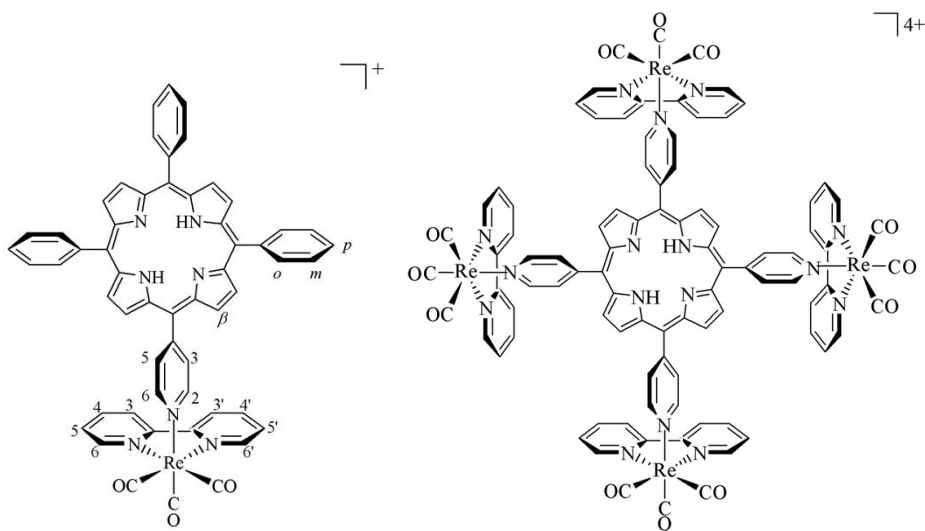
παρεμβλλόμενη μορφή της $\text{Cu}^{\text{II}}\text{TMPyP}$ παρουσιάζει εκπομπή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ένας πολικός διαλύτης, όπως το νερό, προκαλεί απόσβεση της εκπομπής, ενώ η παρεμβολή προστατεύει την πορφυρίνη από την προσβολή από διαλύτη [112]. Στον Πίνακα 4.2 συνοψίζονται οι αλλαγές που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση με το DNA με διάφορες τεχνικές.

4.6. Εξωτερική σύμπλεξη μετάλλων σε πορφυρίνες και το βιολογικό τους ενδιαφέρον

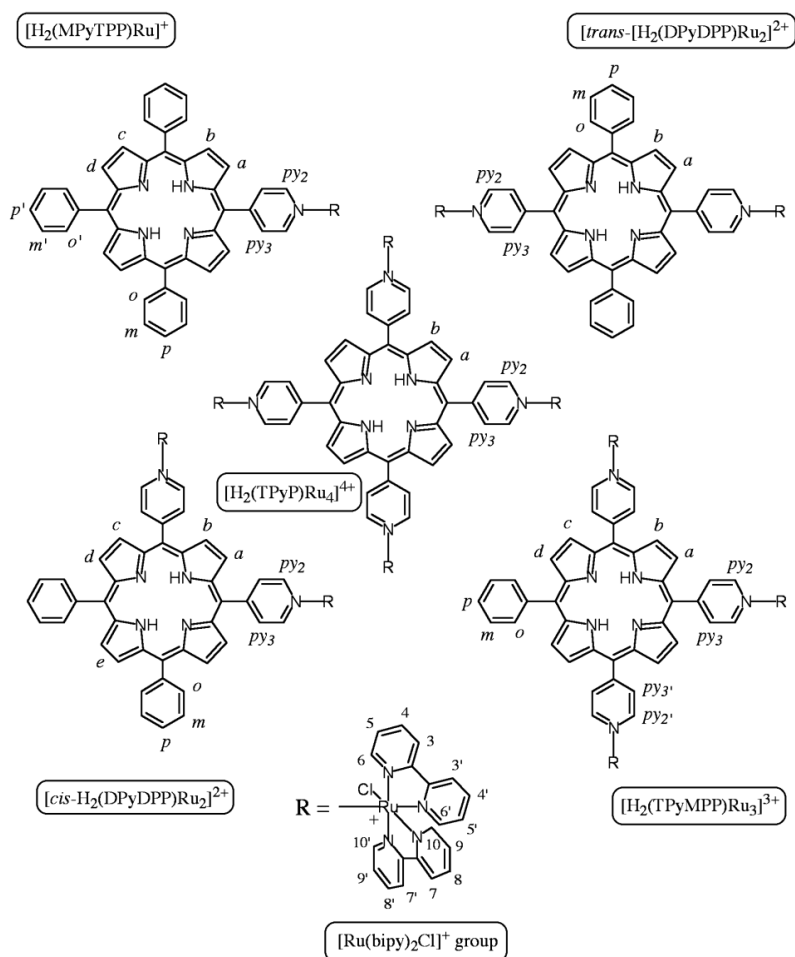
Οι εξαιρετικές φωτοφυσικές ιδιότητες των πορφυρινών, η αποτελεσματική τους χρήση ως φωτοευαισθητοποιητές και η συγγένεια τους με το DNA, που συζητήθηκαν παραπάνω, έχουν οδηγήσει τους επιστήμονες στην προσπάθεια να συνδυάσουν αυτά τα χαρακτηριστικά με εκείνα κάποιων μετάλλων, προκειμένου να αναπτυχθούν νέα μόρια με βιοιατρικές εφαρμογές. Για παράδειγμα, σύμπλοκα με παράγωγα της αιματοπορφυρίνης, συμπλεγμένης περιφερειακά με Pt(II) , έχουν πρόσφατα αναφερθεί, με σκοπό να συνδυαστούν οι κυτταροτοξικές ιδιότητες του λευκοχρύσου με τη φωτοδυναμική δράση των πορφυρινών, και έχουν αφήσει αρκετές υποσχέσεις [121].

Τα τελευταία χρόνια μεγάλος αριθμός συμπλόκων του Ru, Re, Pt, Os, Ir, Rh έχουν συμπλεχθεί στον πορφυρινικό δακτύλιο μέσω των ατόμων N των περιφερειακών πυρίδυλο ομάδων των πυρίδυλο-πορφυρινών. Οι περισσότερες μελέτες περιλαμβάνουν την *meso*-tetra(4-pyridyl)porphyrin (στο εξής H_2TPyP). Έχει δειχθεί ότι η περιφερειακή σύμπλεξη μετάλλου όχι μόνο κάνει πιο ευδιάλυτη την πορφυρίνη, αλλά και δίνει στο σύστημα χρήσιμες λειτουργίες. Για παράδειγμα ο E. Alessio και οι συνεργάτες του, παρουσίασαν σύμπλοκα της H_2TPyP συμπλεγμένης περιφερειακά, με ένα ή και τέσσερα τρικαρβόνυλο διπυριδινικά σύμπλοκα του Re(I) (Σχήμα 4.7), και συνέκρινε τις φωτοφυσικές ιδιότητες με εκείνες της ελεύθερης πορφυρίνης [122,123].

Η ομάδα του K. Araki [124], παρουσίασε μια σειρά *meso*-phenyl-pyridyl-porphyrins συμπλεγμένες με μία, δύο ή και τέσσερεις $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ ομάδες (Σχήμα 4.8), μελετώντας τις φασματοσκοπικά και ηλεκτροχημικά. Παρατηρήθηκε ότι η κβαντική απόδοση φθορισμού της πορφυρίνης, μειώνεται γραμμικά συναρτήσει των συμπλεγμένων $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$.



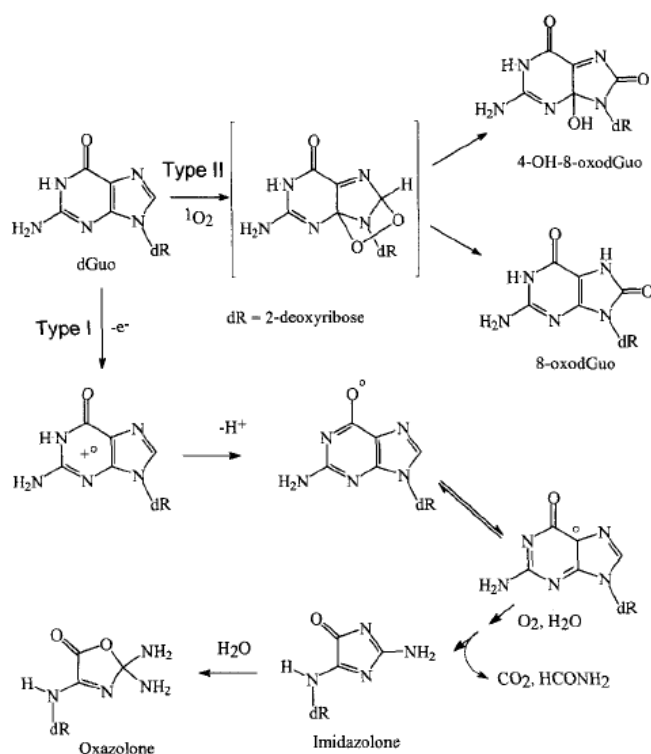
Σχήμα 4.7. Δομές πορφυρινικών συμπλόκων του Re(I) [122,123].



Σχήμα 4.8. Δομές πορφυρινικών συμπλόκων του Ru(II) [124].

Μάλιστα, από την ίδια ομάδα βρέθηκε ότι το τετρα-ρουθηνικό πορφυρινικό παράγωγο (φαίνεται στο Σχήμα 4.8 ως $[H_2(TPyP)Ru_4]^{4+}$) παράγει δραστικά είδη οξυγόνου, είτε μέσω

ριζών (μηχανισμός τύπου I) είτε με παραγωγή μονήρους οξυγόνου (μηχανισμός τύπου II), που είναι απαραίτητα για τη φωτοτοξική διαδικασία [125]. Τα κύρια προϊόντα φωτοοξείδωσης του νουκλεοσιδίου, 2-δεοξυ-γουανοσίνη (dGuo), ταυτοποιήθηκαν με HPLC και ταξινομήθηκαν βάση του μηχανισμού. Συγκεκριμένα, στον μηχανισμό τύπου I, ο διεγερμένος φωτοευαισθητοποιητής παράγει oxazolone ως τελικό προϊόν. Αρχικά σχηματίζεται το ριζικό ενδιάμεσο dGuo[•], μέσω μεταφοράς φορτίου, ακολουθεί απόσπαση H, αποδίδοντας τελικά oxazolone, κάτι που προϋποθέτει την προσθήκη οξυγόνου. Στο μηχανισμό τύπου II, η dGuo αντιδρά με το μονήρες οξυγόνο, το οποίο παράγεται με μεταφορά ενέργειας από τον διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή, και οδηγεί στο σχηματισμό δύο οξειδωμένων νουκλεοσιδίων (Σχήμα 4.9) [126].

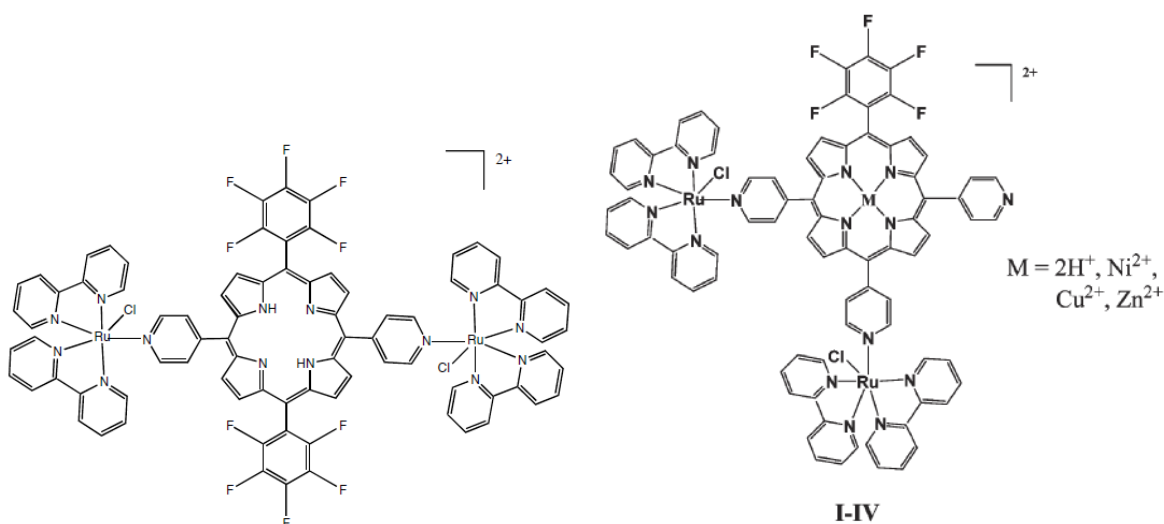


Σχήμα 4.9. Μηχανισμοί τύπου I και II στο σχηματισμό προϊόντων φωτο-οξείδωσης της dGuo, παρουσία του συμπλόκου $[\text{H}_2(\text{TPyP})\text{Ru}_4]^{4+}$.

Η σύμπλεξη Zn(II) στο κέντρο της πορφυρίνης του ανωτέρω συμπλόκου δεν αλλάζει μόνο το είδος της αλληλεπίδρασης με το DNA –[προτιμώνται πλέον οι εξωτερικές συνδέσεις (εκλεκτικές και μη) ή και σύμπλεξη του Zn(II) με τις φωσφορικές ομάδες, αντί της παρεμβολής του πορφυρινικού δακτυλίου στα ζεύγη βάσεων]–, αλλά και τον μηχανισμό φωτο-οξείδωσης του, που γίνεται πλέον μόνο μέσω μηχανισμού τύπου II [127].

Όπως συζητήθηκε προηγουμένως, το παράγωγο του τετρα-ρουθηνίου επιφέρει την ισχυρή σύνδεση με το DNA και προκαλεί τη φωτοδιάσπαση του, μετά από ακτινοβόληση. Επιπλέον, ένα άλλο μονο-Ru-πορφυρινικό παράγωγο, έχει την ικανότητα να συνδέεται στην αύλακα και να φωτοδιασπά το DNA παρουσία οξυγόνου, όμως απαιτείται φως υψηλής ενέργειας (UV) [128]. Στην προσπάθεια αύξησης της αποδοτικότητας των φωτοευαισθητοποιητών, βρέθηκε ότι τα φθοριωμένα παράγωγα πορφυρίνης αυξάνουν την κβαντική απόδοση της τριπλής κατάστασης και βελτιώνουν την κυτταρική πρόσληψη. Έτσι, ο S. Swavey με την ομάδα [129] του πρότειναν την σύμπλεξη των $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ ομάδων στην 5,15-(4-pyridyl)-10,20-(pentafluorophenyl)porphyrin (στο εξής $[(\text{H}_2\text{DPyDPFPP})\text{-Ru}_2]^{2+}$, Σχήμα 4.10 αριστερά) και παρατήρησαν την φωτοδιάσπαση του πλασμιδίου pUC18 μετά από ακτινοβόληση με ορατό φως. Η σταθερά σύνδεσης K_b είναι της τάξης του 10^6 M^{-1} , και σε συνδυασμό με την μεγάλη βαθοχρωμική μετατόπιση της Soret band, προτάθηκε η παρεμβολή ως τρόπος αλληλεπίδρασης με το DNA. Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρούνται και για τη σύμπλεξη των $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ ομάδων σε *cis* θέσεις στην *meso*-5-(pentafluorophenyl)-10,15,20-tris(4-pyridyl)porphyrin (στο εξής $[(\text{H}_2\text{MPFPTPyP})\text{-Ru}_2]^{2+}$, Σχήμα 4.10 δεξιά) [130]. Στην προσπάθεια διερεύνησης του μηχανισμού βρέθηκε, ότι το συγκεκριμένο σύμπλοκο προκαλεί τη φωτοδιάσπαση του DNA, ακόμα και απουσία οξυγόνου, υπό ατμόσφαιρα αργού, σε αντίθεση με το φαίνυλο υποκατεστημένο παράγωγο του ανωτέρου συμπλόκου, που απαιτείται η παρουσία οξυγόνου [131].

Η εισαγωγή Cu(II) στο κέντρο της ανωτέρω πορφυρίνης μειώνει σημαντικά την αποτελεσματικότητα του συμπλόκου στη φωτοδιάσπαση του DNA, χωρίς όμως να αλλάζει ο τρόπος αλληλεπίδρασης με αυτό ($K_b=3.41 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) [132]. Ακόμα περισσότερο μειώνεται η φωτοκαταλυτική δραστηριότητα στο σύμπλοκο του Ni(II), ενώ και τα δύο προκαλούν διάσπαση του ενός κλώνου (nicking) του υπερελικομένου κυκλικού πλασμιδιακού DNA (supercoiled closed circular DNA), αλλά κανένα σπάσιμο και των δύο κλώνων (double strand, linear DNA). Από την άλλη πλευρά η Zn(II) ρουθίνο-πορφυρίνη (Σχήμα 4.10 δεξιά), προκαλεί πλήρες nicking του DNA, και σπάσιμο της διπλής έλικας μετά από 30 min ακτινοβόλησης, παρόλο που είναι λιγότερο δραστική από την ελεύθερη ρουθίνο-πορφυρίνη [133].



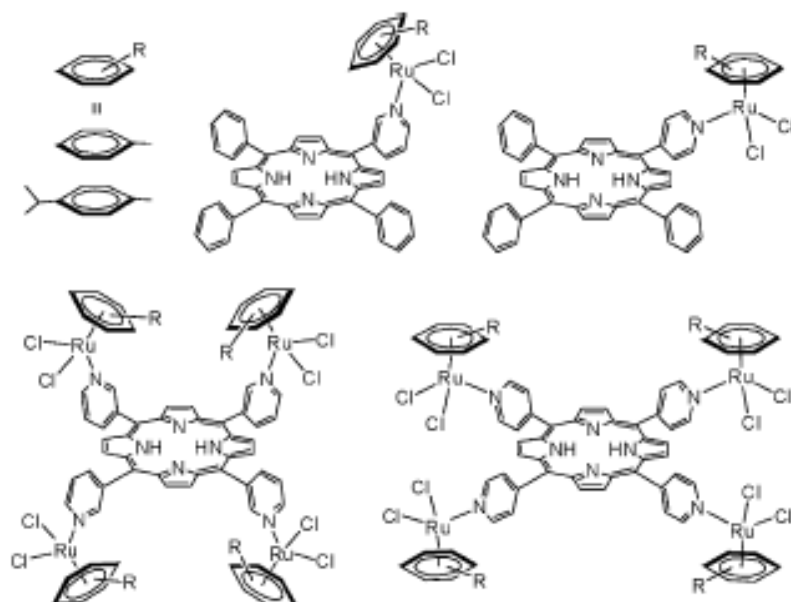
Σχήμα 4.10. Δομές φθόρο-υποκατεστημένων πορφυρινικών συμπλόκων του Ru(II) [129,133].

Οι κυτταρικές μελέτες των ανωτέρω συμπλόκων **I-IV** (Σχήμα 4.10), σε επιδερμικά φυσιολογικά κύτταρα ινοβλαστών (normal fibroblast) και μελανώματος (melanoma), έδειξαν πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα νικελίου(II) (σύμπλοκο **II**) και χαλκού(II) (σύμπλοκο **III**), είναι μη-τοξικά και στις δύο κυτταρικές σειρές σε συγκεντρώσεις 5 και 10 μM όταν ακτινοβολούνται με λάμπα W για 60 min. Η ελεύθερη ματάλλου πορφυρίνη (σύμπλοκο **I**), έδειξε ότι είναι τοξική τόσο στους φυσιολογικούς ινοβλάστες, όσο και στο μελάνωμα, για συγκεντρώσεις 3 μM και ακτινοβολήση 30 min. Το σύμπλοκο του Zn(II) (σύμπλοκο **IV**), είναι μη-τοξικό στα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά σκοτώνει τα κύτταρα μελανώματος, όταν ακτινοβολείται στις ίδιες συνθήκες και βρίσκεται σε συγκέντρωση 5 και 10 μM , καθιστώντας το έτσι έναν πολλά υποσχόμενο φωτοευαισθητοποιητή για την PDT [133].

Με το σκεπτικό να συνδυαστούν η κυτταροτοξικότητα των αρένο συμπλόκων του ρουθηνίου με τις φωτοδυναμικές ιδιότητες του πορφυρινικού δακτυλίου, συντέθηκαν τα μονοπυρηνικά και τετραπυρηνικά αρένο-ρουθηνικά σύμπλοκα με *meso*-πυριδιλ-πορφυρίνες, που φαίνονται στο Σχήμα 4.11. Όλα τα σύμπλοκα παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή τοξικότητα στο σκοτάδι ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$) ως προς τα κύτταρα μελανώματος. Μετά όμως από έκθεση σε ορατό φως, μήκους κύματος 652 nm, αποκτούν υψηλή φωτο-τοξικότητα σε συγκέντρωση 5 μM . Παρόμοια φωτο-τοξικότητα παρατηρήθηκε για το αντίστοιχο τετραπυρηνικό σύμπλοκο του Os(II), αλλά όχι και για αυτό του Rh(III) [134-136]. Μάλιστα, τα σύμπλοκα με τις ομάδες $\{(\text{pPrC}_6\text{H}_4\text{Me})\text{RuCl}_2\}$ συμπλεγμένες στην mono- ή tetra-(3-pyridyl)porphyrin, που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη *in vitro* φωτοδυναμική δραστηριότητα, έχουν δοκιμαστεί και σε *in vivo* πειράματα σε ποντίκια που

φέρουν ανθρώπινο καρκίνωμα. Με κυτταρικό εντοπισμό βρέθηκε ότι τα σύμπλοκα συσσωρεύονται μόνο στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, αλλά όχι στον πυρήνα [137].

Στον Πίνακα 4.3 συνοψίζονται, η αλληλεπίδραση με το DNA και οι κυτταρικές μελέτες μερικών πορφυρινικών συμπλόκων του Ru(II) που αναφέρθηκαν προηγουμένως.



Σχήμα 4.11. Δομές αρένο-πορφυρινικών συμπλόκων του Ru(II) [136].

Πίνακας 4.3. Πορφυρινικά σύμπλοκα με πιθανή εφαρμογή στη PDT. Η αλληλεπίδραση με το DNA και οι κυτταρικές μελέτες.

Σύμπλοκα	Περιγραφή της αλληλεπίδρασης	Ref.
$[H_2(TPyP)Ru_4]^{4+}$	<ul style="list-style-type: none"> Μη ειδικές εξωτερικές αλληλεπιδράσεις (χαμηλές συγκεντρώσεις CT-DNA – $K_b=2.5 \cdot 10^4 M^{-1}$) Παρεμβολή (υψηλές συγκεντρώσεις CT-DNA – $K_b=1.5 \cdot 10^5 M^{-1}$) Φωτοδιάσπαση pBR322 με $\lambda_{ir}=532 nm$ Μηχανισμός τύπου I και II στην οξείδωση της dGuo 	125, 126
$[Zn(TPyP)Ru_4]^{4+}$	<ul style="list-style-type: none"> Μη ειδικές εξωτερικές αλληλεπιδράσεις (χαμηλές συγκεντρώσεις CT-DNA – $K_b=3.0 \cdot 10^4 M^{-1}$) Εξωτερικές αλληλεπιδράσεις – μερική είσοδος στην αύλακα (υψηλές συγκεντρώσεις CT-DNA – $K_b=5.0 \cdot 10^5 M^{-1}$) Φωτοδιάσπαση pBR322 με $\lambda_{ir}=532 nm$ Μηχανισμός τύπου II στην οξείδωση της dGuo 	127
$[H_2(MPyTPP)-$	<ul style="list-style-type: none"> Δέσμευση στις αύλακες του CT-DNA ($K_b=8,6 \cdot 10^5 M^{-1}$) 	128

$\text{Ru}(\text{pip})^+$	<ul style="list-style-type: none"> • Φωτοδιάσπαση pBR322 με UV ακτινοβολία 	
$[(\text{H}_2\text{DPyDPFPP})\text{-Ru}_2]^{2+}$	<ul style="list-style-type: none"> • Μερική παρεμβολή στο CT-DNA ($K_b=1.10 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) • Φωτοδιάσπαση του pUC18 με ορατό φως 	129
$[\text{cis}-(\text{H}_2\text{MPFPTPyP})\text{-Ru}_2]^{2+}$ I	<ul style="list-style-type: none"> • Μερική παρεμβολή στο CT-DNA ($K_b=1.40 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) • Σπάσιμο της διπλής έλικας του pUC18 με $\lambda_{ir}>400 \text{ nm}$ τόσο παρουσία όσο και απουσία O_2 • Φωτο-τοξικό στους ινοβλάστες και στο μελάνωμα 	130, 131, 133
$[\text{cis}-(\text{NiMPFPTPyP})\text{-Ru}_2]^{2+}$ II	<ul style="list-style-type: none"> • Μερική παρεμβολή στο CT-DNA ($K_b=1.06 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) • Nicking του κυκλικού pUC18 με $\lambda_{ir}>400 \text{ nm}$ • Μη φωτο-τοξικό στους ινοβλάστες και στο μελάνωμα 	133
$[\text{cis}-(\text{CuMPFPTPyP})\text{-Ru}_2]^{2+}$ III	<ul style="list-style-type: none"> • Μερική παρεμβολή στο CT-DNA ($K_b=3.41 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) • Nicking του κυκλικού pUC18 με $\lambda_{ir}>400 \text{ nm}$ • Μη φωτο-τοξικό στους ινοβλάστες και στο μελάνωμα 	132, 133
$[\text{cis}-(\text{ZnMPFPTPyP})\text{-Ru}_2]^{2+}$ IV	<ul style="list-style-type: none"> • Μερική παρεμβολή στο CT-DNA ($K_b=2.05 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) • Σπάσιμο της διπλής έλικας του pUC18 με $\lambda_{ir}>400 \text{ nm}$ • Μη φωτο-τοξικό στους ινοβλάστες • Φωτο-τοξικό στο μελάνωμα 	133
αρένο- Ru^{II} σύμπλοκα	<ul style="list-style-type: none"> • Μέτρια τοξικότητα στο σκοτάδι στο μελάνωμα • Υψηλή φωτο-τοξικότητα σε $5 \mu\text{M}$ στα κύτταρα μελανώματος (με $\lambda_{ir}=652 \text{ nm}$) • Συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα 	134, 135, 136

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΤΟ ΓΑΛΛΙΟ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

5.1. Εισαγωγή [138]

Το Γάλλιο ανακαλύφθηκε το 1875 από τον Paul-Emile Lecoq de Boisbaudran, αλλά η ύπαρξη του είχε προβλεφθεί από τον Dmitri Mendeleev έξι χρόνια νωρίτερα, όπου άφησε κενή τη θέση του στον περιοδικό πίνακα. Ουσιαστικά, αυτή η ανακάλυψη έφερε τη γενική αποδοχή του περιοδικού πίνακα. Στην πλειοψηφία των ενώσεων του βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση +3, και η ηλεκτρονιακή διαμόρφωση του ιόντος είναι $[Ar]3d^{10}$.

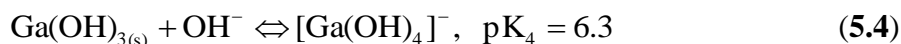
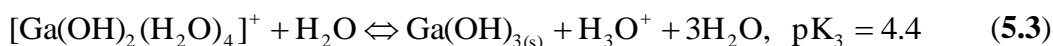
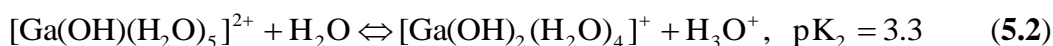
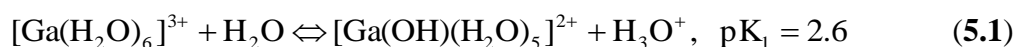
Το στοιχείο επιδεικνύει μεγάλη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Η πρώτη δημοσιευμένη έρευνα για τη θεραπευτική δυνατότητα του γαλλίου πραγματοποιήθηκε από τους C. Levaditi et al. το 1931 [139], όπου το τρυγικό γάλλιο εξάλειψε πειραματικά την σύφιλη σε κουνέλια. Στις αρχές του 1950, πειράματα σε ζώα και ανθρώπους έδειξαν ότι το γάλλιο συγκεντρώνεται σε καρκινικούς όγκους, κάτι που τελικά οδήγησε τη χρήση του ραδιενεργού γαλλίου (^{67}Ga , χρόνος ημιζωής περίπου 78 h) ως διαγνωστικό παράγοντα για ορισμένες μορφές καρκίνου, λοιμώξεων και φλεγμονωδών νοσημάτων [140]. Από τότε μέχρι και σήμερα έχουν γίνει πολλές έρευνες για τη θεραπευτική δραστηριότητα του γαλλίου. Οι θεραπευτικές δράσεις μπορούν γενικά να κατηγοριοποιηθούν ως εξής: (α) μείωση της ταχείας οστικής απορρόφησης (bone mineral resorption), με ή χωρίς αυξημένα επίπεδα ασβεστίου στο πλάσμα, (β) αυτοάνοση ασθένεια και απόρριψη μοςχεύματος, (γ) αναστολή καρκινικού πολλαπλασιασμού και (δ) θεραπεία μολυσματικών νόσων.

Το γάλλιο είναι αποτελεσματικό στην καταστολή της οστικής απορρόφησης όταν υπάρχουν αυξημένα επίπεδα ασβεστίου στο πλάσμα. Αυτή η δράση οδήγησε στη χρήση του στη θεραπεία της κακοήθους υπερασβεστιαμίας (hypercalcemia of malignancy) και στη νόσο Paget των οστών. Επιπλέον, κλινικές μελέτες έχουν δείξει ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα του γαλλίου έναντι της ουροδόχου κύστης και λεμφωμάτων.

5.2. Χημεία υδατικών διαλυμάτων του Γαλλίου [140,141]

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το γάλλιο είναι τρισθενές (Ga^{3+} , ηλεκτρονιακή διαμόρφωση $3d^{10}$). Το ιόν Ga^{3+} είναι σκληρό οξύ κατά Pearson και συνδέεται ευκολότερα

με ισχυρές βάσεις κατά Lewis, ειδικότερα με OH^- . Έτσι, έχει την τάση να σχηματίζει χηλικές ενώσεις με το οξυγόνο και σε μικρότερο βαθμό με το άζωτο. Το ελεύθερο ενυδατωμένο ιόν του Ga^{3+} υδρολύεται σχεδόν πλήρως σε ουδέτερες τιμές pH σχηματίζοντας αδιάλυτο $\text{Ga}(\text{OH})_3$. Το ελεύθερο ιόν Ga^{3+} είναι οκταεδρικά συμπλεγμένο με έξι μόρια νερού, τα οποία αντικαθίστανται σταδιακά από υδροξυλικές ομάδες, παράγοντας ταυτόχρονα H_3O^+ , όπως φαίνεται στις εξισώσεις **5.1-5.4**, με αποτέλεσμα το pH να μειώνεται. Η οξύτητα υδατικού διαλύματος του Ga^{3+} οφείλεται στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του γαλλίου (Lewis acid effect), δηλ. το Ga^{3+} αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το δεσμευμένο άτομο οξυγόνου, με αποτέλεσμα να εξασθενεί ο δεσμός O–H του νερού σύμφωνα με τις χημικές εξισώσεις που ακολουθούν:



Αν το όξινο διάλυμα εξουδετερωθεί, σχεδόν όλο το γάλλιο καταβυθίζεται ως άμορφο αδιάλυτο $\text{Ga}(\text{OH})_3$. Το άμορφο $\text{Ga}(\text{OH})_3$ με το χρόνο μετατρέπεται στη σταθερή κρυσταλλική φάση $\text{GaO}(\text{OH})$, το οποίο είναι ελαφρώς λιγότερο διαλυτό σε ουδέτερα διαλύματα από το $\text{Ga}(\text{OH})_3$, αλλά είναι διαλυτό σε βασικά διαλύματα σχηματίζοντας $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$ (gallate). Έτσι, το ελεύθερο Ga^{3+} έχει μικρή διαλυτότητα στα περισσότερα υδατικά διαλύματα. Σε pH 7.4 και 25 °C, η συνολική διαλυτότητα του γαλλίου (σε ισορροπία με το κρυσταλλικό $\text{GaO}(\text{OH})$) είναι περίπου 1 μM , και ουσιαστικά δεν υπάρχει αδέσμευτο Ga^{3+} (το 98.4% του διαλυμένου γαλλίου βρίσκεται ως $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$ και το 1.6% σαν $\text{Ga}(\text{OH})_3$) [141].

Η χημεία του γαλλίου που περιγράψαμε παραπάνω έχει σημαντικές επιπτώσεις στη θεραπευτική χρήση του μετάλλου. Μιας και τα διαλύματα γίνονται όξινα, είναι ακατάλληλη η παρεντερική χορήγηση τους με ένεση. Για να ξεπεραστούν τα παραπάνω προβλήματα, τα ενέσιμα διαλύματα του γαλλίου συνήθως παρασκευάζονται με κιτρικό, το οποίο συμπλοκοποιείται με το γάλλιο, εμποδίζοντας την υδρόλυση και βελτιώνοντας τη σταθερότητα.

5.3. Βιοχημική σύγκριση του Ga^{3+} με το Fe^{3+} [138,141]

Η χημεία διαλυμάτων και συντονισμού του Ga^{3+} είναι κάπως παρόμοια με εκείνη του Al^{3+} και του In^{3+} , αλλά πολύ όμοια με εκείνη του Fe^{3+} . Η ομοιότητα αυτή οφείλεται στην ιοντική ακτίνα, την ηλεκτραρνητικότητα, το δυναμικό ιοντισμού, τον αριθμό ένταξης και φυσικά το φορτίο. Επομένως, το γάλλιο αναμένεται να ακολουθεί πολλά ίδια βιοχημικά μονοπάτια με τον τρισθενή σίδηρο, αλλά και να καταλαμβάνει τη θέση του Fe^{3+} σε ορισμένες πρωτεΐνες και χηλικές ενώσεις στον οργανισμό.

Παρόλα αυτά υπάρχουν και αρκετές διαφορές, που επιτρέπουν τη θεραπευτική χρήση του γαλλίου και μειώνουν την τοξικότητά του. Η μεγαλύτερη διαφορά είναι ότι το Ga^{3+} ουσιαστικά δεν ανάγεται σε φυσιολογικές συνθήκες, σε αντίθεση με το Fe^{3+} που ανάγεται εύκολα σε Fe^{2+} . Αυτή η διαφορά σημαίνει ότι, *in vivo*, το Ga^{3+} δεν εισέρχεται σε μόρια που φέρουν Fe^{2+} όπως η αίμη, και επομένως δεν εμπλέκεται στη μεταφορά οξυγόνου, αλλά και δεν συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Το τελευταίο σημαίνει ότι όταν το Ga^{3+} αντικαταστήσει το Fe^{3+} σε οξειδοαναγωγικά ένζυμα, αυτά γίνονται μη λειτουργικά, αφού δεν συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις [138,141].

Μια άλλη πολύ σημαντική διαφορά είναι ότι ο Fe^{3+} είναι ακόμα λιγότερο διαλυτός σε ουδέτερα υδατικά διαλύματα από το Ga^{3+} . Σε pH 7.4 και 25 °C, η διαλυτότητα του (σε ισορροπία με το $\text{FeO}(\text{OH})$) είναι μόνο $\sim 10^{-18}$ M, ενώ εκείνη του Ga^{3+} είναι 10^{-6} M [142]. Αυτή η διαφορά σημαίνει ότι πρακτικά όλη η ποσότητα του Fe^{3+} είναι δεσμευμένη σε πρωτεΐνες. Επομένως, η μικρή αλλά σημαντική ποσότητα του $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$ που υπάρχει στο πλάσμα μπορεί να συμμετέχει σε βιοχημικές αντιδράσεις που δεν είναι δυνατόν να συμβούν με το Fe^{3+} .

Στο πλάσμα του αίματος, ο σίδηρος υπάρχει κυρίως ως Fe^{3+} δεσμευμένος στην τρανσφερίνη (transferrin), η οποία είναι η κυριότερη πρωτεΐνη του πλάσματος για τη μεταφορά του σιδήρου, και μπορεί να δεσμεύει δύο μόρια σιδήρου. Ομοίως, σχεδόν όλο το γάλλιο του πλάσματος βρίσκεται δεσμευμένο στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Αν και η συγγένεια της τρανσφερίνης με το Fe^{3+} είναι περίπου 400 φορές υψηλότερη από ότι με το Ga^{3+} , η αντικατάσταση του Ga^{3+} από Fe^{3+} γίνεται πολύ αργά, όπως διαπιστώθηκε με μελέτες NMR [143]. Η τρανσφερίνη, ιδιαίτερα όταν είναι κορεσμένη με δύο μέταλλα, μπορεί να προσδεθεί στον υποδοχέα της τρανσφερίνης. Το σύμπλοκο της μεταλλο-τρανσφερίνης και του υποδοχέα της μεταφέρεται στα κύτταρα με ενδοκύτωση, και εκεί απελευθερώνονται τα μέταλλα (σε pH μικρότερο από 5.5). Ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα, αλλά βρίσκεται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένες ανάγκες σιδήρου, καθώς πολλαπλασιάζονται πολύ

γρήγορα. Τα κύτταρα, αφού διαιρούνται, παράγουν ριβονουκλεοτιδική ρεδοκτάση (ribonucleotide reductase), ένα ένζυμο που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του DNA, και το ενεργό του κέντρο φέρει Fe^{3+} .

5.4. Μηχανισμός θεραπευτικής δράσης [138,141,144]

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, η θεραπευτική δράση του γαλλίου πηγάζει από την ικανότητα του να μιμείται το Fe^{3+} , αλλά και από το γεγονός ότι δεν μπορεί να λάβει μέρος σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, σε αντίθεση με το Fe^{3+} . Αυτή η μιμητική συμπεριφορά οδηγεί το γάλλιο σε σημεία όπου ο Fe^{3+} παραλαμβάνεται από το πλάσμα, και συναντάται σε καρκινικά κύτταρα, μολυσμένα κύτταρα, μακροφάγα και βακτηρία. Όταν το γάλλιο φτάσει σε αυτά τα σημεία θα ανταγωνιστεί το σίδηρο και θα παρεμβαίνει με την πρόσληψη του, το μεταβολισμό και τη δραστηριότητα του.

Όπως είδη αναφέραμε, ο σίδηρος βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της ριβονουκλεοτιδικής ρεδοκτάσης, ενός ενζύμου που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του DNA. Το γάλλιο ανταγωνίζεται το σίδηρο και παρεμβαίνει στη δραστηριότητα του ενζύμου αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA. Επιπλέον, το Ga^{3+} μπορεί να αντικαταστήσει το Fe^{3+} στην M2 υπομανάδα της ριβονουκλεοτιδικής ρεδοκτάσης, απενεργοποιώντας το ένζυμο λόγω δομικών αλλαγών. Από τη στιγμή που αναστέλλεται η σύνθεση του DNA, λόγω έλλειψης σιδήρου, τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται και οδηγούνται στο θάνατο [145]. Όταν το κύτταρο εκτεθούν σε γάλλιο πεθαίνουν μέσω της απόπτωσης, η οποία είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, σε αντίθεση με τους περισσότερους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, που προκαλούν τη νέκρωση του κυττάρου απελευθερώνοντας τοξίνες.

Τα καρκινικά κύτταρα που εκτίθενται σε γάλλιο στερούνται σιδήρου, με αποτέλεσμα να υπερεκφράζεται ο υποδοχέας της τρανσφερίνης. Η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα προκαλεί αυξημένη πρόσληψη της Ga-τρανσφερίνης με αποτέλεσμα την επιπλέον έλλειψη σιδήρου. Αυτός ο κύκλος συνεχίζεται μέχρι την απόπτωση του κυττάρου. Από την άλλη πλευρά, τα φυσιολογικά κύτταρα, ακόμα και αυτά που πολλαπλασιάζονται γρήγορα, καταναλώνουν πολύ λίγο σίδηρο (ή γάλλιο), επειδή αυτός ανακυκλώνεται σε υγιείς ιστούς. Σαν αποτέλεσμα, το γάλλιο δεν συσσωρεύεται σε υγιείς ιστούς και δεν τους καταστρέφει (κάτι που είναι γνωστό πολλές δεκαετίες τώρα με σάρωση με ^{67}Ga). Επιπλέον, όπως αναφέραμε παραπάνω το Ga^{3+} δεν εντάσσεται στην αιμοσφαιρίνη, με αποτέλεσμα να μη συμμετέχει στο σχηματισμό ερυθρών αιμοσφαιρίων και να μην παρεμβαίνει στη φυσιολογική μεταφορά του οξυγόνου. Αυτή η ικανότητα του γαλλίου να στοχεύει τα

καρκινικά κύτταρα, διαφυλάσσοντας τους υγιείς ιστούς, το καθιστά ένα εξαιρετικό αντι-πολλαπλασιαστικό (antiproliferative) παράγοντα.

Εκτός από την αντι-πολλαπλασιαστική δραστηριότητα του γαλλίου που συζητήσαμε παραπάνω, εμφανίζει και ισχυρή αντι-φλεγμονώδη δράση (anti-inflammatory), η οποία και αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητα του να μιμείται το Fe^{3+} , αν και ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως γνωστός.

5.5. Ενώσεις του Γαλλίου με θεραπευτική δράση

Μέχρι στιγμής, μόνο το νιτρικό γάλλιο (Ganite[®]) έχει εγκριθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες από το 1991 για την θεραπεία του καρκίνου που σχετίζεται με την υπερασβεστιαμία. Η Ga-Τρενσφερίνη και η Ga-Τρενσφερίνη-δοξορουβικίνη (gallium–transferrin–doxorubicin) έχουν χορηγηθεί σε ένα μικρό αριθμό ασθενών με καρκίνο. Παρόλα αυτά υπάρχουν πολλές δυνητικές θεραπευτικές ενώσεις του γαλλίου που βρίσκονται σε κλινική δοκιμή, όπως το χλωριούχο γάλλιο το gallium maltolate, το gallium 8-quinolinolate και άλλες.

5.5.1. Νιτρικό γάλλιο και χλωριούχο γάλλιο

Αρχικά, πρέπει να αναφέρουμε ότι λόγω της δημιουργίας δυσδιάλυτων προϊόντων του γαλλίου (όπως αναφέραμε παραπάνω), το νιτρικό γάλλιο χρησιμοποιείται με κάποιο χηλιοτικό παράγοντα. Το εμπορικά διαθέσιμο προϊόν Ganite[®] περιέχει 97.8 mM νιτρικού γαλλίου και κιτρικό σε ουδέτερο pH, το οποίο ουσιαστικά επιτρέπει όλο το γάλλιο να είναι συμπλεγμένο με το κιτρικό, και μια πολύ μικρή ποσότητα να βρίσκεται σε άλλες μορφές.

Η αντικαρκινική δραστηριότητα του νιτρικού γαλλίου πρωτοαναφέρθηκε το 1971 [146], όπου και παρατηρήθηκε μεγαλύτερη από 90% αναστολή του καρκίνου σε αρουραίους, όταν χορηγήθηκε όξινο διάλυμα νιτρικού γαλλίου, χωρίς κάποιο χηλιοτικό παράγοντα. Παρόμοια επίδραση είχαν και τα $GaCl_3$ και $Ga(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$. Η αντι-υπερασβεστιαμική (anti-hypercalcemic) του δράση διαπιστώθηκε όταν βρέθηκε ότι το γάλλιο εναποτίθεται σε σκελετικούς ιστούς, και ιδιαίτερα σε θέσεις που υπάρχει ταχεία οστική απορρόφηση, όπως στην επούλωση καταγμάτων [147]. Μελέτες έδειξαν ότι το γάλλιο προσροφάται στην επιφάνεια των οστών και αναστέλλει την οστική απορρόφηση στους οστεοκλάστες, που διαβρώνουν το οστό (οι οστεοκλάστες έχουν τον αντίθετο ρόλο από τους οστεοβλάστες) [148].

Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι το νιτρικό γάλλιο, εκτός από την παραπάνω ασθένεια, είναι αποτελεσματικό στη θεραπεία του λεμφώματος, του πολλαπλού μυελώματος, τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, καθώς επίσης και σε διάφορα άλλα είδη καρκίνου, αλλά και στη νόσο Paget των οστών [138,141,144]. Ωστόσο, ενδοφλεβίως, το νιτρικό γάλλιο είναι τοξικό για τα νεφρά, αν χορηγηθεί γρήγορα. Ως εκ τούτου, χορηγείται αργά και με συνεχή έγχυση για αρκετές ημέρες. Μια τυπική δόση είναι 200 με 500 mg/m² ημερησίως με συνεχόμενες εγχύσεις για 5 ημέρες, που συνήθως επαναλαμβάνονται για αρκετές εβδομάδες [149]. Η νεφρική τοξικότητα φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$, το οποίο σχηματίζεται όταν το φάρμακο εισάγεται άμεσα στην κυκλοφορία του αίματος [150].

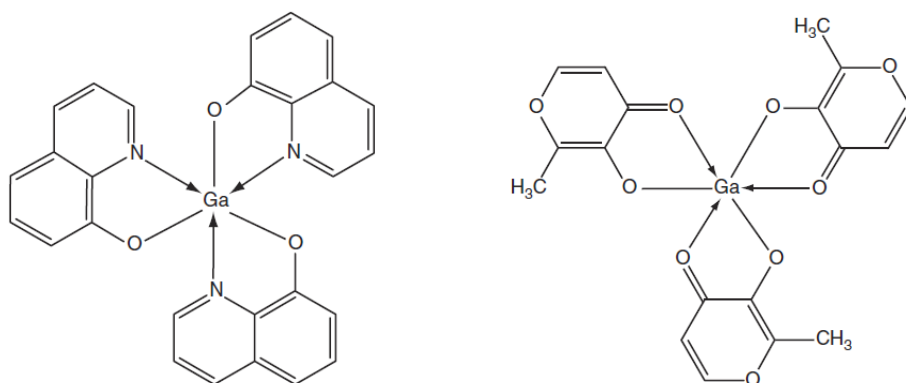
Το γλωριούχο γάλλιο έδειξε αντικαρκινική δραστηριότητα σε ζώα, και μάλιστα τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα την επιδεικνύει όταν ο όγκος βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης του. Επιπλέον, μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι εμφανίζει ισχυρή εκλεκτική πρόσληψη σε καρκινικά κύτταρα όταν χορηγείται από το στόμα, και μάλιστα χωρίς την υψηλή νεφρική τοξικότητα που παρατηρήθηκε για το νιτρικό γάλλιο [138].

5.5.2. Τα σύμπλοκα Gallium 8-quinolinolate και Gallium maltolate

Το σύμπλοκο τρις(8-κινολινολάτο)γάλλιο(III) (Gallium 8-quinolinolate - [tris(8-quinolinolato)gallium(III)]) και το τρις(μαλτολάτο)γάλλιο(III) (Gallium maltolate - [tris(3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-onato)gallium(III)]), αναπτύχθηκαν από τους Bernhard Keppler [151] και Lawrence Bernstein [152], αντίστοιχα (Σχήμα 5.1). Τα δύο αυτά παράγωγα χορηγούνται δια στόματος για τη θεραπεία του καρκίνου και παρουσιάζουν μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα (bioavailability) από τα δύο προαναφερθέντα άλατα του γαλλίου. Βιοδιαθεσιμότητα είναι η ποσότητα του φαρμάκου που φτάνει στο αίμα, και για το gallium maltolate βρέθηκε ότι είναι τουλάχιστον 25-57% σε υγιείς ανθρώπους. *In vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι τα δύο αυτά παράγωγα είναι περισσότερο δραστικά από το νιτρικό γάλλιο, σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως το λέμφωμα, τον καρκίνο του πνεύμονα ή του ήπατος [149,153].

Ο μηχανισμός δράσης και των δύο παραγώγων φαίνεται πως σχετίζεται με την αναστολή της ριβονουκλεοτιδικής ρεδουκτάσης. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι το gallium maltolate προκαλεί απόπτωση των κυττάρων περισσότερο αποδοτικά από νιτρικό γάλλιο. Η απόπτωση επιτυγχάνεται μέσω των μιτοχονδρίων και περιλαμβάνει την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου [154].

Και τα δύο παράγωγα έχουν περάσει επιτυχώς την φάση I των κλινικών δοκιμών. Μάλιστα, το gallium maltolate στην φάση I έδειξε ότι είναι πολύ ανεκτικό, ακόμα και σε υψηλές επαναλαμβανόμενες δόσεις, χωρίς νεφρική ή άλλη τοξικότητα. Η απουσία νεφρικής τοξικότητας φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι στο αίμα το συγκεκριμένο παράγωγο βρίσκεται σχεδόν εξολοκλήρου δεσμευμένο σε πρωτεΐνες (κυρίως στην τρανσφερίνη) [152], και κατ' αυτόν τον τρόπο μεταφέρεται στα κύτταρα. Για το gallium 8-quinolinolate η μεταφορά στα κύτταρα φαίνεται να γίνεται κυρίως μέσω του υποδοχέα της τρανσφερίνης [153]. Αυτή η πρωτεϊνική δέσμευση των φαρμάκων, σε αντίθεση με τα απλά άλατα του γαλλίου, φαίνεται να συμβάλει στη δια στόματος βιοδιαθεσιμότητα και στην κυτταροτοξικότητα των φαρμάκων.



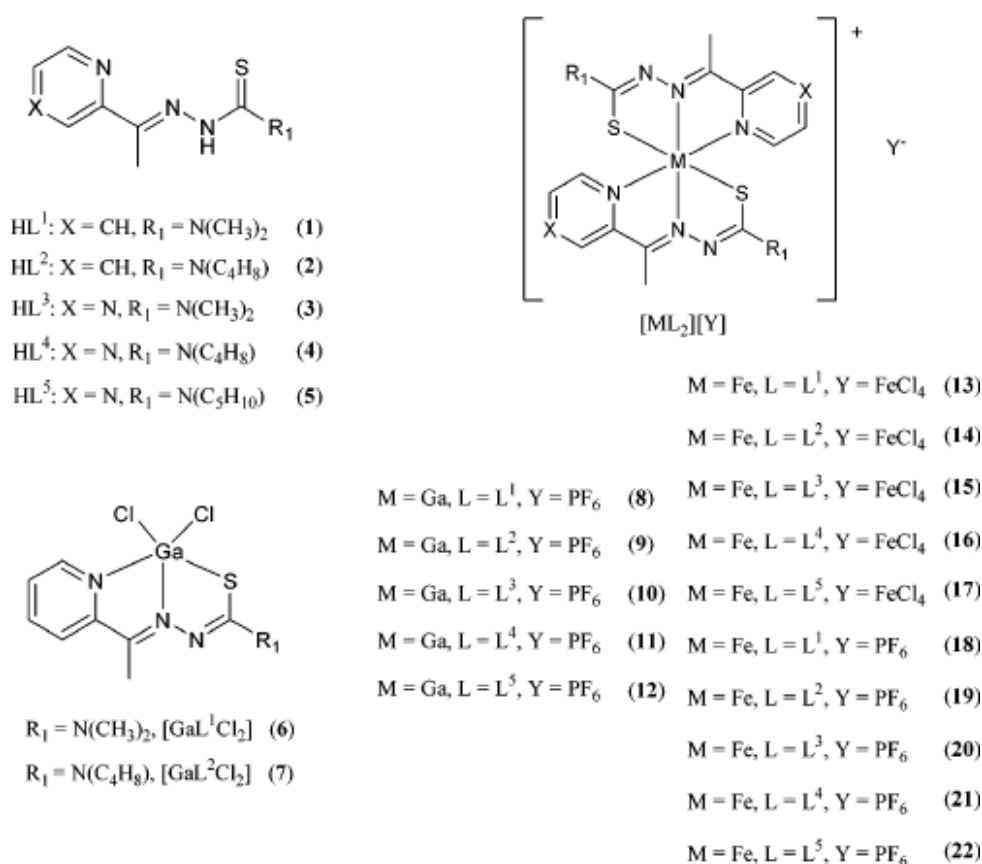
Σχήμα 5.1. Δομές του τρις(8-κινολινολάτο)γάλλιο(III) (Gallium 8-quinolinolate, αριστερά) και του τρις(μαλτολάτο)γάλλιο(III) (Gallium maltolate, δεξιά).

Εκτός της αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης του gallium 8-quinolinolate, έχει αποδειχθεί και η αντι-υπερασβεστιαστική του δραστηριότητα, και μάλιστα είναι παρόμοια με εκείνη του νιτρικού γαλλίου [155]. Επιπλέον, η χρήση του συγκεκριμένου παραγώγου σε συνδυασμό με θεραπεία με το cisplatin έχει δείξει πρόσθετα συνεργιστικά αποτελέσματα, με περισσότερο έντονη δράση σε κύτταρα που είναι λιγότερο ευαίσθητα στο φάρμακο του λευκοχρύσου [156].

5.5.3. Άλλες ενώσεις του γαλλίου

Πρόσφατα συντέθηκε μια σειρά συμπλόκων του Ga(III) και του Fe(III) με πέντε διαφορετικούς ⁴N-υποκατεστημένους α-N-ετεροκυκλικούς θειοημικαρβαζονικούς (thiosemicarbazones) υποκαταστάτες και μελετήθηκε η κυτταροτοξική τους δράση, αλλά και η αλληλεπίδραση τους με το ένζυμο ριβονουκλεοτιδική ρεδοουκτάση (Σχήμα 5.2)

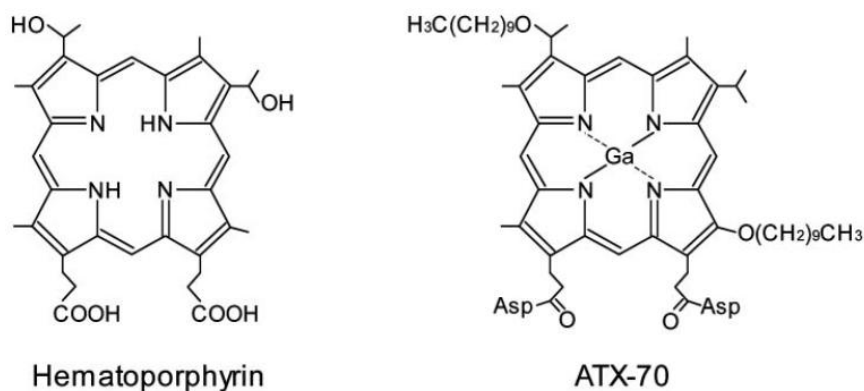
[157,158]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μέταλλο παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο, με το Ga(III) να αυξάνει και το Fe(III) να μειώνει τη δραστικότητα των ελεύθερων υποκαταστατών. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές IC₅₀ για τους ελεύθερους υποκαταστάτες και για τα αντίστοιχα σύμπλοκα του Ga(III), είναι της τάξης των nM, σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, μαστού και παχέος εντέρου. Η μεγαλύτερη τοξικότητα παρατηρείται για τον υποκαταστάτη acetylpyrazine *N,N*-dimethylthiosemicarbazone (εμφανίζεται ως **3** στο Σχήμα 5.2) και για το αντίστοιχο Ga(III) σύμπλοκο (**10** στο Σχήμα 5.2) όπου το IC₅₀ είναι 0.073 και 0.0045 nM (!) έναντι των 41M κυττάρων. Οι αντίστοιχες τιμές για το Fe(III) σύμπλοκο (**20** στο Σχήμα 5.2) και για το cisplatin είναι 149 και 390 nM, δηλαδή η τοξικότητα είναι τουλάχιστον τρεις τάξεις μεγέθους χαμηλότερη. Επίσης, διερευνήθηκε η ικανότητα αναστολής του ενζύμου ριβονουκλεοτιδική ρεδοκτάση, από τους ελεύθερους υποκαταστάτες και τα αντίστοιχα Fe(III) σύμπλοκα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα Fe(III) σύμπλοκα παρουσιάζουν μειωμένη ανασταλτική δράση του ενζύμου σε σύγκριση με τους ελεύθερους υποκαταστάτες. Αυτό αποδόθηκε στην ιοντική φύση και τη μειωμένη λιποφιλικότητα των συμπλόκων, κάτι που οδηγεί σε χαμηλότερη κυτταρική πρόσληψη [158].



Σχήμα 5.2. Δομές των ⁴N-υποκατεστημένων α-N-ετεροκυκλικών θειοημιμαρβαζονικών υποκαταστατών και των αντίστοιχων συμπλόκων του Ga(III) και του Fe(III).

Το σύμπλοκο Ga-πρωτοπορφυρίνη IX έδειξε ότι σε συγκέντρωση περίπου 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αναστέλλει την ανάπτυξη πολλών παθογόνων βακτηριών, όπως τα «θετικά κατά Gram» (Gram-positive) και τα «αρνητικά κατά Gram» (Gram-negative) βακτήρια και τα μυκοβακτήρια [159], αλλά και το παράσιτο *Plasmodium falciparum* που προκαλεί την ελονοσία [160]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τόσο η πρωτοπορφυρίνη IX όσο και το γάλλιο από μόνα τους έχουν περίπου το ένα εκατοστό της αντι-βακτηριδιακής δραστηριότητας του Ga-πορφυρινικού συμπλόκου.

Ένα άλλο πορφυρινικό σύμπλοκο του γαλλίου, βρέθηκε ότι παρουσιάζει ισχυρή αντικαρκινική δραστηριότητα, μέσω ενός μηχανισμού διαφορετικού από αυτόν που αναφέραμε παραπάνω, δηλαδή την στοχοποίηση του ενζύμου που σχετίζεται με την σύνθεση του DNA.



Σχήμα 5.3. Δομές της αιματοπορφυρίνης και του Ga(III)-παραγώγου της (ATX-70) που χρησιμοποιούνται στη sonodynamic θεραπεία του καρκίνου. Το Asp υποδηλώνει ένα κατάλοιπο του αμινοξέος ασπαρτικό οξύ.

Όπως αναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο οι πορφυρίνες είναι φωτοχημικά δραστικές, και με αυτό το σκεπτικό παρασκευάστηκε αρχικά το σύμπλοκο του γαλλίου με ένα παράγωγο της αιματοπορφυρίνης, το 7,12-bis(1-decyloxyethyl)-2,18-bispropionylaspartic acid 3,8,13,17-tetramethyl-porphynate gallium(III) salt (ATX-70, Σχήμα 5.3) [161]. Το ATX-70 βρέθηκε ότι προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο όταν ενεργοποιηθεί με ακτινοβολία υπερήχων (ultrasound irradiation). Οι Umemura et al. [162] βρήκαν ότι το ποσοστό της καταστροφής των κυττάρων σαρκώματος S-180 βελτιώνεται κατά τέσσερις φορές, όταν το παράγωγο ακτινοβοληθεί με υπερήχους. Οι Maruyama et al. [163], επίσης, ανέφεραν ότι το ATX-70 σε συνδυασμό με υπερήχους προκαλεί κυτταρική αναστολή τόσο σε *in vitro* όσο *in vivo* πειράματα σε ποντίκια. Το ATX-70

χορηγήθηκε ενδοφλεβίως σε ποντίκια 24 ώρες πριν τη θεραπεία με υπερήχους (sonodynamic therapy). Η καταστροφή του όγκου παρατηρήθηκε μόνο μετά από συνδυασμό των δύο, ενώ ούτε οι υπέρηχοι από μόνοι τους ούτε το ATX-70 προκάλεσε κάποια κυτταρική αναστολή [164]. Παρόμοια sonodynamic αντικαρκινική δραστηριότητα παρατηρήθηκε έναντι των ανθρώπινων κυττάρων του γαστρικού καρκίνου και της λευχαιμίας [165].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

6.1. Υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich και Alfa Aesar. Το ρήνιο αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich ως πεντακαρβόνυλο χλωρορήνιο (I) $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$, και το γάλλιο ως χλωριούχο γάλλιο (GaCl_3) από την Alfa Aesar. Οι διαλύτες ήταν pro analysis και αγοράστηκαν από τις εταιρείες Merck και Carlo Erba, και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Όπου απαιτήθηκε καθαρισμός, έγινε με τυποποιημένες μεθόδους καθαρισμού [166].

Για τις DNA-δεσμευτικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε φυσικό DNA από θύμο αδένων βοοειδούς (calf thymus DNA, CT-DNA), που αγοράστηκε από την εταιρία Sigma Aldrich ως μετά νατρίου άλας. Για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε αγαρόζη από την Sigma, ενώ το πλασμίδιο pBR322 αγοράστηκε ως lyophilized powder από την Sigma Aldrich. Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ από την εταιρεία Farmitalia Carlo Erba, ενώ το tris-[hydroxymethyl]-aminomethane free base (Tris Base) και το αντίστοιχο υδροχλωρικό άλας (Tris-HCl) αγοράστηκαν από την εταιρεία Alfa Aesar. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν σε νερό milli Q.

Το MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide], που χρησιμοποιείται για τα πειράματα κυτταροτοξικότητας αγοράστηκε από την AppliChem. Όλα τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας, που θα δούμε παρακάτω, αγοράστηκαν από την Biochrom.

6.2. Μέθοδοι χαρακτηρισμού συμπλόκων

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Τα φάσματα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ ελήφθησαν σε κυψελίδες (σωληνάκια) NMR 5 mm με δευτεριωμένους διαλύτες σε θερμοκρασία δωματίου. Η απόδοση των κορυφών έγινε με φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (COSY).

Φασματοσκοπία Ορατού – Υπεριώδους (UV-Vis) και Φασματοσκοπία Εκπομπής

Τα φάσματα απορρόφησης ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Cary 300 E (Varian) σε κυψελίδα δέσμης του 1.000 cm ή του 0.500 cm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα φάσματα φθορισμού ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu Spectrofluorophotometer RF-5301PC με κυψελίδες τετραπλής διαδρομής 1.000 cm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

Τα IR φάσματα ελήφθησαν στην περιοχή από 4000 έως 400 cm^{-1} σε στερεά κατάσταση σε δισκία KBr σε φασματοφωτόμετρο IRAffinity-1 Shimadzu.

Κυκλική Βολταμετρία (CV)

Τα κυκλικά βολταμμογραφήματα ελήφθησαν με ποτενσιοστάτη τύπου AFCBP1 από την Pine Instrument Company. Συγκεκριμένα τα δείγματα ήταν σε συγκέντρωση 0.5 mM σε απεσταγμένο διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), με φέροντα ηλεκτρολύτη 50 mM ($^n\text{Bu}_4\text{N}$)PF₆. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε Ag/AgCl, ως ηλεκτρόδιο εργασίας υαλώδης άνθρακας (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά) και ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο πλέγμα λευκόχρυσου. Η ταχύτητα σάρωσης κυμαίνεται από 40-100 mV/s, και οι τιμές των δυναμικών δίνονται ως προς φερροκένιο (Fc^+/Fc).

Κρυσταλλική Δομή

Η κρυσταλλική δομή αναλύθηκε στο Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε περιθλασίμετρο STOE IPDS-II με μονοχρωμάτορα γραφίτη και ακτινοβολία Mo-K α . Η συλλογή των δεδομένων έγινε σε θερμοκρασία 293 K. Η δομή λύθηκε με άμεσες μεθόδους με το πρόγραμμα SHELXS-97 [167].

6.3. Μελέτη αλληλεπίδρασης συμπλόκων με DNA (DNA binding studies)

6.3.1. Παρασκευή διαλύματος CT-DNA

Παρασκευάζεται διάλυμα DNA με διάλυση ινών φυσικού DNA από θύμο αδένος βοοειδούς (C.T.-DNA), περίπου 5mg σε 5 mL διαλύματος NaCl 0.1 M, υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος DNA ανά νουκλεοτίδιο που προκύπτει, υπολογίζεται με φασματοσκοπία απορρόφησης, αφού γνωρίζουμε το συντελεστή μοριακής απορρόφησης της κορυφής στα 258 nm, που είναι $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Ο λόγος της UV απορρόφησης στα 260:280 nm είναι 1.9:1, κάτι που υποδηλώνει ότι το DNA είναι ελεύθερο από πρωτεΐνες [168]. Η συγκέντρωση είναι της

τάξης των $\sim 1 \cdot 10^{-3}$ M. Η αραιώση μέρους από το πυκνό διάλυμα με μεγάλη ιοντική ισχύ γίνεται με ρυθμιστικό διάλυμα, οπότε προκύπτει διάλυμα της τάξης του $\sim 1 \cdot 10^{-4}$ M. Να σημειωθεί ότι το πυκνό διάλυμα μπορεί να παραμείνει στο ψυγείο το πολύ για 4 ημέρες και πριν την επαναχρησιμοποίηση του ελέγχεται με φάσμα ηλεκτρονικής απορρόφησης.

6.3.2. Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer) pH = 7.0

Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάζεται ως εξής: διαλύονται 1.7867 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ σε 100 mL H_2O και 0.9073 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ σε 100 mL H_2O . Με προσθήκη 58.7 mL του διαλύματος $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ και 41.3 mL του διαλύματος $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ προκύπτουν 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με pH = 7.0.

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (5 mM) με NaCl (50 mM), pH = 7.0

Ζυγίζονται 0.394 g Tris-HCl ($M_r=157.60$) και 1.461 g NaCl και διαλύονται σε λογότερο από 500 mL H_2O milli Q. Τέλος, το pH ρυθμίζεται με προσθήκη διαλύματος NaOH 1M στο 7.0 και συμπληρώνεται νερό μέχρι τα 500 mL.

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM) / NaCl (18 mM), pH = 7.2

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

Ρυθμιστικό διάλυμα «φόρτωσης» TBE 10x (Tris – Borate – EDTA) 100 mL (Loading buffer)

Το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης σε συγκέντρωση 1x, αφού παρέχει τους κατάλληλους ηλεκτρολύτες για τη διέλευση του ρεύματος. Διαλύονται 10.8 g Tris base ($M_r=121.14$), 5.5 g βορικού οξέος και 0.75 g δινάτριο EDTA ($M_r=372.24$) σε 100 mL νερό milli Q. Το πυκνό αυτό ρυθμιστικό διάλυμα έχει pH=8.3 (χωρίς ρύθμιση) και συγκέντρωση 890 mM Tris base, 890 mM βορικού οξέος, 20 mM EDTA. Μέρος αυτού του διαλύματος αραιώνεται 10 φορές για να προκύψει το επιθυμητό 1xTBE ρυθμιστικό διάλυμα, συγκέντρωσης 89 mM Tris base, 89 mM βορικού οξέος, 2 mM EDTA, που χρησιμοποιείται στη «φόρτωση» της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

6.3.3. Προσδιορισμός σημείων θερμικής μετουσίωσης, T_m

Οι μετρήσεις θερμικής μετουσίωσης έγιναν σε φασματοφωτόμετρο Cary 300 E (Varian) συνδεδεμένο με H/Y. Τα διαλύματα θερμάνθηκαν στην περιοχή 25-95 °C με ρυθμό 0.5 °C/min και μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 258 nm συναρτήσει της θερμοκρασίας. Ως σημείο θερμικής μετουσίωσης (T_m) ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία τα μισά μόρια του δίκλωνου DNA έχουν ξετυλιχτεί. Το T_m υπολογίζεται με προσαρμογή των καμπυλών θερμικής μετουσίωσης σε σιγμοειδή καμπύλη, με τη βοήθεια του προγράμματος Origin 8.0.

Οι τιμές της απορρόφησης κάθε διαλύματος εκφράζεται ως %υπερχρωμικότητα (%hyp), η οποία ορίζεται ως:

$$\%hyp = \frac{A_n - A_i}{A_i} \times 100 \quad (6.1)$$

όπου A_i η αρχική απορρόφηση της διπλής έλικας (στους 25 °C) και A_n η μετρούμενη απορρόφηση του διαλύματος σε κάθε θερμοκρασία. Η τελική % υπερχρωμικότητα μετράται στους 95 °C, όπου θεωρείται ότι έχει περατωθεί η μετουσίωση του DNA. Η έκφραση αυτή προτιμήθηκε, ώστε να εξισωθεί η επίδραση του εκάστοτε συμπλόκου σε όλες τις αναλογίες συμπλόκου/DNA, επειδή και το σύμπλοκο απορροφά κοντά στα 258nm, δηλαδή στο μήκος κύματος που γίνεται ο προσδιορισμός του T_m .

Οι μετρήσεις γίνονται ταυτόχρονα σε πανομοιότυπες κυβελίδες από χαλαζία οπτικής διαδρομής 1.000 cm, οι οποίες κλείνουν, ώστε να μην υπάρχει απώλεια διαλύματος κατά τη θέρμανση. Παρασκευάζονται διαλύματα με τελική συγκέντρωση DNA $2 \cdot 10^{-5}$ M (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), και με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος της υπό μελέτης ένωσης προκύπτουν διαλύματα γραμμομοριακής αναλογίας $r = \frac{[\text{complex}]}{[\text{DNA}]}$. Το pH

των διαλυμάτων παραμένει σταθερό με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος. Τα διαλύματα αφήνονται προς επώαση 24 ώρες στους 25 °C και έπειτα μετρώνται. Η επώαση των πορφυρινικών συμπλόκων με το DNA ολοκληρώνεται σε 10 min, όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία UV-Vis. Τα σύμπλοκα δεν είναι διαλυτά σε υδατικό περιβάλλον και επομένως διαλύονται σε οργανικό διαλύτη (MeOH ή DMSO) και κατόπιν αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να προκύψει η επιθυμητή συγκέντρωση. Φροντίζουμε ώστε η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη να είναι σταθερή σε όλα τα διαλύματα και να μην ξεπερνά σε ποσοστό το 5% στο τελικό υδατικό διάλυμα.

6.3.4. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού (CD)

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού ελήφθησαν σε διχρωγράφο Jasco J-815 CD συνδεδεμένο με H/Y (ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος) στην περιοχή 200-400 nm με βήμα 0.2 nm και ροή N₂ υπό πίεση 10 barr. Τα διαλύματα του DNA προετοιμάστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που αναφέρεται παραπάνω, με συγκέντρωση ως προς DNA ίση με 5·10⁻⁵ M (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), ίδιες αναλογίες r και συνολικό όγκο διαλυμάτων 3 mL. Ο διαλύτης baseline ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα και ο οργανικός διαλύτης. Τα διαλύματα αφέθηκαν για επώαση και μετρήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 25 °C.

6.3.5. Ξωδομετρία

Οι μετρήσεις του ξώδους πραγματοποιήθηκαν σε θερμοστατούμενο ξωδόμετρο SI Analytics στους 25 °C ± 0.1 °C. Τα διαλύματα παρασκευάζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως αναφέρθηκε στις προηγούμενες τεχνικές. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων έγιναν τουλάχιστον τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα, οι οποίες δεν έπρεπε να διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερο από 0.4 s και ο τελικός χρόνος ελήφθη ως ο μέσος όρος αυτών.

Το σχετικό ξώδες υπολογίζεται από τη σχέση: $n = \frac{t - t_0}{t_0}$, όπου t ο χρόνος ροής σε s του κάθε διαλύματος και t₀ ο χρόνος ροής του διαλυτή. Η αύξηση του μήκους της έλικας του DNA υπολογίστηκε από τα πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τη προσεγγιστική σχέση [169]:

$$\left(\frac{L}{L_0}\right) = \left(\frac{n}{n_0}\right)^{\frac{1}{3}} = \left(\frac{t - t_0}{t_{\text{DNA}} - t_0}\right)^{\frac{1}{3}} \quad (6.2)$$

όπου L, L₀: το πειραματικό μήκος του DNA, παρουσία και απουσία συμπλόκου, αντίστοιχα.

n, n₀: τα σχετικά ξώδη (για τις συγκεντρώσεις του πειράματος θεωρούνται κατά προσέγγιση ίσα με το ανηγμένο ξώδες) παρουσία και απουσία συμπλόκου, αντίστοιχα.

t, t_{DNA} και t₀: οι χρόνοι ροής των διαλυμάτων DNA παρουσία του συμπλόκου, του διαλύματος DNA απουσία του συμπλόκου και του διαλύτη (ρυθμιστικό διάλυμα), αντίστοιχα.

6.3.6. Πειράματα κυκλικής βολταμετρίας (CV)

Οι μετρήσεις αλληλεπίδρασης με DNA με πειράματα κυκλικής βολταμετρίας, πραγματοποιήθηκαν στον ποτενσιοστάτη που αναφέρεται παραπάνω χρησιμοποιώντας τα ίδια ηλεκτρόδια. Η ταχύτητα σάρωσης ήταν 100 mV/s ενώ ο φέρων ηλεκτρολύτης ήταν το NaCl του ρυθμιστικού διαλύματος.

6.3.7. Τιτλοδότηση UV-Vis και εκπομπής (UV-Vis & Emission Titration)

Τα διαλύματα για την τιτλοδότηση απορρόφησης και φθορισμού παρασκευάστηκαν ως εξής: σταθερή συγκέντρωση συμπλόκων επώαστηκε με διάφορες συγκεντρώσεις DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα και μετρήθηκε η απορρόφηση (ή ο φθορισμός) τους.

Τα πειραματικά δεδομένα από την τιτλοδότηση UV-Vis προσαρμόζονται στην εξίσωση **6.3**, προκειμένου να υπολογιστεί η σταθερά σύνδεσης K_b .

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (6.3)$$

όπου $[\text{DNA}]$: η συγκέντρωση του DNA σε κάθε λόγο R,

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

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

ϵ_f : συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ελεύθερου (μη δεσμευμένου) συμπλόκου. Η γραφική παράσταση του $[\text{DNA}]/[\epsilon_a - \epsilon_f]$ συναρτήσει της $[\text{DNA}]$ δίνει μια γραμμική ευθεία με κλίση $1/[\epsilon_a - \epsilon_f]$ και τομή στον άξονα των Y ίση με $1/K_b[\epsilon_b - \epsilon_f]$, αντίστοιχα. Με τη βοήθεια της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων υπολογίζεται η σταθερή σύνδεσης K_b από το λόγο της κλίσης προς την τομή, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin 8.0.

Η καμπύλη δέσμευσης κατασκευάζεται ως εξής. Αν η απορρόφηση του ελεύθερου μη δεσμευμένου συμπλόκου είναι A_f , η απορρόφηση του δεσμευμένου στο σημείο κορεσμού είναι A_b και A_{obs} είναι η παρατηρούμενη απορρόφηση του συμπλόκου σε κάθε σημείο τιτλοδότησης, τότε το κλάσμα (χ) του δεσμευμένου στο DNA συμπλόκου δίνεται από το λόγο:

$$\chi = \frac{(A_f - A_{\text{obs}})}{(A_f - A_b)} \quad (6.4)$$

Το διάγραμμα του κλάσματος (χ) του δεσμευμένου στο DNA συμπλόκου συναρτήσει του λόγου $[DNA]/[complex]$, δίνει την καμπύλη κορεσμού δέσμευσης (saturation binding curve).

Όμοια, για την τιτλοδότηση εκπομπής το κλάσμα (χ) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\chi = \frac{(I_{obs} - I_f)}{(I_b - I_f)} \quad (6.5)$$

όπου I_{obs} , I_f , I_b είναι οι εντάσεις εκπομπής του παρατηρούμενου, του ελεύθερου και του δεσμευμένου στο DNA συμπλόκου, αντίστοιχα.

6.3.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη (Agarose gel electrophoresis)

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

Αρχικά παρασκευάζεται, πηκτή αγαρόζης (agarose gel) 1% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE. Το μείγμα θερμαίνεται μέχρι να γίνει διαυγές. Στο θερμό διάλυμα προστίθεται κατάλληλος όγκος βρωμιδίου του αιθιδίου ώστε να προκύψει συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 1x TBE υπό σταθερή τάση 100 V για 50 min.

Για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε υπερελικωμένο (supercoiled) pBR322 πλασμιδιακό DNA. Εν συντομία, 100 ng pBR322 (100 ng/ μL) επωάζονται με διάφορες συγκεντρώσεις της υπό μελέτη ένωσης σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl με 18 mM NaCl, pH = 7.2 (συνολικός όγκος διαλύματος 15 μL). Τα δείγματα ακτινοβολούνται με λάμπα Xe 1000 W (Oriol, mod 68820, Universal Arc.) και μήκος κύματος ακτινοβολήσης $\lambda > 335 \text{ nm}$. Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος (loading buffer) 1xTBE υπό σταθερή τάση 100 V για 50 min. Η απεικόνιση των ζωνών του DNA (staining) γίνεται με προθήκη βρωμιδίου του αιθιδίου στο gel (τελική συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Τα gel εμφανίζονται με UV-Transilluminator και φωτογραφίζονται με ψηφιακή κάμερα.

Για τις μηχανιστικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε αζίδιο του νατρίου (NaN_3) και DMSO και ο κατάλληλος όγκος προστίθεται στο πλασμιδιακό DNA πριν την προσθήκη των συμπλόκων. Τα δείγματα επώστηκαν και ακτινοβολήθηκαν όπως σημειώθηκε παραπάνω. Στα πειράματα υπό αναερόβιες συνθήκες τα δείγματα απαερώθηκαν με 3 freeze-pump-thaw κύκλους.

6.4. Μελέτη κυττατοξικότητας υποκαταστατών και συμπλόκων

Σκοπός των κυτταροκαλλιιεργειών είναι να διατηρηθούν τα κύτταρα βιώσιμα, μακριά από το φυσιολογικό οργανισμό από τον οποίο προήλθαν, και κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες.

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν: ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού **MCF-7** (human breast cancer cell line), ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του προστάτη **PC-3** (human prostate cancer cell line) και ανθρώπινα κύτταρα γλοιοβλαστώματος **T98G** (human glioblastoma cell line). Τα *in vitro* πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Ερευνών, Ενέργειας και Ασφάλειας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.

6.4.1. Κυτταρικές καλλιέργειες

Η *in vitro* καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε ειδικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών, όπου τα κύτταρα προσκολλώνται στον πυθμένα της φιάλης, και σε συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές της φυσιολογικής ανάπτυξης τους. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C σε κορεσμένες συνθήκες υγρασίας και παρουσία 5% CO₂. Προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητες μολύνσεις, όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με λάμπα UV και φίλτρα αέρα ώστε να μειώνεται η πιθανότητα μόλυνσης.

Υλικά Κυτταροκαλλιιεργειας

Για τις κυτταροκαλλιιεργειες χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι υλικά:

Διάλυμα Πενικιλίνης – Στρεπτομυκίνης (Penicillin / Streptomycin - Biochrom)

Το διάλυμα περιέχει 10 μονάδες/mL πενικιλίνης και 10 μg/mL στρεπτομυκίνης και προστίθεται στο θρεπτικό υλικό για την αποφυγή μικροβιακών μολύνσεων.

Διάλυμα L-Glutamine – Biochrom

Το διάλυμα αυτό περιέχει 200 mM L-Glutamine σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Το καλλιιεργητικό υλικό εμπλουτίζεται με 1% w/w L-Glutamine.

Διάλυμα θρυψίνης/EDTA - Biochrom

Για την αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα του τρυβλίου καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θρυψίνης/EDTA 0.05% / 0.02% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Η θρυψίνη είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεασών. Υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυ-τελικό άκρο λυσίνης και αργινίνης. Χρησιμοποιείται ευρέως στις κυτταροκαλλιέργειες για την αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα των τρυβλίων αλλά και την ελευθέρωση των από τα συσσωματώματα. Η ενζυμική δράση της αναστέλλεται από συστατικά του ορού. Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης εξαρτώνται από την παρουσία ασβεστίου. Οι κυτταρικές καλλιέργειες περιέχουν ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου (Mg^{2+} , Ca^{2+}), τα ιόντα αυτά αναστέλλουν την δράση της θρυψίνης όπως και ένζυμα που περιέχονται στον ορό. Για να αποδυναμωθεί ο ρόλος των μορίων προσκόλλησης προστίθεται στο διάλυμα της θρυψίνης, EDTA, λόγω της ιδιότητάς του να κάνει χειλικά σύμπλοκα με τα δισθενή κατιόντα.

Διάλυμα έκπλυσης PBS

Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιούνται με ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών – χλωριούχων PBS (Phosphate Buffered Saline). Το διάλυμα PBS έχει pH = 7.4 και στερείται ιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} . Για να μειωθεί η συγκέντρωση των δισθενών κατιόντων και των πρωτεϊνών που αναστέλλουν την δράση της θρυψίνης, κατά την ανακαλλιέργεια γίνονται εκπλύσεις με PBS χωρίς Ca^{2+} / Mg^{2+} .

Εμβρυικός ορός μόσχου FBS (Fetal Bovine Serum – Biochrom).

Η απενεργοποίηση του ορού γίνεται με θέρμανση του στους 57 °C για 35 min.

Εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό DMEM

Οι κυτταρικές σειρές αναπτυχθήκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) υψηλής περιεκτικότητας γλυκόζης, εμπλουτισμένο με 10% απενεργοποιημένο εμβρυικό ορό μόσχου FBS (Fetal Bovine Serum). Σε αυτό προστέθηκαν 1% w/w διαλύματος L-Glutamine, καθώς και 1% w/w διαλύματος αντιβιοτικών Penicillin – Streptomycin.

Καλλιέργεια – Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει τουλάχιστον το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια, μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης. Ο

προσδιορισμός του βαθμού κάλυψης γίνεται με παρατήρηση του τρυβλίου στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

Η διαδικασία της θρυψινοποίησης γίνεται ως εξής: μεταφέρεται το τρυβλίο στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπου αφαιρείται το παλιό θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλένονται με 2 mL διαλύματος PBS. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται τυχόν εναπομείναντα ίχνη ορού FBSτα οποία περιέχουν αναστολείς της θρυψίνης. Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα και προστίθεται ~1,5 mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA και τα κύτταρα επώζονται στον κλίβανο για περίπου 3-5 λεπτά. Με τη διαδικασία αυτή τα κύτταρα ξεκολλούν από τον πυθμένα του τρυβλίου. Η πορεία αποκόλλησης των κυττάρων παρακολουθείται στο μικροσκόπιο. Μετά την ολοκλήρωση αποκόλλησης των κυττάρων, ακολουθεί προσθήκη στο κυτταρικό εναιώρημα 10 mL διαλύματος εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού DMEM. Ακολουθεί καλή ανάδευση (πιπετάρισμα), ώστε να αποφευχθούν τα κυτταρικά συσσωματώματα.

Απόψυξη κυτταρικής σειράς

Οι κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν παραπάνω παραλαμβάνονται από συνθήκες βαθιάς ψύξης (θερμοκρασία υγρού αζώτου $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$) σε ειδικά σωληνάρια ψύξης κυττάρων. Τα σωληνάρια μεταφέρονται αμέσως από το υγρό άζωτο στους 37°C για την απόψυξη των κυττάρων. Στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, τα κύτταρα μεταφέρονται σε τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων με 10 mL προθερμασμένο θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο. Κατά την απόψυξη, το διάλυμα ψύξης πρέπει να αραιωθεί τουλάχιστον 10 φορές σε καλλιεργητικό υλικό για να μειωθεί η τοξικότητα του DMSO που περιέχει.

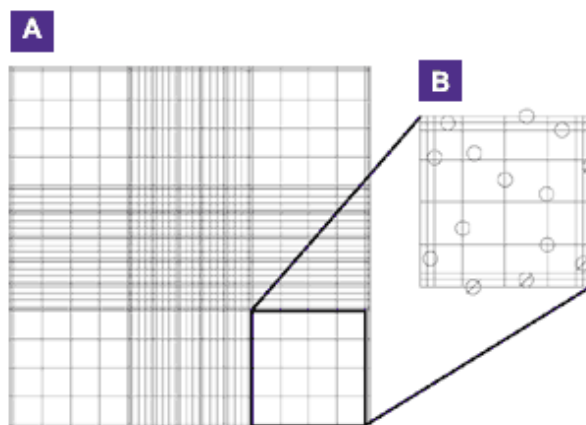
Ψύξη κυττάρων

Η διατήρηση κάθε κυτταρικής σειράς για μεγάλο χρονικό διάστημα γίνεται με την αποθήκευση της σε υγρό άζωτο. Αρχικά, τα κύτταρα που βρίσκονται σε ανάπτυξη μέσα στον επωαστικό κλίβανο αποκολλούνται από την φιάλη, μετά από εκπλύσεις με PBS και επώαση σε διάλυμα θρυψίνης/EDTA και επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, το εναιώρημα μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρωσης όπου και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά με 1500 στροφές ανά λεπτό. Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρωση, αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων με 1 mL διαλύματος ψύξης (10% DMSO σε εμβρυικό ορό μόσχου FBS). Τέλος, μεταφέρονται

σε ειδικά σωληνάρια ψύξης, τα οποία τοποθετούνται σταδιακά για 10 λεπτά στους 4 °C, για 30 λεπτά στους -30 °C, για 24 ώρες στους -80 °C και τέλος μεταφέρονται στο υγρό άζωτο όπου μπορούν να συντηρηθούν επ' αόριστον.

Μέτρηση κυττάρων σε εναιώρημα με αιμοκυτταρόμετρο (Μετρητής Neubauer)

Το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες, λείες επιφάνειες. Κάθε μία από αυτές έχει ένα τετραγωνισμένο πλέγμα το οποίο αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm και εμβαδόν 1 mm² (Σχήμα 6.1A). Σε κάθε ένα από τα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα περιέχονται επιπλέον διαβαθμίσεις (χωρίζονται σε 16 μικρότερα τετράγωνα), για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Κάθε μεγάλο τετράγωνο έχει εμβαδόν 1 mm², και όταν καλύπτεται με καλυπτρίδα, ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος σε κάθε ένα τετράγωνο είναι 10⁻⁴ mL (αφού η καλυπτρίδα βρίσκεται 0.1 mm υψηλότερα από το επίπεδο του πλέγματος).



Σχήμα 6.1. (A) Τετραγωνισμένο πλέγμα αντικειμενοφόρου πλάκας, (B) παρουσιάζεται σχηματικά ο τρόπος υπολογισμού των κυττάρων.

Τοποθετείται η καλυπτρίδα στην αντικειμενοφόρο πλάκα και με την βοήθεια πιπέτας τοποθετούνται 10 μL από το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας. Το κυτταρικό εναιώρημα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια με τριχοειδικά φαινόμενα. Τα κύτταρα που βρίσκονται μέσα στα τέσσερα ακριανά τετράγωνα, και όχι αυτά που βρίσκονται πάνω στις εξωτερικές γραμμές, μετρώνται στο μικροσκόπιο, και

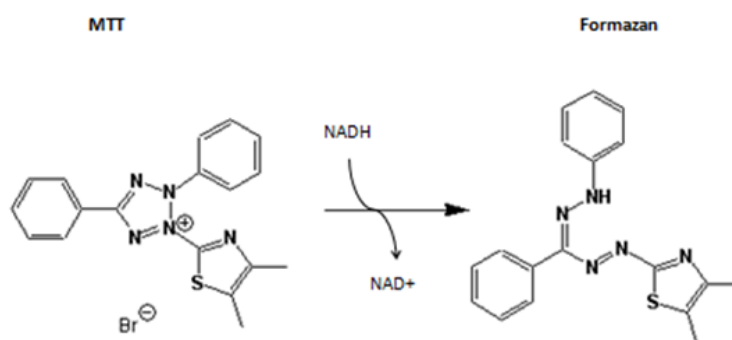
υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων (Σχήμα 6.1B). Η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε **κύτταρα / mL**) υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Αριθμός κυττάρων / mL} = \frac{\text{Μέση μέτρηση κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα}}{\text{mL}} * 10^4$$

6.4.2. Μελέτη κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT (MTT assay)

Γενικά

Η αποτίμηση της κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων έγινε με τη γνωστή μέθοδο ανάλυσης MTT [170], μια χρωματομετρική δοκιμασία, που βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να ανάγουν το υδατοδιαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου (3-[4,5-Dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (MTT) σε αδιάλυτα χρωματιστά σύμπλοκα φορμαζάνης (formazan), ενώ τα νεκρά κύτταρα δεν μπορούν. Συγκεκριμένα, ο δακτύλιος του τετραζολίου μεταβολίζεται στα ενεργά μιτοχόνδρια από διάφορες αφυδρογονάσεις, λαμβάνοντας ηλεκτρόνια από το NADH και NADPH (Σχήμα 6.2). Έτσι το κίτρινο χρώμα του υποστρώματος μετατρέπεται σε πορφυρούς κρυστάλλους. Η διάλυση των κρυστάλλων σε οργανικό διαλύτη (π.χ. ισοπροπανόλη) δίνει ένα σκούρο μοβ χρώμα, η συγκέντρωση του οποίου μπορεί να καθοριστεί φασματοφωτομετρικά. Δεδομένου ότι η αναγωγή του MTT μπορεί να συμβεί μόνο στα ενεργά μιτοχόνδρια (ζωντανά κύτταρα), η διαδικασία αυτή αποτελεί ένα μέτρο μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων.



Σχήμα 6.2. Αντίδραση αναγωγής του άλατος τετραζολίου (MTT) σε φορμαζάνη παρουσία ενζύμων.

Μέθοδος

Γίνεται σπορά κυττάρων σε επίπεδα πλακίδια κυτταροκαλλιιεργειών με 96 φρεάτια (wells) (8x12) προσθέτοντας 100 μ L από το κυτταρικό εναιώρημα με θρεπτικό υλικό

DMEM. Η πυκνότητα των κυττάρων είναι περίπου 4000 – 6000 κύτταρα ανά φρεάτιο. Ακολουθεί επώαση στον κλίβανο για μία μέρα, ώστε τα κύτταρα να προσκολληθούν στον πυθμένα των φρεατίων. Την επόμενη μέρα αφαιρείται το παλιό θρεπτικό υλικό και προστίθενται σε κάθε φρεάτιο 100 μL διαλύματος της υπό μελέτη ένωσης σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις, εις τετραπλούν (1 nM έως 250 μM , αναλογα με την υπό μελέτη ένωση). Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα της υπό μελέτη ένωσης σε DMSO και με κατάλληλες αραιώσεις με DMEM, προκύπτουν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών στο υγρό καλλιέργειας. Πρέπει να σημειωθεί ότι η τελική συγκέντρωση DMSO στο διάλυμα δεν πρέπει να ξεπερνά το 1% καθώς το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα. Σε 4-8 φρεάτια προστίθενται 100 μL θρεπτικού υλικού χωρίς να προστεθεί καμιά ένωση, ώστε να το έχουμε ως δείγμα αναφοράς (control). Τα πλακίδια τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο στους 37 °C. Μετά από 72 ώρες επώασης αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται σε κάθε φρεάτιο 100 μL διαλύματος MTT (1 mg/mL σε DMEM) και τα πλακίδια επωάζονται για 4 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης σχηματίζονται μοβ κρύσταλλοι φορμαζάνης που είναι ορατοί δια γυμνού οφθαλμού. Μετά το τέλος της επώασης αφαιρείται προσεκτικά το διάλυμα MTT. Στο στάδιο αυτό απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, επειδή το υγρό καλλιέργειας πρέπει να απομακρυνθεί εξολοκλήρου, αφού απορροφά στο ορατό (μπορεί να προκαλέσει θετικό σφάλμα) και η παρουσία του να μην επιτρέψει στην συνέχεια την πλήρη διαλυτοποίησή του, ενώ ταυτόχρονα δεν πρέπει να απομακρυνθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης (αρνητικό σφάλμα). Εν συνεχεία προστίθενται 100 μL ισοπροπανόλης σε κάθε φρεάτιο, ακολουθεί καλή ανάδευση ώστε να διαλυθούν οι κρύσταλλοι και μετράται η απορρόφηση του διαλύματος σε κάθε φρεάτιο σε μήκος κύματος 540 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA Reader. Επίσης μετράται η απορρόφηση στα 620 nm ως υπόβαθρο και αφαιρείται.

Η ποσότητα της σχηματιζόμενης φορμαζάνης μπορούμε να πούμε ότι εξαρτάται από την αναπνευστική ικανότητα των κυττάρων παρουσία ή απουσία περισσότερο ή λιγότερο τοξικών παραγώγων. Επομένως, το % OD που υπολογίζεται από το λόγο της μέσης τιμής της οπτικής πυκνότητας κάθε διαλύματος (optical density OD_i) προς τη μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας του δείγματος αναφοράς (OD_{control}), σχετίζεται με την τοξικότητα.

$$\% \text{ Cell Viability} = \frac{OD_i}{OD_{\text{control}}} * 100 \quad (6.6)$$

Κατόπιν, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της % OD συναρτήσει του λογαρίθμου της συγκέντρωσης ($\log C$) και τα σημεία προσαρμόζονται σε σιγμοειδή καμπύλη (όπου είναι αυτό δυνατόν), με την βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος GraphPad Prism 5.

Η IC_{50} (σε μM) είναι η τιμή της συγκέντρωσης όπου παρατηρείται θνησιμότητα των κυττάρων σε ποσοστό 50%. Οι τιμές IC_{50} και τα SD προκύπτουν από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ

7.1. Ο υποκαταστάτης 2-(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνη, (pq)

7.1.1. Σύνθεση του υποκαταστάτη 2-(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνη

Γενική Πορεία Σύνθεσης

Σε ένα διάλυμα *o*-φαινυλενοδιαμίνης (1.08 g, 10.0 mmol) και χλωρομυρμηγκικού μεθυλεστέρα (0.4 mL, 2.6 mmol) σε ισοπροπανόλη (15 mL) προστίθεται 2-ακετυλοπυριδίνη (2.25 mL, 20 mmol). Το προκύπτον διάλυμα θερμαίνεται στους 50 με 60 °C για 48 h. Κατόπιν, η φιάλη ψύχεται στους -5 °C για ένα βράδυ, όπου και σχηματίζεται λευκό στερεό, το οποίο και παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό. Το στερεό αυτό ανακρυσταλλώνεται από ισοπροπανόλη. Απόδοση 60 %.



Σχήμα 7.1. Πορεία σύνθεσης του υποκαταστάτη 2-(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνη (pq).

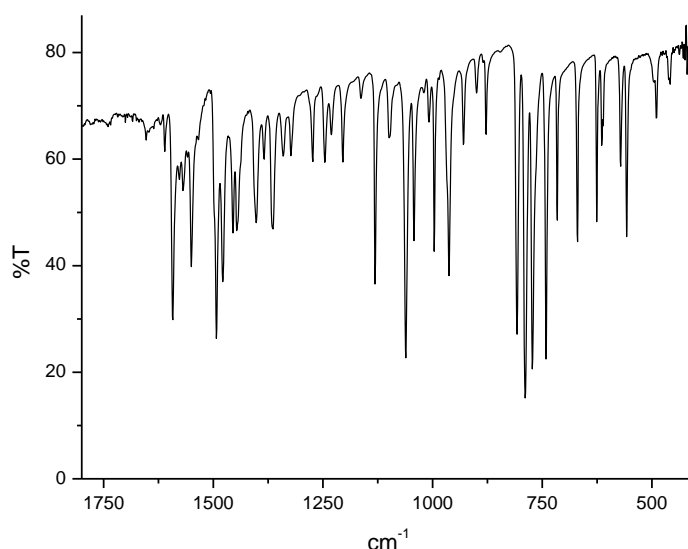
Σχολιασμός Μεθόδου Σύνθεσης

Ο υποκαταστάτης pq παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που παρουσιάστηκε από τους S. Kesselouri et al. [171]. Η πορεία σύνθεσης (Σχήμα 7.1) περιλαμβάνει μια συμπύκνωση Schiff ανάμεσα στην 2-ακετυλο-πυριδίνη και στην *o*-φαινυλενοδιαμίνη, που ακολουθείται από μια διενική κυκλο-προσθήκη. Στα πλαίσια της προσθήκης πρέπει να δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες, κάτι που υποδηλώνει η αντικατάσταση της μιας μεθυλο ομάδας της πυριδίνης από υδρογόνο. Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία καταλύτη χλωρομυρμηγκικού μεθυλεστέρα, στους 50-60 °C και διαλύτη ισοπροπανόλη.

7.1.2. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 2-(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνη

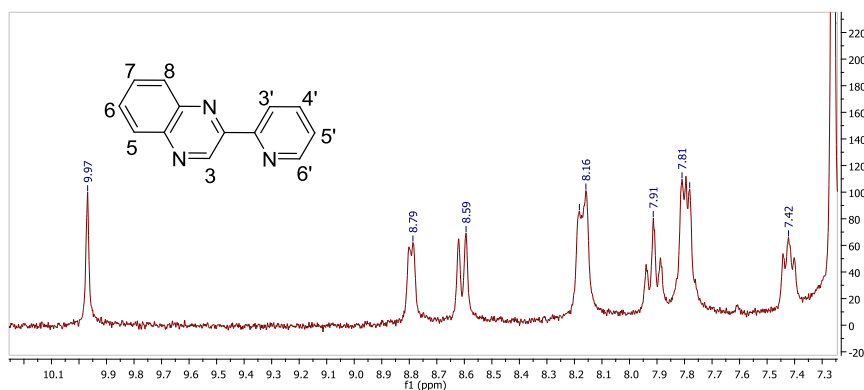
Ο υποκαταστάτης χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 , IR και βρέθηκε σε απόλυτη συμφωνία με τη βιβλιογραφία.

Στο Σχήμα 7.2 φαίνεται το φάσμα IR του υποκαταστάτη σε δισκίο KBr. Το φάσμα είναι αρκετά πολύπλοκο, αλλά παρόλα αυτά υπάρχουν κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές, όπως αυτές στα 626 και 408 cm^{-1} που αποδίδονται στις εντός και εκτός επιπέδου παραμορφώσεις του 2-πυριδινικού δακτυλίου της κινόξαλίνης. Οι κορυφές στα 3040 , 1578 και 1061 cm^{-1} , αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-H, C-C και στην εκτός επιπέδου κάμψη του C-H σε αρωματικούς δακτυλίους, αντίστοιχα.



Σχήμα 7.2. IR φάσμα του ρq σε δισκίο KBr.

Στο Σχήμα 7.3 φαίνεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της 2-(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνης σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), και στον Πίνακα 7.1 συνοψίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων. Στο μόριο του ρq υπάρχουν 9 χημικώς διακριτά υδρογόνα, παρ' όλα αυτά στο φάσμα NMR παρατηρούνται μόλις 7 κορυφές. Αυτό συμβαίνει επειδή υπάρχουν δύο ζεύγη υδρογόνων που συντονίζονται σε παρόμοιες συχνότητες. Το υδρογόνο που μπορεί εύκολα να αποδοθεί είναι το H3 που εμφανίζεται ως απλή κορυφή, καθώς είναι το μόνο που δεν συζεύγνυται με κανένα άλλο. Τα υπόλοιπα υδρογόνα του κινόξαλινικού παραγώγου έχουν αποδοθεί πλήρως με φασματοσκοπία δύο διαστάσεων COSY NMR [171].



Σχήμα 7.3. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του pq σε διαλύτη CDCl_3 , και η αρίθμηση των πρωτονίων.

Πίνακας 7.1. Χημικές μετατοπίσεις του pq σε CDCl_3 .

Πρωτόνια	δ (ppm) ^a						
	H3	H6'	H3'	H5,8	H4'	H6,7	H5'
pq	9.97s	8.79d	8.59d	8.16mt	7.91t	7.81mt	7.42t

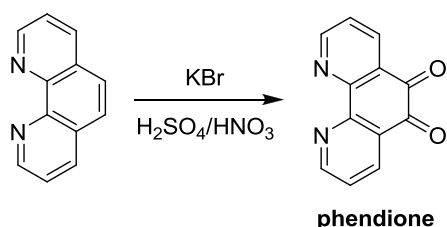
^a s: απλή, d: διπλή, t: τριπλή, mt: πολλαπλή

7.2. Ο υποκαταστάτης 1,10-φαινανθρόλινο-5,6-διόνη, (phendione)

7.2.1. Σύνθεση του υποκαταστάτη 1,10-φαινανθρόλινο-5,6-διόνη

Γενική Πορεία Σύνθεσης

Ένα μείγμα 1,10-φαινανθρολίνης (1.00 g, 5.04 mmol) και KBr (5.95 g, 50.0 mmol) προστίθεται σε 20 mL πυκνού θεικού οξέος, το οποίο έχει προψυχθεί σε θερμοκρασία υγρού αζώτου. Το μείγμα αφήνεται να φτάσει σιγά-σιγά σε θερμοκρασία δωματίου και σχηματίζεται μια πορτοκαλί πάστα. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη 10 mL πυκνού νιτρικού οξέος σε θερμοκρασία δωματίου. Το κόκκινο διάλυμα που προκύπτει θερμαίνεται στους 90 °C για 3 ώρες και αφού φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου, ρίχνεται σε 400 mL νερό. Το διάλυμα εξουδετερώνεται με Na_2CO_3 και εκχειλίζεται 4 φορές με CH_2Cl_2 . Το κίτρινο εκχύλισμα ξηραίνεται με MgSO_4 , διηθείται και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό κενό. Το κίτρινο στερεό ανακρυσταλλώνεται από MeOH. Απόδοση 56 %.



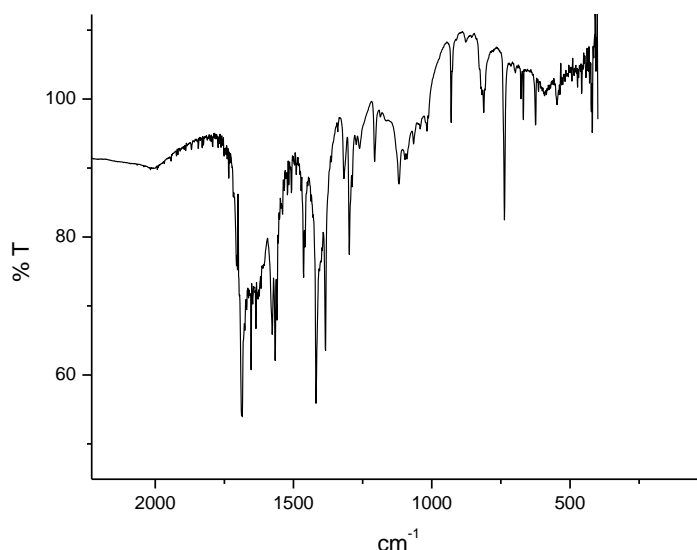
Σχήμα 7.4. Πορεία σύνθεσης του υποκαταστάτη 1,10-φαινανθρόλινο-5,6-διόνη (phendione).

Σχολιασμός Μεθόδου Σύνθεσης

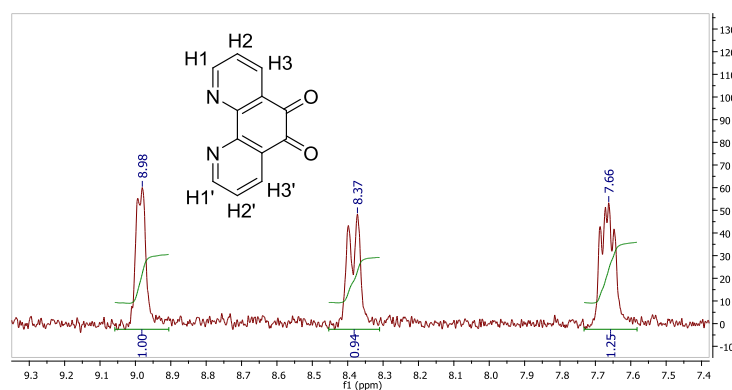
Οι συνθήκες σύνθεσης των φαινανθρόλινο-5,6-διονών απαιτούν συνήθως δύσκολες αντιδράσεις και έχουν γενικά χαμηλές αποδόσεις, γι' αυτό έχουν αναφερθεί αρκετές προσπάθειες σύνθεσης τους. Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι αυτή που προτάθηκε από τους M. Yamada et al. [172], που χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό οξειδωτικών αντιδραστηρίων. Σε αυτή τη διαδικασία, 1,10-φαινανθρολίνη οξειδώνεται χρησιμοποιώντας $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3/\text{KBr}$, στην οποία πρώτα οξειδώνεται το βρωμίδιο προς Br_2 , διευκολύνοντας την μετατροπή που φαίνεται στο Σχήμα 7.4. Μια τροποποίηση της μεθόδου αυτής [173] προτείνει ότι το κρίσιμο σημείο για τη σύνθεση της διόνης είναι το μείγμα της διαμίνης/KBr σε πυκνό H_2SO_4 να έχει ψυχθεί σε θερμοκρασία υγρού αζώτου. Η αντίδραση απαιτεί μεγάλη προσοχή γιατί είναι πιθανό να μην παραληφθεί καθόλου το επιθυμητό προϊόν.

7.2.2. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 1,10-φαινανθρόλινο-5,6-διόνη

Ο υποκαταστάτης χαρακτηρίστηκε πλήρως με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ και IR. Στο Σχήμα 7.5 φαίνεται το IR φάσμα του υποκαταστάτη, που αν και είναι αρκετά πολύπλοκο, διακρίνονται κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές αρωματικών δακτυλίων, που αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-H και C-C και την εκτός επιπέδου κάμψη του C-H. Η πιο χαρακτηριστική κορυφή του υποκαταστάτη εμφανίζεται στα 1687 cm^{-1} και μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση τάσης του C=O.



Σχήμα 7.5. IR φάσμα του υποκαταστάτη 1,10-φαινανθρολίνη-5,6-διόνη.



Σχήμα 7.6. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της rhenidione σε διαλύτη DMSO-d_6 , και η αρίθμηση των πρωτονίων.

Η ταυτοποίηση της rhenidione έγινε και με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ σε DMSO-d_6 , όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.6, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.2. Στο μόριο της rhenidione υπάρχουν 6 διακριτά πρωτόνια, τα οποία είναι ανά δύο χημικώς ισοδύναμα, επομένως θα συντονίζονται στις ίδιες συχνότητες. Για αυτό άλλωστε εμφανίζονται μόλις 3 κορυφές. Η διπλή κορυφή που εμφανίζεται σε ασθενές πεδίο μπορεί εύκολα να αποδοθεί στα H1 και $\text{H1}'$, ενώ η πολλαπλή χωρίς ιδιαίτερο προβληματισμό αποδίδεται στα $\text{H2,2}'$, καθώς μόνο τα συγκεκριμένα πρωτόνια συζεύγνυνται με δύο γειτονικούς πυρήνες. Το δύο διαστάσεων φάσμα COSY NMR επιβεβαίωσε τη συγκεκριμένη απόδοση. Η ολοκλήρωση μας δίνει την αναλογία των πρωτονίων κάθε κορυφής. Όπως αναμένονταν, η αναλογία είναι 1:1:1.

Πίνακας 7.2. Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) της phendione σε DMSO-d6.

Πρωτόνια	δ (ppm)
H1, H1'	8.98d
H2, H2'	7.66t
H3, H3'	8.37d

7.3. Ο υποκαταστάτης τετρα(4-πυριδυλ)πορφυρίνη, (H₂TPyP)

7.3.1. Σύνθεση του υποκαταστάτη τετρα(4-πυριδυλ)πορφυρίνη

Γενική Πορεία Σύνθεσης

Σε μια σφαιρική φιάλη προστίθεται προπιονικό οξύ (35 mL) και θερμαίνεται στους 90 °C. Ακολουθεί πολύ αργή προσθήκη απεσταγμένης 4-πυριδυλ-καρβοξυ-αλδεύδη (1.32 mL, 0.014 mmol) και απεσταγμένου πυρρολίου (1 mL, 0.014 mmol). Το μείγμα θερμαίνεται με βρασμό υπό αναρροή (reflux) για 40 min. Μετά το τέλος του βρασμού το μείγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρεται σε μεγαλύτερη φιάλη, όπου και προστίθενται ~300 mL νερού. Το pH του μείγματος φέρεται περίπου στο 3 με προσθήκη ένυδρου Na₂CO₃ και αφήνεται σε ηρεμία για να καταβυθιστεί το μωβ ίζημα. Εν συνεχεία, το ίζημα διηθείται και πλένεται με θερμό DMF, έως ότου το διήθημα να βγαίνει ένα ελαφρύ κίτρινο χρώμα. Το ίζημα ξεπλένεται με θερμό νερό αρκετές φορές και ξηραίνεται στους 100 °C για 24 ώρες. Απόδοση 8 %, 171.7 mg.

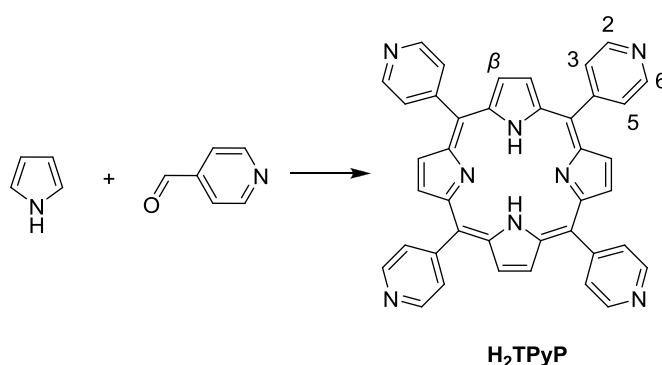
Σχολιασμός Μεθόδου Σύνθεσης

Η σύνθεση των *meso*-υποκατεστημένων πορφυρινών πραγματοποιείται αρκετά εύκολα από τη συμπύκνωση του πυρρολίου με την κατάλληλη αλδεύδη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.7. Για τη σύνθεση της 5,10,15,20-τετρα(4-πυριδυλ)πορφυρίνης (στο εξής θα αναφέρεται ως H₂TPyP) η αλδεύδη που απαιτείται είναι η 4-πυριδυλ-καρβοξυ-αλδεύδη, ενώ η απόδοση της αντίδρασης βάση βιβλιογραφίας είναι περίπου στο 20 %.

Στο εργαστήριο, η σύνθεση της συγκεκριμένης πορφυρίνης πραγματοποιήθηκε με μια τροποποίηση [174] της γνωστής βιβλιογραφικής μεθόδου συμπύκνωσης που προτάθηκε από τους A. Adler et al. [175]. Οι συνθήκες περιλαμβάνουν την άμεση αντίδραση ισομοριακών ποσοτήτων πυρρολίου και αλδεύδης σε προπιονικό οξύ και reflux για 40 min. Αξίζει να σημειωθεί ότι το προπιονικό οξύ δεν πρέπει να φτάσει μέχρι το σημείο

βρασμού του πριν την προσθήκη των αντιδραστηρίων, γιατί αν αυτά προστεθούν πολύ γρήγορα, η προκύπτουσα εξώθερμη αντίδραση είναι αρκετά βίαιη για να προκαλέσει παραπάνω βρασμό. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει και ο χρόνος αντίδρασης, αφού ο παραπάνω χρόνος βρασμού στο προπιονικό οξύ δεν φέρνει βελτίωση της απόδοσης, αλλά στη πραγματικότητα μειώνει την καθαρότητα του προϊόντος.

Το συγκεκριμένο προϊόν διαλύεται εξαιρετικά καλά σε όξινο περιβάλλον, εξαιτίας της πρωτονίωσης των αζώτων στο κέντρο της πορφυρίνης, αποδίδοντας έντονα πράσινα διαλύματα. Σε οργανικούς διαλύτες διαλύεται καλά μόνο σε CHCl_3 και μέτρια σε CH_2Cl_2 , αποκτώντας ανοιχτό ροζ χρώμα. Στους υπόλοιπους διαλύτες η πορφυρίνη είναι αδιάλυτη.



Σχήμα 7.7. Πορεία σύνθεσης του υποκαταστάτη τετρα(4-πυριδύλ)πορφυρίνη, (H₂TPyP).

7.3.2. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη τετρα(4-πυριδύλ)πορφυρίνη

Το πορφυρινικό μόριο που συντέθηκε χαρακτηρίστηκε πλήρως με φασματοσκοπία IR, ¹H-NMR και UV-Vis.

IR Φασματοσκοπία

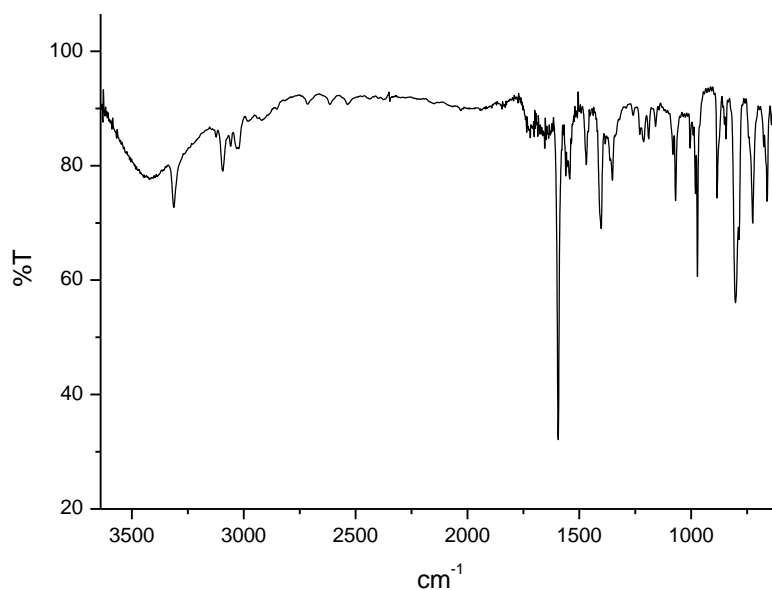
Στο Σχήμα 7.8 φαίνεται το IR φάσμα της H₂TPyP σε δισκίο KBr και στον Πίνακα 7.3 συνοψίζονται οι συχνότητες των δονήσεων και η απόδοση τους. Στις ελεύθερες μετάλλου πορφυρίνες μια πολύ χαρακτηριστική κορυφή είναι αυτή που εμφανίζεται κοντά στα 3310 cm^{-1} και οφείλεται στη δόνηση του δεσμού N-H του πυρρολίου, η οποία προφανώς και απουσιάζει όταν συμπλεχθεί μέταλλο μέσα στην πορφυρίνη. Οι δονήσεις στα 1469 και 1352 cm^{-1} , είναι ασθενείς και αποδίδονται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=N του πυρρολίου. Η ισχυρή κορυφή στα 972 cm^{-1} αποδίδεται στην παραμόρφωση του δακτυλίου της πορφυρίνης. Οι δονήσεις στα 785 και 725 cm^{-1} οφείλονται στην εκτός επιπέδου CH κάμψη και στις σκελετικές δονήσεις παραμόρφωσης των πυριδύλο ομάδων, αντίστοιχα. Οι

εντός επιπέδου CH παραμορφώσεις είναι πιο δύσκολο να προσδιοριστούν, αλλά πιθανόν να είναι κοντά στα 1060 cm^{-1} .

Πίνακας 7.3. Δονήσεις υπερόθρου (σε cm^{-1}) της H_2TPyP και η απόδοσή τους σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [176].

cm^{-1} ^a	Αποδόσεις
3311w	N-H δόνηση τάσης
1594s	C=C (pyridine) δόνηση τάσης
1544vw	C=C (pyrrole) δόνηση τάσης
1469w	C=N (pyrrole) δόνηση τάσης
1402m	pyridine skeletal τάση
1352w	C=N (pyrrole) δόνηση τάσης
1069w	
990vw	παραμόρφωση δακτυλίου προφυρίνης
972s	παραμόρφωση δακτυλίου προφυρίνης
799s	παραμόρφωση πυρρολικού δακτυλίου
785s	CH εκτός επιπέδου κάμψη (pyridine)
725s	pyridine skeletal deformation

^a. Εντάσεις: vw: very weak, w: weak, m: medium, s: strong



Σχήμα 7.8. Φάσμα IR της H_2TPyP σε δισκίο KBr.

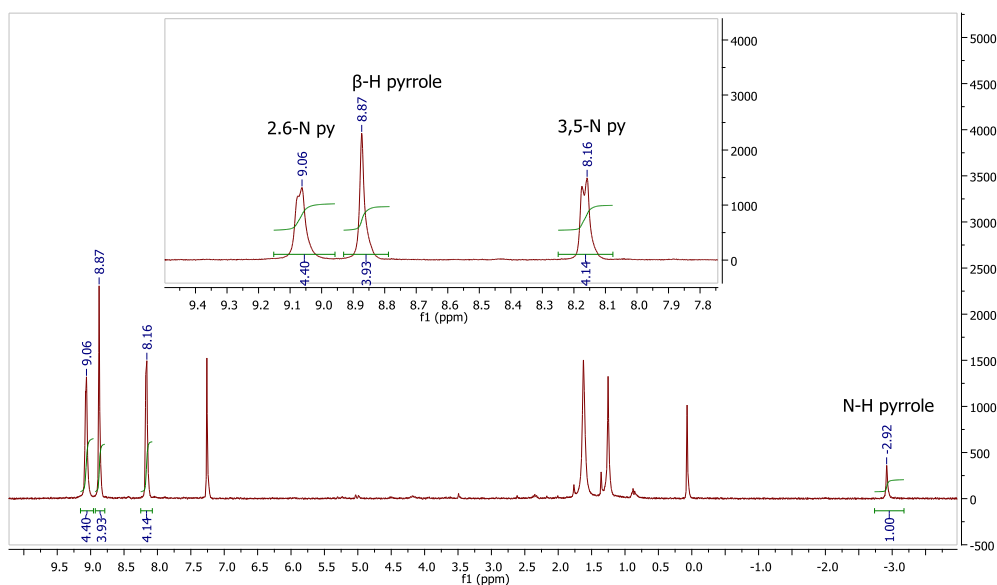
¹H-NMR φασματοσκοπία

Το NMR φάσμα της πορφυρίνης σε CDCl₃ φαίνεται στο Σχήμα 7.9 και οι χημικές μετατοπίσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 7.4. Η πορφυρίνη εμφανίζει μόνο 4 κορυφές στο NMR, όσα είναι δηλαδή και τα χημικώς μη ισοδύναμα υδρογόνα του μορίου. (Οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα αποδίδονται σε διαλύτες, CHCl₃, προπιονικό οξύ, TMS). Τα περισσότερο αποπροασπισμένα είναι τα υδρογόνα H2 και H6 της πυριδίνης και εμφανίζονται σαν διπλή κορυφή (η αρίθμηση φαίνεται στο Σχήμα 7.7). Αντίθετα, τα περισσότερο προασπισμένα είναι τα N-H του πυρρολίου, και εμφανίζονται σε πολύ ισχυρά πεδία, ακόμα ισχυρότερα και από το TMS. Για την συγκεκριμένη πορφυρίνη εμφανίζονται στα -2.92 ppm.

Οι κορυφές των πυριδύλο υδρογόνων φαίνεται να μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία σε διαλύτη δευτεριωμένο υδροχλωρικό οξύ (DCl) (Πίνακας 7.4). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην πρωτονίωση των πυριδινικών αζώτων από το οξύ. Αυτά που επηρεάζονται περισσότερο από την αλλαγή του διαλύτη είναι τα 3 και 5-H της πυριδίνης. Από 8.16 ppm που είναι στο CDCl₃ μετατοπίζονται στα 9.32 ppm στο DCl, όπως φαίνονται στον Πίνακα 7.4. Αντίθετα, τα β-H του πυρρολίου μετατοπίζονται μεν προς χαμηλότερα πεδία αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό. Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν την πρωτονίωση των N της πυριδίνης από το διαλύτη. Τα N-H πρωτόνια του πυρρολίου δεν εμφανίζονται [176]. Το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Με ολοκλήρωση, βρίσκουμε ότι οι κορυφές έχουν σχέση 4:4:4:1 (ή 8:8:8:2), ακριβώς όπως αναμένουμε.

Πίνακας 7.4. Χημικές μετατοπίσεις (ppm) της H₂TPyP σε CDCl₃ και DCl. Σε παρένθεση φαίνεται ο αριθμός των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.

Πρωτόνια	δ (ppm)	
	CDCl ₃	DCl
H2,6 πυριδίνης	9.06d (8H)	9.45d (8H)
β-H πυρρολίου	8.87s (8H)	9.11s (8H)
H3,5 πυριδίνης	8.16d (8H)	9.32d (8H)
N-H πυρρολίου	-2.92s (2H)	



Σχήμα 7.9. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της πορφυρίνης H_2TPyP σε διαλύτη CDCl_3 .

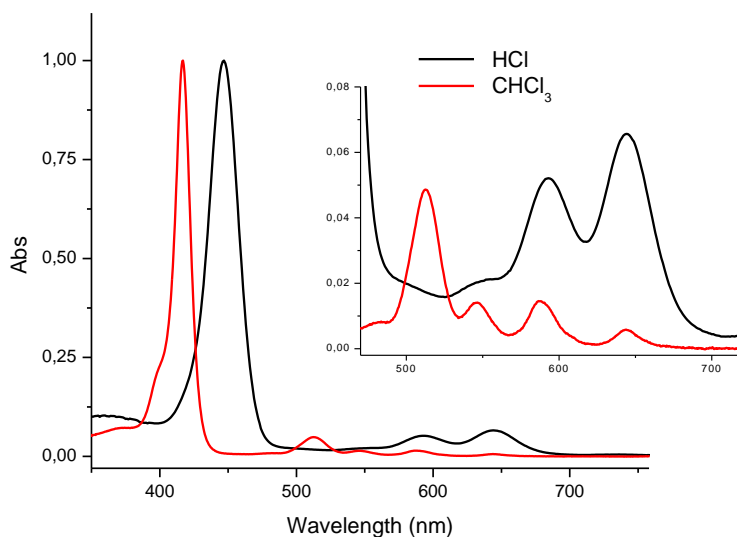
UV-Vis φασματοσκοπία

Η πορφυρίνη, όπως αναφέραμε προηγουμένως, είναι διαλυτή σε χλωροφόρμιο και σε όξινα υδατικά διαλύματα, κάτι που μας επέτρεψε να πάρουμε φάσμα ορατού-υπεριώδους. Το ορατό φάσμα της H_2TPyP σε CHCl_3 , που φαίνεται στο Σχήμα 7.10, είναι χαρακτηριστικό για ελεύθερες μετάλλου πορφυρίνες. Παρουσιάζει μια υψηλής έντασης Soret band στα 417 nm και τέσσερις χαμηλότερης έντασης ταινίες (Q bands), κάτι που υποδηλώνει και την απουσία μετάλλου στο εσωτερικό της. Το χρώμα του διαλύματος είναι ανοιχτό ροζ. Το φάσμα της πορφυρίνης σε CH_2Cl_2 δεν παρουσιάζει καμία αξιοσημείωτη μεταβολή.

Αντίθετα, σε διάλυμα HCl 1M το χρώμα είναι λαμπερό πράσινο, γεγονός που υποδηλώνει την πρωτονίωση των αζώτων του πυρρολίου στο κέντρο της πορφυρίνης, και κατ' επέκταση την ύπαρξη δύο αντί τεσσάρων Q band (όπως και στις μεταλλοπορφυρίνες). Όμως σε ισχυρώς όξινα διαλύματα ($\text{pH} < 2.3$) έχει δειχθεί ότι η πορφυρίνη έχει τέσσερα επιπλέον πρωτόνια στα περιφερειακά άζωτα της πορφυρίνης. Το pK_a των εσωτερικών πρωτονίων έχει βρεθεί ότι είναι περίπου 1 [177]. Αυτή η χαμηλή τιμή του pK οφείλεται στο υψηλό φορτίο του μορίου που προκαλείται από την παρουσία των πρωτονίων της πυριδίνης. Στον Πίνακα 7.5 παρουσιάζονται τα μήκη κύματος και οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας (ϵ) των φασμάτων απορρόφησης της H_2TPyP σε διαλύτες CHCl_3 , CH_2Cl_2 και σε HCl 1M.

Πίνακας 7.5. Δεδομένα φασμάτων απορρόφησης ορατού της H₂TPyP και η απόδοσή τους, σε διαλύτες CHCl₃, CH₂Cl₂, και HCl 1M. Σε παρένθεση φαίνονται οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας, ε σε M⁻¹cm⁻¹.

λ_{\max} σε nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$ σε M ⁻¹ cm ⁻¹)			Απόδοση
CHCl ₃	CH ₂ Cl ₂	HCl 1M	
417 (366)	416 (391)	447 (287)	Soret band
512 (17.6)	512 (17.0)	-	Q bands
546 (4.9)	545 (4.4)	-	
587 (5.3)	587 (5.0)	593 (12.5)	
644 (1.8)	642 (1.5)	644 (15.8)	



Σχήμα 7.10. Κανονικοποιημένο φάσμα ορατού της H₂TPyP σε CHCl₃ και HCl 1M. Στο ένθετο φαίνονται οι Q bands σε μεγέθυνση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

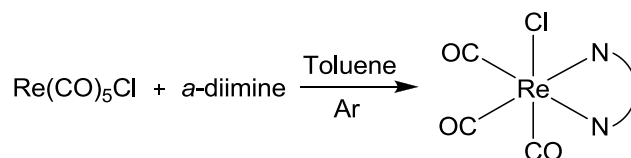
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

8.1. Το συμπλόκο *fac*-Re(CO)₃(phendione)Cl, [Re(phendione)Cl]

8.1.1. Σύνθεση του συμπλόκου *fac*-Re(CO)₃(phendione)Cl

Γενική Πορεία Σύνθεσης

Σε 5 mL απαερωμένου τολουολίου προστίθενται 121.1 mg (0.33 mmol) Re(CO)₅Cl και 104 mg (0.49 mmol) phendione και το μείγμα βράζεται για 4 h με βρασμό υπό αναρροή. Μετά το τέλος του βρασμού το μείγμα διηθείται και παραλαμβάνεται καφέ στερεό. Το βρώμικο στερεό καθαρίζεται με στήλη silica gel και διαλύτη έκλουσης THF. Η κύρια κόκκινη μπάνα συλλέγεται, απομακρύνεται το THF και γίνεται ανακρυστάλλωση με CH₂Cl₂. Μετά από προσθήκη ισοοκτανίου καταβυθίζεται καφέ στερεό. Απόδοση 74%, 0.126 g



Σχήμα 8.1. Γενική πορεία σχηματισμού *a*-διμινικών συμπλόκων του τύπου *fac*-Re(CO)₃(*a*-diimine)Cl. Με N-N συμβολίζεται η *a*-διμίνη.

Σχολιασμός Μεθόδου Σύνθεσης

Τα τρικαρβονυλο-χλώρο-σύμπλοκα του Re(I) με *a*-διμίνες παρασκευάζονται εύκολα με μια απλή αντίδραση υποκατάστασης μεταξύ του εμπορικά λαμβανόμενου συμπλόκου [Re(CO)₅Cl] και μικρής περίσσειας της επιθυμητής διμίνης (συνήθως αναλογία 1:1.3), όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.1. Η αντίδραση συνήθως πραγματοποιείται σε διαλύτη τολουόλιο με βρασμό υπό αναρροή και υπό Ar. Συνήθως, το τελικό σύμπλοκο είναι αδιάλυτο στον διαλύτη αυτό και επομένως απομονώνεται εύκολα με διήθηση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το επιθυμητό προϊόν δεν βγαίνει καθαρό από την αντίδραση. Ανακρυσταλλώσεις από CH₂Cl₂, CHCl₃, THF δεν απέδωσαν καρπούς. Έτσι λοιπόν, για τον καθαρισμό κρίνεται απαραίτητη η χρήση στήλης με

πληρωτικό υλικό silica gel και διαλύτη έκλουσης THF. Η απόδοση της αντίδρασης είναι αρκετά υψηλή.

8.1.2. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου *fac*-Re(CO)₃(phendione)Cl

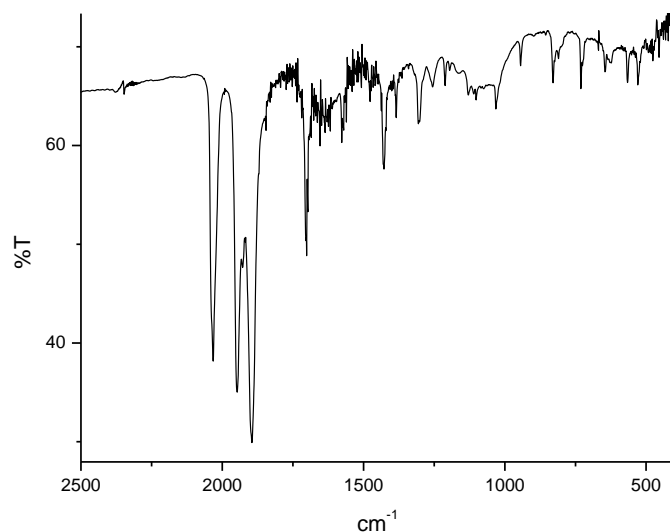
Το σύμπλοκο *fac*-Re(CO)₃(phendione)Cl χαρακτηρίστηκε πλήρως με φασματοσκοπία IR, ¹H-NMR, UV-Vis.

IR Φασματοσκοπία

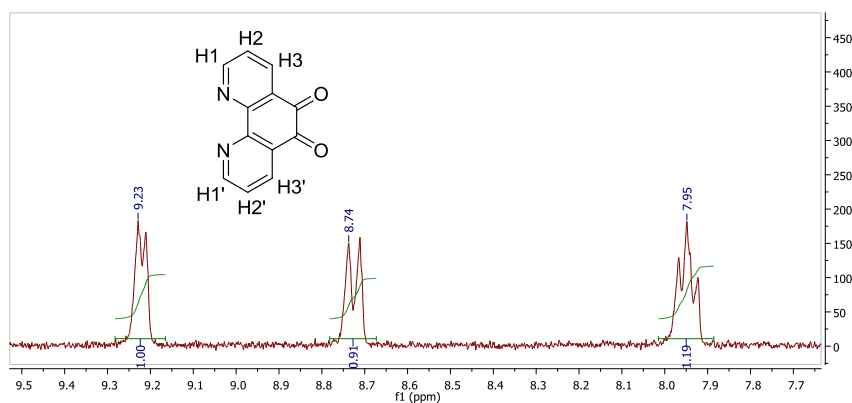
Η συμπλοκοποίηση του υποκαταστάτη στο μεταλλικό κέντρο επιφέρει κάποιες μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών κορυφών σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη. Η χαρακτηριστική κορυφή τάσης $\nu(\text{C}=\text{O})$ στα 1687 cm^{-1} της ελεύθερης phendione έχει πλέον μετατοπιστεί στα 1704 cm^{-1} , υποδεικνύοντας τη σύμπλεξη του υποκαταστάτη στο μέταλλο, και μάλιστα μέσω N. Σε διαφορετική περίπτωση, αν δηλαδή η σύμπλεξη γινόταν μέσω των O, δεν θα παρατηρούσαμε καθόλου τη συγκεκριμένη δόνηση τάσης [178]. Η περιοχή του φάσματος από 2040 έως 1890 cm^{-1} του συμπλόκου (Σχήμα 8.2) χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών πολύ ισχυρών κορυφών. Οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης των καρβονυλίων $\text{C}\equiv\text{O}$, σύμφωνα με την C_{3v} συμμετρία των *fac*-συμπλόκων. Συγκεκριμένα, σε υψηλή συχνότητα, στα 2033 cm^{-1} βρίσκουμε την απόλυτα συμμετρική εντός επιπέδου $\nu(\text{CO})$ δόνηση (A'_1). Οι δύο χαμηλότερης συχνότητας απορροφήσεις οφείλονται στην εκτός επιπέδου συμμετρική (A'_2) δόνηση (1891 cm^{-1}), και την ασύμμετρη (A'') δόνηση (1910 cm^{-1}) των ισημερινών CO υποκαταστατών.

NMR Φασματοσκοπία

Στον Πίνακα 8.1 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις του ελεύθερου υποκαταστάτη, phendione, και του αντίστοιχου συμπλόκου, σε διάφορους δευτεριωμένους διαλύτες διαφορετικής πολικότητας, ενώ στο Σχήμα 8.3 φαίνεται το φάσμα ¹H-NMR του συμπλόκου Re(CO)₃(phendione)Cl. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 8.1, μετά τη σύμπλεξη, όλα τα πρωτόνια αποπροσπίζονται, το οποίο υποδηλώνει την μεταφορά ηλεκτρονιακής πυκνότητας από την phendione στο μεταλλικό τμήμα Re(CO)₃Cl. Από την αλλαγή του διαλύτη τα υδρογόνα που φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο είναι τα H1,1'.



Σχήμα 8.2. IR φάσμα του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ σε στερεά κατάσταση.



Σχήμα 8.3. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ σε DMSO-d_6 .

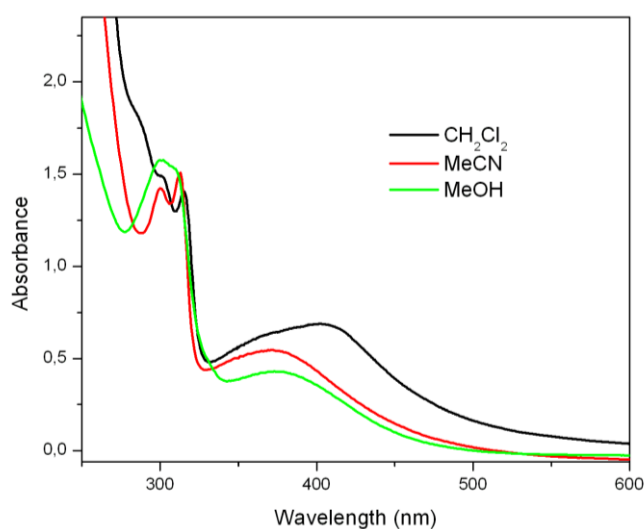
Πίνακας 8.1. Χημικές μετατοπίσεις του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ και του ελεύθερου υποκαταστάτη σε διαλύτες CDCl_3 , DMSO-d_6 , CD_3CN .

Ένωση	Διαλύτης	δ (ppm)		
		H1, H1'	H3, H3'	H2, H2'
phendione	DMSO	8.98d	8.37d	7.66t
	DMSO	9.23d	8.74d	7.95t
$\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$	CD_3CN	9.23d	8.68d	7.86t
	CDCl_3	9.49d	8.79d	7.93t

UV-Vis φασματοσκοπία

Στο Σχήμα 8.4 φαίνονται τα φάσματα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαφόρους διαλύτες με διαφορετική πολικότητα. Τα φάσματα χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη δύο κύριων κορυφών, εκ των οποίων η χαμηλής ενέργειας (~400 nm) είναι ευρεία και χαμηλής έντασης, και από μια υψηλής ενέργειας που είναι στενότερη και περισσότερο έντονη στα 320 nm. Οι κορυφή στην περιοχή του UV μοιάζει σε σχήμα και θέση με την αντίστοιχη του ελεύθερου υποκαταστάτη.

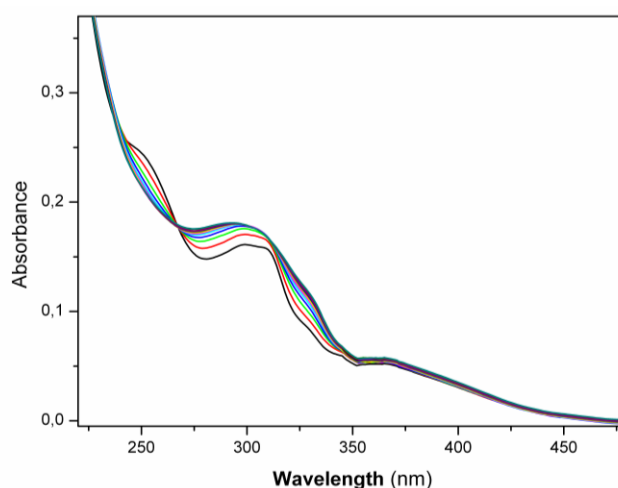
Με την αλλαγή του διαλύτη δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή στη θέση ή στην ένταση της κορυφής στη UV περιοχή, υποδηλώνοντας τον IL χαρακτήρα της κορυφής. Αντίθετα, στη χαμηλότερης ενέργειας κορυφή παρατηρείται αρνητικός διαλυτοχρωμισμός, δηλαδή καθώς μειώνεται η πολικότητα του διαλύτη, το μέγιστο της κορυφής μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Συγκεκριμένα, σε διαλύτη CH_2Cl_2 η MLCT εμφανίζεται στα 404 nm, ενώ σε MeOH στα 373 nm. Το σχήμα της χαμηλής έντασης κορυφής σε συνδυασμό με την εξάρτησή της από το διαλύτη δηλώνει τον $d\pi(\text{Re}) \rightarrow \pi^*$ (phendione) μεταφοράς φορτίου (MLCT) χαρακτήρα της συγκεκριμένης κορυφής. Για τα περισσότερα σύμπλοκα της κατηγορίας αυτής η ταινία μεταφοράς φορτίου εμφανίζεται ελαφρώς σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (330-400 nm) από την IL κορυφή, όπως σχολιάσαμε και στην §3.3 [90,179].



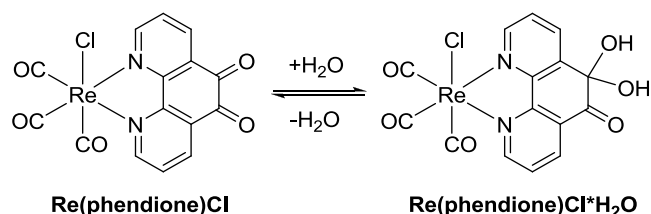
Σχήμα 8.4. Φάσματα UV-Vis του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ σε διαλύτες CH_2Cl_2 , MeCN, MeOH.

Οι κινητικές μελέτες στους συγκεκριμένους διαλύτες έδειξαν ότι το σύμπλοκο είναι σταθερό στη μονάδα του χρόνου, για μεγάλο χρονικό διάστημα (ακόμα και για διάστημα πολλών ημερών).

Στο Σχήμα 8.5 φαίνεται η αλλαγή στο φάσμα ορατού – υπεριώδους του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ σε μεθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και $\text{pH} = 7.0$ (σύσταση 10 % μεθανόλη και 90 % ρυθμιστικό διάλυμα) με την πάροδο του χρόνου. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η MLCT δεν επηρεάζεται αισθητά από την παρουσία του νερού σε βάθος χρόνου. Αντίθετα, η κορυφή στην περιοχή του UV είναι αυτή που αλλάζει και μετατοπίζεται ελαφρά προς μικρότερα μήκη κύματος, ενώ η εμφάνιση ενός ισοσβεστικού σημείου (στα 268 nm) υποδηλώνει τη δημιουργία ενός μόνο νέου είδους. Η αλλαγή αυτή οφείλεται στη δημιουργία ενός νέου ενυδατωμένου μορίου, εξαιτίας της ενυδάτωσης των καρβόνυλο ομάδων του υποκαταστάτη. Πράγματι, η ενυδάτωση των καρβονυλίων της phendione έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία όταν στα άζωτα είναι συμπλεγμένο κάποιο μεταλλικό ιόν [180,181]. Η ενυδάτωση έχει επίσης παρατηρηθεί και για τον ελεύθερο υποκαταστάτη, σε πολύ χαμηλές τιμές pH, όπου τα πυριδινικά N είναι πρωτονιωμένα. Αντίθετα, σε υψηλότερες τιμές pH που τα N δεν είναι πρωτονιωμένα [180] δεν παρατηρείται καμία ενυδάτωση των καρβονυλο ομάδων. Στο Σχήμα 8.6 φαίνεται η ισορροπία για την αντίδραση ενυδάτωσης του καρβονυλίου του υποκαταστάτη. Η ενυδάτωση φυσικά μπορεί να συμβεί και στα δύο καρβονύλια.



Σχήμα 8.5. Κινητική μελέτη του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ σε μεθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα $\text{pH}=7$.



Σχήμα 8.6. Πιθανή ισορροπία για την αντίδραση ενυδάτωσης του καρβονυλίου της phendione.

8.2. Το σύμπλοκο *fac*-[Re(CO)₃(pq)Cl], (Re_{pq}-Cl)

8.2.1. Σύνθεση του συμπλόκου *fac*-Re(CO)₃(pq)Cl

Γενική Πορεία Σύνθεσης

Σε 10 mL απαερωμένου τολουολίου προστίθενται 101.3 mg (0.28 mmol) Re(CO)₅Cl και 75.5 mg (0.364 mmol) pq και το μείγμα βράζεται για 4 h με βρασμό υπό αναρροή. Μετά το τέλος του βρασμού το μείγμα ψύχεται στο ψυγείο για ~20 min. Το προκύπτον κόκκινο στερεό διηθείται, εκπλένεται αρκετές φορές με κρύο τολουόλιο και αιθέρα. Απόδοση 81 %, 92.76 mg

Σχολιασμός Μεθόδου Σύνθεσης

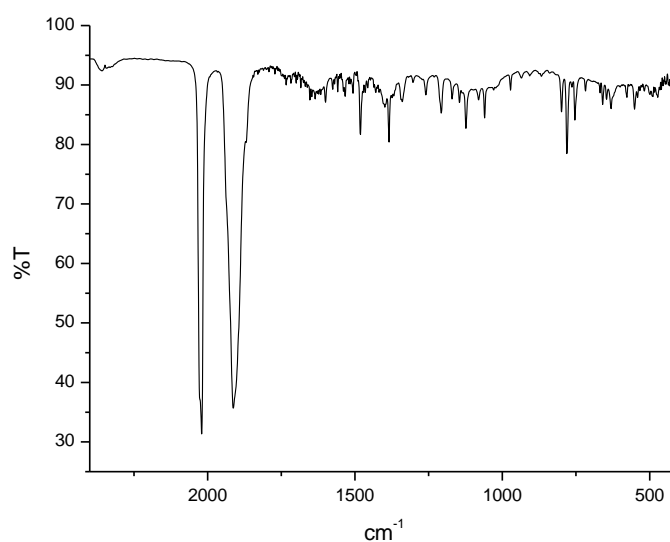
Το Re(CO)₃(pq)Cl παρασκευάστηκε με μια τροποποίηση της μεθόδου που αναφέρθηκε από τους I. Veroni et al. [182]. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη τολουόλιο υπό Ar και σε βρασμό υπό αναρροή για 4 ώρες, σύμφωνα με την αντίδραση του Σχήματος 8.1, όπου για α-διμίνη έχουμε πλέον τον pq υποκαταστάτη. Το τελικό σύμπλοκο Re_{pq}-Cl έχει μια μικρή διαλυτότητα στο τολουόλιο, και γι' αυτό ακολουθεί ψύξη πριν την απομόνωσή του. Ακολουθούν αρκετές εκπλήσεις με κρύο τολουόλιο και αιθέρα για να απομακρυνθεί ο υποκαταστάτης που δεν αντέδρασε.

8.2.2. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου *fac*-Re(CO)₃(pq)Cl

Το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία IR και ¹H-NMR και βρέθηκε σε απόλυτη συμφωνία με τη βιβλιογραφία [182]. Παρ' όλα αυτά αξίζει να γίνει μια μικρή αναφορά στα φάσματα του συμπλόκου, προκειμένου να καταδειχθεί η πολύ ενδιαφέρουσα χημεία του υποκαταστάτη, αλλά κυρίως για λόγους σύγκρισης με τα δύο νέα κατιοντικά κινόξαλινικά σύμπλοκα, η σύνθεση των οποίων παρουσιάζεται παρακάτω.

IR Φασματοσκοπία

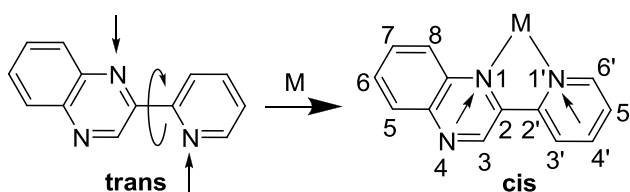
Στο φάσμα υπερόθρου του Σχήματος 8.7 διακρίνονται πολύ έντονα οι χαρακτηριστικές κορυφές δόνησης $\nu(\text{CO})$ των καρβονυλίων του τμήματος $\text{Re}(\text{CO})_3$. Η εντός επιπέδου συμμετρική δόνηση τάσης ($A'1$) εμφανίζεται στα 2018 cm^{-1} , ενώ η εκτός επιπέδου συμμετρική δόνηση και η ασύμμετρη δόνηση των ισημερινών CO υποκαταστατών, έχουν συγχωνευθεί και εμφανίζονται ως μία κορυφή στα 1913 cm^{-1} . Η μεγάλη διαφορά σε κυματαριθμούς της $A'1$ σε σχέση με το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$, και ο μη διαχωρισμός των $A'2$ και A'' κορυφών υποδεικνύουν ότι ο ρq υποκαταστάτης προκαλεί σημαντική διατάραξη στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του μεταλλικού κέντρου, και συγκεκριμένα προκαλεί αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο Re.



Σχήμα 8.7. IR φάσμα του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\rho\text{q})\text{Cl}$.

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (§ 7.1.2), οι εντός και εκτός επιπέδου παραμορφώσεις του 2-υποκατεστημένου πυριδινικού δακτυλίου παρατηρούνται στα 626 και στα 408 cm^{-1} , αντίστοιχα. Μετά τη σύμπλεξη του ρq στο μέταλλο, οι συγκεκριμένες κορυφές παρατηρούνται μετατοπισμένες προς μεγαλύτερες συχνότητες (632 και 415 cm^{-1}), κάτι που υποδηλώνει την σύμπλεξη του πυριδινικού $\text{N}1'$ [171]. Η περιοχή από 900 - 1000 cm^{-1} θεωρείται κλειδί για την εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την μονοδοντική και διδοντική γεφυρωτική σύμπλεξη του κινόξαλινικού συστήματος. Ο διαχωρισμός της ισχυρής κορυφής του ελεύθερου ρq στα 960 cm^{-1} σε μια τριπλή θα υποδήλωνε τη συμμετοχή και των δύο κινόξαλινικών αζώτων στη σύμπλεξη. Η εμφάνιση μια απλής έντονης κορυφής στα 972 cm^{-1} υποδηλώνει την μονοδοντική σύμπλεξη του κινόξαλινικού

τιμήματος [171]. Συμπερασματικά λοιπόν, μπορούμε να πούμε ότι ο ρq υποκαταστάτης δρα χηλικά, με σύμπλεξη των N1 και N1'. Κάτι τέτοιο βέβαια προϋποθέτει την cis-διαμόρφωση του υποκαταστάτη, δηλαδή το πυριδινικό άζωτο N1' και το κινολιναλικό άζωτο N1 να βρίσκονται στην ίδια πλευρά του δεσμού C-C που συνδέει το κινολιναλικό με τον πυριδινικό δακτύλιο (Σχήμα 8.8). Να θυμίσουμε ότι ο ελεύθερος υποκαταστάτης βρίσκεται σε trans-διαμόρφωση. Πράγματι, κάτι τέτοιο έχει διαπιστωθεί ότι λαμβάνει χώρα μετά από σύμπλεξη με μέταλλα [171,182,183].



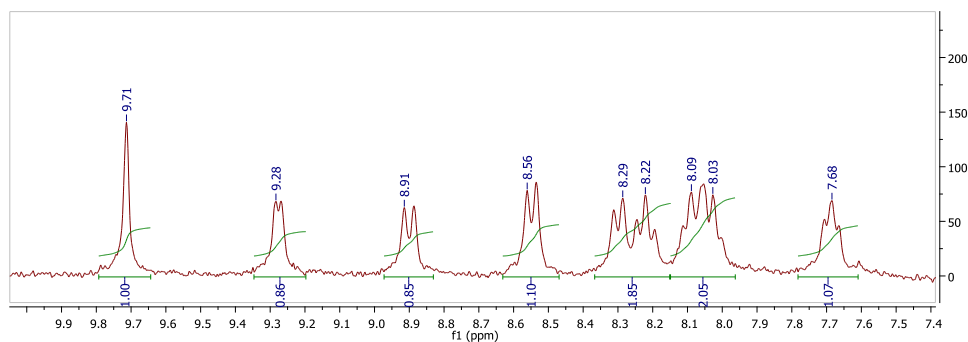
Σχήμα 8.8. Η cis και η trans-διαμόρφωση του υποκαταστάτη ρq. Φαίνεται η αρίθμηση των ατόμων αζώτου και άνθρακα.

NMR Φασματοσκοπία

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου σε CDCl_3 , που φαίνεται στο Σχήμα 8.9, παρατηρούμε μερικά πολύ ενδιαφέροντα στοιχεία. Καταρχήν, οι κορυφές του ρq υποκαταστάτη έχουν διαχωριστεί και διακρίνονται πλέον και τα 9 μη ισοδύναμα πρωτόνια του υποκαταστάτη. Επιπλέον, οι 8 κορυφές του ρq έχουν μετατοπιστεί προς χαμηλότερα πεδία μετά τη σύμπλεξη, κάτι που υποδηλώνει την μεταφορά ηλεκτρονιακής πυκνότητας προς το μέταλλο. Η μεγαλύτερη μετατόπιση (προς χαμηλότερα πεδία) παρατηρείται για το $\text{H6}'$ ($\Delta\delta=0.49$ ppm, Πίνακας 8.2), γεγονός που αποδεικνύει τη σύμπλεξη του πυριδινικού αζώτου N1' με το μέταλλο. Σημαντική επίσης είναι η μετατόπιση του H8, αφού και αυτό βρίσκεται κοντά στη θέση σύμπλεξης. Εξίσου σημαντική όμως, είναι και η μετατόπιση σε χαμηλότερα πεδία του H3' ($\Delta\delta=0.32$ ppm), η οποία οφείλεται στο ότι το συγκεκριμένο πρωτόνιο βρίσκεται πλέον κοντά με το H3 λόγω της cis-διαμόρφωσης που αποκτά ο υποκαταστάτης. Εντύπωση προκαλεί η προάσπιση του H3, που πιθανόν να οφείλεται στην αλληλεπίδραση του με το γειτονικό πλέον H3', αλλά και στην επίδραση του διαλύτη. Η επίδραση του διαλύτη τόσο στον ελεύθερο υποκαταστάτη όσο και στο σύμπλοκο έχει μελετηθεί πλήρως στο εργαστήριο μας [182] και έχει αποδειχθεί η σημαντικότητα του στην προάσπιση των πρωτονίων.

Πίνακας 8.2. Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})\text{Cl}$ και του ελεύθερου υποκαταστάτη pq σε διαλύτη CDCl_3 . Η αριθμηση των πρωτονίων φαίνεται στο Σχήμα 8.8.

	H3	H6'	H3'	H5	H8	H4'	H6	H7	H5'
pq	9.97s	8.79d	8.59d	8.16mt	8.16mt	7.91mt	7.81mt	7.81mt	7.42mt
Repq-Cl	9.71s	9.28d	8.91d	8.29d	8.56d	8.22t	8.03mt	8.09mt	7.68t



Σχήμα 8.9. ^1H -NMR φάσμα του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})\text{Cl}$ σε CDCl_3 .

8.3. Τα σύμπλοκα $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$, (Repq-MeCN) και $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$, (Repq-py)

8.3.1. Σύνθεση των συμπλόκων $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ και $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$

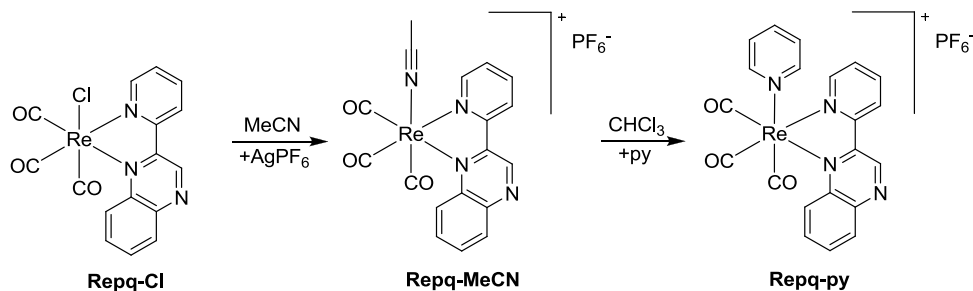
Γενική Πορεία Σύνθεσης του $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$

100 mg του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})\text{Cl}$ (0.20 mmol) διαλύονται με τη βοήθεια θέρμανσης σε 25 mL απαερωμένου MeCN και προστίθενται 60 mg AgPF_6 (0.24 mmol). Ακολουθεί βρασμός υπό αναρροή όλη νύχτα υπό άζωτο στο σκοτάδι. Μετά το πέρας της αντίδρασης το διάλυμα από κόκκινο έχει γίνει κίτρινο. Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h, ώστε να ολοκληρωθεί η καταβύθιση του λευκού στερεού AgCl , οπότε και απομακρύνεται. Το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ~3 mL όγκου. Μετά από προσθήκη αιθέρα στο διήθημα και ψύξη καταβυθίζεται κίτρινο στερεό. Απόδοση 85 %, 107 mg.

Γενική Πορεία Σύνθεσης του $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$

Σε απεσταγμένο και απαερωμένο CHCl_3 (40 mL) διαλύονται με τη βοήθεια θέρμανσης 70 mg (0.106 mmol) του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ και ακολουθεί προσθήκη

απεσταγμένης πυριδίνης (34 μL , 0.42 mmol). Ακολουθεί βρασμός υπό αναρροή όλη νύχτα υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το προκύπτον πορτοκαλί διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ~ 2 mL όγκου και με την προσθήκη αιθέρα καταβυθίζεται στερεό. Ακολουθεί ψύξη για αρκετή ώρα ώστε να ολοκληρωθεί η καταβύθιση και κατόπιν παραλαμβάνεται το πορτοκαλί στερεό με διήθηση, το οποίο εκπλένεται με αιθέρα. Απόδοση 65 %, 48.34 mg



Σχήμα 8.10. Πορεία σύνθεσης των συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\eta^3\text{q})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\eta^3\text{q})(\text{py})]\text{PF}_6$.

Σχολιασμός Μεθόδων Σύνθεσης

Τα σύμπλοκα του τύπου $fac\text{-Re}(\text{CO})_3(\alpha\text{-διμίνη})\text{L}^{0/+}$ (όπου L: κάποιος μονοσχιδής υποκαταστάτης, όπως ανιόν CN^- ή κάποιο νιτρίλιο ή κάποιο παράγωγο πυριδίνης) παρασκευάζονται από το αντίστοιχο χλωρο-σύμπλοκο με αντίδραση περίσσειας άλατος Ag^+ , προκειμένου να απομακρυνθεί το χλώριο, οπότε και σχηματίζεται λευκό στερεό AgCl , που είναι αδιάλυτο σε κοινούς οργανικούς διαλύτες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρώτη αντίδραση πρέπει να πραγματοποιηθεί στο σκοτάδι με μικρή περίσσεια AgPF_6 (αναλογία 1:1.2) γιατί ο Ag^+ οξειδώνεται παρουσία φωτός. Η αντίδραση μπορεί εύκολα να παρακολουθηθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και για την ολοκλήρωση της απαιτούνται τουλάχιστον 10 h. Η πορεία σύνθεσης των παραπάνω συμπλόκων φαίνεται στο Σχήμα 8.10.

Το σύμπλοκο $\text{Re}\eta^3\text{q-py}$ παρασκευάζεται μετά από αντίδραση του ενδιαμέσου συμπλόκου $\text{Re}\eta^3\text{q-MeCN}$ με περίσσεια πυριδίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι απαιτείται αρκετά μεγάλη περίσσεια py, καθώς με μικρή περίσσεια (περίπου 1:1.2) η αντίδραση δεν προχώρησε προς τον σχηματισμό του επιθυμητού συμπλόκου.

Επιπλέον, η επιλογή του διαλύτη (για τη δεύτερη αντίδραση) φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στο σχηματισμό του προϊόντος αλλά και στην απόδοση της αντίδρασης. Παρ' όλο που το $\text{Re}\eta^3\text{q-MeCN}$ έχει πολύ καλύτερη διαλυτότητα σε THF από ότι σε CHCl_3 , η παραπάνω αντίδραση (σε διαλύτη THF) οδήγησε μεν στο σχηματισμό του

επιθυμητού συμπλόκου, αλλά σε πολύ μικρή απόδοση. Εν ολίγοις, μετά το πέρας της αντίδρασης, η ανακρυστάλλωση του διαλύματος με THF/ether οδήγησε στην απομόνωση του αρχικού συμπλόκου $\text{Re}(\text{pq})\text{-MeCN}$. Το διήθημα που προέκυψε ανακρυσταλλώθηκε με $\text{CHCl}_3/\text{ether}$ για να απομονωθεί το επιθυμητό σύμπλοκο $\text{Re}(\text{pq})\text{-py}$ σε απόδοση μόλις 13%.

Να σημειωθεί ότι επιχειρήθηκε να συντεθεί το τελικό πυριδινικό σύμπλοκο απευθείας από το αντίστοιχο χλώρο-σύμπλοκο σε διαλύτη πυριδίνη. Το χλωρο-σύμπλοκο έχει αρκετά καλή διαλυτότητα στην πυριδίνη και επομένως θα μπορούσε να λειτουργήσει όχι μόνο ως διαλύτης, αλλά και ως υποκαταστάτης, όπως ακριβώς συνέβη και για το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{pq})\text{-MeCN}$. Προς απογοήτευση μας, διαπιστώσαμε ότι η απομάκρυνση του χλωρίου από την αξονική θέση του συμπλόκου δεν είχε πραγματοποιηθεί. Το σχηματιζόμενο λευκό στερεό που απομονώθηκε δεν ήταν AgCl (όπως θα αναμέναμε), αλλά πιθανόν κάποιο σύμπλοκο του Ag^+ με την πυριδίνη. Το IR φάσμα του λευκού στερεού φαίνεται να ταιριάζει αρκετά με εκείνα συμπλόκων $[\text{Ag-bis}(\text{pyridine})]^+$, που παρουσιάστηκαν πρόσφατα στη βιβλιογραφία [184]. Το στερεό αυτό διαλύεται σε CHCl_3 (όπως και αυτά της βιβλιογραφίας), γεγονός που μας επέτρεψε να πάρουμε φάσμα NMR και UV-Vis. Με τον τρόπο αυτό λοιπόν επιβεβαιώθηκε ότι δεν πρόκειται για το επιθυμητό σύμπλοκο $\text{Re}(\text{pq})\text{-py}$, αλλά για κάποιο σύμπλοκο του Ag^+ με την πυριδίνη.

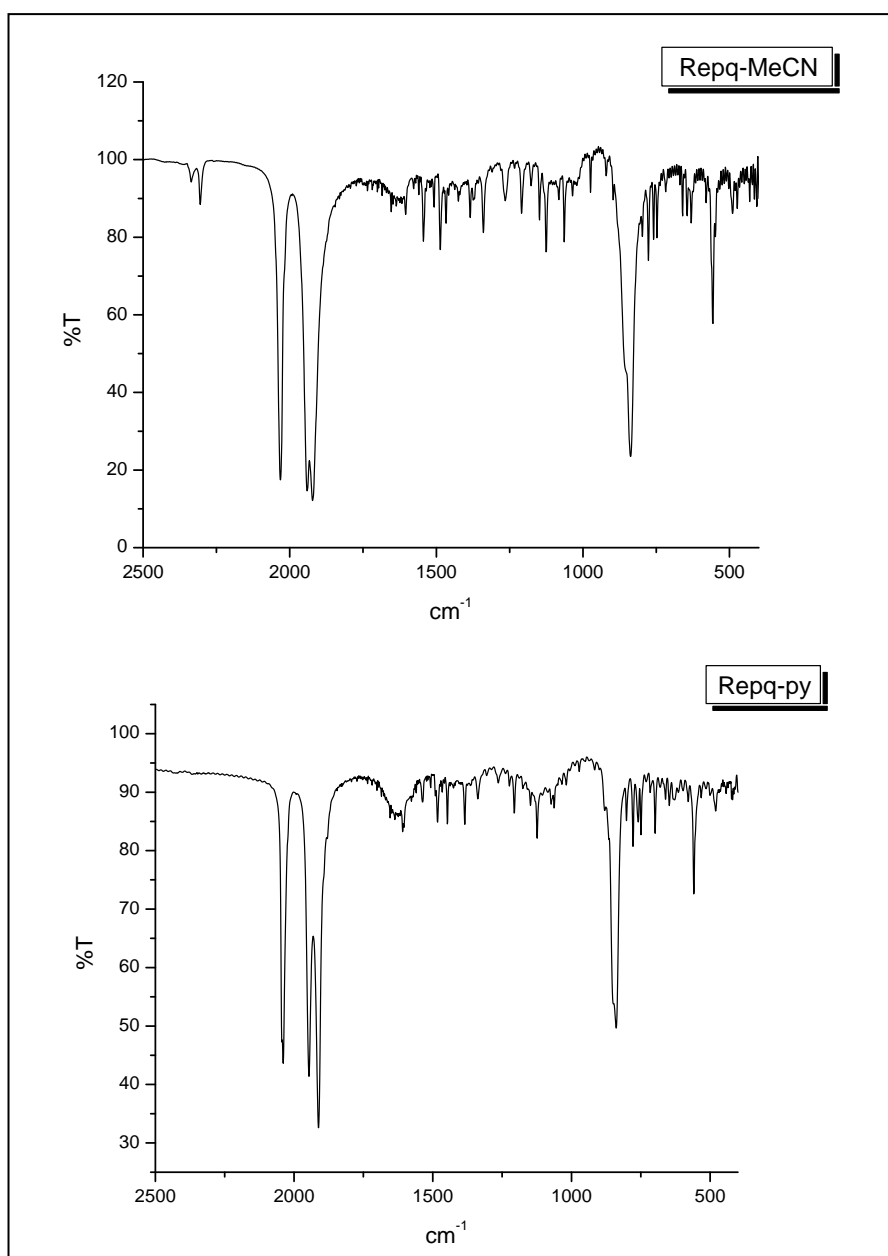
8.3.2. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ και $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$

Τα δύο νέα κατιοντικά σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν πλήρως με όλες τις φασματοσκοπικές τεχνικές, IR, NMR, UV-Vis και εκπομπής. Επιπλέον μελετήθηκε η ηλεκτροχημική συμπεριφορά τους, ενώ το πυριδινικό σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε και με κρυσταλλογραφία ακτίνων X.

IR Φασματοσκοπία

Τα φάσματα υπέρυθρου των δύο συμπλόκων, παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.11. Όπως πολύ αναλυτικά σχολιάσαμε προηγουμένως, έτσι και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούνται οι κορυφές δόνησης που αποδίδονται στον pq υποκαταστάτη, χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις. Η διαφορά μεταξύ των δύο φασμάτων με το αντίστοιχο χλώρο-σύμπλοκο εμφανίζεται στα 838 και 559 cm^{-1} , που αποδίδονται στο αντισταθμιστικό ιόν PF_6^- . Η συμμετρική εντός επιπέδου δόνησης τάσης $\nu(\text{CO})$ ($A'1$) εμφανίζεται στα 2030 cm^{-1} για το MeCN -σύμπλοκο και 2039 cm^{-1} για το πυριδινικό σύμπλοκο του $\text{Re}(\text{I})$,

σημαντικά αυξημένες εν συγκρίσει με το αντίστοιχο χλώρο-σύμπλοκο. Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι, η αλλαγή του αξονικού υποκαταστάτη προκαλεί σημαντικές διαταράξεις στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του μεταλλικού κέντρου. Συγκεκριμένα, η παρουσία του –MeCN και του –py στην αξονική θέση φαίνεται να προκαλεί μείωση στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του μεταλλικού κέντρου, εξαιτίας της Re→CO π οπισθοσύνδεσης [90]. Επιπλέον, οι κορυφές A' και A'2 είναι πλέον διαχωρισμένες. Να σημειωθεί ότι ο διαχωρισμός των δύο κορυφών είναι καλύτερος για το πυριδινικό σύμπλοκο Re-py.



Σχήμα 8.11. Φάσματα IR των συμπλόκων [Re(CO)₃(pq)(MeCN)]PF₆ (επάνω) και [Re(CO)₃(pq)(py)]PF₆ (κάτω) σε δισκία KBr.

Οι ασθενείς μάντες στα 2336 και 2305 cm^{-1} του πρώτου συμπλόκου αποδίδονται στο συμπλεγμένο MeCN υποκαταστάτη. Όπως ήταν αναμενόμενο οι συγκεκριμένες δονήσεις απουσιάζουν από το Rerq-py. Στον Πίνακα 8.3 συνοψίζονται κάποιες χαρακτηριστικές δονήσεις των τριών κινουζαλινικών συμπλόκων του Re(I) που συντέθηκαν.

Πίνακας 8.3. Χαρακτηριστικές συχνότητες δόνησης των τριών διαφορετικών rq συμπλόκων. Για την δόνηση τάσης $\nu(\text{CO})$ εμφανίζεται και η συμμετρία τους.

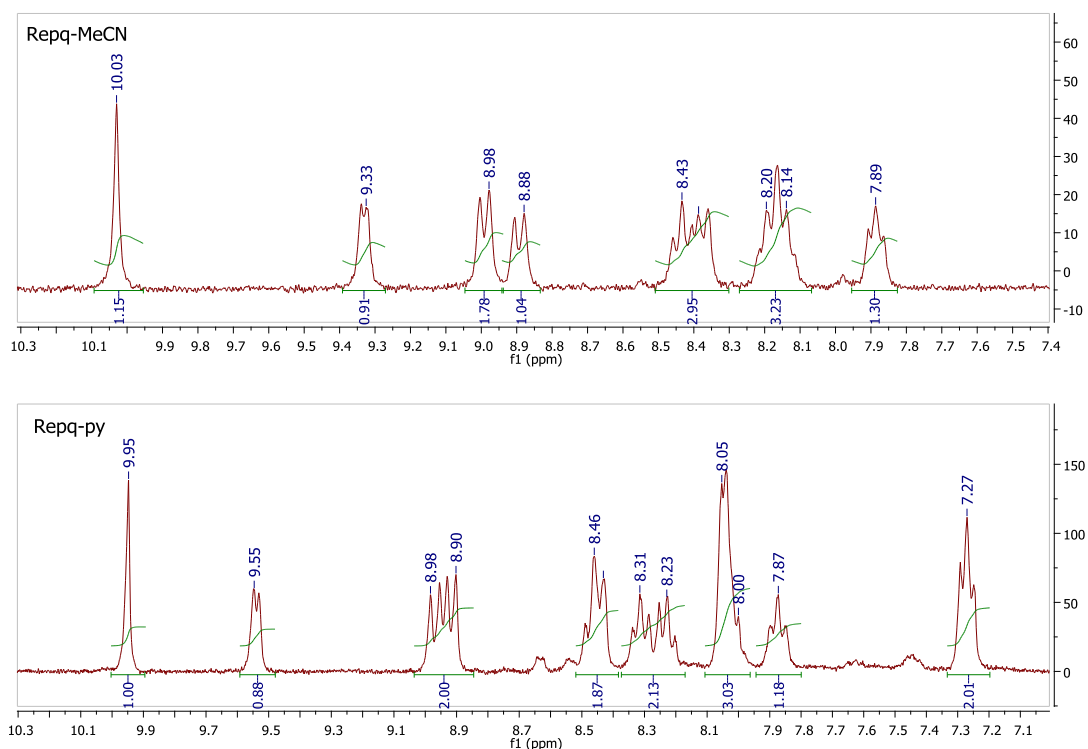
Σύμπλοκα	Συχνότητες δόνησης (cm^{-1})		
	PF_6^-	CN^-	$-\text{CO}$
Rerq-Cl	-	-	2018 (A'1), 1913 (A'', A'2)
Rerq-MeCN	839, 556	2336, 2305	2030 (A'1), 1946 (A''), 1912 (A'2)
Rerq-py	838, 559	-	2039 (A'1), 1940 (A''), 1922 (A'2)

NMR Φασματοσκοπία

Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των δύο συμπλόκων παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.12, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 8.4. Η απόδοση των κορυφών έγινε με φασματοσκοπία δύο διαστάσεων $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY NMR και τα φάσματα φαίνονται στο Σχήμα 8.13.

Πάνω στη διαγωνίου του φάσματος COSY του πυριδινικού συμπλόκου (Σχήμα 8.13) απεικονίζονται οι κορυφές του φάσματος της μιας διάστασης. Για διευκόλυνση μας έχουμε αριθμήσει τις κορυφές της διαγωνίου. Μελετώντας το φάσμα, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η κορυφή με συντεταγμένες (9.95, 9.95) δεν συζεύγνυται με καμία άλλη, επομένως χωρίς δεύτερη σκέψη αποδίδεται στο H3 του rq. Η κορυφή (2) (στα 9.55 ppm) διασταυρώνεται με την (8) στα 8.04 ppm, η οποία με τη σειρά της διασταυρώνεται με την (5) στα 8.46 ppm. Λαμβάνοντας υπόψη, ότι το H6' που βρίσκεται ακριβώς δίπλα στη θέση σύμπλεξης θα πρέπει να είναι το περισσότερο αποπροασπισμένο, μπορεί να του αποδοθεί η διπλή κορυφή στα 9.55 ppm. Επομένως, το H5' το «βλέπουμε» στα 8.04 ppm και το H4' στα 8.46 ppm. Το H4' με τη σειρά του διασταυρώνεται όχι μόνο με το H5', αλλά και με το H3', και θα πρέπει να εμφανίζεται ως διπλή κορυφή, κάτι που παρατηρούμε δηλαδή για την κορυφή (4) στα 8.90 ppm. Η κορυφή (3) με συντεταγμένες (8.98, 8.98) συζεύγνυται με την κορυφή (6) (8.31, 8.31), και αυτή με τη σειρά της με την κορυφή (7) (8.23, 8.23). Βλέποντας το φάσμα της μιας διάστασης η κορυφή στα 8.98 ppm είναι διπλή ενώ οι άλλες δύο τριπλές. Επομένως στη κορυφή στα 8.98 ppm θα πρέπει να αντιστοιχεί είτε το H8 είτε

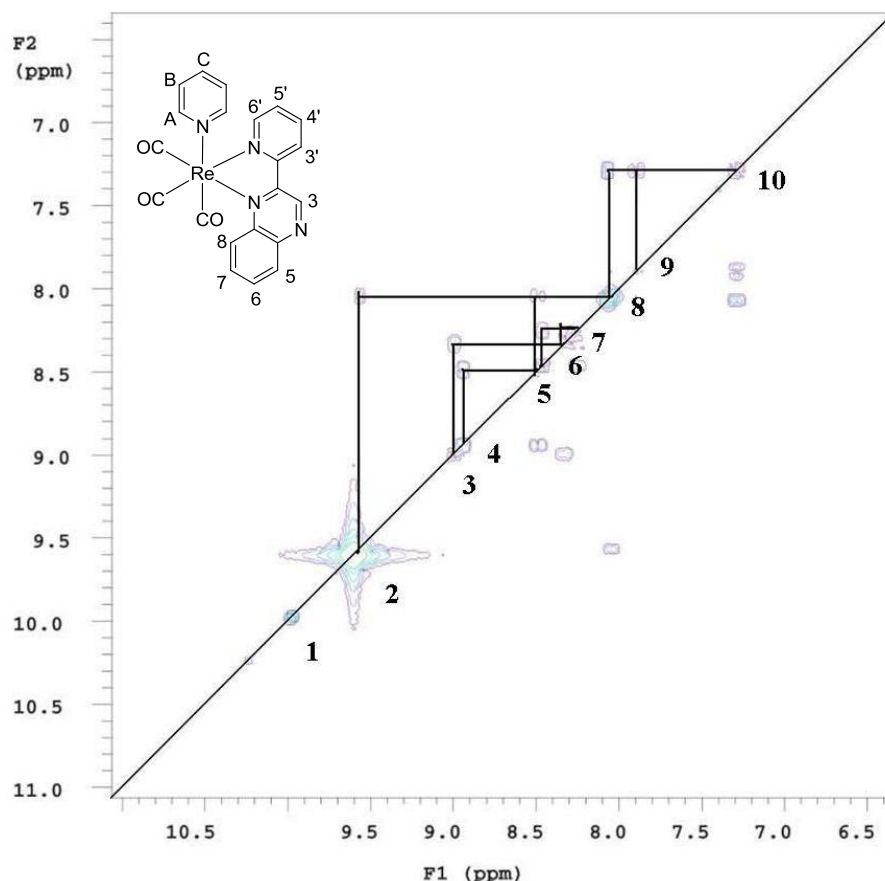
το H5 του κινουζαλινικού τμήματος του ρq, και οι άλλες δύο στα H6 και H7. Βάση βιβλιογραφικών δεδομένων το H8 εμφανίζεται περισσότερο αποπροασπισμένο από το H5, αφού βρίσκεται πιο κοντά στη θέση σύμπλεξης. Επομένως, η κορυφή στα 8.98 ppm αποδίδεται στο H8 και η κορυφή στα 8.31 ppm στο H7. Το H6 εμφανίζεται σαν τριπλή στα 8.23 ppm και το H5 στα 8.43 ppm. Η κορυφή **(10)** στα 7.27 ppm συζεύγνυται με την **(9)** και την **(8)** στα 7.87 και 8.00 ppm, αντίστοιχα, οπότε και μπορούν να αποδοθούν στο H_A, H_C και H_B της πυριδίνης στην αξονική θέση, που βάσει βιβλιογραφίας εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία.



Σχήμα 8.12. Φάσματα ¹H-NMR των συμπλόκων Repq-MeCN (πάνω) και Repq-py (κάτω) σε διαλύτη CD₃OD.

Από τον Πίνακα 8.4 γίνεται εμφανές ότι τα πρωτόνια του ρq υποκαταστάτη μετατοπίζονται ελαφρώς προς χαμηλότερα πεδία για το πυριδινικό σύμπλοκο. Γεγονός που υποδηλώνει ότι η πυριδίνη προκαλεί ελαφρώς μεγαλύτερη μετατόπιση ηλεκτρονιακής πυκνότητας προς το μεταλλικό κέντρο (επομένως και μεγαλύτερη αποπροάσπιση των πρωτονίων), συγκριτικά με το ακετονιτρίλιο. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ενώ τα περισσότερα υδρογόνα είναι μετατοπισμένα περίπου κατά 0.10 ppm σε χαμηλότερα πεδία, το H6' μετατοπίζεται κατά 0.23 ppm (σε διαλύτη CD₃OD). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι είναι δίπλα στη θέση σύμπλεξης, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται περισσότερο από την

αλλαγή του αξονικού υποκαταστάτη. Μάλιστα, όπως διαπιστώθηκε και με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (που θα αναλύσουμε παρακάτω) το πυριδινικό τμήμα του ρq συνδέεται ισχυρότερα στο μέταλλο από ότι το κινόξαλινικό. Επομένως, είναι λογικό το πυριδινικό Η6' να επηρεάζεται περισσότερο από μια διαταραχή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας.



Σχήμα 8.13. ^1H - ^1H COSY NMR του συμπλόκου Re(q)-py σε διαλύτη CD_3OD .

Ακριβώς αντίθετη συμπεριφορά παρατηρείται για το Η3 και Η3', που προασπίζονται περισσότερο παρουσία πυριδίνης στην αξονική θέση. Αυτή η «ανωμαλία» εξηγείται από τη θέση τους στο μόριο του ρq. Αξίζει να θυμίσουμε ότι αντίθετη συμπεριφορά από τα υπόλοιπα πρωτόνια εμφάνισαν και στο αντίστοιχο χλώρο-σύμπλοκο (Re(q)-Cl). Εξάλλου, τα πρωτόνια αυτά είναι που επηρεάζονται περισσότερο από την αλλαγή του διαλύτη, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.4, κάτι που έχει αποδειχθεί και βιβλιογραφικά [182].

Πίνακας 8.4. Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των συμπλόκων **Repq-MeCN** και **Repq-py**. Σε παρένθεση φαίνεται ο αριθμός των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.

Πρωτόνια	Repq-MeCN		Repq-py	
	CD ₃ OD	CD ₃ CN	CD ₃ OD	CD ₃ CN
H3	10.03s (1H)	9.92s (1H)	9.95s (1H)	9.74s (1H)
H3'	8.98d (1H)	8.82d (1H)	8.90d (1H)	8.65d (1H)
H4'	8.38t(1H)	8.38t (1H)	8.46mt (1H)	8.41mt (1H)
H5'	7.89t (1H)	7.87t (1H)	8.04mt (1H)	7.93mt (1H)
H6'	9.32d (1H)	9.24d (1H)	9.55d (1H)	9.42d (1H)
H5	8.43d (1H)	8.43d (1H)	8.43mt (1H)	8.38mt (1H)
H6	8.14mt (1H)	8.13mt (1H)	8.23t (1H)	8.19t (1H)
H7	8.19mt (1H)	8.19mt (1H)	8.31t (1H)	8.28t (1H)
H8	8.88d (1H)	8.74d (1H)	8.98d (1H)	8.90d (1H)
A	-	-	8.00mt (2H)	7.93mt (2H)
B	-	-	7.27t (2H)	7.18t (2H)
C	-	-	7.87t (1H)	7.79t (1H)
-CH ₃	1.99s (3H)	*	-	-

s: απλή, d: διπλή, t: τριπλή, mt: πολλαπλή. * κρύβεται από την κορυφή του διαλύτη.

UV-Vis Φασματοσκοπία

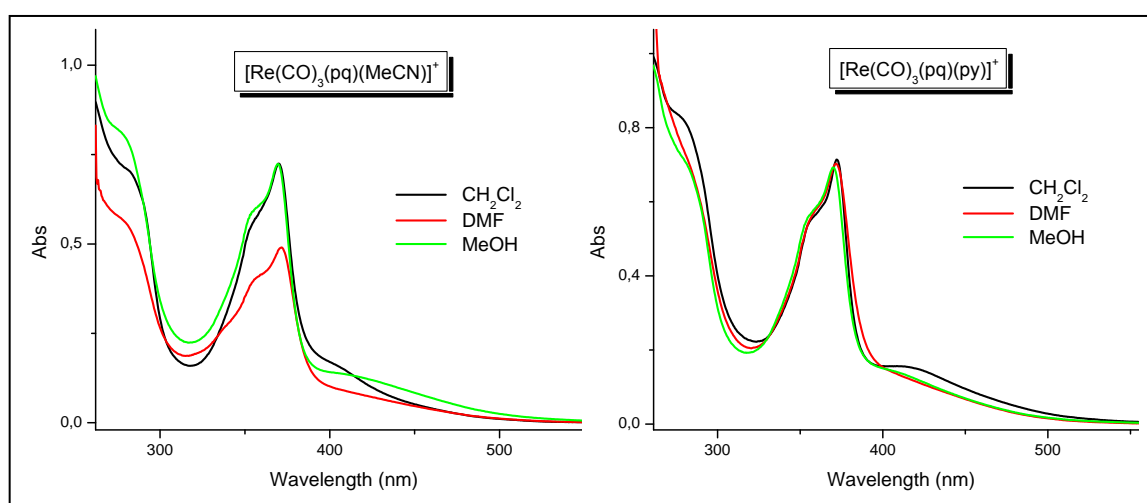
Στα φάσματα απορρόφησης των δύο κατιοντικών συμπλόκων (Σχήμα 8.14) παρατηρούμε την ύπαρξη υψηλής ενέργειας κορυφών με πολλούς ώμους ανάμεσα στα 240 έως 350 nm, οι οποίες αντιστοιχούν σε $\pi \rightarrow \pi^*$ αλληλεπιδράσεις του κινοξαλινικού τμήματος. Η ισχυρής έντασης κορυφή στα ~370 nm είναι χαρακτηριστική για σύμπλοκα του Re(I) με τέτοιους υποκαταστάτες και μπορεί να αποδοθεί βάση βιβλιογραφίας σε μετάπτωση που είναι βασισμένη στο 2-πυριδύλ-τμήμα του rq υποκαταστάτη [182]. Οι ταινίες αυτές δεν φαίνεται να επηρεάζονται ούτε από την αλλαγή του διαλύτη (Πίνακας 8.5) αλλά ούτε και από την αλλαγή του αξονικού υποκαταστάτη. Το μέγιστο του μήκους κύματος δε μεταβάλλεται σημαντικά ακόμα και αν ο αξονικός υποκαταστάτης είναι κάποιο αλογονίδιο [182], ή νιτρίλιο, ή πυριδίνη, επιβεβαιώνοντας τον IL χαρακτήρα των συγκεκριμένων ταινιών. Το αντίθετο συμβαίνει με την χαμηλότερης ενέργειας ταινία γύρω

στα 410 nm, που βάση βιβλιογραφίας μπορεί να αποδοθεί σε MLCT μετάπτωση. Οι συγκεκριμένες κορυφές και για τα δύο σύμπλοκα εμφανίζονται σαν «ώμοι», ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά από την πολικότητα του διαλύτη, σε αντίθεση με το χλώρο-σύμπλοκο που η MLCT είναι περισσότερο δομημένη και παρουσιάζει αρνητικό διαλυτοχρωμισμό [182].

Πίνακας 8.5. Δεδομένα φασμάτων απορρόφησης των κατιοντικών κινιξαλινικών συμπλόκων και του πρόδρομου χλώρο-συμπλόκου.

Σύμπλοκα	Διαλύτες	$\lambda_{\max}/ \text{nm} (\epsilon \cdot 10^{-3} / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})^a$	
		IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)	MLCT
Repq-Cl ^b	CHCl ₃	352sh, 371	458
	DMF	355sh, 371	431
Repq-MeCN	CH ₂ Cl ₂	280sh (23.5), 357sh (19.0), 370 (24.0)	405sh (5.3)
	MeOH	279sh (26.7), 357sh (20.0), 370 (24.0)	412sh (4.5)
	DMF	280sh (24.1), 356sh (18.5), 371 (23.4)	410sh (4.7)
Repq-py	CH ₂ Cl ₂	279sh (27.4), 358sh (18.6), 372 (23.8)	412sh (5.2)
	MeOH	281sh (23.5), 356sh (18.8), 370 (23.1)	410sh (4.8)
	DMF	280sh (24.5) 355sh (18.5), 371 (23.4)	410sh (4.8)

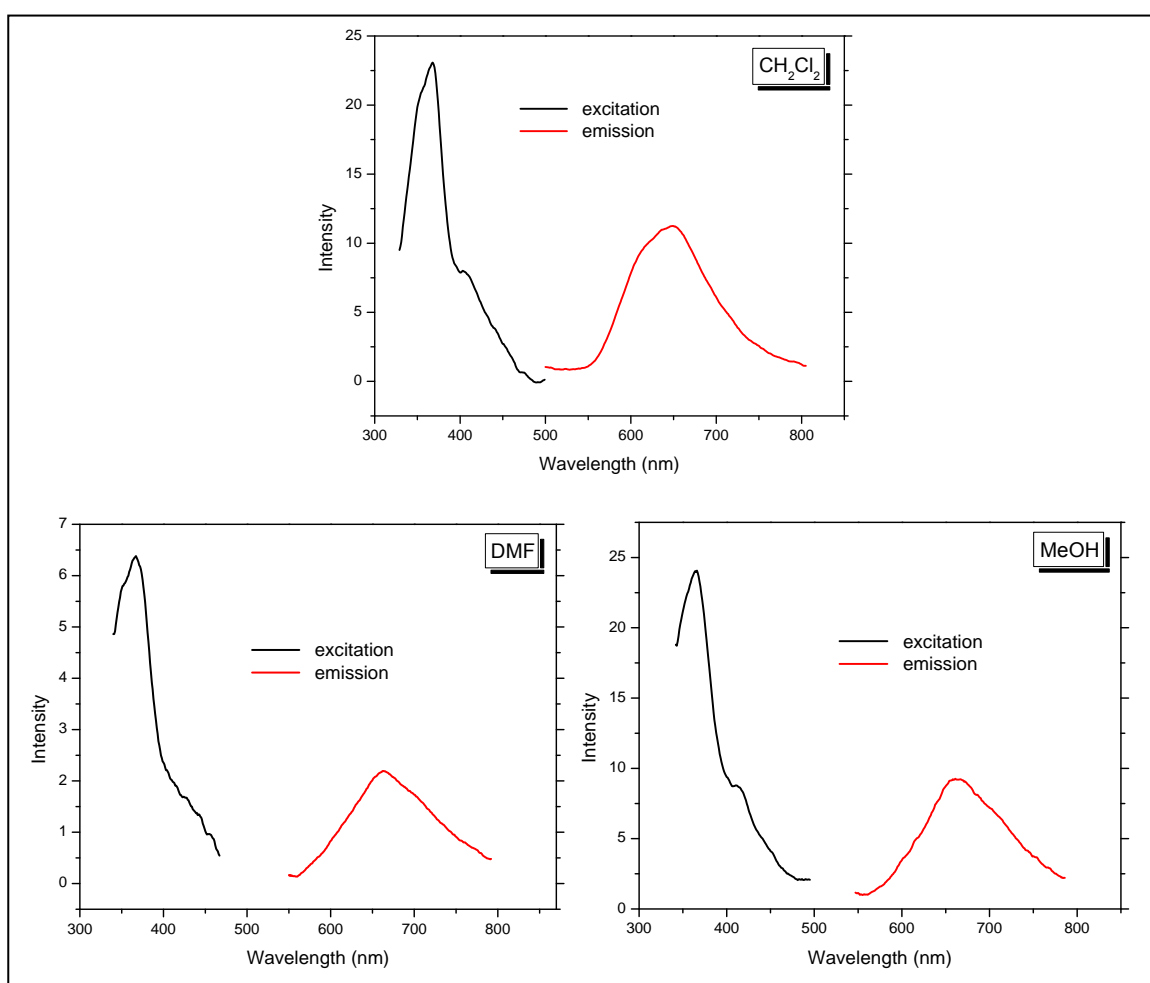
^a. sh: shoulder, ^b. τα δεδομένα από αναφορά [182]



Σχήμα 8.14. Φάσματα UV-Vis των συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ (δεξιά) και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$ (αριστερά) σε CH₂Cl₂, DMF, MeOH. Η συγκέντρωση όλων των διαλυμάτων είναι 30 μM και η θερμοκρασία 25 °C.

Φασματοσκοπία Εκπομπής

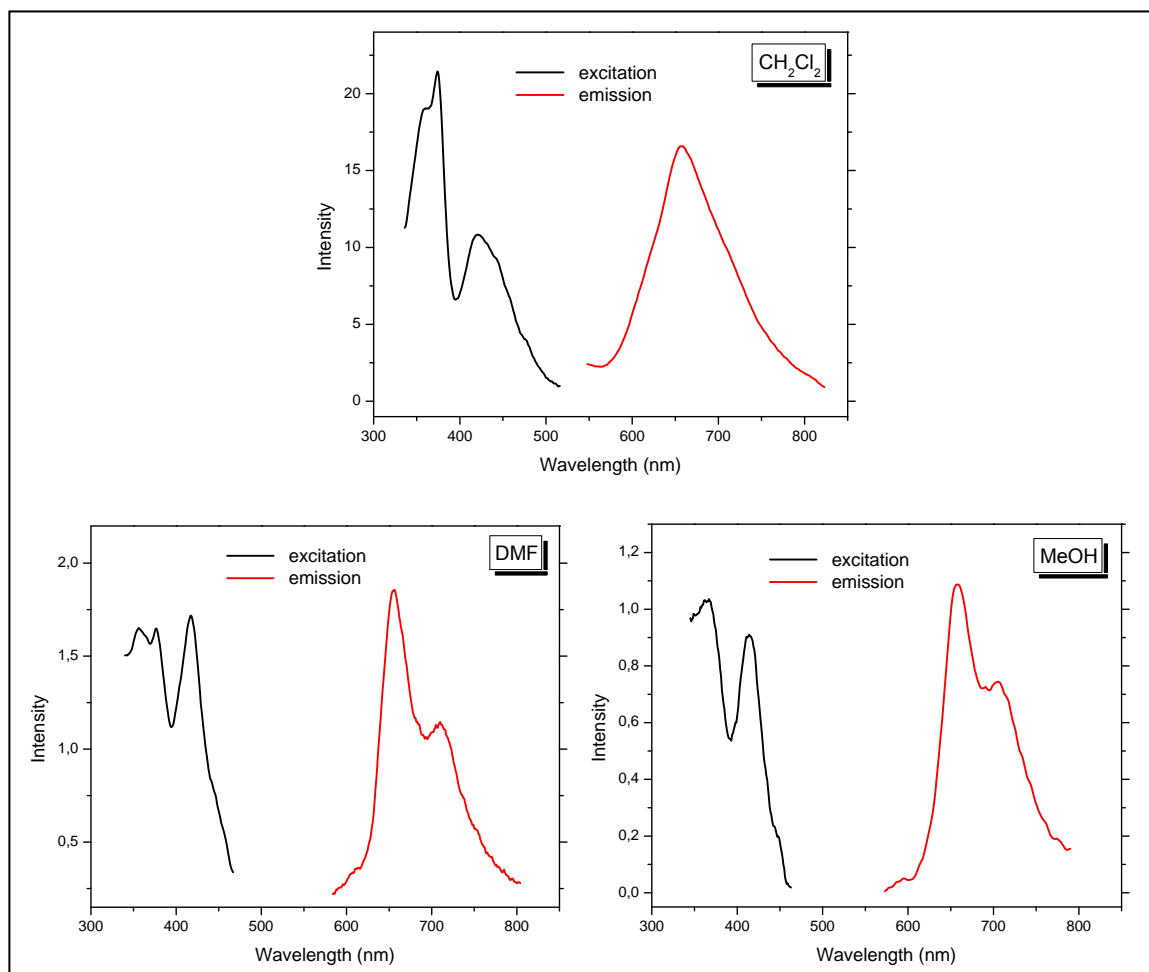
Τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής των συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$ φαίνονται στα Σχήματα 8.15 και 8.16. Τα φάσματα ελήφθησαν σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς απαέρωση των διαλυμάτων, ενώ η συγκέντρωση των συμπλόκων σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 30 μM . Τα φάσματα διέγερσης μοιάζουν αρκετά με εκείνα της απορρόφησης στη περιοχή από 360-450 nm. Διαφορά παρατηρείται για το πυριδινικό σύμπλοκο, που στο φάσμα διέγερσης η κορυφή χαμηλής ενέργειας είναι πλέον διαχωρισμένη. Να θυμίσουμε ότι στο φάσμα απορρόφησης εμφανίζεται σαν «ώμος» της ΠL κορυφής.



Σχήμα 8.15. Φάσματα διέγερσης (μαύρη γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]^+$ σε διαλύτες CH_2Cl_2 , DMF, MeOH.

Τα φάσματα εκπομπής και των δύο κατιοντικών συμπλόκων, σε διαλύτη CH_2Cl_2 , εμφανίζουν μια φαρδιά κορυφή, χωρίς δομή, με μέγιστο στα 650 και 656 nm για το MeCN- και το py-σύμπλοκο, αντίστοιχα. Συγκριτικά με άλλα $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{diimine})(\text{L})]^+$

σύμπλοκα τα μέγιστα των κορυφών εμφανίζονται μετατοπισμένα προς το ερυθρό. Η συμπεριφορά αυτή όμως είναι όμοια με άλλα ουδέτερα κινολινικά σύμπλοκα του Re(I) (αξονικός υποκαταστάτη χλώριο) [185]. Η εκπομπή βάση βιβλιογραφικών δεδομένων μπορεί να αποδοθεί σε $dp(\text{Re}) \rightarrow \pi^*(\text{diimine})^3\text{MLCT}$ κατάσταση [179,186].



Σχήμα 8.16. Φάσματα διέγερσης (μαύρη γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]^+$ σε διαλύτες CH_2Cl_2 , DMF, MeOH.

Όπως συζητήσαμε στο θεωρητικό μέρος της διατριβής, πολλά σύμπλοκα της κατηγορίας αυτής εμφανίζουν διαλυτοχρωμική φωταύγεια, δηλαδή φωταύγεια άμεσα εξαρτώμενη από τον διαλύτη. Πράγματι, σε πολικούς διαλύτες, όπως DMF και MeOH, το λ_{max} της εκπομπής του MeCN-σύμπλοκο μετατοπίζεται προς το ερυθρό κατά 12 και 13 nm, αντίστοιχα. Αντίθετα, το py-σύμπλοκο σε DMF εμφανίζει μια περισσότερο δομημένη κορυφή με δύο δονητικές συνιστώσες, με λ_{max} στα 657 και 710 nm. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και σε διαλύτη MeOH. Κάτι τέτοιο πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη μιας δεύτερης τριπλής κατάστασης πολύ κοντά ενεργειακά κείμενη με την πρώτη.

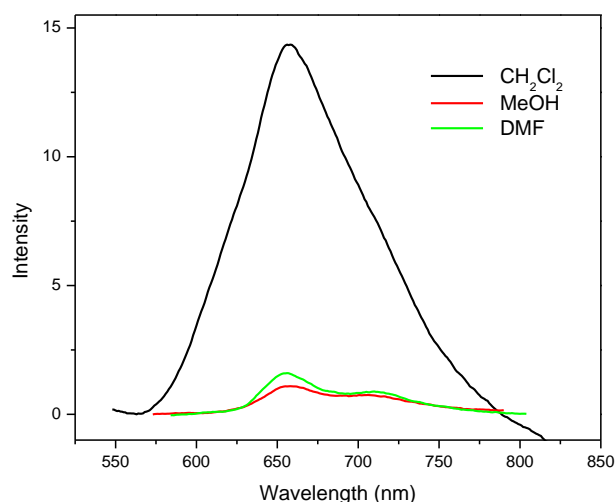
Όμοια με άλλα σύμπλοκα της κατηγορίας αυτής, το $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ και το $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$ εμφανίζουν ασθενή φωταύγεια σε πολικούς διαλύτες, όπως DMF ή MeOH, όπως φαίνεται ενδεικτικά στο Σχήμα 8.17. Μάλιστα η ένταση φθορισμού εμφανίζεται τουλάχιστον 10 φορές μειωμένη συγκριτικά με το CH_2Cl_2 . Αυτό αντανακλάται πολύ καλύτερα στην κβαντική απόδοση φθορισμού των συμπλόκων, που φαίνονται στον Πίνακα 8.6. Οι κβαντικές αποδόσεις είναι πολύ μικρές, αλλά ανάλογες για σύμπλοκα της κατηγορίας αυτής. Η κβαντική απόδοση φθορισμού (quantum yield) των συμπλόκων υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας ως πρότυπο ένα διάλυμα συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ σε H_2O κορεσμένο με αέρα, με κβαντική απόδοση $\Phi_{em}=0.028$ [187]. Η κβαντική απόδοση υπολογίστηκε ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη φωταύγειας και χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση [179]:

$$\phi_{\text{sample}} = \left(\frac{OD_{\text{std}}}{OD_{\text{sample}}} \right) * \left(\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{std}}} \right) * \phi_{\text{std}}$$

όπου OD είναι η απορρόφηση του δείγματος (sample) και του προτύπου (std) στο μήκος κύματος διέγερσης, και A είναι το εμβαδόν κάτω από το φάσμα εκπομπής.

Πίνακας 8.6. Μέγιστα μήκη κύματος φασμάτων εκπομπής, και η κβαντική απόδοση φθορισμού, των κατιοντικών κινολαλινικών συμπλόκων του Re(I). Η διέγερση έγινε στην MLCT κορυφή του εκάστοτε συμπλόκου.

Σύμπλοκα	Διαλύτες	λ_{em} / nm	Φ_{em}
Repq-MeCN	CH_2Cl_2	650	0.001
	MeOH	663	0.0002
	DMF	662	0.0002
Repq-py	CH_2Cl_2	656	0.002
	MeOH	658, 705	0.0001
	DMF	657, 710	0.0002

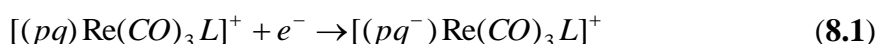


Σχήμα 8.17. Φάσματα εκπομπής του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]^+$ (30 μM) σε CH_2Cl_2 , DMF, MeOH. Φαίνεται χαρακτηριστικά η πολύ ασθενής φωταύγεια του συμπλόκου σε πολικούς εν συγκρίσει με άπολους διαλύτες.

Ηλεκτροχημικά δεδομένα συμπλόκων

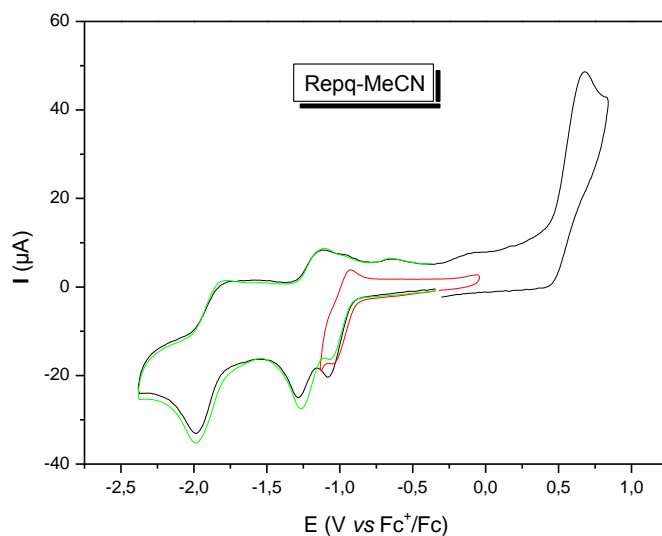
Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά των συμπλόκων μελετήθηκε με κυκλική βολταμετρία (CV) σε απεσταγμένο DMF χρησιμοποιώντας ως ηλεκτρόδιο εργασίας υαλώδη άνθρακα (glassy carbon). Τα δείγματα είχαν συγκέντρωση συμπλόκου 0.5 mM και φέροντα ηλεκτρολύτη $(^n\text{Bu}_4\text{N})\text{PF}_6$ 50 mM. Τα δείγματα απαερώθηκαν με διαβίβαση N_2 για 5 min πριν τη μέτρηση. Τα ηλεκτροχημικά δεδομένα συνοψίζονται στον Πίνακα 8.7 και αναφέρονται ως προς το ζεύγος Fc^+/Fc .

Στα Σχήματα 8.18 και 8.19 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμογραφήματα των υπό μελέτη συμπλόκων. Και για τα δύο σύμπλοκα παρατηρούμε μία πρώτη αναγωγή αρκετά εύκολη. Το αναγωγικό αυτό κύμα είναι ημι-αντιστρεπτό και αποδίδεται στην ενός ηλεκτρονίου αναγωγή του συμπλεγμένου υποκαταστάτη, όπως φαίνεται στην ισορροπία **(8.1)**. Για το MeCN-σύμπλοκο παρατηρείται στα -1.028 V ($\Delta E = E_{p,a} - E_{p,c} = 114$ mV, $i_{p,c}/i_{p,a} = 0.62$), ενώ για το δεύτερο στα -0.985 V ($\Delta E = 99$ mV, $i_{p,c}/i_{p,a} = 0.54$).

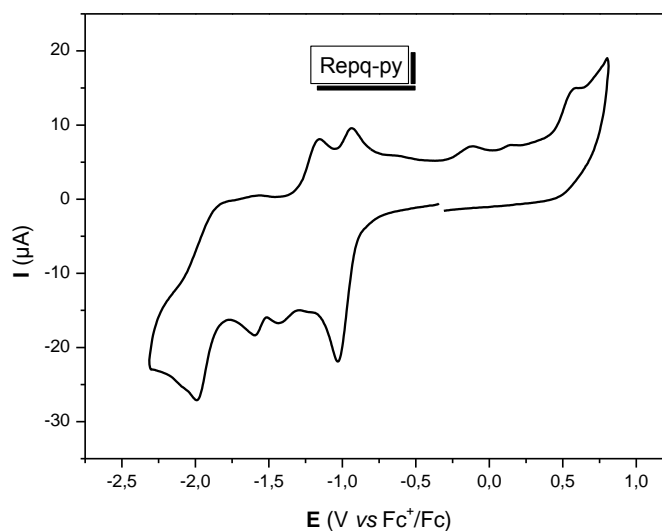


Ένα άλλο, επίσης ημι-αντιστρεπτό κύμα εμφανίζεται σε περισσότερο αρνητικά δυναμικά. Στο $\text{Re}(\text{pq})\text{-MeCN}$ εμφανίζεται στα -1.866 V, με $\Delta E = 245$ mV και $i_{p,c}/i_{p,a} = 0.84$, ενώ για το πυριδινικό σύμπλοκο στα -1.888 V, με $\Delta E = 209$ mV και $i_{p,c}/i_{p,a} = 0.89$. Και αυτό το κύμα οφείλεται σε μια δεύτερη αναγωγή του υποκαταστάτη $\text{pq}^-/\text{pq}^{2-}$, εντοπισμένη στο πυριδυλο-τμήμα του συμπλεγμένου υποκαταστάτη. Αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι κανένα από τα δύο ηλεκτροχημικά κύματα δεν επηρεάζονται σημαντικά από την αλλαγή

του αξονικού υποκαταστάτη. Επομένως δεν θα μπορούσε να αποδοθεί στην αναγωγή του μετάλλου ή ακόμα στην αναγωγή του αξονικού υποκαταστάτη. Αυτό το φαινόμενο, αλλά και το πως μπορούν να ελεγχθούν οι ιδιότητες αλλάζοντας την υποκατάσταση στην 6 θέση του μορίου του ρq, έχει μελετηθεί εκτεταμένα από το εργαστήριο μας [182].



Σχήμα 8.18. Κυκλικό βολταμμογράφημα του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\rho\text{q})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$, σε DMF και ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s.



Σχήμα 8.19. Κυκλικό βολταμμογράφημα του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\rho\text{q})(\rho\text{y})]\text{PF}_6$, σε DMF και ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s.

Αντίθετα, στην αναγωγή του μεταλλικού κέντρου, $\text{Re}(\text{I})/\text{Re}(\text{0})$, μπορεί να αποδοθεί το μη αντιστρεπτό κύμα που εμφανίζεται στο CV του πρώτου συμπλόκου στα -1.286 V και

για του δευτέρου στα -1.431 V. Κάτι τέτοιο έρχεται σε συμφωνία με δεδομένα που έχουν είδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία [188]. Όπως ήταν αναμενόμενο, η αναγωγή αυτή επηρεάζεται από τη διαφορετική σύμπλεξη του αξονικού υποκαταστάτη. Το πρώτο σύμπλοκο, έχοντας χαμηλότερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο κέντρο του Re από το πυριδινικό παράγωγο, εμφανίζει ευκολότερη Re(I)/Re(0) αναγωγή (λιγότερο αρνητικό δυναμικό).

Μια ηλεκτροχημικά μη αντιστρεπτή κορυφή εμφανίζεται στα 0.679 V και 0.595 V για το MeCN- και py-σύμπλοκο, αντίστοιχα, η οποία βάση βιβλιογραφικών δεδομένων αποδίδεται στην οξείδωση του Re(I)→Re(II) [188]. Η καλύτερη π δεκτική ικανότητα της ομάδας του ακετονιτριλίου καθιστά το συγκεκριμένο σύμπλοκο περισσότερο δύσκολο στην οξείδωση, όπως μαρτυρά η περισσότερο θετική τιμή του πρώτου συμπλόκου.

Πίνακας 8.7. Ηλεκτροχημικά δεδομένα για τα σύμπλοκα [Re(CO)₃(pq)(MeCN)]PF₆ και [Re(CO)₃(pq)(py)]PF₆ σε DMF.

Σύμπλοκα	E _{red} (V)			E _{ox} (V)
Repq-MeCN	-1.028 ^a	1.286 ^b	-1.866 ^a	0.679 ^b
Repq-py	-0.985 ^a	-1.431 ^b	-1.888 ^a	-1.593 ^b

^a. οι κορυφές είναι ηλεκτροχημικά ημι-αντιστρεπτές και οι τιμές εμφανίζονται ως

$$E_{1/2}=(E_{p,a}+E_{p,c})/2$$

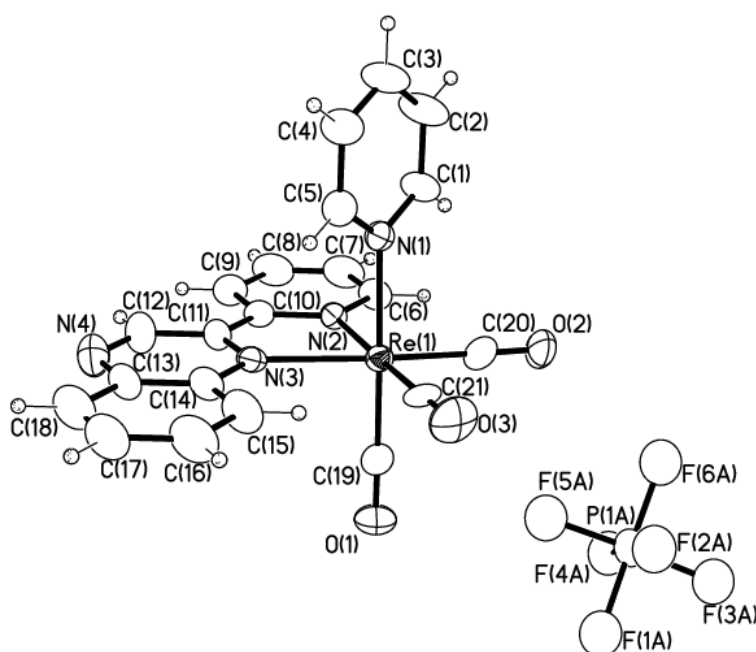
^b. οι κορυφές είναι ηλεκτροχημικά μη-αντιστρεπτές και οι τιμές παρουσιάζονται ως το δυναμικό κορυφής.

Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου [Re(CO)₃(pq)(py)]PF₆

Μονοκρύσταλλοι του συμπλόκου [Re(CO)₃(pq)(py)]PF₆ κατάλληλοι για περίθλαση ακτίνων X αναπτύχθηκαν από αέρια διάχυση αιθέρα σε διάλυμα ακετόνης. Το σύμπλοκο κρυσταλλώνει σε ένα μονοκλινές σύστημα P2₁/C, και στον Πίνακα 8.8 συνοψίζονται οι κρυσταλλογραφικές παράμετροι. Το διάγραμμα ORTEP και επιλεγμένα μήκη δεσμού και γωνίες δίνονται στο Σχήμα 8.20 και τον Πίνακα 8.9, αντίστοιχα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η αρίθμηση των ατόμων του συμπλόκου ακολουθεί το σύστημα του κρυσταλλογράφου, και είναι διαφορετική από την αρίθμηση των ατόμων υδρογόνου που ακολουθήθηκε προηγουμένως για τα NMR δεδομένα.

Η γεωμετρία του μεταλλικού κέντρου είναι οκταεδρική με τις τρεις καρβόνυλο ομάδες να συντονίζονται σε *facial* τρόπο. Ο pq υποκαταστάτης δρα διδοντικά χηλικά, υιοθετώντας

cis-διαμόρφωση, σε συμφωνία με έναν μεγάλο αριθμό ρq συμπλόκων με διάφορα μέταλλα [182,183,189,190]. Το ισημερινό επίπεδο αποτελείται από τον ρq υποκαταστάτη και από τις δύο καρβόνυλο ομάδες, C(20)–O(2) και C(21)–O(3). Το αξονικό επίπεδο, που αποτελείται από τον πυριδινικό υποκαταστάτη και το C19 είναι σχεδόν κάθετο στο ισημερινό, με τη δίεδρη να είναι 86.03° (Σχήμα 8.21). Τα μήκη των δεσμών του ρηνίου με τα καρβονύλια δεν παρουσιάζουν καμία σημαντική διαφοροποίηση συγκριτικά με παρόμοια σύμπλοκα του τύπου αυτού [43,44]. Καμία ιδιαίτερη διαφοροποίηση δεν παρατηρείται και για το δεσμό Re(1)–N(1) (2.219Å) του αξονικού υποκαταστάτη, συγκριτικά με άλλα πυριδινικά σύμπλοκα, όπου ο δεσμός είναι περίπου 2.21 Å.

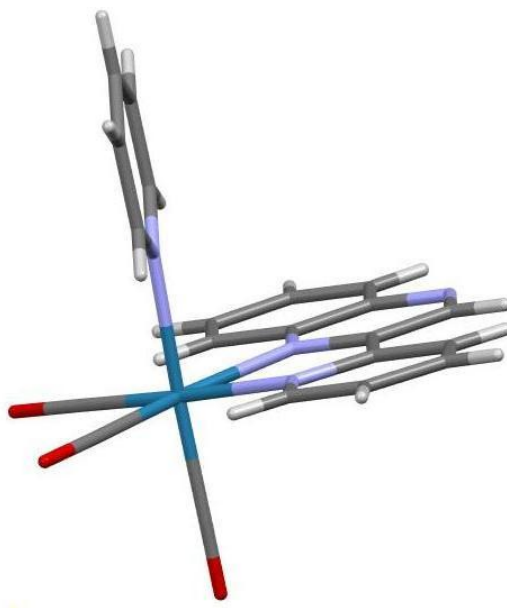


Σχήμα 8.20. Το ORTEP διάγραμμα του συμπλόκου *fac*-[Re(CO)₃(ρq)(py)]PF₆.

Η γωνία N(2)–Re(1)–N(3) στο σύμπλοκο βρέθηκε ότι είναι 75.5°, αρκετά μικρότερη από 90°, γεγονός που πηγάζει από την μικρή γωνία χηλίωσης των κινουζαλινικών παραγώγων. Η γωνία αυτή είναι ίδια για σύμπλοκα αυτού του τύπου με dppz, dppn υποκαταστάτη [43,44]. Ο δεσμός Re–N(3) είναι κατά 0.11 Å μεγαλύτερος από τον Re–N(2), κάτι που υποδηλώνει την ισχυρότερη δέσμευση του μετάλλου με το πυριδινικό παρά με το κινουζαλινικό τμήμα του ρq υποκαταστάτη. Μάλιστα, στην περίπτωση του συμπλόκου που μελετάμε, ο δεσμός αυτός είναι αρκετά μεγαλύτερος (2.274Å) συγκριτικά με το σύμπλοκο του ρq με το Pd(II) (2.062) [183]. Κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί για πολλά ακόμα σύμπλοκα του συγκεκριμένου υποκαταστάτη [189,190]. Αυτό πιθανόν να οφείλεται

σε στερεοχημική παρεμπόδιση που προκαλείται από το φαινυλικό τμήμα της κινόξαλης, ή ακόμα και στη διαφορά της δοτικής ισχύος των αντίστοιχων ατόμων αζώτου. Παρόλα αυτά και οι δύο δεσμοί βρίσκονται μέσα στα πλαίσια των μηκών δεσμών Re–N (από 2.16–2.22 Å) που συναντάμε στη βιβλιογραφία για διαφορετικούς πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες [43,44].

Από το Σχήμα 8.21 παρατηρούμε ότι το Re βρίσκεται ουσιαστικά στο ίδιο επίπεδο με το ισημερινό (βρίσκεται υψηλότερα μόνο κατά 0.012 Å) που ορίζει ο σκελετός του ρq υποκαταστάτη. Επιπλέον μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι ο ρq υποκαταστάτης διατηρεί την επιπεδότητα του μέσα στο σύμπλοκο. Το αντίθετο έχει παρατηρηθεί όταν το ρq είναι υποκατεστημένο στην 6 θέση του κινόξαλινικού τμήματος, με κάποια –CH₃ ή –COOH ομάδα [182,185]. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το πυρίδιλο με το κινόξαλινικό τμήμα της διμίνης σχηματίζει γωνία 17.62° [185].



Σχήμα 8.21. Πλάγια άποψη του συμπλόκου *fac*-[Re(CO)₃(ρq)(ρy)]PF₆, όπου διακρίνεται η επιπεδότητα του ρq υποκαταστάτη και η δίεδρη γωνία του αζονικού ως προς το ισημερινό επίπεδο.

Πίνακας 8.8. Κρυσταλλικά δεδομένα για το σύμπλοκο *fac*-[Re(CO)₃(pq)(py)]PF₆.

εμπειρικός τύπος	C ₂₁ H ₁₄ F ₆ N ₄ O ₃ P Re
μοριακό βάρος	701.53
θερμοκρασία	293(2) K
μήκος κύματος	0.71073 Å
κρυσταλλικό σύστημα	monoclinic, P 2 _{1/c}
διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a = 10.727 (2) Å $\alpha = 90^\circ$ b = 13.140 (3) Å $\beta = 121,53 (2)^\circ$ c = 19.392 (5) Å $\gamma = 90^\circ$
όγκος	2329.8 (9) Å ³
Z, υπολογιζόμενη πυκνότητα	4, 2.000 Mg/m ³
συντελεστής απορρόφησης	5.364 mm ⁻¹
F(000)	1344
μέγεθος κρυστάλλου	0.50 x 0.40 x 0.20 mm ³
θ περιοχή για συλλογή δεδομένων	1.98 to 26.76°
δείκτες περιορισμού (limiting indices)	-13 ≤ h ≤ 13 -16 ≤ k ≤ 16 -24 ≤ l ≤ 24
ανακλάσεις που συλλέγονται/ μοναδική	24807 / 4831 [R(int) = 0.0864]
πληρότητα (completeness) σε $\theta = 26.76$	97.3 %
max. and min. transmission	0.4134 and 0.1745
μέθοσδος βελτίωσης	full-matrix least-squares on F ²
δεδομένα/περιορισμοί/παράμετροι	4831 / 102 / 272
goodness-of-fit on F ²	1.140
τελικού δείκτες R [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0620, wR2 = 0.1167
δείκτες R (όλα τα δεδομένα)	R1 = 0.1029, wR2 = 0.1265
largest diff. peak and hole	0.971 and -1.678 e Å ⁻³

Πίνακας 8.9. Επιλεγμένα μήκη δεσμού (Å) και γωνίες δεσμού (deg) για το σύμπλοκο *fac*-[Re(CO)₃(pq)(py)]PF₆.

Μήκη Δεσμών			
Re(1)–C(21)	1.885(14)	Re(1)–N(3)	2.274(4)
Re(1)–C(20)	1.901(13)	C(10)–C(11)	1.394(7)
Re(1)–C(19)	1.914(13)	C(19)–O(1)	1.154(14)
Re(1)–N(1)	2.219(5)	C(20)–O(2)	1.162(14)
Re(1)–N(2)	2.162(5)	C(21)–O(3)	1.176(15)
Γωνίες Δεσμών			
N(1)–Re(1)–C(19)	177.6(4)	N(3)–Re(1)–C(19)	91.4(4)
N(1)–Re(1)–C(20)	91.9(4)	N(3)–Re(1)–C(20)	172.0(4)
N(1)–Re(1)–C(21)	94.5(4)	N(3)–Re(1)–C(21)	104.0(5)
N(1)–Re(1)–N(2)	83.5(3)	C(19)–Re(1)–C(20)	88.5(5)
N(1)–Re(1)–N(3)	87.9(2)	C(19)–Re(1)–C(21)	87.9(5)
N(2)–Re(1)–N(3)	75.5(2)	C(20)–Re(1)–C(21)	84.0(6)
N(2)–Re(1)–C(19)	94.0(4)	O(1)–C(19)–Re(1)	178.1(11)
N(2)–Re(1)–C(20)	96.5(4)	O(2)–C(20)–Re(1)	179.1(12)
N(2)–Re(1)–C(21)	178.0(4)	O(3)–C(21)–Re(1)	177.9(13)

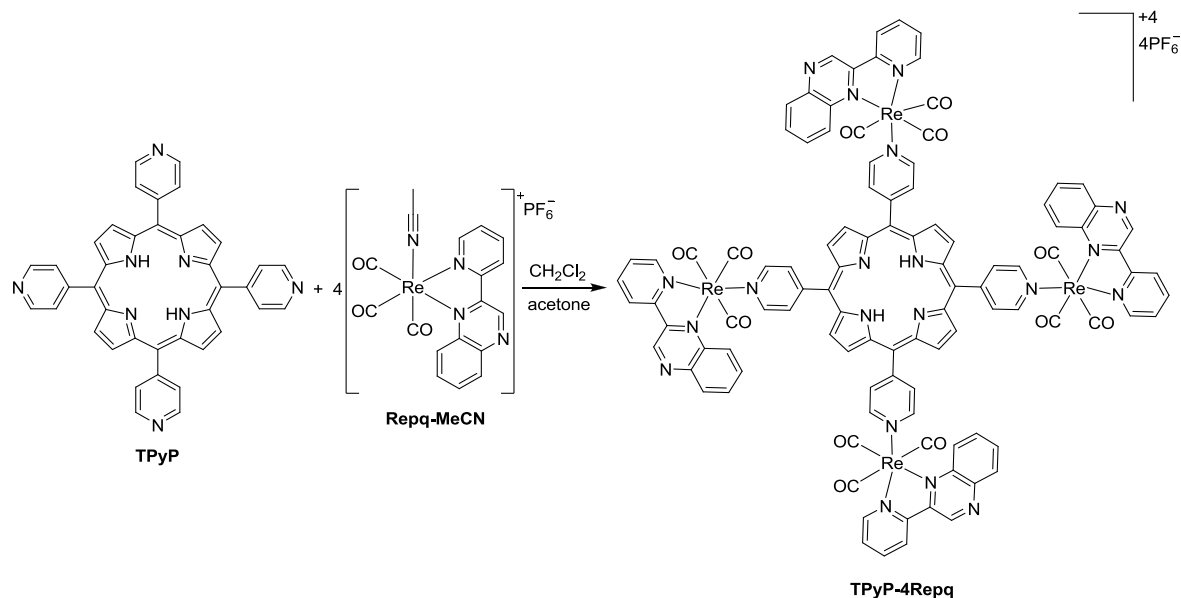
8.4. Το τετρα-ρηνικό pq πορφυρινικό σύμπλοκο {H₂TPyP[Re(CO)₃(pq)]₄}·4PF₆, (H₂TPyP-4Re)

8.4.1. Σύνθεση του πορφυρινικού συμπλόκου H₂TPyP-4Re

Γενική Πορεία Σύνθεσης

Σε ένα αιώρημα H₂TPyP (22.94 mg, 0.0365 mmol) σε μείγμα διαλυτών διγλωρομεθανίου:ακετόνης (1:1) προστίθεται 104.1 mg Repq-MeCN (0.157 mmol) και το μείγμα θερμαίνεται υπό αναρροή για 6 ώρες υπό ατμόσφαιρα N₂. Μετά το τέλος του βρασμού το μείγμα αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και διηθείται για να απομακρυνθεί η πορφυρίνη που δεν αντέδρασε. Το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι να μείνουν ~3 mL όγκου. Μετά από προσθήκη διαιθυλ-αιθέρα καταβυθίζεται καφέ στερεό το οποίο διηθείται υπό κενό. Το στερεό αυτό δεν είναι αρκετά καθαρό. Για επιπλέον

καθαρισμό το στερεό ανακρυσταλλώνεται από νιτρομεθάνιο (CH_3NO_2) και με τη βοήθεια αιθέρα καταβυθίζεται καφέ στερεό, το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό μετά από ψύξη. Απόδοση 20%, 16.2 mg.



Σχήμα 8.22. Πορεία σύνθεσης του τετρα-ρηνικού ρq πορφυρινικού συμπλόκου ($\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$).

Σχολιασμός Μεθόδου Σύνθεσης

Γενικά, για την άμεση σύμπλεξη ενός μεταλλικού κέντρου στα περιφερειακά άζωτα της *meso*-τετρα-πυριδυλ-πορφυρίνης, έχουν αναπτυχθεί δύο μέθοδοι. Η πρώτη μέθοδος, που αναπτύχθηκε από τον K. Araki και τους συνεργάτες του [191], χρησιμοποιεί ως διαλύτη παγόμορφο οξικό οξύ, για να περιγράψει την σύμπλεξη των $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$ ομάδων στην H_2TPyP . Η δεύτερη, και πιο πρόσφατη, αναπτύχθηκε από τον E. Alessio [122], για να περιγράψει την σύμπλεξη $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})]^+$ στην H_2TPyP . Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, ενώ σαν πρόδρομο μόριο χρησιμοποιήθηκε το $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})(\text{dmsO-O})]^+$. Στην περίπτωση μας, χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης μείγμα διχλωρομεθανίου:ακετόνης και σαν πρόδρομο το $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{rq})(\text{MeCN})]^+$. Η πορεία σύνθεσης του τέτρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.22.

Ο συνδυασμός διαλυτών επιλέχθηκε προκειμένου να διαλυθεί η πορφυρίνη (με τη βοήθεια θέρμανσης) στο CH_2Cl_2 και να προχωρήσει η αντίδραση, αλλά και να μπορεί εύκολα να απομονωθεί η ποσότητα που δεν αντέδρασε μετά από ψύξη (σε αυτό βοηθάει η προσθήκη ακετόνης). Πράγματι, σε θερμοκρασία δωματίου η πορφυρίνη δεν διαλύεται στο μείγμα διαλυτών που επιλέξαμε, ενώ το σύμπλοκο είναι διαλυτό σε αυτό, και έτσι

απομονώθηκε εύκολα. Η προσθήκη αιθέρα στο διήθημα οδήγησε στη καταβύθιση του επιθυμητού συμπλόκου, αλλά και σε μια μικρή ποσότητα του πρόδρομου μορίου $\text{Re}q\text{-MeCN}$. Η προσπάθεια καθορισμού του προϊόντος με στήλη (τόσο σε silica gel όσο και σε alumina) ήταν αδύνατη καθώς το επιθυμητό σύμπλοκο δεν προχωρούσε από τη γραμμή βάσης ($\text{RF}=0$). Η ανακρυστάλλωση με CH_3NO_2 οδήγησε τελικά στην απομόνωση του επιθυμητού συμπλόκου.

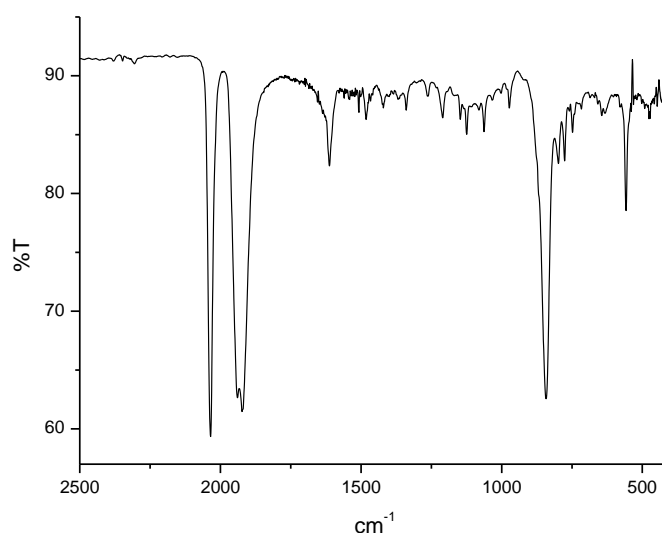
Το νέο αυτό σύμπλοκο έχει καλή διαλυτότητα σε πολικούς οργανικούς διαλύτες όπως MeOH , acetone, DMF, είναι αρκετά διαλυτό σε CH_2Cl_2 , αλλά δεν διαλύεται σε CHCl_3 . Παρουσία υδατικού διαλύματος, και σε υψηλές συγκεντρώσεις, το σύμπλοκο κάνει συσσωματώματα (aggregation), και καταβυθίζεται. Αυτό περιόρισε σε ένα σημαντικό βαθμό τις μελέτες αλληλεπίδρασης με το DNA, και πολύ περισσότερο τα *in vitro* πειράματα, όπως θα δούμε στα επόμενα κεφάλαια.

8.4.2. Χαρακτηρισμός του πορφυρινικού συμπλόκου $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$

IR Φασματοσκοπία

Στο Σχήμα 8.23 φαίνεται το IR φάσμα του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου σε δισκίο KBr. Οι πλέον χαρακτηριστικές κορυφές είναι αυτές που οφείλονται στις δονήσεις τάσης των καρβόνυλο ομάδων των μονάδων του Re(I) αλλά και των αντισταθμιστικών ιόντων PF_6^- του πορφυρινικού παραγώγου. Οι δονήσεις $\nu(\text{CO})$ παρατηρούνται στα 2035, 1939 και 1923 cm^{-1} . Συγκρίνοντας τις συχνότητες αυτές με τις αντίστοιχες του μονομερούς συμπλόκου $\text{Re}q\text{-py}$ (Πίνακας 8.3), θα παρατηρήσουμε ότι είναι πολύ κοντά μεταξύ τους. Προφανώς κάτι τέτοιο δεν είναι παράλογο, αφού το χημικό περιβάλλον γύρω από την ομάδα $\text{Re}(\text{CO})_3$ είναι σε γενικές γραμμές ίδιο. Επομένως η μείωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο τμήμα $\text{Re}(\text{CO})_3$ είναι παρόμοια, με αποτέλεσμα οι κορυφές $\nu(\text{CO})$ να εμφανίζονται ενεργειακά πολύ κοντά.

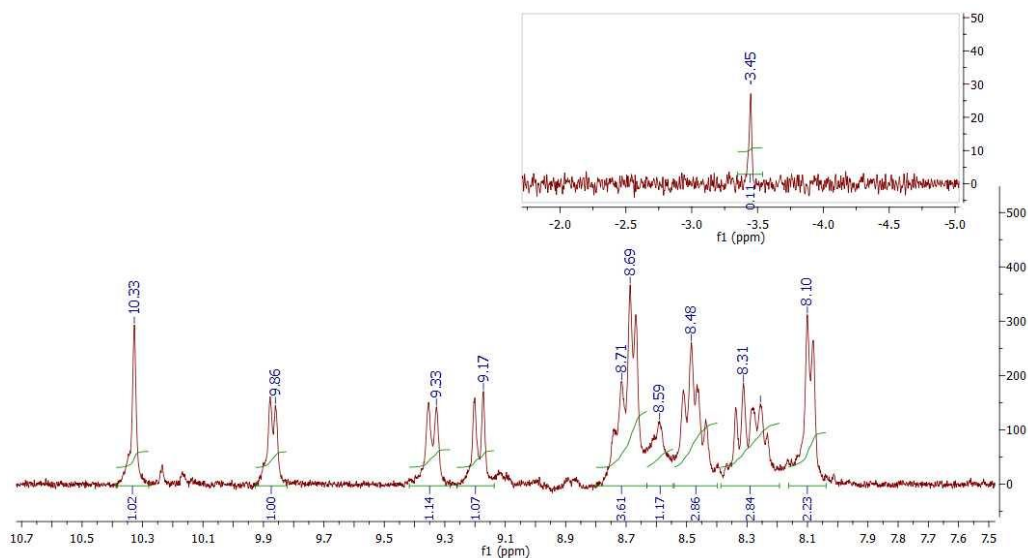
Στην ελεύθερη πορφυρίνη η δόνηση τάσης $\text{C}=\text{C}$ των πυριδινικών δακτυλίων εμφανίζεται στη συχνότητα 1594 cm^{-1} . Η αντίστοιχη για το πορφυρινικό σύμπλοκο παρατηρείται στα 1612 cm^{-1} , εμφανώς μετατοπισμένη, προφανώς λόγω της άμεσης σύμπλεξης των ομάδων του Re(I) . Οι δονήσεις παραμόρφωσης του πυρρολικού δακτυλίου εμφανίζονται στα 798 cm^{-1} , χωρίς όμως να μετατοπίζεται αισθητά, όπως άλλωστε αναμέναμε.



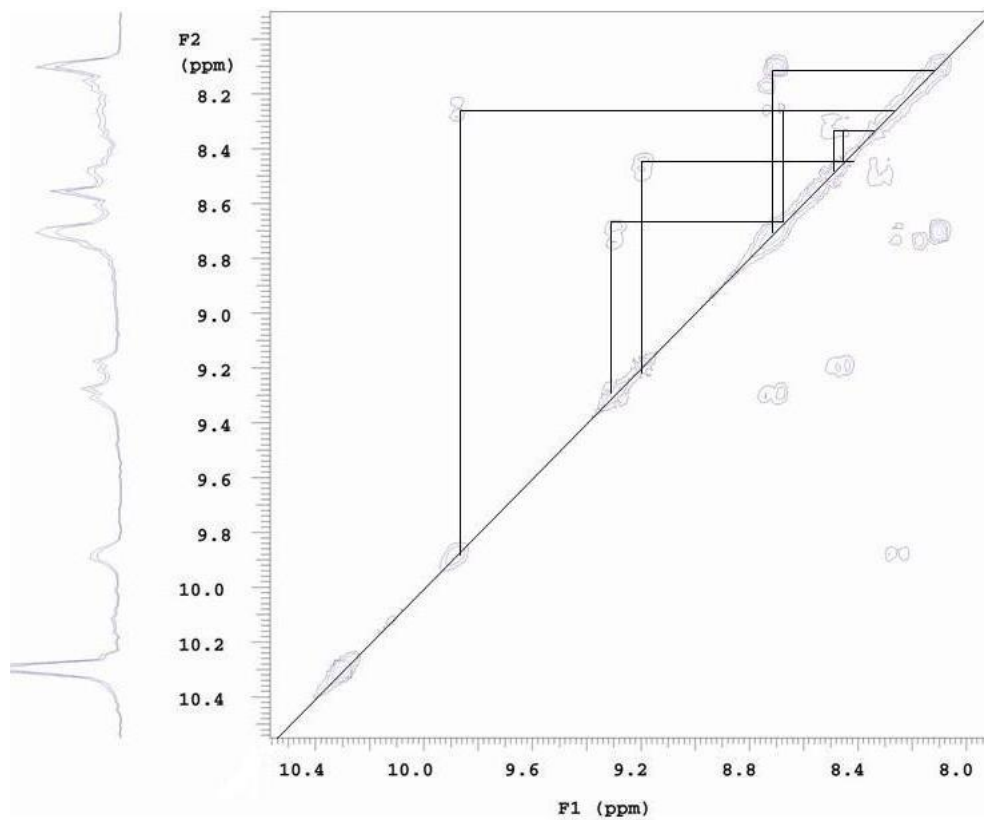
Σχήμα 8.23. IR φάσμα του πορφυρινικού συμπλόκου $H_2TPyP-4Re$ σε δισκίο KBr .

NMR φασματοσκοπία

Στο Σχήμα 8.24 φαίνεται το φάσμα ^1H-NMR του πορφυρινικού συμπλόκου $H_2TPyP-4Re$ σε δευτεριομένη $acetone-d_6$, ενώ στον Πίνακα 8.10 συνοψίζονται οι χημικές μετατοπίσεις. Οι συντονισμοί της πορφυρίνης και του υποκαταστάτη rq αποδόθηκαν με τη βοήθεια $^1H-^1H$ COSY NMR, και το φάσμα παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.25. Στο φάσμα του πορφυρινικού παραγώγου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του rq . Γίνεται αμέσως εμφανές ότι τα τέσσερα μεταλλικά τμήματα είναι ισοδύναμα, εξαιτίας της ελεύθερης περιστροφής του δεσμού $Re-N(py)$. Η διπλή κορυφή στα 8.10 ppm αποδίδεται αναμφίβολα στα πρωτόνια της πυριδίνης $py_{3,5}$, ενώ τα πρωτόνια που βρίσκονται πλησιέστερα στο συμπλεγμένο άτομο N της py εμφανίζονται στα 8.71 ppm. Σε γενικές γραμμές, η σύμπλεξη ενός πυριδινικού τμήματος στο μεταλλικό κέντρο επιφέρει μετατόπιση των πρωτονίων σε χαμηλότερα πεδία, όπως άλλωστε παρατηρήσαμε να συμβαίνει με το σύμπλοκο $[Re(CO)_3(rq)(py)]^+$. Αντίθετα, στο συγκεκριμένο πορφυρινικό παράγωγο παρατηρείται μετατόπιση των $H_{2,6}$ σε υψηλότερα πεδία συγκριτικά με την ελεύθερη πορφυρίνη, κάτι που έχει παρατηρηθεί και για άλλα ανάλογα πορφυρινικά σύμπλοκα με Re [123] ή Ru [124]. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της θωράκισης που προκαλείται από τον rq υποκαταστάτη. Τα πρωτόνια των εσωτερικών αζώτων της πορφυρίνης εμφανίζονται στα -3.45 ppm.



Σχήμα 8.24. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ του πορφυρινικού συμπλόκου $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ σε Acetone-d_6 .



Σχήμα 8.25. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY NMR του πορφυρινικού συμπλόκου $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ σε Acetone-d_6 .

Πίνακας 8.10. Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) του πορφυρινικού συμπλόκου H₂TPyP-4Re. Σε παρένθεση φαίνεται ο αριθμός των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή. Η αρίθμηση των πρωτονίων είναι ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε παραπάνω.

Πρωτόνια	δ (ppm)
H3	10.33s (4H)
H3'	9.33d (4H)
H4'	8.69mt (4H)
H5'	8.26mt (4H)
H6'	9.86d (4H)
H5	8.48mt (4H)
H6	8.31mt (4H)
H7	8.48mt (4H)
H8	9.17d (4H)
py2,6	8.71mt (8H)
py3,5	8.10d (8H)
β-H	8.59s (8H)
N-H πυρρολιου	-3.45s (2H)

s: απλή, d: διπλή, mt: πολλαπλή.

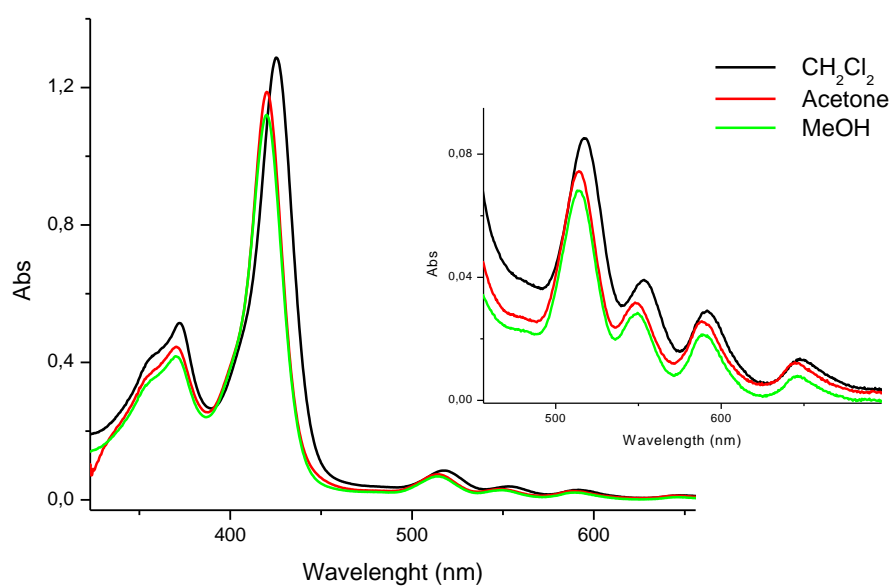
UV-Vis φασματοσκοπία

Στο Σχήμα 8.26 φαίνεται το φάσμα απορρόφησης του H₂TPyP-4Re σε διαλύτες CH₂Cl₂, MeOH και acetone. Η ορατή περιοχή των φασμάτων κυριαρχείται από τα χαρακτηριστικά του πορφυρινικού συστατικού, εμφανίζοντας τέσσερεις Q bands στην περιοχή από 500 έως 650 nm, και μια πολύ μεγάλης έντασης Soret band κοντά στα 420 nm. Στη UV περιοχή απορροφούν οι μονάδες του Re(I). Η Re(I)→pq MLCT μετάπτωση είναι κρυμμένη από την Soret band της πορφυρίνης, ενώ IL(pq) μετάπτωση εμφανίζεται στα 370 nm με έναν «ώμο» στα 356 nm. Στον Πίνακα 8.11 συνοψίζονται τα μέγιστα μήκη κύματος και οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας της ελεύθερης πορφυρίνης και του τετρα-ρηνικού παραγώγου. Συγκρίνοντας τις απορροφήσεις που οφείλονται στο πορφυρινικό συστατικό με τις αντίστοιχες της ελεύθερης πορφυρίνης, είναι εμφανής η μετατόπιση όλων των κορυφών προς το κόκκινο (red shift). Συγκεκριμένα, σε διαλύτη CH₂Cl₂, οι Q bands μετατοπίζονται κατά 5 nm και η Soret κατά 9 nm, ενώ η ένταση της

τελευταίας εμφανίζεται αρκετά μειωμένη σε σχέση την ελεύθερη πορφυρίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι, με αύξηση της πολικότητας του διαλύτη παρατηρείται μετατόπιση των συγκεκριμένων κορυφών προς την μπλε περιοχή του φάσματος (blue shift), κατά 5 nm για τη Soret και 3 nm για τις Q bands.

Πίνακας 8.11. UV-Vis φασματοσκοπικά δεδομένα της πορφυρίνης H₂TPyP, και του αντίστοιχου πορφυρινικού παραγώγου το Re(I) (H₂TPyP-4Re) και η απόδοσή τους, σε διαλύτες CH₂Cl₂, MeOH και acetone. Σε παρένθεση φαίνονται οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας, ε σε M⁻¹cm⁻¹.

H ₂ TPyP	λ _{max} σε nm (ε·10 ⁻³ σε M ⁻¹ cm ⁻¹)			Απόδοση
	CH ₂ Cl ₂	MeOH	Acetone	
-	372 (103)	370 (83.0)	370 (89.0)	ΠL (pq)
416 (391)	425 (257)	420 (224)	420 (237)	Soret band
512 (17.0)	517 (17.0)	514 (13.6)	514 (14.9)	Q bands
545 (4.4)	553 (7.8)	549 (5.7)	548 (6.3)	
587 (5.0)	591 (5.8)	588 (4.3)	588 (5.1)	
642 (1.5)	647 (2.6)	645 (1.5)	644 (2.4)	

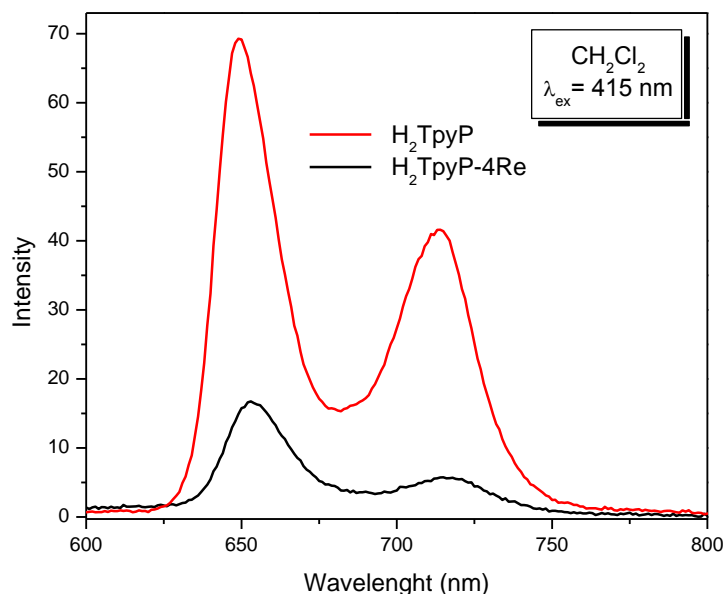


Σχήμα 8.26. UV-Vis φάσματα του πορφυρινικού συμπλόκου H₂TPyP-4Re (5 μM) σε διαλύτες CH₂Cl₂, MeOH και acetone. Στο ένθετο φαίνονται οι Q band της πορφυρίνης σε μεγέθυνση.

Το φάσμα του μεταλλικού τμήματος του $H_2TPyP-4Re$ (Σχήμα 8.26), είναι παρόμοιο με το φάσμα απορρόφησης του μονομερούς συμπλόκου $Repq-py$ (Σχήμα 8.14). Μια πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας της $\pi \rightarrow \pi^*(pq)$ του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού παραγώγου είναι περίπου τετραπλάσιος από τον αντίστοιχο του μονομερούς συμπλόκου (Πίνακας 8.5).

Φασματοσκοπία εκπομπής

Η φθορίζουσα συμπεριφορά του ρηνιο-πορφυρινικού παραγώγου μελετήθηκε συγκριτικά με την ελεύθερη πορφυρίνη, σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης και σε διαφορετικούς διαλύτες. Η H_2TPyP , με διέγερση στη Soret band, φθορίζει παρουσιάζοντας εκπομπή στα 649 και 712 nm σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο (Σχήμα 8.27). Η εκπομπή αυτή παρατηρείται από την χαμηλότερη απλή διεγερμένη κατάσταση ($S_1 \rightarrow S_0$) και μπορεί να αποδοθεί στις $Q(0,0)$ και $Q(1,0)$ μεταπτώσεις. Η ίδια εκπομπή παρατηρείται ακόμα και αν διεγείρουμε στις Q bands της πορφυρίνης ($\lambda_{ex}=512$ nm).



Σχήμα 8.27. Φάσμα εκπομπής της H_2TPyP (κόκκινη γραμμή) και του $H_2TPyP-4Re$ (μαύρη γραμμή). Τα φάσματα ελήφθησαν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες, σε CH_2Cl_2 και μήκος κύματος διέγερσης $\lambda_{ex} = 415$ nm. Η συγκέντρωση των δύο παραγώγων ήταν 0.1 μM .

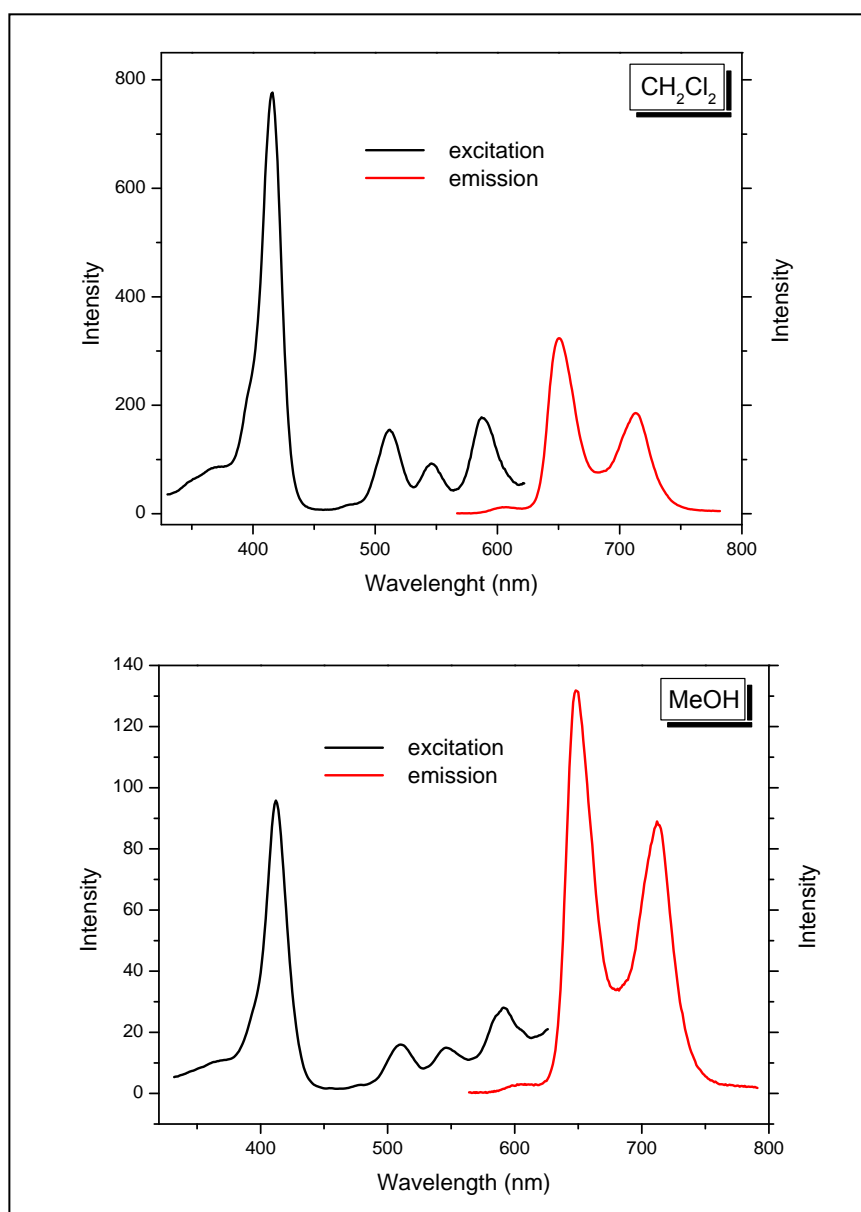
Όταν η ομάδα $[Re(CO)_3(pq)]^+$ συμπλέκεται περιφερειακά στις πυριδυλ-ομάδες της πορφυρίνης παρατηρείται σημαντική μείωση του φθορισμού, αλλά το φάσμα εκπομπής διατηρεί τα χαρακτηριστικά του πορφυρινικού δακτυλίου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.27.

Παρατηρείται μόνο μια μικρή βαθοχρωμική μετατόπιση του μέγιστου μήκους κύματος κατά 4 nm, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.12. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται ακόμα και με διέγερση στις Q bands ($\lambda_{ex}=512$ nm), η παρατηρούμενη φωταύγεια, όμως, είναι χαμηλότερης έντασης. Ως εκ τούτου, η φωταύγεια αναμένεται να επικεντρώνεται γύρω από τη χαμηλότερη διεγερμένη απλή κατάσταση της πορφυρίνης, και όχι στη χαμηλότερη διεγερμένη τριπλή κατάσταση της ομάδας $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]^+$. Η ομάδα αυτή, όπως συζητήσαμε προηγουμένως, παρουσιάζει εκπομπή στα 656 nm σε διαλύτη CH_2Cl_2 , αλλά δεν μπορούμε να την παρατηρήσουμε λόγω της πολύ μικρής κβαντικής απόδοσης της (Πίνακας 8.6).

Ανάλογη συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί τόσο μετά από τη σύμπλεξη ομάδων $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$, όσο και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})]^+$, και μάλιστα βρέθηκε ότι η κβαντική απόδοση φθορισμού μειώνεται όσο αυξάνονται οι ομάδες μεταλλικών κέντρων στην περιφέρεια της πορφυρίνης [122-124]. Αυτό οφείλεται στην ενισχυμένη ενδοσυστηματική διασταύρωση της πορφυρινικής μονάδας, λόγω του heavy-atom effect που προέρχεται από τον πυρήνα του μετάλλου [122].

Το φάσμα διέγερσης του πορφυρινικού παραγώγου $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$, φαίνεται με μαύρη γραμμή στο Σχήμα 8.28. Εκ πρώτης όψεως, μοιάζει αρκετά με το φάσμα απορρόφησης του $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ σε διαλύτη CH_2Cl_2 , εμφανίζοντας τις Soret και Q bands μετατοπισμένες προς χαμηλότερα μήκη κύματος. Στη UV περιοχή του φάσματος διέγερσης του $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$, η μπάντα του μεταλλικού τμήματος, εμφανίζεται σαν ουρά γύρω στα 365 nm, και έχει εμφανώς μειωμένη ένταση. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι οι διεγερμένες μονάδες του Re(I) καλύπτονται από την φθορίζουσα κατάσταση του πορφυρινικού τμήματος [122].

Προκειμένου να διαπιστωθούν οι επιπτώσεις της πολικότητας του διαλύτη στην εκπομπή του $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$, πραγματοποιήθηκαν τα ίδια πειράματα σε MeOH (Σχήμα 8.28, Πίνακας 8.12). Τα αποτελέσματα έδειξαν σαφώς ότι, για το παραπάνω σύμπλοκο, οι ιδιότητες εκπομπής δεν επηρεάζονται αισθητά από την πολικότητα του διαλύτη, σε αντίθεση με ότι παρατηρήσαμε για το μονομερές σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]^+$.



Σχήμα 8.28. Φάσματα διέγερσης (μαύρη γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) του συμπλόκου $H_2TPyP-4Re$ ($0.1 \mu M$) σε διαλύτες CH_2Cl_2 (πάνω) και $MeOH$ (κάτω).

Πίνακας 8.12. Δεδομένα φασμάτων εκπομπής της ελεύθερης πορφυρίνης (H_2TPyP), του μονομερούς συμπλόκου ($Repq-py$), και του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού παραγώγου $H_2TPyP-4Re$.

Ενώσεις	Διαλύτες	λ_{em} / nm
H_2TPyP	CH_2Cl_2	649, 712
$Repq-py$	CH_2Cl_2	656
	$MeOH$	658
$H_2TPyP-4Re$	CH_2Cl_2	653, 716
	$MeOH$	650, 713

8.5. Το χλωρο-γάλλιο(III) πυρφυρινάτο σύμπλοκο, [(TPyP)GaCl]

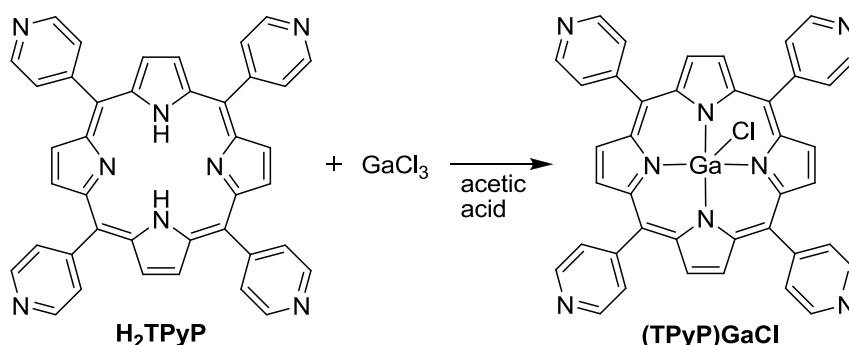
8.5.1 Σύνθεση του χλωρο-γάλλιο(III) πυρφυρινάτο συμπλόκου

Γενική Πορεία Σύνθεσης

Σε 60 mL παγόμορφου οξικού οξέος (glacial acetic acid) προστίθενται 117 mg (0.18 mmol) H_2TPyP , 55 mg (0.28 mmol) $GaCl_3$ και 103.4 mg (1.26 mmol) άνυδρου οξικού νατρίου. Το μείγμα βράζεται υπό αναρροή και υπό ανάδευση (~130 °C) όλη νύχτα. Την επόμενη μέρα το μείγμα ψύχεται στους 0 °C για μια ώρα και σχηματίζεται ένα βαθύ μωβ μικροκρυσταλλικό στερεό, το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση και ανακρυσταλλώνεται από ακετόνη και καταβυθίζεται με εξάνιο. Το τελικό προϊόν ξηραίνεται στους 120 °C για μια ημέρα. Απόδοση 42%, 54.6 mg.

Σχολιασμός Μεθόδου Σύνθεσης

Για τη σύνθεση πορφυρινικών συμπλόκων του Ga(III) έχουν αναπτυχθεί τρεις γενικές μέθοδοι. Η πρώτη χρησιμοποιεί $Ga(acac)_2$ σε φαινόλη [192], ενώ η δεύτερη $NH_4Ga(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ σε οξικό οξύ [193]. Η τρίτη, και πιο διαδεδομένη, είναι αυτή που αναπτύχθηκε από τους A. Coutsolelos et al. [194] και χρησιμοποιεί $GaCl_3$ σε οξικό οξύ. Από τη συγκεκριμένη αντίδραση παράγονται οι αντίστοιχες χλωρο-γάλλιο(III) πορφυρίνες, σε αποδόσεις που κυμαίνονται από 70 έως 90%. Από το μείγμα αντίδρασης παράγεται και ένα μικρό ποσοστό (~3.5%) της ασετάτο-πορφυρίνης, $(TPP)Ga(OAc)$, που μπορεί να απομονωθεί από το διήθημα με εκχύλιση.



Σχήμα 8.29. Πορεία σύνθεσης του χλωρο-Ga(III) πορφυρινάτο συμπλόκου $(TPyP)GaCl$.

Ακολουθώντας λοιπόν, την πορεία που φαίνεται στο Σχήμα 8.29 συντέθηκε ένα νέο Ga(III) πορφυρινάτο σύμπλοκο. Η πορεία της αντίδρασης μπορεί εύκολα να

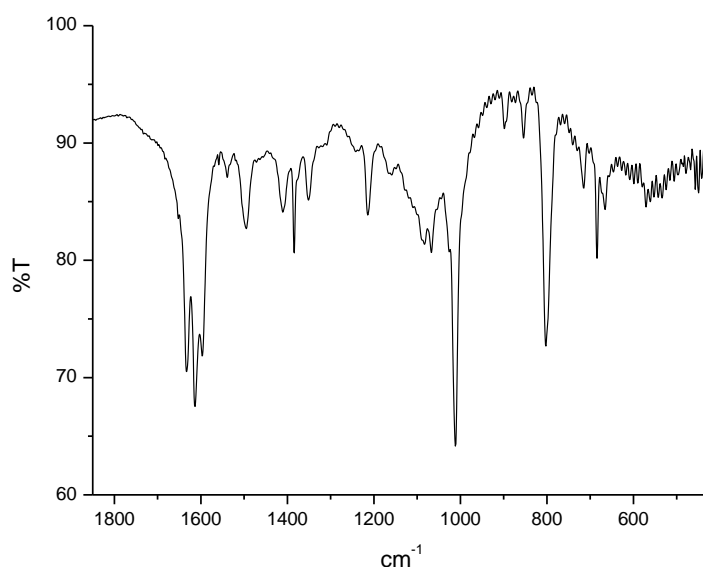
παρακολουθηθεί με φασματοσκοπία ορατού, μέσω της εξαφάνισης των Q ταινιών της ελεύθερης πορφυρίνης. Το νέο αυτό σύμπλοκο διαλύεται καλά σε πολικούς διαλύτες, όπως MeOH, DMSO, DMF, acetone, με τη μέγιστη διαλυτότητα να παρατηρείται στην MeOH. Σε αντίθεση με την ελεύθερη πορφυρίνη, το σύμπλοκο δεν διαλύεται σε CHCl₃. Σε όξινα διαλύματα η μεταλλοπορφυρίνη διαλύεται ελαφρώς, λόγω της πρωτονίωσης των περιφερειακών αζώτων. Το χρώμα του διαλύματος είναι μωβ (όπως και στη μεθανόλη) σε αντίθεση με την ελεύθερη πορφυρίνη που σε οξύ δίνει έντονο πράσινο χρώμα.

8.5.2. Χαρακτηρισμός του χλωρο-γάλλιο(III) πυρφυρινάτο συμπλόκου

Το σύμπλοκο αυτό χαρακτηρίστηκε πλήρως με φασματοσκοπικές μεθόδους όπως IR, NMR, MS, UV-Vis και εκπομπής.

IR Φασματοσκοπία

Το IR φάσμα του (TPyP)GaCl σε δισκίο KBr παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.30 και οι κυριότερες κορυφές δόνησης παρατίθενται στον Πίνακα 8.13. Η ασθενής δόνηση τάσης του δεσμού N-H της ελεύθερης H₂TPyP απουσιάζει, εξαιτίας της αντικατάστασης των όξινων υδρογόνων του πυρρολίου από το μεταλλικό ιόν. Οι κορυφές στα 1597 και 1539 cm⁻¹ αποδίδονται στις C=C δονήσεις τάσης των πυρίδυλο ομάδων και του πυρρολίου, αντίστοιχα. Οι κορυφές αυτές δεν επηρεάζονται αισθητά από την παρουσία μετάλλου στο εσωτερικό της πορφυρίνης. Στα 1350 cm⁻¹ απορροφά η CN τάση του πυρρολικού δακτυλίου, ενώ στα 802 cm⁻¹ η εκτός επιπέδου κάμψη του πυριδινικού δακτυλίου.



Σχήμα 8.30. Το IR φάσμα της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl σε δισκίο KBr.

Μια άλλη χαρακτηριστική κορυφή του φάσματος υπερόυθρου του γαλλιο-πορφυρινάτο συμπλόκου είναι αυτή στα 1012 cm^{-1} που αποδίδεται στη δόνηση παραμόρφωσης του πορφυρινικού δακτυλίου. Για την ελεύθερη μέταλλου πορφυρίνη η κορυφή αυτή εμφανίζεται στα 972 cm^{-1} . Η ακριβής θέση της συγκεκριμένης κορυφής σχετίζεται άμεσα με τη φύση του μετάλλου και με την ισχύ των δεσμών μετάλλου-αζώτου της μεταλλοπορφυρίνης. Συγκριτικά, με άλλες μεταλλοπορφυρίνες της H_2TPyP , η αντίστοιχη του Ga(III) βρέθηκε να εμφανίζει αυξημένη σταθερότητα, με τη σειρά να είναι $\text{Ga}^{\text{III}}(1012) > \text{Ni}^{\text{II}}(1010) > \text{Co}^{\text{II}}(1000) > \text{Zn}^{\text{II}}(997)$ [195]. Η σειρά σταθερότητας των $\text{M}(\text{TPyP})$ (όπου M κάποιο μεταλλικό ιόν) πιθανόν να επηρεάζεται από διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Οι αξονικοί υποκαταστάτες θα μπορούσαν επίσης, να επηρεάσουν τη φύση του δεσμού μετάλλου πορφυρίνης.

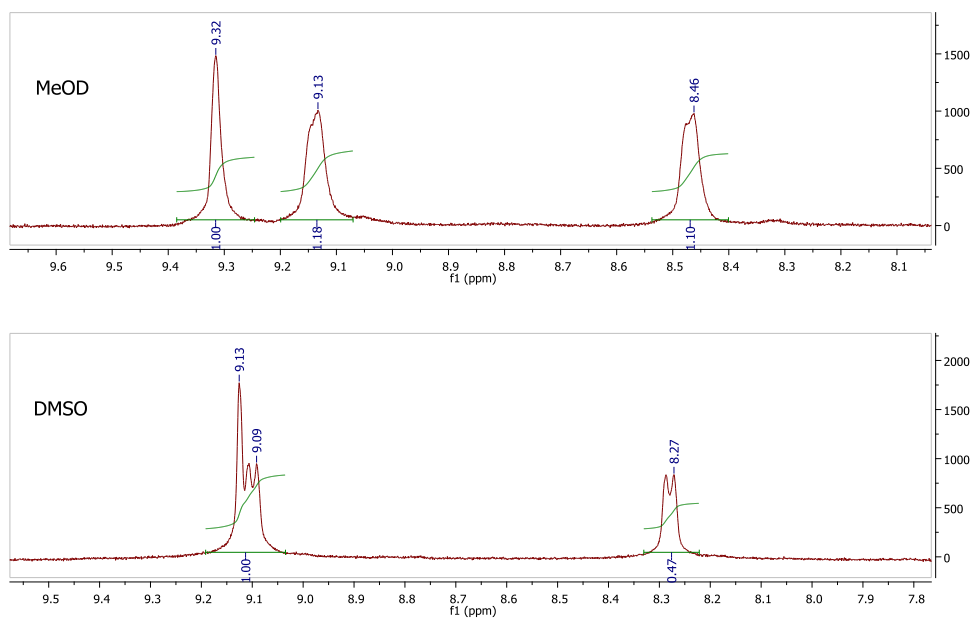
Δυστυχώς όμως, αυτή η τεχνική δεν μας βοηθάει να «δούμε» καθαρά τον αξονικό υποκαταστάτη του Cl . Η δόνηση τάσης του δεσμού Ga-Cl , σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [194], παρατηρείται στα $330\text{-}370\text{ cm}^{-1}$. Παρ' όλα αυτά, μπορούμε να αποκλείσουμε τη σύμπλεξη κάποιου ασετάτο ή υδρόξο υποκαταστάτη, που είναι και οι πλέον πιθανοί που προκύπτουν από την αντίδραση. Συγκεκριμένα, η τάση $\nu(\text{OH})$ θα εμφανιζόταν σαν μια οξεία κορυφή στα $3580\text{-}3640\text{ cm}^{-1}$ [196]. Στην περίπτωση του $-\text{OAc}$ αξονικού υποκαταστάτη θα παρατηρούσαμε την τάση $\nu_{\text{as}}(\text{C=O})$ περίπου στα 1665 cm^{-1} και την $\nu_{\text{s}}(\text{C-O})$ στα $1270\text{-}1290\text{ cm}^{-1}$. Αν και στο Σχήμα 8.30 εμφανίζεται μια ισχυρή κορυφή στα 1632 cm^{-1} , εντούτοις η περιοχή του φάσματος στα $1240\text{-}1340\text{ cm}^{-1}$ είναι εντελώς καθαρή.

Πίνακας 8.13. Χαρακτηριστικές δονήσεις (σε cm^{-1}) της ελεύθερης πορφυρίνης (H_2TPyP) και της Ga(III) μεταλλοπορφυρίνης.

H_2TPyP	$(\text{TPyP})\text{GaCl}$	Απόδοση
3311	-	N-H δόνηση τάσης
1594	1597	pyridine skeletal str
1544	1539	C=C (pyrrole) δόνηση τάσης
1352	1352	C=N (pyrrole) δόνηση τάσης
972	1012	παραμόρφωση δακτυλίου πορφυρίνης
785	802	CH εκτός επιπέδου κάμψη (pyridine)

NMR φασματοσκοπία

Τα φάσματα πρωτονίου NMR της μεταλλοπορφυρίνης σε διαλύτες MeOD και DMSO φαίνονται στο Σχήμα 8.31, ενώ στον Πίνακα 8.14 συνοψίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων. Η απόδοση των κορυφών έγινε με φασματοσκοπία δύο διαστάσεων COSY, και το φάσμα φαίνεται στο Σχήμα 8.32.



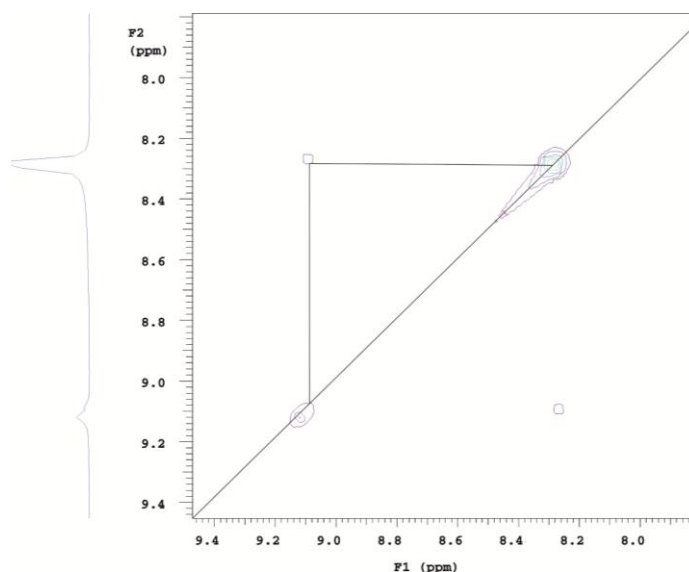
Σχήμα 8.31. Φάσματα ¹H-NMR της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl σε MeOD-d₄ (πάνω) και DMSO-d₆ (κάτω).

Λόγω του γεγονότος ότι δεν υπάρχει κάποιος κοινός διαλύτης που να διαλύει την ελεύθερη πορφυρίνη και την αντίστοιχη του Ga(III), δεν μπορεί να γίνει ακριβής σύγκριση των δεδομένων NMR για την μεταλλοπορφυρίνη με την ελεύθερη μέταλλο. Εντούτοις, με μια πρώτη ματιά γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η κορυφή των N-H του πυρρολίου στα αρνητικά ppm απουσιάζει, κάτι που υποδηλώνει την σύμπλεξη του γαλλίου στο κέντρο της πορφυρίνης. Κατά τα άλλα, στην αρωματική περιοχή παρατηρούμε τα πρωτόνια που αντιστοιχούν στα H_{2,6} και H_{3,5} της πυριδίνης και τα β-H του πυρρολίου. Ενδιαφέρον προκαλεί η σημαντική αποπροάσπιση των β-υδρογόνων του πυρρολίου συγκριτικά με τα υδρογόνα του πυριδινικού δακτυλίου, αφού εμφανίζονται πλέον σε χαμηλότερα πεδία από τα H_{2,6} (Σχήμα 8.31, πάνω). Αυτό βέβαια δεν πρέπει να μας προκαλεί εντύπωση, αφού βρίσκονται πολύ κοντά στη θέση σύμπλεξης. Η αλλαγή του διαλύτη σε DMSO προκαλεί χαμηλότερη αποπροάσπιση όλων των πρωτονίων, και όχι καλό διαχωρισμό των κορυφών β-H με τα H_{2,6} (Σχήμα 8.31, κάτω).

Από τα φάσματα NMR μπορούμε να επιβεβαιώσουμε ότι δεν έχει συμπλεχθεί αξονικά στο μέταλλο κάποιος -OAc ή -OH υποκαταστάτης, τα πρωτόνια των οποίων θα εμφανιζόταν στο NMR. Από βιβλιογραφικά δεδομένα για ανάλογες μεταλλοπορφυρίνες του Ga(III) θα αναμένονταν κορυφές σε πολύ ισχυρά πεδία (αρνητικές τιμές ppm) [196].

Πίνακας 8.14. Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl σε MeOD-d4 και DMSO-d6. Σε παρένθεση φαίνεται ο αριθμός των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.

Πρωτόνια	δ (ppm)	
	MeOD	DMSO
H2,6 πυριδίνης	9.13d (8H)	9.09d (8H)
β -H πυρρολίου	9.32s (8H)	9.13s (8H)
H3,5 πυριδίνης	8.46d (8H)	8.27d (8H)

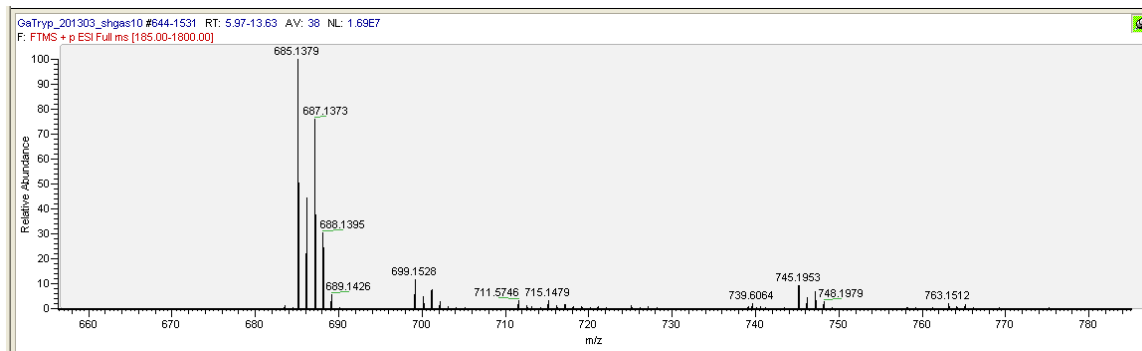


Σχήμα 8.32. ^1H - ^1H COSY NMR της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl σε DMSO-d6.

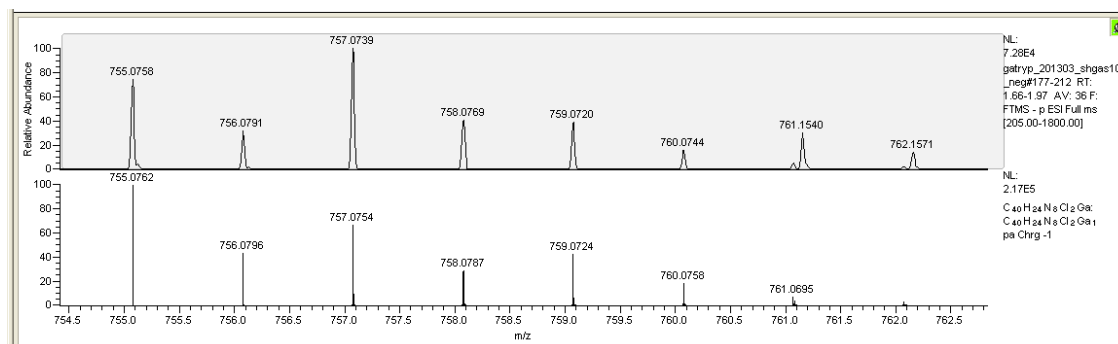
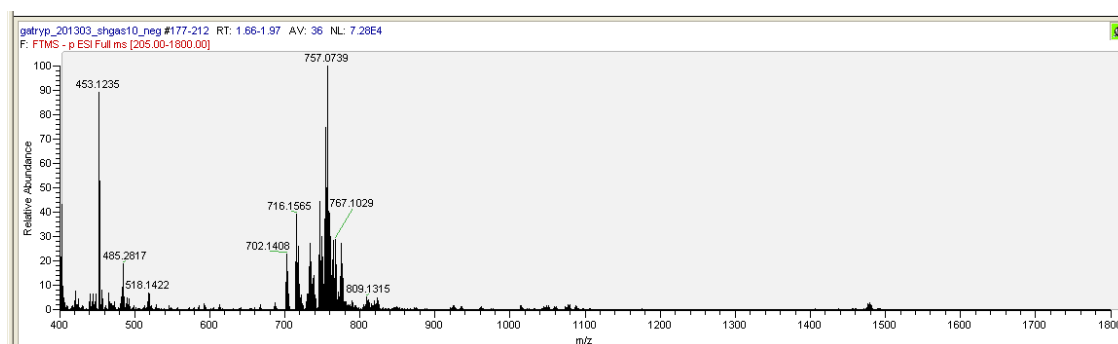
Φασματοσκοπία μάζας

Τα φάσματα μάζας της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl ελήφθησαν σε Mass Spectrometer TSQ 7000 Finnigan MAT, και σε διαλύτη μεθανόλη, στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Τα φάσματα MS της πορφυρίνης του γαλλίου(III) παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.33 (θετικός ιονισμός) και 8.34 (αρνητικός ιονισμός), και στον Πίνακα 8.15 συνοψίζονται οι κυριότερες κορυφές και η απόδοση τους σε θραύσματα. Στο θετικό ιονισμό η κορυφή

με τη μεγαλύτερη αφθονία αντιστοιχεί στο θραύσμα $[M-Cl]^+$. Το ιόν M^{++} δεν παρατηρείται. Στον αρνητικό ιονισμό η κορυφή με τη μεγαλύτερη αφθονία εμφανίζεται στα 757.07 και αποδίδεται στο ιόν $[M+Cl]^-$, όπου η μεταλλοπορφυρίνη έχει ένα επιπλέον άτομο χλωρίου.



Σχήμα 8.33. Φάσμα μάζας της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl, μετά από θετικό ιονισμό.



Σχήμα 8.34. Φάσμα μάζας της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl, μετά από αρνητικό ιονισμό.

Από της παραπάνω τρεις τεχνικές που αναφέραμε δεν μπορούμε να προβλέψουμε με απόλυτη βεβαιότητα τον αξονικό υποκαταστάτη. Παρόλα αυτά από το NMR αλλά και από το MS με αρνητικό ιονισμό, μπορούμε να προτείνουμε τη σύμπλεξη ενός ατόμου χλωρίου στο μέταλλο. Βάση βιβλιογραφικών δεδομένων [192-194,196,197] οι μεταλλοπορφυρίνες

του γαλλίου(III) είναι πενταενταγμένες, σχηματίζοντας δηλαδή τέσσερις δεσμούς με τα άζωτα της πορφυρίνης και ένα δεσμό με τον αξονικό υποκαταστάτη. Μόνο στην περίπτωση που ο αξονικός υποκαταστάτης είναι το H₂O, το Ga(III) έχει αριθμό ένταξης 6. Στην περίπτωση αυτή η μεταλλοπορφυρίνη είναι θετικά φορτισμένη, ενώ σε όλες τις υπόλοιπες είναι ουδέτερη [197]. Επομένως η πιθανότερη δομή της πορφυρίνης του γαλλίου(III) είναι αυτή που προτείνεται στο Σχήμα 8.29.

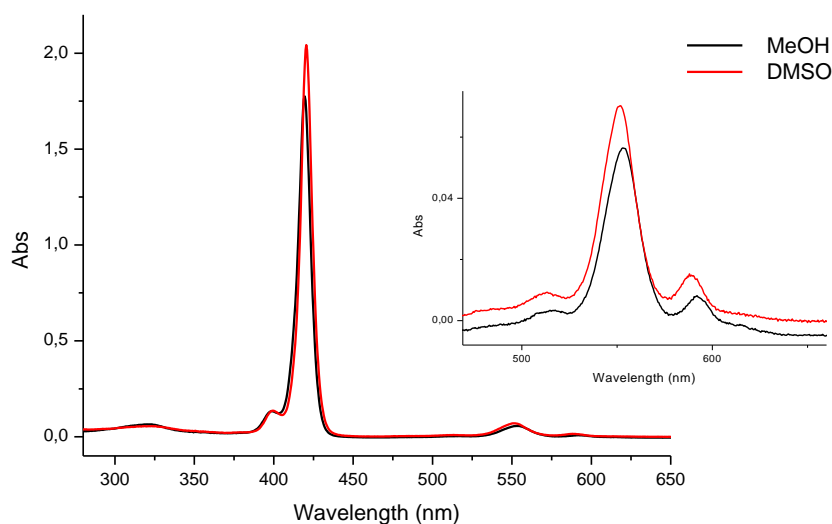
Πίνακας 8.15. Δεδομένα φάσματος μάζας της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl. Σε παρένθεση φαίνεται η % σχετική αφθονία.

Ιόντα	Θετικός ιονισμός			Αρνητικός ιονισμός			
	[M-Cl] ⁺	[M-Cl+1] ⁺	[M-Cl+2] ⁺	[M+Cl] ⁻	[M+Cl-2] ⁻	[M+Cl+1] ⁻	[M+Cl+2] ⁻
m/z	685.14 (100)	686.14 (45)	687.14 (76)	757.07 (100)	755.08 (76)	758.08 (40)	759.07 (40)

UV-Vis φασματοσκοπία

Το φάσμα απορρόφησης της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl, που φαίνεται στο Σχήμα 8.35, παρουσιάζει συμπεριφορά «κανονικής» πορφυρίνης. Συγκεκριμένα, εμφανίζεται μια ισχυρής έντασης Soret band [B(0.0)] στα 419 nm και μια μικρότερης έντασης [B(1.0)] σε χαμηλότερο μήκος κύματος. Ο διαχωρισμός της Soret band σε δύο δεν είναι κάτι πρωτόγνωρο για μεταλλοπορφυρίνες [194-196]. Στην ορατή περιοχή παρατηρούνται δύο Q bands στα 553 και 592 nm, και μια επιπλέον ταινία [B(2.0)] στα 515 nm. Οι παρατηρούμενες μετατοπίσεις στις μεταπτώσεις ενέργειας και στις σχετικές εντάσεις των Q ταινιών εξαρτώνται από το φορτίο και την πολωσιμότητα του αξονικού υποκαταστάτη και σχετίζονται με τις αλλαγές στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του πορφυρινικού δακτυλίου [194].

Όπως παρατηρούμε από τον Πίνακα 8.16, η αλλαγή του διαλύτη δεν επηρεάζει αισθητά τα μέγιστα των κορυφών του φάσματος απορρόφησης. Παρατηρείται μόνο μια μικρή αύξηση στους συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας των κορυφών.



Σχήμα 8.35. Φάσματα UV-Vis της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl (5 μM) σε MeOH (μαύρη γραμμή) και DMSO (κόκκινη γραμμή). Στο ένθετο φαίνονται οι Q bands σε μεγέθυνση.

Πίνακας 8.16. UV-Vis φασματοσκοπικά δεδομένα της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl και η απόδοση τους, σε διαλύτες MeOD και DMSO. Σε παρένθεση φαίνονται οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας, ϵ σε $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

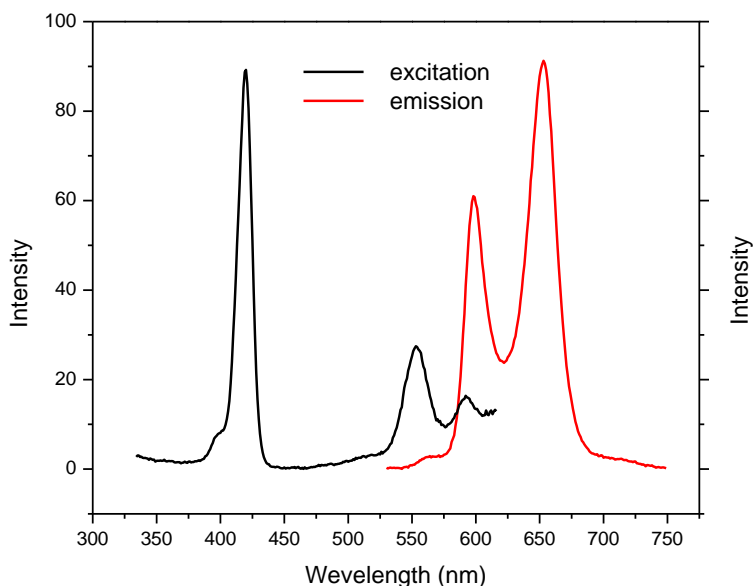
λ_{max} σε nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$ σε $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)		
MeOH	DMSO	Απόδοση
321 (15.5)	323 (11.3)	N band
399 (26.5)	399 (27.1)	Soret [B(1,0)]
419 (355)	420 (408)	Soret [B(0,0)]
515 (1.8)	513 (1.9)	Q(2,0)
553 (13.6)	551 (14.0)	Q(1,0)
592 (2.8)	589 (3.1)	Q(0,0)

Φασματοσκοπία εκπομπής

Στο Σχήμα 8.36 φαίνεται το φάσμα διέγερσης και εκπομπής της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl σε διαλύτη MeOH. Τα φάσματα ελήφθησαν σε κορεσμένα με αέρα διαλύματα και σε θερμοκρασία δωματίου. Το φάσμα διέγερσης δεν παρουσιάζει καμία αξιόλογη διαφορά με το φάσμα απορρόφησης της μεταλλοπορφυρίνης.

Το φάσμα εκπομπής είναι χαρακτηριστικό για πορφυρίνες και εμφανίζει δύο κορυφές στα 598 και 653 nm, μετά από διέγερση στη Soret band ($\lambda_{\text{ex}}=419$ nm). Η ίδια

συμπλεριφορά παρατηρείται και μετά από διέγερση στις Q bands της μεταλλοπορφυρίνης ($\lambda_{ex}=553$ nm). Σύμφωνα με όσα συζητήσαμε στο κεφάλαιο 4, η μετάπτωση αυτή πρέπει να έχει χαρακτήρα $\pi \rightarrow \pi^*$, επειδή το Ga(III) είναι d10 μέταλλο.



Σχήμα 8.36. Φάσμα διέγερσης (μαύρη γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl (1 μ M) σε διαλύτη MeOH.

Αν και μια σύγκριση των φασμάτων εκπομπής της μεταλλοπορφυρίνης και της ελεύθερης μετάλλου δεν είναι απόλυτα ασφαλής, λόγω του μη κοινού διαλύτη, εντούτοις μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η παρουσία του Ga(III) στο κέντρο της αυξάνει σε ενέργεια τις κορυφές εκπομπής (μικρότερο μήκος κύματος). Αυτό συνεπάγεται ότι η εκπέμπουσα διεγερμένη κατάσταση βρίσκεται ενεργειακά υψηλότερα από την αντίστοιχη της H_2TPyP .

Αξίζει να σημειωθεί ότι για αρκετές μεταλλοπορφυρίνες [96], αλλά και για την γάλλιο(III) πορφυρίνη (TPP)GaCl [198] παρατηρείται εκπομπή από κάποια ανώτερη διεγερμένη κατάσταση (για παράδειγμα από την S2) και όχι από την S1 που παρατηρείται για την ελεύθερη πορφυρίνη H_2TPyP .

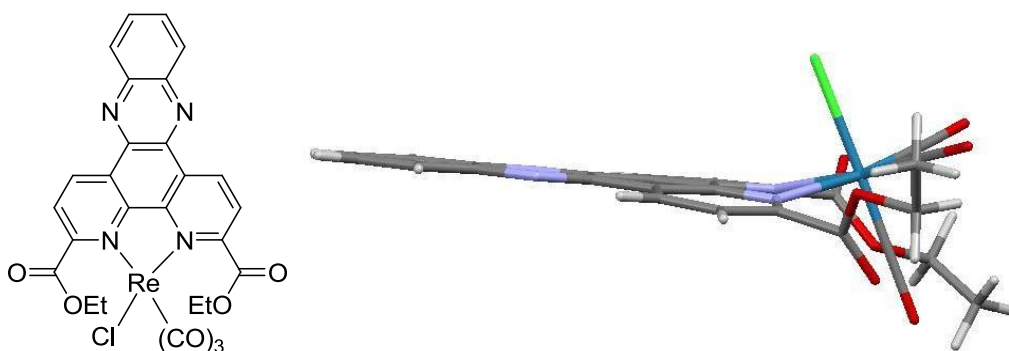
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

DNA-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

9.1. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}[\text{dppz-3,6}(\text{COOEt})_2]$ με DNA

9.1.1. Το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}[\text{dppz-3,6}(\text{COOEt})_2]$

Το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}[\text{dppz-3,6}(\text{COOEt})_2]$ (όπου $\text{dppz-3,6}(\text{COOEt})_2$: διπυριδο[3,2-*a*:2',3'-*c*]φαιναζινο-3,6-διαιθυλεστέρας) [στο εξής θα αναφέρεται ως $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$] συντέθηκε και χαρακτηρίστηκε πλήρως από την Δρ. Ειρήνη Βερόνη στα πλαίσια της διδακτορικής της διατριβής [185].



Σχήμα 9.1. Δομή του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}[\text{dppz-3,6}(\text{COOEt})_2]$ και η πλάγια άποψη της κρυσταλλικής δομής. Διακρίνεται η επιπεδότητα του υποκαταστάτη και η κλίση του αξονικού ως προς το ισημερινό επίπεδο.

Προτού περάσουμε, όμως, στη μελέτη αλληλεπίδρασης του με το DNA, αξίζει να γίνει μια μικρή αναφορά στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου και κυρίως στην διαμόρφωση του υποκαταστάτη. Όπως αναφέραμε στο θεωρητικό μέρος της εργασίας, ο υποκαταστάτης είναι αυτός που θα κρίνει ως ένα μεγάλο βαθμό τον τρόπο δέσμευσης στο DNA. Άποψη της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου φαίνεται στο Σχήμα 9.1. Το άτομο του ρηνίου(I) υιοθετεί μια διαταραγμένη οκταεδρική γεωμετρία με τις τρεις καρβόνυλο ομάδες σε *fac* διευθέτηση, χωρίς όμως να παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στις αποστάσεις των δεσμών και των γωνιών με παρόμοια α -διμινικά σύμπλοκα του $\text{Re}(\text{I})$. Από το Σχήμα 9.1 γίνεται ξεκάθαρο ότι ο υποκαταστάτης $\text{dppz-3,6}(\text{COOEt})_2$ διατηρεί την επιπεδότητα του μέσα στο σύμπλοκο, και ορίζει το ισημερινό επίπεδο. Το τελευταίο

σχηματίζει διεδρη γωνία $\sim 25^\circ$ με το αξονικό επίπεδο. Το μεταλλικό κέντρο βρίσκεται 0.564 \AA υψηλότερα από το ισημερινό επίπεδο, ενώ οι δύο εστερομάδες βρίσκονται επάνω και κάτω από το επίπεδο αυτό [185]. Η επιπεδότητα του υποκαταστάτη, το καθιστά αυτομάτως ως έναν καλό υποψήφιο για να δράσει ως παρεμβολέας στα ζεύγη βάσεων του DNA.

9.1.2. Πειράματα θερμικής μετουσίωσης, T_m

Η διπλή έλικα του φυσικού DNA (στη συγκεκριμένη μελέτη από θύμο αδένα βοοειδούς), η οποία σαγκρατείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων, αυξανόμενης της θερμοκρασίας αρχίζει να ξεδιπλώνεται και να διαχωρίζεται στους συμπληρωματικούς κλώνους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εμφανίζεται υπερχρωμικότητα (hyperchromicity) των διαλυμάτων του, δηλαδή αύξηση της απορρόφησης της κορυφής στα 258 nm , σχετικά απότομα πάνω από μια ορισμένη θερμοκρασία. Το μέσο της απότομης κλίσης της καμπύλης απορρόφησης συναρτήσει της θερμοκρασίας ονομάζεται «σημείο τήξεως» T_m . Το T_m υπολογίζεται με προσαρμογή των καμπυλών σε σιγμοειδή καμπύλη, με τη βοήθεια του προγράμματος Origin 8.0.

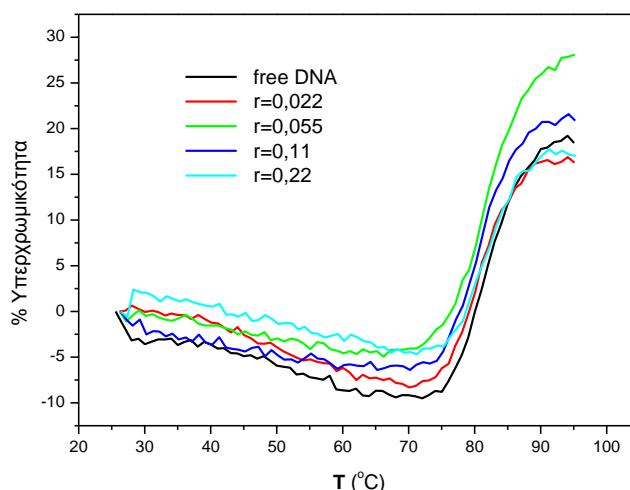
Μέσω αυτής της τεχνικής επιχειρείται η μελέτη της επίδρασης του συμπλόκου στη σταθερότητα του C.T.-DNA σε πανομοιότυπα διαλύματα διαφόρων γραμμομοριακών αναλογιών. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $\text{pH}=7.0$ και σταθερής ιοντικής ισχύος $\text{NaCl } 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Οι τιμές της απορρόφησης των διαλυμάτων εκφράζονται ως %υπερχρωμικότητα (%hyp), η οποία ορίζεται ως:

$$\%hyp = \frac{A_n - A_i}{A_i} \times 100,$$

όπου A_i η αρχική απορρόφηση στους 25°C και A_n η μετρούμενη σε κάθε θερμοκρασία απορρόφηση των διαλυμάτων. Η τελική % υπερχρωμικότητα μετράται στους 95°C , όπου θεωρείται ότι έχει περατωθεί η μετουσίωση του DNA. Η έκφραση αυτή προτιμήθηκε, ώστε να εξισωθούν οι επιδράσεις του συμπλόκου σε όλες τις αναλογίες συμπλόκου/DNA, επειδή και το σύμπλοκο απορροφά κοντά στα 258 nm , δηλαδή στο μήκος κύματος που γίνεται ο προσδιορισμός του T_m .

Αξίζει να σημειωθεί ότι έγινε και τυφλό πείραμα T_m διαλύματος συμπλόκου χωρίς την παρουσία DNA στις ίδιες συνθήκες και δεν παρατηρήθηκε καμία αξιόλογη μεταβολή στην απορρόφηση του, άρα η παρατηρούμενη μεταβολή οφείλεται αποκλειστικά στη μετουσίωση του δίκλωνου DNA.

Τα διαλύματα που μετρήθηκαν είχαν γραμμομοριακές αναλογίες ($r = \frac{[\text{complex}]}{[\text{DNA}]}$) $r = 0, 0.022, 0.055, 0.11, 0.22$ με τη συγκέντρωση του C.T.-DNA να είναι σε όλα τα διαλύματα ίση με $1.5 \cdot 10^{-5}$ M. Σε όλα τα διαλύματα, είχαμε φροντίσει η αναλογία μεθανόλης/ νερού να είναι σταθερή. Τα διαλύματα αυτά αφέθηκαν για επώαση 24h πριν τη μέτρηση τους για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Στο Σχήμα 9.2 φαίνονται οι καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου Re(dppz-ester) με το C.T.-DNA, ενώ στον Πίνακα 9.1 συνοψίζονται τα σημεία μετουσίωσης, όπως αυτά υπολογίστηκαν μέσω του κατάλληλου υπολογιστικού προγράμματος. Επιπλέον, ο προσδιορισμός των σημείων τήξεως μπορεί να γίνει λαμβάνοντας την πρώτη παράγωγο των καμπυλών μετουσίωσης ($d(\%hyp)/dT$), ώστε να καθοριστεί το T_m στο μέγιστο των καμπυλών της παραγώγου, οι οποίες αντιστοιχούν στο μέσον της απότομης κλίσης της καμπύλης.



Σχήμα 9.2. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου Re(dppz-ester)Cl με το DNA.

Η παρουσία του συμπλόκου του Re(I) φαίνεται να επιφέρει πολύ μικρή μείωση του σημείου τήξεως, T_m , στο C.T.-DNA για όλους τους λόγους r , εκτός του $r = 0.22$, που πρακτικά δεν αλλάζει. Ταυτόχρονα, για όλους τους λόγους παρατηρείται αύξηση της υπερχρωμικότητας, από 18.44% που είναι για το ελεύθερο C.T.-DNA φτάνει στο 28.0% για το λόγο $r=0.055$.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι, τουλάχιστον υπό αυτές τις πειραματικές συνθήκες, το σύμπλοκο δεν επηρεάζει σημαντικά την σταθερότητα της διπλής έλικας. Σε καμία περίπτωση όμως αυτό δεν σημαίνει ότι δεν αλληλεπιδρά καθόλου με το DNA.

Πίνακας 9.1. Δεδομένα θερμικής μετουσίωσης και κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου Re(dppz-ester)Cl με το DNA.

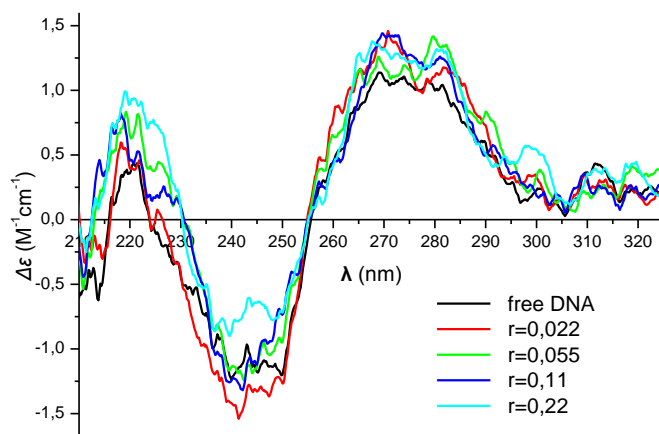
	Θερμική Μετουσίωση			Κυκλικός Διχρωισμός	
	T_m (°C)	ΔT_m	%hyp	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
r=0	82.68 (±0.41)	0	18.44	240	-1.24
				270	+1.14
r=0.022	81.82 (±0.50)	-0.86	16.36	241	-1.54
				271 (282)	+1.46
r=0.055	82.06 (±0.24)	-0.62	28.04	242	-1.24
				280 (270)	+1.42
r=0.11	81.32 (±0.26)	-1.36	21.03	241	-1.32
				270 (281)	+1.44
r=0.22	82.74 (±0.41)	+0.06	17.05	240	-0.90
				268 (280)	+1.38

^a. $\Delta T_m = T_m - T_{mDNA}$

9.1.3. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD)

Το CD του φυσικού CT-DNA είναι συντηρητικό, δίνοντας μια αρνητική κορυφή στα ~246 nm, και μια θετική στα ~278 nm, με σημείο αλλαγής της κλίσης στα 258 nm, που αντιστοιχεί στο μέγιστο της κορυφής στο φάσμα ηλεκτρονικής απορρόφησης στη UV περιοχή. Τόσο η μορφή του φάσματος CD του DNA όσο και η ένταση και η θέση της κάθε ταινίας είναι ευαίσθητες κατά την αλληλεπίδραση, παρουσιάζοντας μεταβολές που είναι χαρακτηριστικές του τρόπου αλληλεπίδρασης.

Στο Σχήμα 9.3 φαίνεται το φάσμα κυκλικού διχρωισμού του DNA αυξανόμενης της συγκέντρωσης του συμπλόκου, ενώ στον Πίνακα 8.1 συνοψίζονται οι αλλαγές στην ένταση και το μήκος κύματος των κορυφών του DNA παρουσία του συμπλόκου. Γενικά δεν παρατηρείται καμία σημαντική αλλαγή ούτε στην ελλειπτικότητα, αλλά ούτε και στα μέγιστα μήκη κύματος των κορυφών. Γίνεται εύκολα σαφές λοιπόν, ότι η Β-διαμόρφωση του DNA δεν αλλάζει παρουσία του συμπλόκου, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες.



Σχήμα 9.3. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T.-DNA με το σύμπλοκο **Re(dppz-ester)Cl**.

9.1.4. Τιτλοδότηση ορατού-υπεριώδους (UV-Vis titration)

Η εφαρμογή της φασματοσκοπίας ηλεκτρονικής απορρόφησης στη μελέτη αλληλεπίδρασης μορίων με το DNA είναι μία από τις πιο χρήσιμες τεχνικές. Οποιαδήποτε μεταβολή στην απορρόφηση και στο μέγιστο μήκος κύματος αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα, μείωση της απορρόφησης (*υποχρωμία*), προκαλείται εξαιτίας της ισχυρής αλληλεπίδρασης στοιβάγματος ανάμεσα σε ένα αρωματικό χρωμοφόρο υποκαταστάτη και τα ζεύγη βάσεων του DNA. Επίσης, η μετατόπιση της θέσης του λ_{\max} προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, *βαθυχρωμία* ή *ερυθρή μετατόπιση (red shift)*, υποδηλώνει σταθεροποίηση της διπλής έλικας. Αντίθετα, μετατόπιση προς μικρότερα μήκη κύματος, *υψιχρωμία* ή *κυανή μετατόπιση (blue shift)*, δείχνει αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA. Η ερυθρή μετατόπιση σε συνδυασμό με υποχρωμία υποδηλώνει παρεμβολή της ένωσης στα ζεύγη βάσεων, ενώ υπερχρωμία υποδηλώνει πιθανότατα εξωτερική συναρμογή ή δέσμευση στην αύλακα του DNA [199].

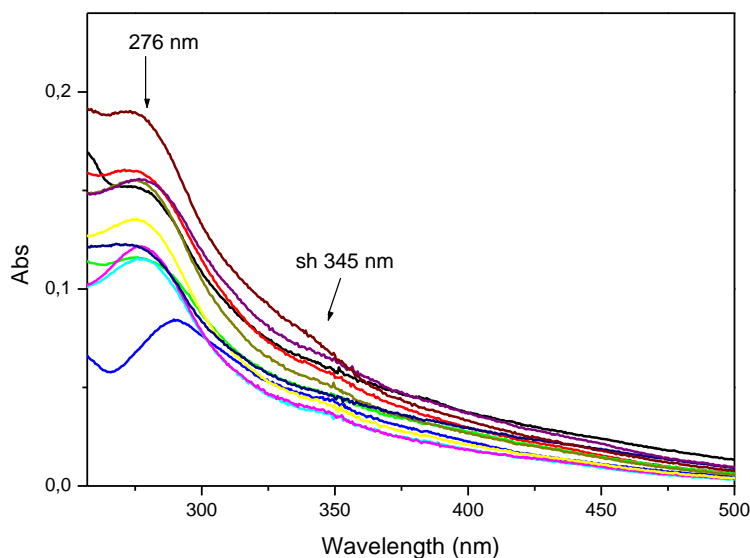
Στο Σχήμα 9.4 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου παρουσία και απουσία C.T.-DNA, έχοντας πάντα σταθερή τη συγκέντρωση του συμπλόκου (10 μM) και αλλάζοντας μόνο αυτή του DNA. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του DNA παρατηρείται μείωση της IL απορρόφησης στα 276 nm που φτάνει έως και 40%, με ταυτόχρονη μετατόπιση του μεγίστου μήκους κύματος προς το ερυθρό κατά 7 nm. Ο όμως της MLCT μετάπτωσης στα 345 nm, παρουσιάζει υποχρωμισμό έως και 36.5% και 5 nm βαθυχρωμική μετατόπιση, κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Ο συνδυασμός υποχρωμισμού με βαθυχρωμία δείχνει σαφή παρεμβολή του επίπεδου αρωματικού υποκαταστάτη του συμπλόκου στα ζεύγη βάσεων.

Ο ποσοτικός υπολογισμός της ισχύος της σύνδεσης γίνεται χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

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

όπου $[\text{DNA}]$ είναι η συγκέντρωση του DNA, ε_a είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και υπολογίζεται ως $A/[\text{complex}]$, ε_b είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του δεσμευμένου με το DNA συμπλόκου, ε_f είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ελεύθερου (μη δεσμευμένου) συμπλόκου, ενώ K_b είναι η σταθερά σύνδεσης της ένωσης με το DNA.

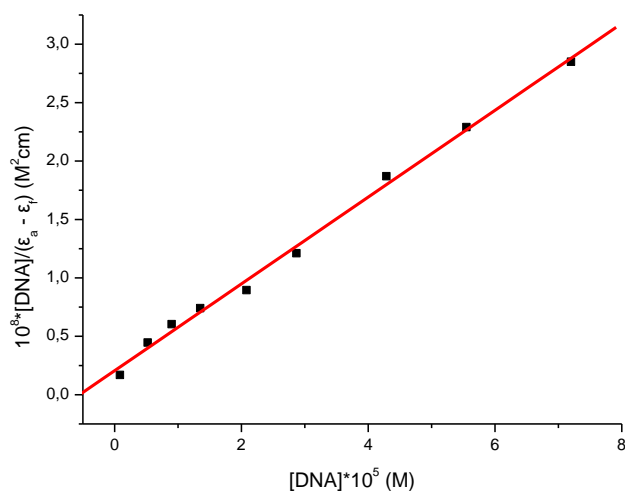
Από την παραπάνω σχέση παρατηρείται ότι ο λόγος $\frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)}$ είναι γραμμική συνάρτηση της $[\text{DNA}]$, και η σταθερά K_b υπολογίζεται από το λόγο της τεταγμένης στον άξονα των y προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων. Το διάγραμμα της μεταβολής του λόγου $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ συναρτήσει της συγκέντρωσης $[\text{DNA}]$ δίνεται στο Σχήμα 9.5. Μελετώντας της αλλαγές της IL απορρόφησης, η σταθερά σύνδεσης K_b βρέθηκε ίση με $1.34(\pm 0.51) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.



Σχήμα 9.4. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ ($10 \mu\text{M}$) με αυξανόμενη συγκέντρωση CT-DNA ($5\text{-}180 \mu\text{M}$) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $\text{pH}=7.0$.

Με μια γρήγορη ματιά στη βιβλιογραφία, θα διαπιστώσει κανείς ότι η σταθερά αυτή είναι μια τάξη μεγέθους μικρότερη από τα αντίστοιχα dppz σύμπλοκα του $\text{Ru}(\text{II})$. Αυτό προφανώς οφείλεται στο +2 φορτίο των συμπλόκων του ρουθηνίου, ενώ το υπό μελέτη

σύμπλοκο του ρηνίου είναι ουδέτερο. Το θετικό φορτίο αυξάνει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το φωσφορικό σκελετό του DNA, αυξάνοντας και κατ' επέκταση τη σταθερά σύνδεσης. Σε σχέση με ανάλογα Re(I) σύμπλοκα η σταθερά σύνδεσης είναι της ίδιας τάξης μεγέθους. Προφανώς, η δέσμευση του υπό μελέτη συμπλόκου είναι ισχυρότερη από ανάλογα σύνδεσης στην αύλακα σύμπλοκα της βιβλιογραφίας [53], επιβεβαιώνοντας τον παρεμβολικό τρόπο δέσμευσης του. Εντούτοις, η σταθερά δέσμευσης του $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}[\text{dpprz-3,6-(COOEt)}_2]$ εμφανίζεται ελαφρώς μειωμένη συγκριτικά με παρεμβολείς Re(I)-dpprz σύμπλοκα της βιβλιογραφίας [42-44,51]. Η παρατήρηση αυτή φαίνεται να είναι φυσική συνέπεια της υποκατάστασης στην 3 και 6 θέση του dpprz υποκαταστάτη. Η στερεοχημική παρεμπόδιση των εστερικών ομάδων φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη δεσμευτική ισχύ του συμπλόκου.



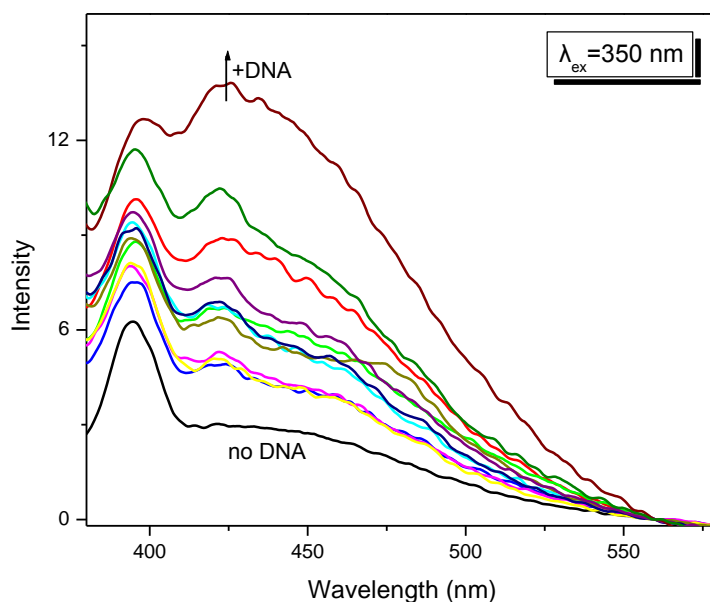
Σχήμα 9.5. Καμπύλη μεταβολής του λόγου $10^{8*}[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ συναρτήσει της συγκέντρωσης $[\text{DNA}]*10^5$ της τιτλοδότησης του $\text{Re}(\text{dpprz-ester})\text{Cl}$ με DNA.

9.1.5. Τιτλοδότηση εκπομπής (Emission titration)

Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, πολλά σύμπλοκα με dpprz υποκαταστάτη, σε υδατικά διαλύματα παρουσιάζουν αμελητέο φθορισμό. Παρουσία, όμως, DNA έχει παρατηρηθεί ότι η ένταση φθορισμού αυξάνεται, λόγω της παρεμβολής του dpprz υποκαταστάτη ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα το περιβάλλον γύρω από τον υποκαταστάτη να γίνεται λιγότερο πολικό. Τα σύμπλοκα αυτά καλούνται μοριακοί διακόπτες φωτός. Αυτή η ιδιότητα των συμπλόκων, σε συνδυασμό με την ισχυρή δεσμευτική τους ικανότητα, καθιστούν αυτά τα σύμπλοκα σημαντικούς μοριακούς ανιχνευτές για το DNA. Επομένως, η φασματοσκοπία εκπομπής είναι μια ακόμα

σημαντική ένδειξη της ύπαρξης αλληλεπίδρασης, και μπορεί να παρέχει πληροφορίες όχι μόνο για τη δεσμευτική ισχύ, αλλά και πολλά ακόμα χρήσιμα συμπεράσματα. Εδώ όμως πρέπει να τονιστεί ότι η αύξηση της εκπομπής δεν σημαίνει αναγκαστικά την παρεμβολή του υποκαταστάτη. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι δεν απαιτείται η παρεμβολή στα ζεύγη βάσεων για να συμπεριφερθεί ένα σύμπλοκο ως μοριακός διακόπτης φωτός [200].

Τα πειράματα τιτλοδότησης εκπομπής πραγματοποιήθηκαν σε πανομοιότυπα διαλύματα με την τιτλοδότηση ορατού. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και αφέθηκαν προς επώαση 24 h. Τα φάσματα εκπομπής των διαλυμάτων αυτών παρουσία και απουσία DNA φαίνονται στο Σχήμα 9.6. Μετά από διέγερση σε μήκος κύματος 350 nm, το σύμπλοκο παρουσιάζει αμελητέο φθορισμό, με μέγιστο στα 425 nm. Όμως, μετά από προσθήκη DNA παρατηρείται σημαντική αύξηση της φωταύγειας. Παρόλα αυτά, από τα πειραματικά δεδομένα δεν προέκυψε η κατάλληλη καμπύλη ώστε να προσδιοριστεί με αξιοπιστία η σταθερά σύνδεσης.



Σχήμα 9.6. Φάσματα εκπομπής του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ ($15 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}}=350 \text{ nm}$) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε διάφορες συγκεντρώσεις DNA. Το βέλος δείχνει την αύξηση της έντασης αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ επιδεικνύει συμπεριφορά μοριακού διακόπτη φωτός. Ο μηχανισμός του φαινομένου έχει μελετηθεί λεπτομερέστερα για το σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3(4\text{-methypyridine})(\text{dppz})]^+$ [42] αποκαλύπτοντας ότι η εκπομπή του δεσμευμένου στο DNA συμπλόκου προέρχεται από

μια τριπλή ενδομοριακή κατάσταση, βασισμένη στον dppz υποκαταστάτη ($^3\text{IL}_{\text{dppz}}$). Η διαφορά των φωτοφυσικών ιδιοτήτων του συγκεκριμένου συμπλόκου με τα ανάλογα Ru(II)-dppz οφείλεται στο γεγονός ότι η $\text{d}\pi(\text{M}) \rightarrow \pi^*(\text{dppz})$ $^3\text{MLCT}$ βρίσκεται σε υψηλότερη ενέργεια στο σύμπλοκο του Re(I), με αποτέλεσμα να κυριαρχεί η $^3\text{IL}_{\text{dppz}}$. Κατά συνέπεια, ένας παρόμοιος μηχανισμός μπορεί να υποτεθεί ότι ισχύει και στην περίπτωση μας.

9.1.6. Πειράματα ιξωδομετρίας (Viscosity measurements)

Οι οπτικές φωτοφυσικές μελέτες παρέχουν χρήσιμες, αλλά όχι επαρκείς ενδείξεις για να επαληθεύσουμε τον τρόπο σύνδεσης του DNA με χημικές ενώσεις. Η κατεξοχήν υδροδυναμική μέθοδος για τη διερεύνηση αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι η ιξωδομετρία, επειδή είναι πολύ ευαίσθητη στη μεταβολή της δομής και του μήκους των αλυσίδων του μακρομορίου και θεωρείται η πλέον αδιάσειστη απόδειξη, όχι μόνο της ύπαρξης αλληλεπίδρασης, αλλά και του είδους της. Είναι δυνατόν, μάλιστα, με μετρήσεις του ιξώδους να διαγνωστεί το είδος της αλληλεπίδρασης, όπως π.χ. παρεμβολή (intercalation), δέσμευση στις αύλακες κ.α. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι κλασσικά μόρια παρεμβολείς, όπως το βρωμίδιο του αιθιδίου, αυξάνουν το μήκος της έλικας, αφού τα ζεύγη βάσεων διαχωρίζονται για να φιλοξενηθεί το μόριο παρεμβολέας, όπως είδαμε στην §1.3.1, με συνέπεια να αυξάνεται το ιξώδες του διαλύματος του DNA. Αντίθετα, υπό τις ίδιες συνθήκες, μόρια που δεσμεύονται αποκλειστικά στις αύλακες του DNA προκαλούν κάμψη ή/και περιστροφή της έλικας του DNA, μειώνοντας το δραστικό μήκος της και κατά συνέπεια και το ιξώδες του μορίου.

Οι μετρήσεις τους ιξώδους πραγματοποιήθηκαν σε θερμοστατούμενο ιξωδόμετρο στους $25^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$, αυξάνοντας την ποσότητα του συμπλόκου και κρατώντας σταθερή αυτή του DNA. Τα τελικά διαλύματα είχαν συγκέντρωση ως προς DNA ίση με 15 μM και με προσθήκη, κάθε φορά ανάλογης ποσότητας διαλύματος συμπλόκου, σχηματίστηκαν διαλύματα των επιθυμητών λόγων $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$.

Το σχετικό ιξώδες υπολογίζεται από τη σχέση:

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

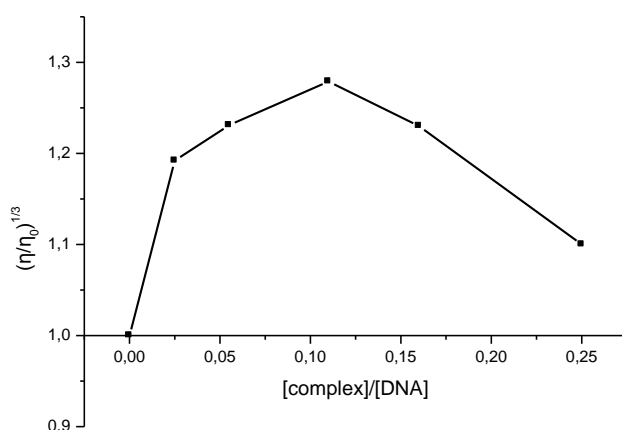
όπου t ο χρόνος ροής σε s του κάθε διαλύματος και t_0 ο χρόνος ροής του διαλυτή. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων έγιναν τρεις μετρήσεις για κάθε λόγο,

οι οποίες δεν έπρεπε να διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερο από 0,5s, και τελικός χρόνος ελήφθη ως ο μέσος όρος.

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

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

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



Σχήμα 9.7. Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων του συμπλόκου Re(dppz-ester)Cl στο σχετικό ιξώδες του CT-DNA (15 μM).

Στο Σχήμα 9.7 παριστάνεται η μεταβολή του $\left(\frac{n}{n_0}\right)^{\frac{1}{3}}$ συναρτήσει του λόγου $r = \frac{[\text{complex}]}{[\text{DNA}]}$. Από αυτό το σχήμα είναι εμφανής η αύξηση του σχετικού ιξώδους του DNA από 1 σε 1.28 για σχετικά μικρούς λόγους r ($r \leq 0.11$), ενώ στη συνέχεια αυτό μειώνεται στο 1.08 για το λόγο 0.25. Η παρατηρούμενη αρχική αύξηση είναι της ίδιας έκτασης με το γνωστό παρεμβολέα βρωμίδιο του αιθιδίου, γεγονός που υποδηλώνει την κλασσική παρεμβολή (classical intercalation) του συμπλόκου Re(dppz-ester)Cl στα ζεύγη

βάσεων. Αντίθετα, σε μεγάλες συγκεντρώσεις ($r=0.25$) η παρατηρούμενη μείωση πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι το σύμπλοκο συνδέεται μερικώς (partial intercalation) ή και με μη-κλασσική παρεμβολή (non classical intercalation) στο DNA. Πιθανόν να αναπτύσσονται ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των εστερομάδων του υποκαταστάτη (που βρίσκονται εξωτερικά) και των φωσφορικών ομάδων της διπλής έλικας, και το φαινόμενο αυτό να συμβαίνει «ανταγωνιστικά» με την παρεμβολή, αφού το σχετικό ιξώδες είναι πάλι μεγαλύτερο από 1.00, που είναι το ιξώδες του ελεύθερου DNA.

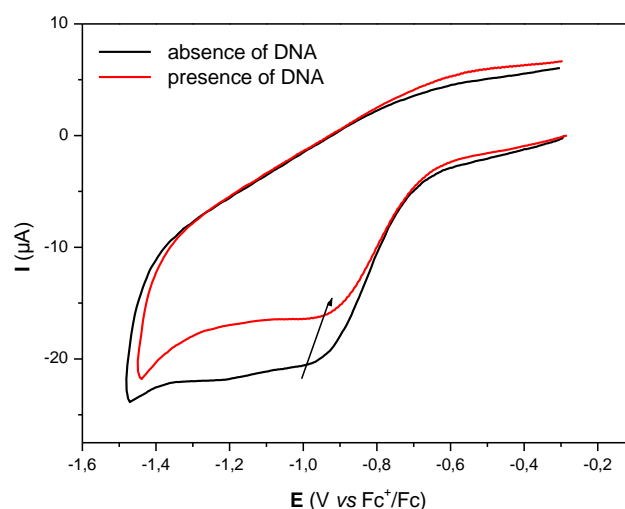
Η ενσωμάτωση λοιπόν, των $-\text{COOEt}$ ομάδων στον dppz υποκαταστάτη και η διαταραγμένη οκταεδρική γεωμετρία του συμπλόκου προκαλούν στερεοχημικές παρεμποδίσεις, όταν το σύμπλοκο του ρηνίου αλληλεπιδρά με το DNA. Αυτές οι στερεοχημικές παρεμποδίσεις φαίνεται να είναι πιο σημαντικές σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του συμπλόκου. Ως εκ τούτου, η υπό μελέτη ένωση μπορεί να παρεμβάλλεται λιγότερο βαθιά και σφιχτά στα ζεύγη βάσεων από ανάλογους κλασσικούς παρεμβολείς όπως, το $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(4\text{-methypyridine})(\text{dppz})]^+$ ή το $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ [17].

9.1.7. Πειράματα κυκλικής βολταμετρίας (CV experiments)

Η ηλεκτροχημική διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του DNA με σύμπλοκα μπορεί να προσφέρει ένα χρήσιμο συμπλήρωμα σε άλλες φασματοσκοπικές μεθόδους, και πληροφορίες για το μηχανισμό αλληλεπίδρασης. Αρχικά, καταγράφονται τα κυκλικά βολταμμογραφήματα διαλύματος του συμπλόκου παρουσία και απουσία DNA και υπολογίζονται τα δυναμικά. Οποιαδήποτε μεταβολή του CV λαμβάνει χώρα μετά την προσθήκη DNA αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης. Γενικά, έχει δειχθεί ότι η παρεμβολή επιφέρει μετατόπιση των δυναμικών σε θετικότερες τιμές, ενώ η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση προς αρνητικότερες τιμές [199]. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι κατά απόλυτη τιμή η μεταβολή, τόσο ισχυρότερη είναι και η αλληλεπίδραση του συμπλόκου.

Στο Σχήμα 9.8 φαίνονται τα κυκλικά βολταμμογραφήματα του συμπλόκου (85 μM) πριν και μετά την προσθήκη DNA (170 μM), σε 1:3 DMF/phosphate buffer. Για τα CV ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε Ag/AgCl , ως ηλεκτρόδιο εργασίας λευκοχρύσου και ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο σύρμα λευκοχρύσου, και η ταχύτητα σάρωσης ήταν 100 mV/s . Η ένταση του ρεύματος του μη αντιστρεπτού δυναμικού στα -0.98 V μειώνεται σημαντικά, ενώ ταυτόχρονα, το δυναμικό μετατοπίζεται προς θετικότερες τιμές κατά 45 mV . Αυτό προτείνει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο σύμπλοκο και το DNA, και

μάλιστα μέσω παρεμβολής του επίπεδου dppz-3,6-COOEt υποκαταστάτη, κάτι που επιβεβαιώνει τις ανωτέρω ενδείξεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι το φυσικό DNA δεν ανάγεται στο ηλεκτρόδιο λευκοχρύσου, επειδή η σταθερότητα της διπλής έλικας καθιστά τις βάσεις απρόσιτες στο ηλεκτρόδιο [201]. Συνεπώς, η παρατηρούμενη μείωση του ρεύματος μπορεί να αποδοθεί τόσο στην παρεμβολή του συμπλόκου ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA, όσο και στην ύπαρξη ενός μείγματος ισορροπίας ελεύθερου και δεσμευμένου στο DNA συμπλόκου με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου [202].



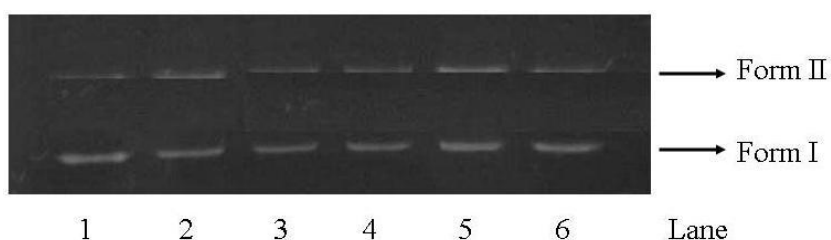
Σχήμα 9.8. CV του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία CT-DNA (κόκκινη γραμμή).

9.1.8. Μελέτη Διάσπασης του DNA (DNA cleavage studies)

Η αντίδραση διάσπασης του DNA μπορεί εύκολα να μελετηθεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή, αφού παρατηρείται αλλαγή στην κινητικότητα των διαφόρων μορφών του πλασμιδιακού DNA. Συγκεκριμένα, όταν κυκλικό υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA (supercoiled plasmid DNA) ηλεκτροφορηθεί μετακινείται σχετικά γρήγορα, παρατηρώντας μόνο την άθικτη υπερελικωμένη μορφή του (Form I). Εάν συμβεί σπάσιμο στον έναν κλώνο (nicking), τότε το DNA αποελικώνεται, αποδίδοντας την χαλαρή ή ανοιχτή κυκλική μορφή (relaxed or open circular, Form II), που κινείται πιο αργά. Αν σπάσουν και οι δύο κλώνοι, παρατηρείται η γραμμική μορφή (linear, Form III) που μεταναστεύει ανάμεσα στην Form I και II.

Έτσι λοιπόν, προκειμένου να διαπιστωθεί η φωτοεπαγόμενη διάσπαση του DNA, το πλασμιδιακό pBR322 DNA (100 ng) επωάστηκε με διάφορες συγκεντρώσεις του υπό μελέτη σύμπλοκου, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM)/NaCl (18 mM), pH = 7.2.

Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν για 2 ώρες με ακτινοβολία μήκους κύματος $\lambda > 335$ nm, ώστε να «κόψουμε» την UV-B ακτινοβολία που θα κατέστρεφε έτσι και αλλιώς το DNA. Ως δείγμα αναφοράς (control) χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό pBR322 DNA και εκτέθηκε στις ίδιες ακριβώς συνθήκες όπως όλα τα δείγματα. Στο Σχήμα 9.9 φαίνεται το ηλεκτοφόρημα του πλασμιδιακού pBR322. Όπως αναμενόταν, καμία DNA-διάσπαση δεν παρατηρήθηκε στο δείγμα αναφοράς, όπου το σύμπλοκο απουσιάζει (lane 1). Καμία όμως διάσπαση δεν ανιχνεύθηκε ούτε παρουσία του συμπλόκου, τόσο σε συνθήκες σκότους (lane 2), όσο και μετά από ακτινοβολία (lane 3-6), ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του παραγώγου (200 μ M, lane 6). Έτσι, γίνεται σαφές ότι το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}[\text{dppz-3,6-(COOEt)}_2]$ δεν μπορεί να προκαλέσει καμία διάσπαση του πλασμιδιακού pBR322 DNA, ούτε χωρίς, αλλά ούτε και με ακτινοβολία.



Σχήμα 9.9. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (100 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και $\lambda_{ir} > 335$ nm. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA+200 μ M συμπλόκου στο σκοτάδι, Lane 3-6: DNA+σύμπλοκο σε 10, 50, 100, 200 μ M, αντίστοιχα, μετά από ακτινοβολία.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε ότι ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}[\text{dppz-3,6-(COOEt)}_2]$ σε θερμοκρασία δωματίου και σε διαλύτη MeCN βρέθηκε ~ 5 ns [185], που είναι πολύ μικρότερος από τον αντίστοιχο του $[\text{Re}(\text{CO})_3(4\text{-methylpyridine})(\text{dppz})]^+$ στον ίδιο διαλύτη [42]. Σε υδατικά διαλύματα, ο χρόνος ζωής και η κβαντική απόδοση φθορισμού είναι ακόμα χαμηλότερα. Αν και, όπως διαπιστώσαμε προηγουμένως, το σύμπλοκο δεσμευμένο στο DNA παρουσιάζει εντονότερη φωταύγεια, εντούτοις αυτό δεν είναι αρκετό για να προκαλέσει αποτελεσματική φωτοδιάσπαση του DNA. Να σημειωθεί ότι ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης του δεσμευμένου με το DNA συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(4\text{-methylpyridine})(\text{dppz})]^+$ είναι 0.97 μ s [42], πολύ μεγαλύτερος, δηλαδή, από του υπό μελέτη συμπλόκου. Έτσι λοιπόν μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ανικανότητα φωτοδιάσπασης του DNA πιθανόν να οφείλεται στο μικρό χρόνο ζωής και την χαμηλή οξειδωτική ικανότητα της διεγερμένης κατάστασης του συμπλόκου.

9.1.9. Συζήτηση

Όπως αναλύσαμε παραπάνω όλες οι πειραματικές τεχνικές συγκλίνουν στο ότι το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}[\text{dppz}-3,6-(\text{COOEt})_2]$ συνδέεται ισχυρά με το DNA, με σταθερά σύνδεσης $1.34 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, χωρίς όμως να μεταβάλλει τη B-διαμόρφωση του DNA, όπως διαπιστώθηκε με πειράματα κυκλικού διχρωισμού. Συγκεκριμένα, ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης είναι παρεμβολικής φύσεως, χωρίς όμως να παραμένει το ίδιο είδος παρεμβολής σε όλη την έκταση των συγκεντρώσεων, κάτι που προτείνει το πείραμα της ιξωδομετρίας, και επιβεβαιώνει η τιμή της σταθεράς σύνδεσης. Η κλασική παρεμβολή που επικρατεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις του συμπλόκου, φαίνεται να λειτουργεί ανταγωνιστικά με ένα είδος μη κλασικής ή μερικής παρεμβολής, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του παραγώγου. Η υποκατάσταση του dppz με δύο εστερομάδες στην 3 και 6 θέση είναι ο λόγος της που παρατηρείται η αλλαγή αυτή. Η διαταραγμένη οκταεδρική γεωμετρία του συμπλόκου και οι ογκώδεις εστερομάδες προκαλούν στερεοχημική παρεμπόδιση, η οποία είναι εντονότερη σε υψηλές συγκεντρώσεις, εμποδίζοντας την βαθιά και σφιχτή παρεμβολή του επίπεδου υποκαταστάτη. Αυτή η παρατήρηση ενισχύεται από τη χαμηλότερη τιμή της σταθεράς σύνδεσης του συγκεκριμένου συμπλόκου αναλογικά με $\text{Re}(\text{I})\text{-dppz}$ σύμπλοκα, που ο υποκαταστάτης δεν έχει τροποποιηθεί. Τα δεδομένα αυτά, υποδεικνύουν ότι το μέγεθος και η τροποποίηση του υποκαταστάτη έχει σημαντική επίδραση στην ισχύ της δέσμευσης στο DNA, και η κατάλληλη επιλογή του υποκαταστάτη θα οδηγήσει στην υψηλότερη συγγένεια με το DNA.

Παρά την ελαφρώς μειωμένη συγγένεια του παραπάνω συμπλόκου, μπορεί να λειτουργήσει ως μοριακός διακόπτης φωτός, ανάλογα με τα συγγενικά dppz σύμπλοκα. Ο μηχανισμός φαίνεται να είναι ίδιος με αυτόν που προτάθηκε για το σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3(4\text{-methypyridine})(\text{dppz})]^+$ [42] όπου η φωταυγάζουσα $^3\text{IL}_{\text{dppz}}$ κατάσταση επικρατεί στο άπολο περιβάλλον του DNA. Αντίθετα σε πολικό περιβάλλον (χωρίς DNA) η $^3\text{IL}_{\text{dppz}}$ απενεργοποιείται μέσω εσωτερικής μετατροπής στην σκοτεινή $^3\text{MLCT}$ κατάσταση.

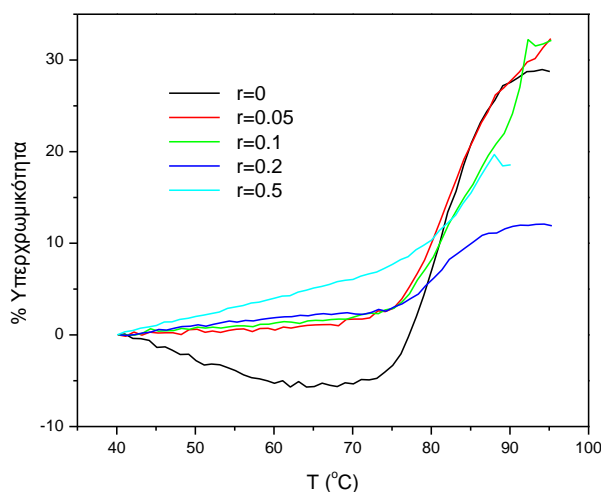
Αν και το σύμπλοκο συνδέεται αρκετά ισχυρά με το DNA και μπορεί να συμπεριφερθεί σαν μοριακός διακόπτης φωτός, εντούτοις είναι δύσκολο να προκαλέσει την άμεση φωτοδιάσπαση του DNA, πιθανώς λόγω του μικρού χρόνου ζωής και την χαμηλή οξειδωτική ικανότητα της διεγερμένης κατάστασης του.

Επομένως, η ενσωμάτωση των δύο εστερομάδων στον dppz υποκαταστάτη φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά όχι μόνο την δεσμευτική ισχύ με το DNA, αλλά και τις φωτοφυσικές ιδιότητες του συμπλόκου, και κατά συνέπεια και την φωτο-διασπαστική του ικανότητα.

9.2. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ με DNA

9.2.1. Πειράματα θερμικής μετουσίωσης, T_m

Η επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ στη σταθερότητα της διπλής έλικας του DNA μελετήθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως για το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$, δηλαδή σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με $\text{pH}=7.0$. Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν είχαν γραμμομοριακή αναλογία $r=0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5$ και επώαστηκαν για 24 h ώστε να ισορροπήσει το σύστημα. Στο Σχήμα 9.10 φαίνονται οι καμπύλες θερμικής μετουσίωσης του DNA από θύμο αδένων βοοειδούς παρουσία του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$, και στον Πίνακα 9.2 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα δεδομένα των πειραμάτων T_m . Οι τιμές στον άξονα των y εμφανίζονται σαν %υπερχρωμικότητα, όπως είδαμε προηγουμένως. Και σε αυτήν την περίπτωση τα σημεία T_m βρέθηκαν βάση υπολογιστικού προγράμματος.



Σχήμα 9.10. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ με το DNA.

Συγκεκριμένα, τα πειράματα θερμικής μετουσίωσης έδειξαν ότι το σύμπλοκο προκαλεί μόνο μια μικρή αποσταθεροποίηση από 1 έως 3 °C για όλους τους λόγους. Ειδικότερα, για το λόγο $r=0.5$ παρατηρείται μετατόπιση κατά -2.9 °C με ταυτόχρονη μείωση της υπερχρωμικότητας (τελική τιμή 19%). Η υπερχρωμικότητα για το ελεύθερο DNA βρέθηκε 27.6%, ενώ παρουσία του συμπλόκου παρατηρείται μια συνεχόμενη μείωση.

Τα αποτελέσματα προτείνουν μια εξωτερικής φύσης αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA. Μόρια μη κλασσικοί παρεμβολείς παρουσιάζουν ανάλογη συμπεριφορά

[74,203,204], ενώ παρεμβολικοί υποκαταστάτες όπως το βρωμιούχο αιθίδιο προκαλούν σημαντική σταθεροποίηση της διπλής έλικας [205].

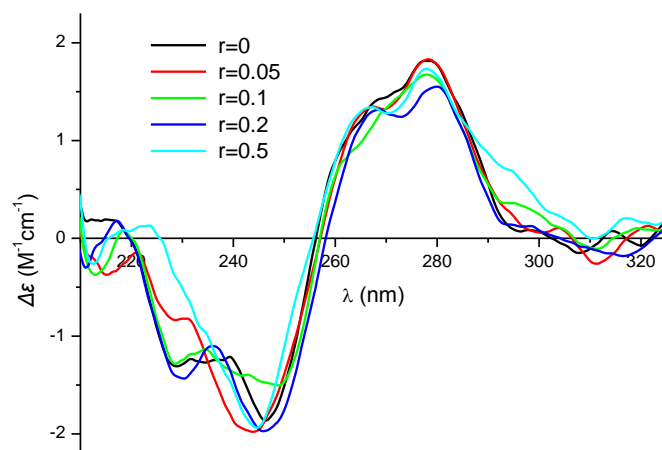
Πίνακας 9.2. Δεδομένα θερμικής μετουσίωσης και κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου Re(rhendione)Cl με το DNA.

	Θερμική Μετουσίωση			Κυκλικός Διχρωισμός	
	T _m (°C)	ΔT _m	%hyp	λ (nm)	Δε (M ⁻¹ cm ⁻¹)
r=0	82.05 (±0.26)	0	27.6	278	1.82
				246	-1.86
r=0.05	80.43 (±0.10)	-1.62	27.8	278	1.82
				245	-1.97
r=0.1	80.33 (±0.55)	-1.72	27.0	278	1.70
				247	-1.50
r=0.2	81.29 (±0.39)	-0.76	19.0	279	1.55
				246	-1.97
r=0.5	79.13 (±0.36)	-2.92	19.0	278	1.73
				245	1.93

9.2.2. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD)

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το σύμπλοκο αλλάζει την Β-δομή του DNA πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικού διχρωισμού. Παρασκευάστηκαν λοιπόν, οι ίδιοι ακριβώς λόγοι r με προηγουμένως σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

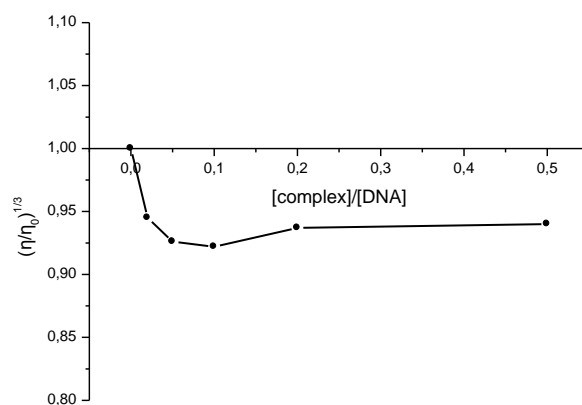
Μετά από προσθήκη του συμπλόκου του Re(I) δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση ούτε στην ελλειπτικότητα των ταινιών αλλά ούτε και στην θέση τους, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9.11. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται μόνο μια μικρή αλλαγή της ελλειπτικότητας της θετικής κορυφής στα 278 nm (το Δε μειώνεται από 1.82 σε 1.55 55 M⁻¹cm⁻¹) για το λόγο r=0.2, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στον Πίνακα 9.2. Παρόλα αυτά καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στο μήκος κύματος των δύο ταινιών. Τα αποτελέσματα προτείνουν ότι το σύμπλοκο δεν μπορεί να αλλάξει τη Β-δομή του DNA, και αυτό είναι μια πρώτη ένδειξη ότι ο τρόπος δέσμευσης δεν είναι παρεμβολικής φύσεως, σε συμφωνία με τα πειράματα θερμικής μετουσίωσης.



Σχήμα 9.11. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T.-DNA με το σύμπλοκο Re(phenanthroline)Cl.

9.2.3. Πειράματα ιξωδομετρίας (Viscosity measurements)

Οι πρώτες ενδείξεις για τον τρόπο αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA προτείνουν εξωτερική συναρμογή. Η επιβεβαίωση της παραπάνω παρατήρησης έρχεται από τις μετρήσεις ιξωδομετρίας που πραγματοποιήσαμε σε πανομοιότυπα με τα προηγούμενα διαλύματα, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.12. Από το σχήμα αυτό είναι εμφανής η μείωση του σχετικού ιξώδους του διαλύματος του DNA με την παρουσία του συμπλόκου (έως και 0.92 για το λόγο $r=0.1$). Η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του συμπλόκου πρακτικά δεν αλλάζει το σχετικό ιξώδες, κάτι που υποδηλώνει ότι ο τρόπος αλληλεπίδρασης δεν αλλάζει με τη συγκέντρωση του συμπλόκου. Η μείωση του ιξώδους οφείλεται στην μείωση του μήκους του DNA, που προκαλείται από την κάμψη της διπλής έλικας παρουσία του συμπλόκου, αποκαλύπτοντας ότι η συγκεκριμένη ένωση αλληλεπιδρά εξωτερικά και πιθανόν με την αύλακα του DNA. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ανάλογη μείωση του ιξώδους παρατηρήθηκε και για το the Δ ισομερές του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, που συναρμόζεται στην αύλακα [24].

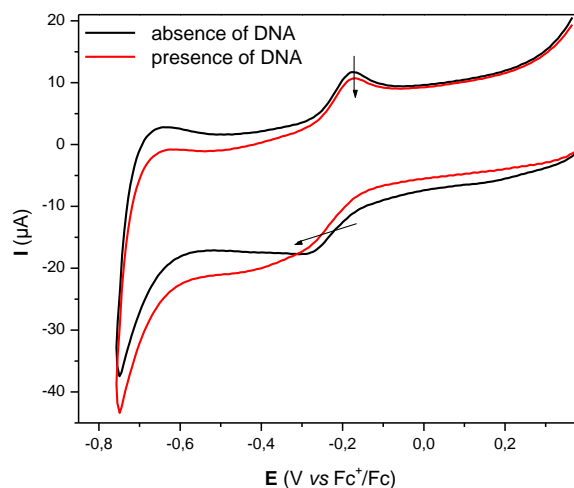


Σχήμα 9.12. Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων του συμπλόκου Re(phendione)Cl στο σχετικό ιξώδες του CT-DNA (100 μM).

9.2.4. Πειράματα κυκλικής βολταμετρίας (CV experiments)

Τα προηγούμενα πειράματα φανερώνουν μια εξωτερικής φύσεως αλληλεπίδραση με το DNA, χωρίς να παρατηρείται κάποια δοσο-εξαρτώμενη αλληλεπίδραση (όπως προτείνεται από τα πειράματα ιξωδομετρίας). Επομένως, για να το πείραμα κυκλικής βολταμετρίας επιλέξαμε να δοκιμάσουμε έναν και μόνο λόγο, ώστε να διαπιστωθεί ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης. Μιας και στο T_m παρατηρείται η μεγαλύτερη αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας στο $r=0.5$ θεωρήσαμε ότι αυτός είναι ο πλέον κατάλληλος για μελετήσουμε τις διαφορές. Έτσι, στο Σχήμα 9.13 φαίνεται το CV του συμπλόκου (100 μM) απουσία και παρουσία DNA (200 μM). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κυψελίδα που επιτρέπει τη διαβίβαση N_2 στο διάλυμα, με ηλεκτρόδια εργασίας λευκόχρυσο και ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s. Το NaCl του ρυθμιστικού διαλύματος χρησίμευσε και ως φέροντας ηλεκτρολύτης.

Μετά από την προσθήκη DNA, καμία νέα οξειδοαναγωγική κορυφή δεν παρατηρείται. Αντίθετα, οι εντάσεις του ρεύματος εμφανίζονται ελαφρώς μειωμένες, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ του συμπλόκου και του DNA. Από το Σχήμα 9.13 παρατηρούμε ότι παρουσία του DNA, το καθοδικό δυναμικό εμφανίζει αρνητική μετατόπιση έως τα -313 mV (με $\Delta E_{pa} = -44$ mV, όπου $\Delta E_{pa} = E_{pa}^b - E_{pa}^f$, και E_{pa}^b , E_{pa}^f είναι τα καθοδικά δυναμικά του δεσμευμένου στο DNA συμπλόκου και του ελεύθερου συμπλόκου, αντίστοιχα). Στο ανοδικό δυναμικό δεν εμφανίζεται καμία μετατόπιση. Η μετατόπιση του δυναμικού αναγωγής σε περισσότερο αρνητικές τιμές υποδηλώνει την εξωτερική αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA, κάτι που έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα.



Σχήμα 9.13. CV του συμπλόκου Re(phenanthroline)Cl απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία CT-DNA (κόκκινη γραμμή).

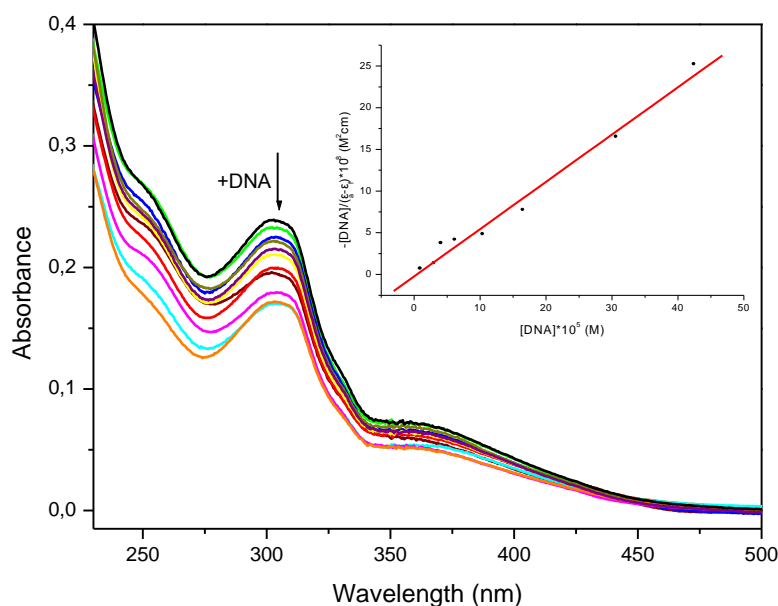
9.2.5. Τιτλοδότηση UV-Vis και Εκπομπής

Η τιτλοδότηση απορρόφησης είναι μια πολύ χρήσιμη μέθοδος προκειμένου όχι μόνο να διαπιστωθεί το είδος της αλληλεπίδρασης αλλά και να υπολογιστεί ποσοτικά η δεσμευτική ισχύς. Για τα πειράματα αυτά διατηρούμε σταθερή τη συγκέντρωση του συμπλόκου, αντίθετα με ότι είδαμε στα προηγούμενα πειράματα. Εν συντομία, η συγκέντρωση του συμπλόκου ήταν 20 μM σε μεθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με $\text{pH}=7.0$ και η θερμοκρασία σταθερή στους 25 $^{\circ}\text{C}$. Στο σύμπλοκο προσθέσαμε διάφορες ποσότητες DNA, από 5 μέχρι 400 μM , και καταγράφηκαν τα φάσματα απορρόφησης, που φαίνονται στο Σχήμα 9.14.

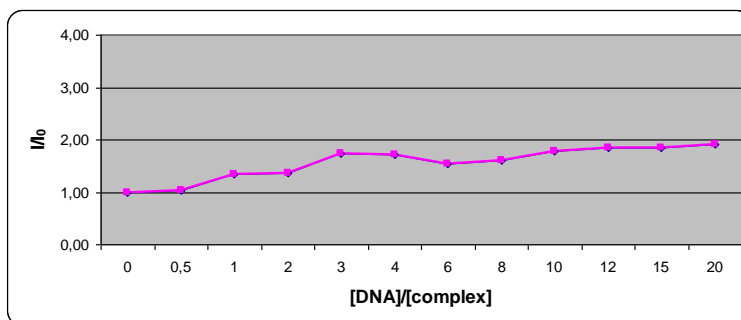
Κατά την προσθήκη DNA παρατηρείται μείωση της απορρόφησης (υποχρωμισμός) της κορυφής στα 310 nm, έως και 30%, αλλά καμία απολύτως μετατόπιση του μέγιστου μήκους κύματος δεν εμφανίζεται. Παρά τον παρατηρούμενο υποχρωμισμό, το σύμπλοκο δεν αλληλεπιδρά μέσω παρεμβολής στα ζεύγη βάσεων, όπως προτείνει η μηδενική μετατόπιση του μήκους κύματος. Να υπενθυμίσουμε ότι το Re(dppz-ester)Cl που παρεμβάλλεται στα ζεύγη βάσεων εμφάνισε ανάλογο % υποχρωμισμό, αλλά και σημαντική μετατόπιση του μήκους κύματος προς το ερυθρό. Επομένως, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι το σύμπλοκο Re(phenanthroline)Cl δρα μέσω συναρμογής στην αύλακα και όχι μέσω παρεμβολής, επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα αποτελέσματα.

Η σταθερά σύνδεσης του συμπλόκου στο DNA υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης (6.3), μελετώντας τις αλλαγές της απορρόφησης στα 310 nm και βρέθηκε ίση με

$7.95(\pm 1.89) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (ένθετο Σχήματος 9.14). Η τιμή αυτή έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα.



Σχήμα 9.14. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ ($20 \mu\text{M}$) με αυξανόμενη συγκέντρωση CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Το ένθετο δείχνει τη γραφική παράσταση $-10^8 * [\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs. $[\text{DNA}] * 10^5$ και τη γραμμική προσαρμογή για την τιτλοδότηση απορρόφησης.



Σχήμα 9.15. Τιτλοδότηση εκπομπής του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ με DNA. Οι εντάσεις I (παρουσία DNA) και I_0 (απουσία DNA) αφορούν την κορυφή στα 442 nm .

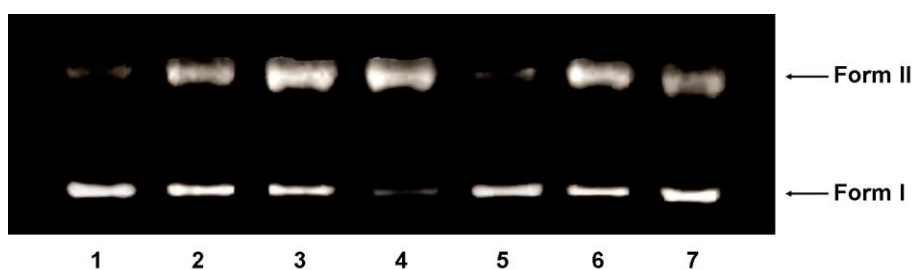
Το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ εμφανίζει ασθενή φθορισμό σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Όμως, η δέσμευση του συμπλόκου στο DNA δεν οδήγησε σε κάποια σημαντική αλλαγή στην ένταση της εκπομπής. Συνεπώς, η φασματοσκοπία εκπομπής δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των δεσμευτικών ιδιοτήτων του συμπλόκου στο

DNA. Στο Σχήμα 9.15 φαίνονται οι καμπύλες τιτλοδότησης του συμπλόκου με DNA για την κορυφή εκπομπής στα 442 nm.

9.2.6. Μελέτη Διάσπασης του DNA (DNA cleavage studies)

Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα φωτο-διάσπασης του DNA παρουσία του συμπλόκου Re(phendione)Cl πραγματοποιήθηκαν πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζη. Εν συντομία, 150 ng πλασμιδιακού pBR322 DNA επωάζονται με διάφορες συγκεντρώσεις συμπλόκου, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl/NaCl, pH=7.2. Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με $\lambda_{ir}>335$ nm για 2 ώρες υπό αερόβιες συνθήκες.

Τα αποτελέσματα (Σχήμα 9.16) δείχνουν ότι το σύμπλοκο Re(phendione)Cl προκαλεί σπάσιμο του ενός κλώνου του υπερελικωμένου pBR322 (Form I) σε ανοιχτή nicked μορφή (Form II). Το πλασμίδιο απουσία συμπλόκου (lane 1) δεν παρουσίασε καμιά διάσπαση μετά από ακτινοβολήση. Όμως, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του συμπλόκου (lanes 2-4) το ποσοστό του Form II αυξάνει βαθμιαία, ενώ αυτό του Form I ελαττώνεται σταδιακά. Το σύμπλοκο ακόμα και σε συγκέντρωση 100 μ M δεν παρουσιάζει καμιά διασπαστική ικανότητα υπό συνθήκες σκότους (lane 5).



Σχήμα 9.16. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (150 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου Re(phendione)Cl σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και $\lambda_{ir}>335$ nm. Lane 1: DNA control, Lane 2-4: DNA+σύμπλοκο σε 10, 50, 100 μ M, αντίστοιχα, παρουσία O_2 , Lane 5: DNA+100 μ M συμπλόκου στο σκοτάδι, Lane 6: DNA+100 μ M συμπλόκου+DMSO (0.9 M), Lane 7: DNA+100 μ M συμπλόκου υπό αργό.

9.2.7. Μηχανιστικές μελέτες (Mechanistic studies)

Προκειμένου να βρεθεί ο μηχανισμός διάσπασης του πλασμιδίου pBR322 από το συμπλόκο Re(phendione)Cl, πραγματοποιήθηκαν οι πρωταρχικές μηχανιστικές μελέτες που αναφέρονται παρακάτω. Για να διαπιστωθεί η συμμετοχή του οξυγόνου στο μηχανισμό, το πλασμίδιο επωάστηκε υπό αναερόβιες συνθήκες με 100 μ M του συμπλόκου

και κατόπιν ακτινοβολήθηκε για 2 h. Στο πείραμα αυτό, το δείγμα υποβλήθηκε σε τρεις διαδοχικούς freeze-pump-thaw κύκλους και επωάστηκε για 24 h υπό ατμόσφαιρα αργού. Τα αποτελέσματα (Σχήμα 9.16, lane 7) έδειξαν ότι τόσο παρουσία (lane 4) όσο και απουσία οξυγόνου (lane 7) το σύμπλοκο διασπά το πλασμιδιακό pBR322. Αν και υπό αναερόβιες συνθήκες παρατηρείται μια μικρή αναστολή στις διάσπασης (όπως φανερώνει η μικρότερη ένταση του Form II και η μεγαλύτερη του Form I), μπορούμε να πούμε ότι σε γενικές γραμμές το μοριακό οξυγόνο δεν εμπλέκεται στο μηχανισμό διάσπασης ή πιο σωστά εμπλέκεται σε ένα μικρό ποσοστό.

Για να διαπιστωθεί η κρισιμότητα τις ρίζας υδροξυλίου (ενός άλλου πολύ δραστικού μορίου) στο μηχανισμό διάσπασης, το πλασμίδιο επωάστηκε με 100 μM συμπλόκου παρουσία μεγάλης περισσειας DMSO, ενός γνωστού OH^\cdot scavenger [206]. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 9.16, lane 6, δεν παρατηρήθηκε καμία αναστολή στη δραστικότητα διάσπασης του συμπλόκου, υποδεικνύοντας ότι ούτε η ρίζα OH^\cdot εμπεριέχεται στη φωτοεπαγόμενη διάσπαση.

9.2.8. Συζήτηση

Πριν ξεκινήσουμε τη συζήτηση των πειραματικών αποτελεσμάτων, κρίνεται σκόπιμο να υπενθυμίσουμε ότι το $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ παρουσία υδατικού διαλύματος βρίσκεται σε ισορροπία με την ενυδατωμένη μορφή $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Σχήμα 8.6). Επομένως, η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA, που θα αναφερθούμε, αφορά το μείγμα ισορροπίας μεταξύ της ενυδατωμένης και μη μορφής του συμπλόκου. Η ενυδατωμένη μορφή πιθανόν να είναι υπεύθυνη για την φωτο-διάσπαση, όπως θα δούμε παρακάτω.

Μελετώντας τις καμπύλες θερμικής μετουσίωσης διαπιστώνουμε ότι παρατηρείται μια μικρή αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας του DNA ανάλογα με τη γραμμομοριακή αναλογία. Συγκρίνοντας αυτή τη συμπεριφορά με ανάλογα σύμπλοκα στη βιβλιογραφία, μπορούμε να προτείνουμε ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}$ δεν είναι παρεμβολικής φύσεως. Πράγματι, κάτι τέτοιο επιβεβαιώνουν όλες οι τεχνικές που μελετήθηκαν, όπως το CV η ιξωδομετρία και η τιτλοδότηση. Αναλυτικότερα, η ιξωδομετρία προτείνει ότι το σύμπλοκο δεσμεύεται πιθανότατα στην αύλακα του DNA, προκαλώντας κάμψη της διπλής έλικας, ανάλογη του συναρμογέα στην αύλακα συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ [24]. Παρόλα αυτά η B-διαμόρφωση του DNA δεν διαταράσσεται σημαντικά, όπως έδειξαν τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι για το σύμπλοκο $[\text{Co}(\text{phendione})_2\text{Cl}_2]^+$, που συνδέεται ομοιοπολικά με το N7

της γουανίνης, ο rhendione υποκαταστάτης εντάσσεται στην μεγάλη αύλακα χωρίς να διαταράσσει την έλικα του B-DNA [207].

Η σταθερά του συμπλόκου $\text{Re}(\text{rhendione})\text{Cl}$ βρέθηκε $7.95 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, περίπου 1.7 φορές μικρότερη αυτής του dppz συμπλόκου, που μελετήσαμε παραπάνω. Η τιμή αυτή ενισχύει τη συναρμογή στην αύλακα, μιας και ο αυτός τρόπος αλληλεπίδρασης είναι ασθενέστερος από την παρεμβολή.

Πειράματα ηλεκτροφόρησης απέδειξαν ότι το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{rhendione})\text{Cl}$ προάγει την φωτο-διάσπαση του πλασμιδιακού DNA, μέσω ενός μηχανισμού που δεν περιλαμβάνει ούτε την άμεση συμμετοχή του οξυγόνου ούτε των υδροξυλικών ριζών OH^\cdot . Ο μηχανισμός διάσπασης, πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της άμεσης οξειδωσης της γουανίνης από το διεγερμένο σύμπλοκο, όπως ακριβώς αναλύσαμε στο θεωρητικό μέρος, να συμβαίνει για το σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz})(\text{py})]^+$ [44]. Εναλλακτικά, ένας άλλος πιθανός μηχανισμός να γίνεται μέσω ταυτόχρονης μεταφοράς ηλεκτρονίου-πρωτονίου (proton-coupled electron transfer). Στην περίπτωση αυτή η αποπρωτονιωμένη μορφή του διεγερμένου συμπλόκου $\text{Re}(\text{rhendione})\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}^*$ μπορεί να προκαλέσει απόσπαση υδρογόνου από το σάκχαρο, οδηγώντας τελικά σε αντιδράσεις διάσπασης. Έτσι λοιπόν, μπορεί να προταθεί ένας μηχανισμός παρόμοιος με αυτόν που δημοσιεύθηκε πολύ πρόσφατα από τους S. A. Poteet et al. [181] για το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{rhendione})]^{2+}$.

9.3. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$ με DNA

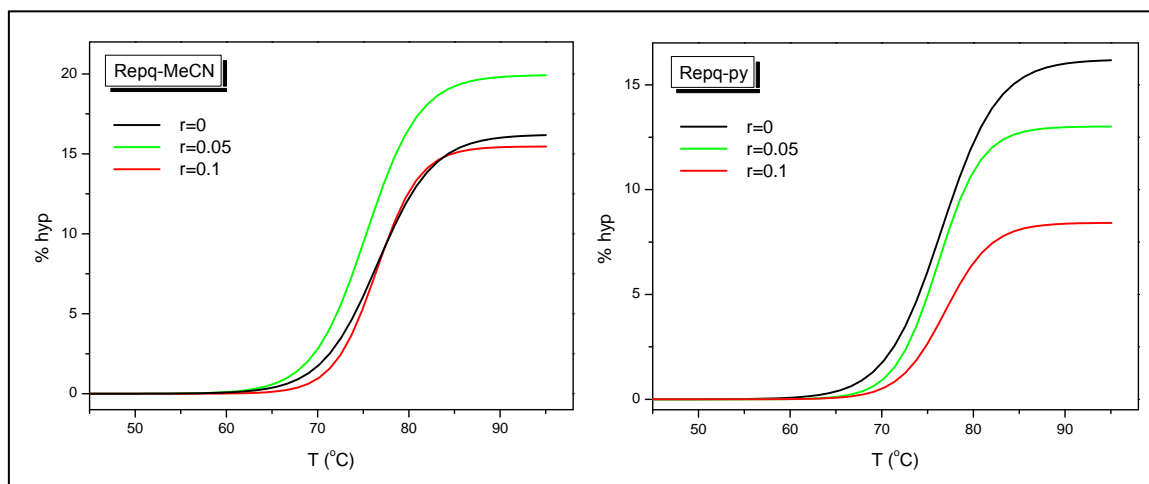
9.3.1. Πειράματα θερμικής μετουσίωσης, T_m

Η σταθερότητα της διπλής έλικας του DNA παρουσία των συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]\text{PF}_6$ και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$ μελετάται μετρώντας τις αλλαγές της κορυφής στα 258 nm συναρτήσει της θερμοκρασίας. Το DNA αυξανόμενης της θερμοκρασίας εμφανίζει μεγάλο υπερχρωτισμό. Αντίθετα, τα σύμπλοκα δεν εμφανίζουν ουσιαστικά καμία αλλαγή με την αύξηση της θερμοκρασίας, όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία UV-Vis. Επομένως, οι αλλαγές της απορρόφησης οφείλονται αποκλειστικά στην αλληλεπίδραση του DNA με τα σύμπλοκα. Για τις ανάγκες του πειράματος αυτού παρασκευάστηκαν διαλύματα των εξής γραμμομοριακών αναλογιών $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}] = 0, 0.05, 0.1$, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (5 mM) με NaCl (50 mM) και pH = 7.0. Όλα τα διαλύματα είχαν σταθερή συγκέντρωση ως προς DNA ίση με 20 μM και μεταβαλλόμενη αυτή των συμπλόκων. Όπως και στα δύο προηγούμενα

σύμπλοκα του Re(I), ο χρόνος επώασης που απαιτείται είναι τουλάχιστον 24 h, όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία UV-Vis.

Πίνακας 9.3. Δεδομένα πειραμάτων θερμικής μετουσίωσης (T_m) της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων **Re_q-MeCN** και **Re_q-py** με το DNA.

		Re_q-MeCN	Re_q-py
r=0	T_m	76.55 (± 0.17)	76.55 (± 0.17)
	ΔT_m	0	0
	% hyp	16.17	16.17
r=0.05	T_m	75.32 (± 0.12)	76.16 (± 0.20)
	ΔT_m	-1.23	-0.39
	% hyp	19.92	13.01
r=0.1	T_m	76.47 (± 0.24)	76.93 (± 0.19)
	ΔT_m	-0.08	+0.38
	% hyp	15.46	8.41



Σχήμα 9.17. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων **Re_q-MeCN** (αριστερά) και **Re_q-py** (δεξιά) με το DNA.

Οι καμπύλες θερμικής μετουσίωσης παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.17, και στον Πίνακα 9.3 συνοψίζονται τα πειραματικά αποτελέσματα. Από τον Πίνακα 8.3 γίνεται αμέσως εμφανές ότι κανένα από τα δύο σύμπλοκα δεν επηρεάζει τη σταθερότητα της διπλής έλικας του DNA (οι παρατηρούμενες αλλαγές είναι μέσα στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος). Αντίθετα, αλλαγές παρατηρούνται στην % υπερχρωμικότητα, κυρίως για το σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{rq})(\text{py})]\text{PF}_6$, όπου εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη, ακόμα και σε

πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ($r=0.05$). Μάλιστα, για τον λόγο 0.1 η % hyp φτάνει στο μισό. Αντίθετη συμπεριφορά παρουσιάζει το σύμπλοκο που εμφανίζει ελαφρώς αυξημένη % hyp.

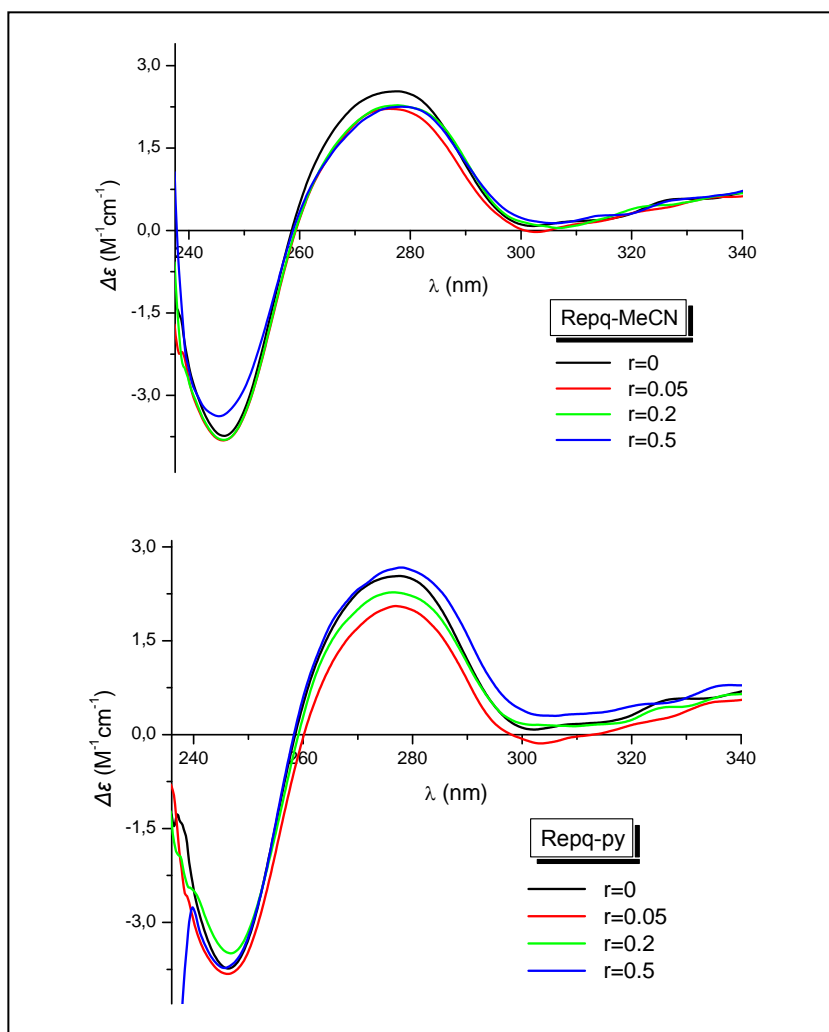
9.3.2. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD)

Προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση των συμπλόκων στη Β-διαμόρφωση του DNA πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικού διχρωισμού όπως αναφέρεται παρακάτω. Εν συντομία, τα δείγματα είχαν συγκέντρωση ως προς CT-DNA 50 μM , ενώ εκείνη των συμπλόκων κυμαινόταν από 2.5 έως 25 μM και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σταθερό $\text{pH}=7.0$ με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl/NaCl.

Τα CD φάσματα των δειγμάτων που μετρήθηκαν φαίνονται στο Σχήμα 9.18, όπου για όλους τους λόγους παρατηρείται το συντηρητικό φάσμα της διαμόρφωσης της Β-έλικας του DNA. Πιο συγκεκριμένα, για το MeCN-σύμπλοκο του Re(I) παρατηρείται μια μικρή μείωση στην ένταση της θετικής κορυφής (το $\Delta\epsilon$ από 2.53 για το ελεύθερο DNA μειώνεται στα 2.21 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), με την αρνητική να παραμένει ουσιαστικά αμετάβλητη. Το μήκος κύματος δεν μεταβάλλεται, παρά μόνο στο λόγο $r=0.5$ όπου η θετική κορυφή μετατοπίζεται κατά 1 nm προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Ανάλογη μετατόπιση παρατηρήθηκε και για την αρνητική κορυφή, αλλά προς μικρότερα μήκη κύματος.

Πίνακας 9.4. Δεδομένα πειραμάτων κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων Repq-MeCN και Repq-py με το DNA.

	Repq-MeCN		Repq-py	
	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
r=0	277	2.53	277	2.53
	246	-3.73	246	-3.73
r=0.05	276	2.21	277	2.05
	246	-3.82	246	-3.82
r=0.2	277	2.28	277	2.27
	246	-3.81	247	-3.49
r=0.5	278	2.25	278	2.67
	245	-3.38	245	-3.73

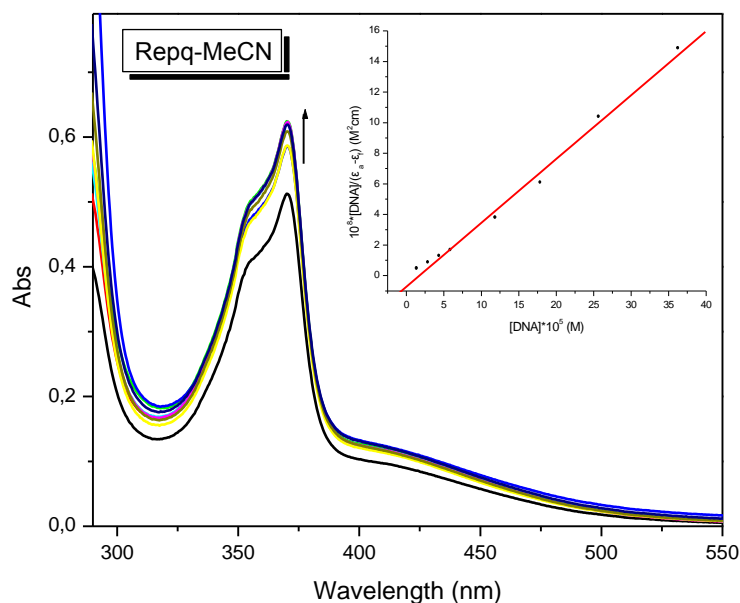


Σχήμα 9.18. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T.-DNA με τα σύμπλοκα Repq-MeCN (πάνω) και Repq-py (κάτω).

Ομοίως, για το πυριδινικό σύμπλοκο του Re(I) παρατηρείται ανάλογη μετατόπιση της θέσης των κορυφών με εκείνη που σχολίασαμε παραπάνω, και μόνο για το λόγο $r=0.5$. Η μείωση της ελλειπτικότητας της θετικής κορυφής για το λόγο $r=0.05$ είναι ελαφρώς μεγαλύτερη συγκριτικά με το πρώτο σύμπλοκο. Στον Πίνακα 9.4 συνοψίζονται τα $\Delta\epsilon$ και τα μήκη κύματος των κορυφών και των δύο κατιοντικών συμπλόκων.

9.3.3. Τιτλοδότηση UV-Vis και Εκπομπής

Από τα έως τώρα δεδομένα δεν έχουμε λάβει σαφείς ενδείξεις για το είδος της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA. Η τιτλοδότηση απορρόφησης λοιπόν είναι μια τεχνική που θα μπορούσαμε να συλλέξουμε ασφαλείς πληροφορίες για τη δεσμευτική τους ικανότητα, μελετώντας τις αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης των συμπλόκων, αυξάνοντας το DNA.

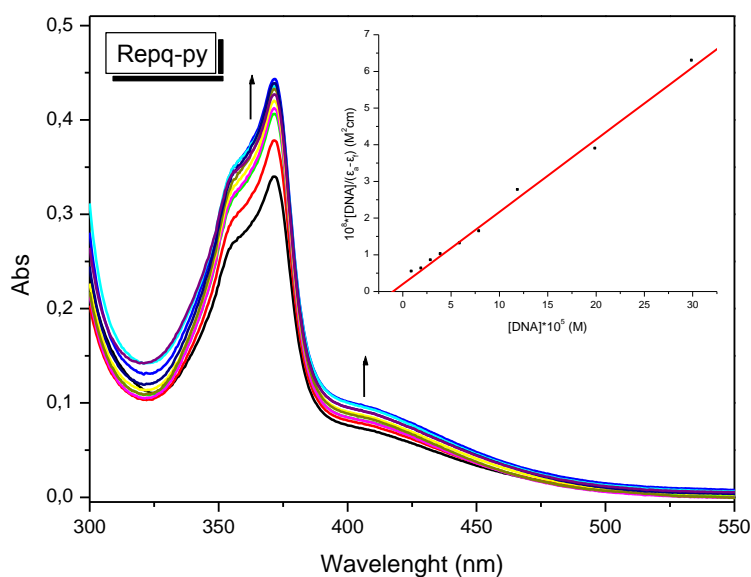


Σχήμα 9.19. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης του συμπλόκου Rerq-MeCN (30 μM) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Το ένθετο δείχνει τη γραφική παράσταση $10^8 * [DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA] * 10^5$ και τη γραμμική προσαρμογή για την τιτλοδότηση απορρόφησης.

Στα Σχήματα 9.19 και 9.20 φαίνονται, αντίστοιχα, τα φάσματα απορρόφησης των συμπλόκων Rerq-MeCN και Rerq-py, σε Tris-HCl/NaCl buffer αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA. Είναι ξεκάθαρο ότι κατά την προσθήκη του DNA, και τα δύο σύμπλοκα εμφανίζουν αύξηση απορρόφησης τόσο στην ενδομοριακή IL όσο και στη MLCT κατάσταση, αλλά καμία απολύτως αλλαγή στο μήκος κύματος των συγκεκριμένων κορυφών. Ο υπερχρωμισμός της ενδομοριακής κορυφής φτάνει στο 21.7 % και στο 30.4 % για το -MeCN και -py σύμπλοκο, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας την ελαφρώς ισχυρότερη σύνδεση του Rerq-py στο DNA. Να σημειωθεί ότι περαιτέρω αύξηση της ποσότητας του DNA δεν επιφέρει επιπλέον μείωση της IL απορρόφησης, γεγονός που δείχνει τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης του DNA από τα σύμπλοκα. Στο Σχήμα 8.21 φαίνονται οι καμπύλες κορεσμού του Rerq-MeCN και Rerq-py συμπλόκου. Η καμπύλη αυτή στην ουσία είναι το διάγραμμα του κλάσματος του δεσμευμένου στο DNA συμπλόκου συναρτήσει του λόγου $[DNA]/[complex]$. Το κλάσμα του δεσμευμένου συμπλόκου υπολογίζεται από τον τύπο $\frac{(A_f - A_{obs})}{(A_f - A_b)}$, όπου A_f και A_b είναι οι απορροφήσεις του ελεύθερου και του δεσμευμένου στο DNA συμπλόκου, αντίστοιχα, και A_{obs} η παρατηρούμενη απορρόφηση του συμπλόκου σε κάθε σημείο τιτλοδότησης. Το σημείο κορεσμού εμφανίζεται σε λόγο $[DNA]/[complex]$ ίσο με 3 και 4 για το -MeCN και -py σύμπλοκο, αντίστοιχα.

Η μηδενική μετατόπιση του μήκους κύματος και ο υπερχρωμισμός των κορυφών προτείνουν ότι η αλληλεπίδραση των δύο συμπλόκων δεν είναι παρεμβολικής φύσεως, αλλά πιθανόν να γίνεται με συναρμογή στην αύλακα.

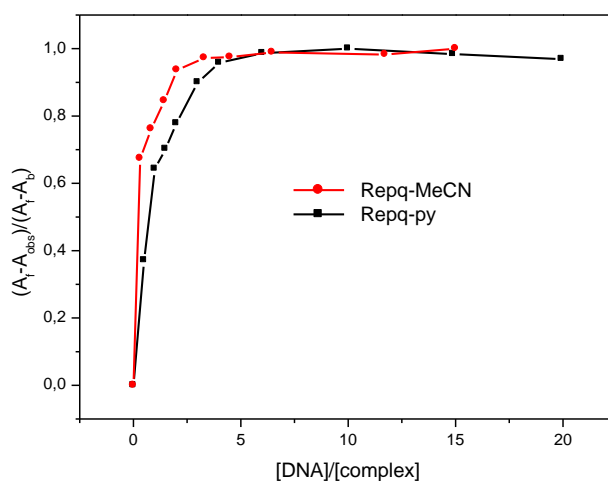
Η ποσοτική ανάλυση της δεσμευτικής ισχύος των δύο συμπλόκων έγινε με παρακολούθηση των αλλαγών απορρόφησης της Π κορυφής του εκάστοτε συμπλόκου. Με τη βοήθεια της εξίσωσης (5.3) η σταθερά σύνδεσης K_b υπολογίστηκε από το λόγο της κλίσης της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων προς την τεταγμένη επί την αρχή του διαγράμματος $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs DNA (ένθετα Σχημάτων 9.19 και 9.20). Η K_b για το σύμπλοκο Repq-MeCN προσδιορίστηκε $6.21(\pm 1.75) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ και για το Repq-py $9.89(\pm 1.88) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Η σταθερά σύνδεσης του δευτέρου συμπλόκου είναι περίπου 1.5 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πρώτου, όπως φάνηκε εξαρχής και από την % αύξηση του υπερχρωτισμού. Το γεγονός αυτό πιθανόν να υποδηλώνει ότι για το δεύτερο σύμπλοκο μπορεί να υπάρχει και κάποιο άλλο είδος αλληλεπίδρασης με το DNA.



Σχήμα 9.20. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης του συμπλόκου Repq-py (20 μM) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Το ένθετο δείχνει τη γραφική παράσταση $10^8 * [DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA] * 10^5$ και τη γραμμική προσαρμογή για την τιτλοδότηση απορρόφησης.

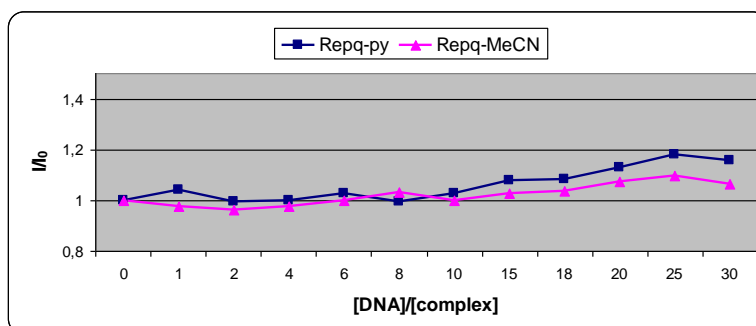
Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειώσουμε ότι, το ακετονιτρίλιο θεωρείται ευκίνητος (ή ασταθής) υποκαταστάτης. Έτσι λοιπόν μπορούμε να υποθέσουμε ότι το αντίστοιχο σύμπλοκο θα μπορούσε να συμπλεχθεί μέσω του αζώτου των βάσεων του DNA. Το γεγονός όμως ότι η σταθερά σύνδεσης του -MeCN συμπλόκου δεν είναι μεγαλύτερη από τη K_b συμπλόκων που στερούνται τέτοιου είδους υποκαταστάτη (όπως του -py

συμπλόκου που μελετάμε αλλά και αντίστοιχων στη βιβλιογραφία [42-44,51]), αποκλείει κάθε τέτοιου είδους αλληλεπίδραση.



Σχήμα 9.21. Καμπύλη δέσμευσης τιτλοδότησης UV-Vis των συμπλόκων Repq-MeCN (κόκκινη γραμμή) και Repq-py (μαύρη γραμμή) που παριστάνει τον κορεσμό δέσμευσης.

Η φωταύγεια και των δύο συμπλόκων σε υδατικό διάλυμα είναι αμελητέα. Η δέσμευση τους στο DNA δεν οδήγησε σε καμία σημαντική αλλαγή στην ένταση της εκπομπής (Σχήμα 9.22), σε αντίθεση με τα παραδοσιακά συστήματα διακοπών φωτός, κάτι που αποκλείει την τιτλοδότηση εκπομπής στη μελέτη αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA.



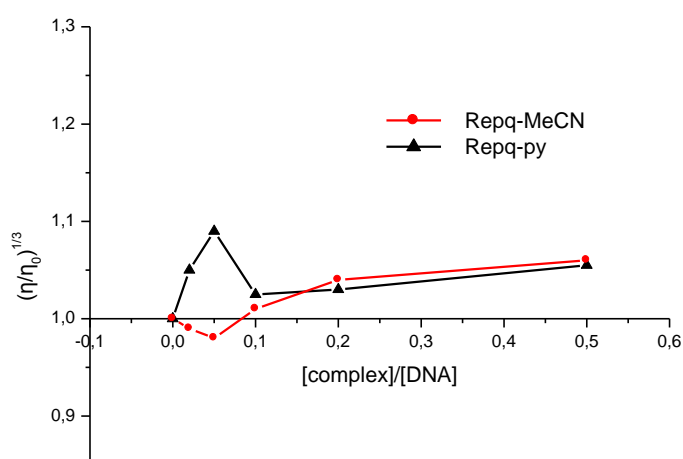
Σχήμα 9.22. Τιτλοδότηση εκπομπής των συμπλόκων Repq-MeCN (\blacktriangle) και Repq-py (\blacksquare) με το DNA. Οι εντάσεις I (παρουσία DNA) και I_0 (απουσία DNA) αφορούν την κορυφή 655 και 660 nm, αντίστοιχα.

9.3.4. Πειράματα ιξωδομετρίας (Viscosity measurements)

Οι πρώτες ενδείξεις από την τιτλοδότηση UV-Vis των συμπλόκων δείχνουν μια εξωτερικού είδους σύνδεση με το DNA, με το πυριδινικό σύμπλοκο να παρουσιάζει, πιθανότατα, περισσότερους από έναν τρόπο δέσμευσης. Η ιξωδομετρία είναι ίσως η λιγότερο αμφιλεγόμενη και αρκετά ασφαλής μέθοδος για την εξακρίβωση του τρόπου σύνδεσης.

Στο Σχήμα 9.23 φαίνεται η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των υπό μελέτη συμπλόκων (από 0.4 έως 10 μM) στο σχετικό ιξώδες του DNA (20 μM). Είναι προφανές ότι το σύμπλοκο Rerq-MeCN δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στο ιξώδες του DNA, (η αρχική μείωση του ιξώδους στο 0.98 είναι αμελητέα), κάτι που υποδηλώνει τη δέσμευση του μεταλλικού παραγώγου στην αύλακα.

Αντίθετα, το πυριδινικό σύμπλοκο παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά. Αρχικά, και σε πολύ μικρούς λόγους ($[\text{complex}]/[\text{DNA}] = 0.02, 0.05$), το σύμπλοκο Rerq-py εμφανίζει αύξηση του σχετικού ιξώδους έως και 1.10, κάτι που προτείνει την μερική παρεμβολή του συγκεκριμένου συμπλόκου στα ζεύγη βάσεων. Η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης (έως και $r=0.5$) του παραγώγου οδηγεί στη μείωση του σχετικού ιξώδους του DNA, στα επίπεδα τιμών του Rerq-MeCN, δηλώνοντας τον ίδιο τρόπο δέσμευσης των δύο συμπλόκων (τουλάχιστον σε αυτήν την περιοχή των συγκεντρώσεων).

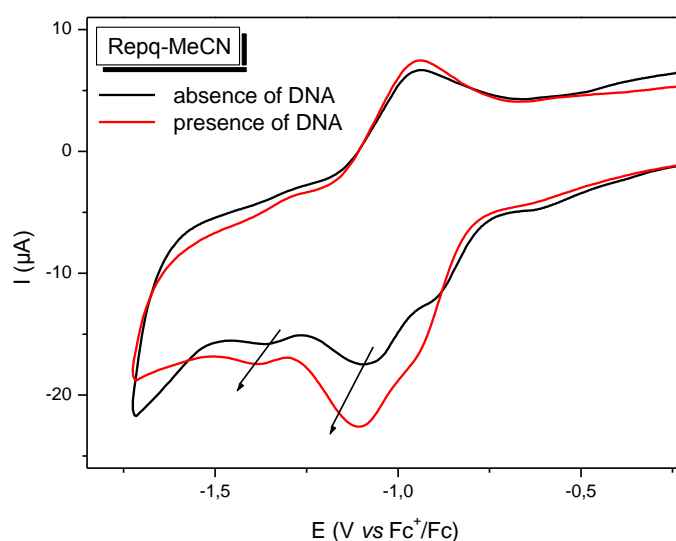


Σχήμα 9.23. Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων των συμπλόκων Rerq-MeCN (κόκκινη γραμμή) και Rerq-py (μαύρη γραμμή) στο σχετικό ιξώδες του DNA.

9.3.5. Πειράματα κυκλικής βολταμετρίας (CV experiments)

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ενός είδους παρεμβολής του Rerq-py στο DNA πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικής βολταμετρίας. Τα πειράματα έγιναν σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα, με ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s, και φέροντα ηλεκτρολύτη 50 mM NaCl. Τα CV των συμπλόκων συγκέντρωσης 100 μ M σε 1:3 DMF:ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl φαίνονται στα Σχήματα 9.24 και 9.25. Μετά την προσθήκη DNA (200 μ M) στα διαλύματα των συμπλόκων, καμία νέα οξειδοαναγωγική κορυφή δεν παρατηρείται, αλλά οι εντάσεις των ρευμάτων εμφανίζουν σημαντικές αλλαγές. Στον Πίνακα 9.5 φαίνονται τα δυναμικά των συμπλόκων και οι μετατοπίσεις μετά την προσθήκη DNA.

Στην περίπτωση του συμπλόκου Rerq-MeCN (Σχήμα 9.24) όλα τα καθοδικά δυναμικά έχουν μετατοπιστεί προς περισσότερο αρνητικές τιμές (η πρώτη αναγωγή εμφανίζει $\Delta E_{pa} = -24$ mV). Το ανοδικό δυναμικό δεν εμφανίζει κάποια αξιόλογη αλλαγή. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την δέσμευση του συμπλόκου στην αύλακα του DNA, σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα.



Σχήμα 9.24. CV του συμπλόκου Rerq-MeCN απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία (κόκκινη γραμμή) DNA.

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του Rerq-py (Σχήμα 9.25) παρουσία DNA είναι κάπως διαφορετική. Συγκεκριμένα, και σε αυτήν την περίπτωση όλα τα καθοδικά δυναμικά εμφανίζονται αρνητικά μετατοπισμένα, με την πρώτη αναγωγή να μετατοπίζεται κατά $\Delta E_{pa} = -44$ mV και τη δεύτερη κατά $\Delta E_{pa} = -101$ mV. Αντίθετα, το ανοδικό δυναμικό E_{pc}

μετατοπίζεται σε θετικότερες τιμές ($\Delta E_{pc} = +39$ mV), όπως απαιτεί η παρεμβολή. Η αντίθετη συμπεριφορά των δυναμικών υποδηλώνει την ύπαρξη δύο διαφορετικών τρόπων αλληλεπίδρασης. Συνεπώς μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το σύμπλοκο Repq-py αλληλεπιδρά με το DNA και με τους δύο τρόπους, όπως έδειξε και το πείραμα ιξωδομετρίας. Αξίζει να σημειώσουμε ότι, όσο μεγαλύτερη είναι κατά απόλυτη τιμή η μεταβολή του δυναμικού, τόσο ισχυρότερη είναι και η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA. Πράγματι, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8.5, το πυριδινικό σύμπλοκο εμφανίζει μεγαλύτερη μεταβολή από το -MeCN παράγωγο, επιβεβαιώνοντας την ισχυρότερη συγγένεια δέσμευσης του, όπως έδειξε και η σταθερά σύνδεσης.

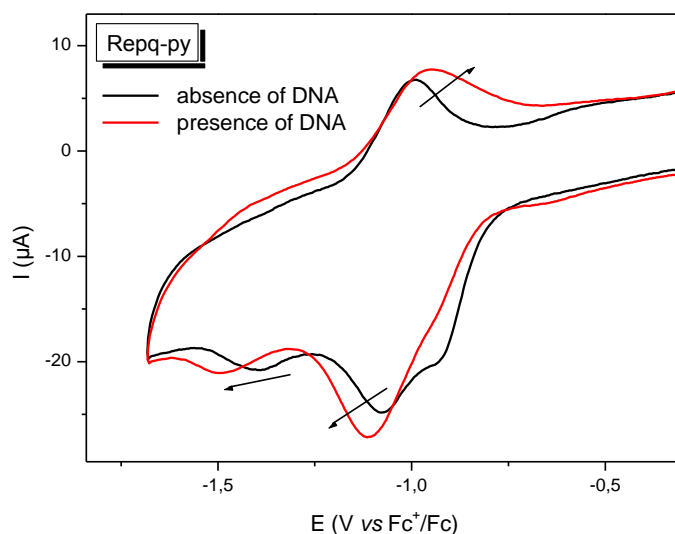
Πίνακας 9.5. Ανοδικά και καθοδικά δυναμικά (σε mV) των συμπλόκων και η μετατόπιση των δυναμικών απουσία και παρουσία DNA.

Σύμπλοκα	Ανοδικά (mV)						Καθοδικά (mV)		
	$E_{pa}^{f\ a}$	$E_{pa}^{b\ b}$	$\Delta E_{pa}^{c\ c}$	$E_{pa}^{f\ a}$	$E_{pa}^{b\ b}$	$\Delta E_{pa}^{c\ c}$	$E_{pc}^{f\ a}$	$E_{pc}^{b\ b}$	$\Delta E_{pc}^{c\ c}$
Repq-MeCN	-1090	-1114	-24	-1363	-1387	-24	-937	-937	0
Repq-py	-1077	-1121	-44	-1394	-1495	-101	-989	-950	+39

^a. $E_{pa/c}^f$: ανοδικό/καθοδικό δυναμικό για τα ελεύθερα σύμπλοκα

^b. $E_{pa/c}^b$: ανοδικό/καθοδικό δυναμικό για τα δεσμευμένα στο DNA σύμπλοκα

^c. $\Delta E_{pa/c} = E_{pa/c}^b - E_{pa/c}^f$

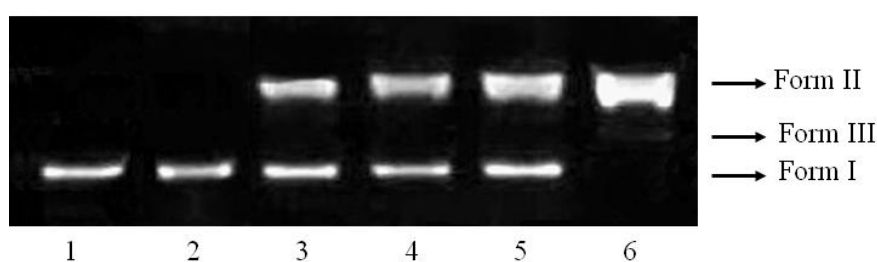


Σχήμα 9.25. CV του συμπλόκου Repq-py απουσία (μαύρη γραμμή) και παρουσία (κόκκινη γραμμή) DNA.

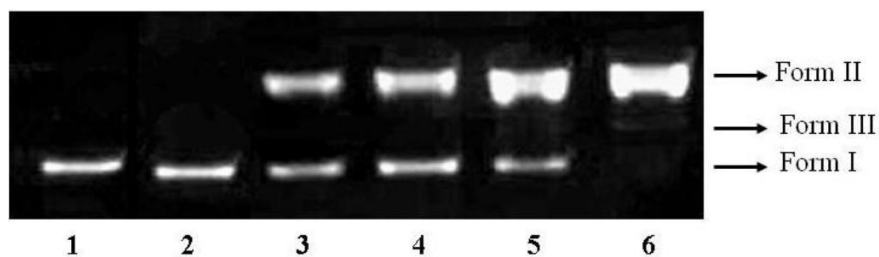
9.3.6. Μελέτη Διάσπασης του DNA (DNA cleavage studies)

Η ικανότητα των δύο νέων κατιοντικών συμπλόκων του Re(I) να διασπούν το DNA μετά από ακτινοβολία παρακολουθείται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζη, μελετώντας την κινητικότητα του πλασμιδιακού pBR322 DNA. Έτσι λοιπόν, το υπερελικομένο pBR322 DNA επωάζεται, υπό αερόβιες συνθήκες, με διαφορές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ενώσεων για 24 h και κατόπιν ακτινοβολείται για 2 h με μήκος κύματος $\lambda > 335$ nm. Οι μάντες του DNA εμφανίζονται με τη βοήθεια βρωμιδίου του αιθιδίου και φωτογραφίζονται. Τα ηλεκτροφορήματα παρουσία των συμπλόκων Repq-MeCN και Repq-py παρουσιάζονται στα Σχήματα 9.26 και 9.27, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι και τα δύο σύμπλοκα προάγουν την φωτο-διάσπαση του υπερελικομένου πλασμιδιακού pBR322 DNA. Το ελεύθερο πλασμίδιο δεν παρουσίασε καμία διάσπαση υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Επιπλέον, καμία απολύτως διάσπαση δεν παρατηρήθηκε όταν τα δείγματα επώστηκαν στο σκοτάδι, όπως φαίνεται στα lane 2 των Σχημάτων 9.26 και 9.27. Σε συγκέντρωση συμπλόκων 10 μ M παρατηρήσαμε μόνο ίχνη διάσπασης της υπερελικομένης μορφής του πλασμιδίου. Όμως, αυξανόμενης της συγκέντρωσης και των δύο συμπλόκων, το ποσοστό της μορφής I του πλασμιδιακού pBR322 DNA μειώνεται βαθμιαία, ενώ αυτό της ανοιχτής κυκλικής (nicked) μορφής II εμφανίζεται (lane 3-6 σχημάτων). Μάλιστα, τα σύμπλοκα σε συγκέντρωση 150 μ M προκαλούν πλήρη μετατροπή του υπερελικομένου DNA στη nicked μορφή (lane 6), ενώ εμφανίζονται και ίχνη της γραμμικής μορφής (linear, Form III).



Σχήμα 9.26. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (100 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου Repq-MeCN σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και $\lambda_{ir} > 335$ nm. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA+150 μ M συμπλόκου στο σκοτάδι, Lane 3-6: DNA+σύμπλοκο σε 20, 50, 100, 150 μ M, αντίστοιχα.



Σχήμα 9.27. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (100 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις του συμπλόκου Repq- γ y σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και λ_{ir} > 335 nm. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA+150 μ M συμπλόκου στο σκοτάδι, Lane 3-6: DNA+σύμπλοκο σε 20, 50, 100, 150 μ M, αντίστοιχα.

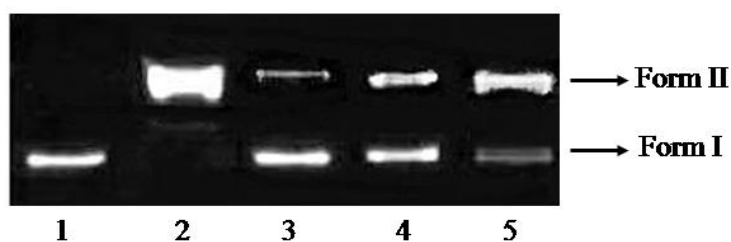
Παρατηρώντας τις εντάσεις των ζωνών του DNA, θα διαπιστώσουμε ότι δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στην φωτο-διασπαστική ικανότητα των δύο συμπλόκων. Συγκρίνοντας όμως την ένταση της Form I (lane 5 σχημάτων) θα δούμε ότι είναι λίγο ασθενέστερη για το πυριδινικό σύμπλοκο, ενώ αυτή της Form II λίγο ισχυρότερη, υποδεικνύοντας μια ελαφρώς μεγαλύτερη αποδοτικότητα στη διάσπαση. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη ισχυρότερη συγγένεια δέσμευσης του γ -y συμπλόκου, που σχολιάσαμε προηγουμένως.

9.3.7. Μηχανιστικές μελέτες (Mechanistic studies)

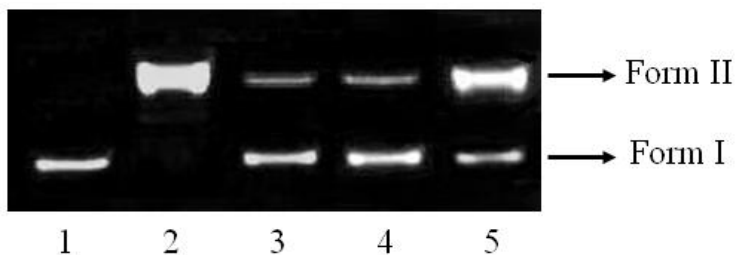
Σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε τη μηχανιστική οδό των αντιδράσεων φωτο-διάσπασης, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις DNA διάσπασης παρουσία διαφόρων παραγόντων αναστολής των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS scavengers), και τα αποτελέσματα φαίνονται στα Σχήματα 9.28 και 9.29. Τα δείγματα υπό αναερόβιες συνθήκες υποβλήθηκαν σε τρεις συνεχόμενους freeze-pump-thaw κύκλους και επώαστηκαν κλεισμένα υπό ατμόσφαιρα Ar. Από τα Σχήματα 9.28 και 9.29 (lane 3) παρατηρούμε σημαντική αναστολή της αντίδρασης διάσπασης υπό αναερόβιες συνθήκες, γεγονός που φανερώνει την κρισιμότητα του μοριακού οξυγόνου στην πορεία της διάσπασης του DNA.

Οι αντιδράσεις διάσπασης που περιλαμβάνουν μοριακό οξυγόνο μπορούν να προχωρήσουν μέσω δύο κύριων μηχανισμών. Στον πρώτο, η διεγερμένη κατάσταση του συμπλόκου μπορεί να μεταφέρει ενέργεια στο μοριακό οξυγόνο, παράγοντας το πολύ δραστικό οξυγόνο στην απλή του κατάσταση (singlet oxygen, 1O_2), μέσω του μηχανισμού τύπου II. Εναλλακτικά, το μοριακό οξυγόνο μπορεί να αναχθεί από τη διεγερμένη

κατάσταση του συμπλόκου με μεταφορά ηλεκτρονίου, παράγοντας δραστικές ρίζες υδροξυλίου (ή και συγγενικές) [98].



Σχήμα 9.28. Φωτο-διάσπαση του pBR322 DNA από 150 μM του συμπλόκου Repq-MeCN παρουσία διαφόρων αναστολέων. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA επωασμένο με 150 μM συμπλόκου, Lane 3: DNA επωασμένο με συμπλόκο υπό Ag, Lane 4: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 4 mM NaN₃, Lane 5: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 500 mM DMSO.



Σχήμα 9.29. Φωτο-διάσπαση του pBR322 DNA από 150 μM του συμπλόκου Repq-py παρουσία διαφόρων αναστολέων. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA επωασμένο με 150 μM συμπλόκου, Lane 3: DNA επωασμένο με συμπλόκο υπό Ag, Lane 4: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 4 mM NaN₃, Lane 5: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 500 mM DMSO.

Έτσι, ως αποροφητής απλού οξυγόνου (singlet oxygen scavenger) χρησιμοποιήθηκε NaN₃ [206,208] σε συγκέντρωση 4 mM και προστέθηκε στο pBR322 πριν την προσθήκη των συμπλόκων. Τα αποτελέσματα (lane 4) έδειξαν ότι παρουσία NaN₃ προκαλείται σημαντική αναστολή της απόδοσης διάσπασης, προτείνοντας την κρίσιμη συμμετοχή του ¹O₂ στο μηχανισμό. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν μελέτες παρουσία αναστολέα ριζών υδροξυλίου (hydroxyl radical scavenger), όπως το DMSO [206], και παρατηρήθηκε μερική αναστολή της αντίδρασης φωτο-διάσπασης (lane 5). Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι και το OH[•] εμπλέκεται στο μηχανισμό, αλλά σε μικρότερο βαθμό από το ¹O₂. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν φαίνεται να υπάρχει καμία διαφορά στο μηχανισμό διάσπασης του DNA που προκαλείται από τα δύο σύμπλοκα.

9.3.8. Συζήτηση

Τα δύο νέα σύμπλοκα που συντέθηκαν αλληλεπιδρούν ισχυρά με το DNA με σταθερές σύνδεσης ανάλογες με αυτές που παρατηρούνται στη βιβλιογραφία [42-44,51]. Όπως παρατηρήθηκε και για τα προηγούμενα σύμπλοκα που μελετήσαμε, έτσι και αυτά με *rq* ως υποκαταστάτη, δεν επηρεάζουν σημαντικά την θερμική σταθερότητα του DNA. Ακόμα και το γεγονός ότι τα δύο *rq*-σύμπλοκα είναι θετικά φορτισμένα (ενώ τα προηγούμενα είναι ουδέτερα) δεν φαίνεται να προκαλεί κάποια αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στο T_m του DNA.

Συγκρίνοντας τα δύο κατιοντικά σύμπλοκα μεταξύ τους θα διαπιστώσουμε μια μικρή διαφοροποίηση στον τρόπο δέσμευσης τους με το DNA, που οφείλεται στο διαφορετικό αξονικό υποκαταστάτη. Συγκεκριμένα, το MeCN-σύμπλοκο συνδέεται στην αύλακα του DNA με σταθερά σύνδεσης $6.21 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Όλα τα πειραματικά αποτελέσματα και κυρίως η ιξωδομετρία, η κυκλική βολταμμετρία, και η τιτλοδότηση ορατού, συμφωνούν στην πρόταση αυτή.

Αντίθετα, το πυριδινικό σύμπλοκο συνδέεται ελαφρώς ισχυρότερα με το DNA ($K_b=9.89 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), με έναν περισσότερο πολύπλοκο τρόπο, που περιλαμβάνει δέσμευση στην αύλακα και πιθανή μερική παρεμβολή. Τα πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας φανερώνουν χαρακτηριστικά αυτόν το διπλό τρόπο αλληλεπίδρασης, αφού παρουσιάζουν αντίθετες μετατοπίσεις τα δυναμικά τους παρουσία του βιοπολυμερούς. Ακόμα και το γεγονός της ισχυρότερης συγγένειας δέσμευσης (~1.5 φορά) με το DNA ενισχύει αυτήν την παρατήρηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η ισχυρότερη δέσμευση του *py*-συμπλόκου συγκριτικά με το -MeCN, επιβεβαιώνεται και από το μεγαλύτερο ποσοστό του παρατηρούμενου υπερχρωτισμού, αλλά πολύ περισσότερο από την μεγαλύτερη κατά απόλυτη τιμή μετατόπιση των ανοδικών δυναμικών του πυριδινικού παραγώγου.

Στο σημείο αυτό πρέπει να γίνει μια μικρή αναφορά στη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$, ώστε να γίνει κατανοητή η ύπαρξη της μερικής παρεμβολής. Όπως λοιπόν αναφέρθηκε στο κεφ. 8.3.2, ο *rq* υποκαταστάτης υιοθετεί μια επίπεδη διαμόρφωση, με το μεταλλικό κέντρο να βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο που ορίζει ο υποκαταστάτης. Επιπλέον, ο πυριδινικός υποκαταστάτης είναι σχεδόν κάθετος στο ισημερινό επίπεδο. Ως εκ τούτου, η δομή του συγκεκριμένου συμπλόκου βοηθάει να λειτουργήσει η ένωση ως πιθανός παρεμβολέας στα ζεύγη βάσεων. Βέβαια το μόριο του *rq* δεν είναι τόσο εκτεταμένος αρωματικός υποκαταστάτης όσο για παράδειγμα το *dppz*, με αποτέλεσμα να εισέρχεται στο DNA λιγότερο βαθιά και ισχυρά, από τα κλασικά *dppz* παρεμβολικά σύμπλοκα. Η έλλειψη εκτεταμένης αρωματικότητας στο μόριο του *rq* έχει

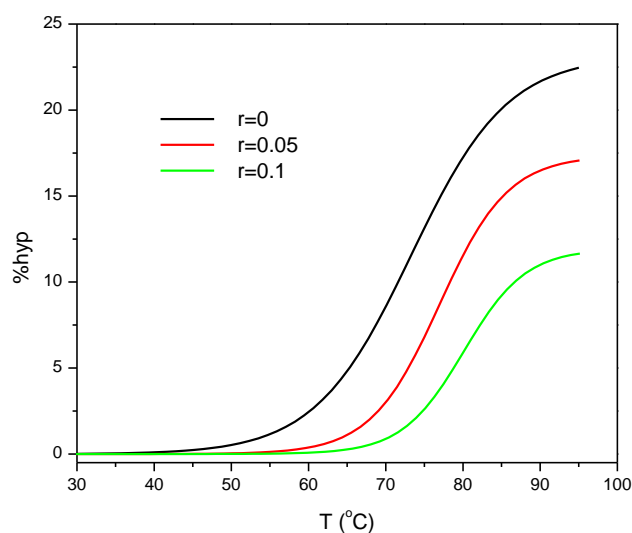
ως συνέπεια να επικρατεί η δέσμευση στις αύλακες, με επακόλουθο τη μικρότερη DNA-συγγένεια δέσμευσης συγκριτικά με το $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ που μελετήσαμε αλλά και με ανάλογα σύμπλοκα της βιβλιογραφίας [42-44,51].

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι και τα δύο σύμπλοκα μπορούν να προκαλέσουν διάσπαση του πλασμιδιακού DNA μετά από ακτινοβολήση με UV-A ακτινοβολία. Η απόδοση του πυριδινικού συμπλόκου είναι ελαφρώς μεγαλύτερη, προφανώς λόγω της ισχυρότερης δέσμευσης στο DNA. Οι μηχανιστικές μελέτες με αναστολείς δραστικών ειδών οξυγόνου απέδειξαν την κρισιμότητα του $^1\text{O}_2$ στην αντίδραση διάσπασης, αφού τα σύμπλοκα είναι μη δραστικά υπό αργό ή υπό την παρουσία αναστολέα του $^1\text{O}_2$ (NaN_3). Στην μηχανιστική οδό, βρέθηκε ότι πιθανόν να εμπεριέχεται και η ρίζα υδροξυλίου, σε μικρότερο όμως βαθμό από το $^1\text{O}_2$. Συμπερασματικά, μπορούμε να προτείνουμε ότι τα δύο διεγερμένα σύμπλοκα δρουν σαν ευαισθητοποιητές του μοριακού οξυγόνου παράγοντας με μεταφορά ενέργειας $^1\text{O}_2$, και με μεταφορά ηλεκτρονίου ρίζες υδροξυλίου. Η πρώτη διαδικασία όμως φαίνεται να είναι πιο αποδοτική. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε για το σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{dppn})(\text{CO})_3(\text{py})][\text{O}_3\text{SCF}_3]$ [44], αλλά και για αλλά διμινικά σύμπλοκα του $\text{Ru}(\text{II})$ [208,209] και του $\text{Cu}(\text{II})$ [210].

9.4. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου $\{\text{H}_2\text{TPyP}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})]_4\} \cdot 4\text{PF}_6$ με DNA

9.4.1. Πειράματα θερμικής μετουσίωσης, T_m

Η επίδραση του νέου αυτού συμπλόκου στη σταθερότητα της διπλής έλικας του DNA, μελετάται μέσω του υπολογισμού της θερμοκρασίας μετουσίωσης (T_m) του DNA απουσία και παρουσία της υπό μελέτης ένωσης. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl/NaCl (pH = 7.0), με σταθερή συγκέντρωση ως προς DNA ίση με 20 μM και μεταβαλλόμενη αυτή του συμπλόκου (1 μM και 2 μM). Με τη βοήθεια φασματοσκοπίας UV-Vis διαπιστώθηκε ότι το νέο πορφυρινικό παράγωγο χρειάζεται μόλις 10 min για επέλθει ισορροπία, αντίθετα με ότι είχαμε διαπιστώσει για τα προηγούμενα διμινικά σύμπλοκα του $\text{Re}(\text{I})$. Η καμπύλες θερμικής μετουσίωσης για διάφορες συγκεντρώσεις συμπλόκου φαίνονται στο Σχήμα 9.30 και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 9.6. Από τις καμπύλες θερμικής μετουσίωσης παρατηρούμε σταθεροποίηση τις διπλής έλικας του DNA αυξανόμενης της συγκέντρωσης του συμπλόκου, έως και 6.8 $^\circ\text{C}$ για το λόγο $r=0.1$. Εντυπωσιακή είναι επίσης η αλλαγή της παρατηρούμενης υπερχρωμικότητας, που μειώνεται έως και 50% της αρχικής.



Σχήμα 9.30. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου H₂TPyP-4Re με το DNA.

Πίνακας 9.6. Δεδομένα θερμικής μετουσίωσης και κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του πορφυρινικού συμπλόκου H₂TPyP-4Re με το DNA.

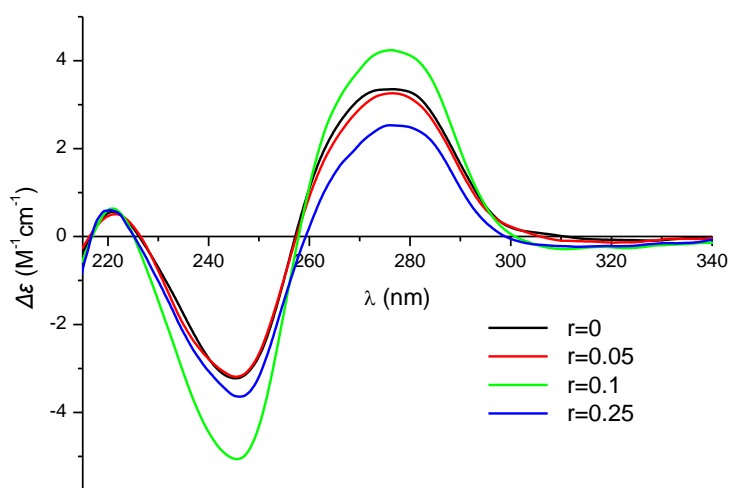
	Θερμική Μετουσίωση			Κυκλικός Διχρωισμός	
	T _m (°C)	ΔT _m	%hyp	λ (nm)	Δε (M ⁻¹ cm ⁻¹)
r=0	73.31 (±0.31)	0	22.5	277	3.35
				246	-3.22
r=0.05	76.95 (±0.24)	+3.64	17.1	277	3.26
				246	-3.19
r=0.1	80.11 (±0.64)	+6.8	11.7	277	4.23
				246	-5.06
r=0.25				277	2.53
				246	-3.64

Στο σημείο αυτό αξίζει να θυμηθούμε ότι το μονομερές σύμπλοκο Rerq-py δεν επηρεάζει τη θερμική σταθερότητα του DNA, ενώ το νέο τέτρα-ρηνικό πορφυρινικό παράγωγο προκαλεί σημαντική σταθερότητα της διπλής έλικας έως και ~7 °C. Η διαφορετική αυτή συμπεριφορά πιθανόν να οφείλεται στο υψηλό θετικό φορτίου του πορφυρινικού συμπλόκου. Κάτι άλλο που είναι άξιο σχολιασμού είναι το ποσοστό μείωσης της υπερχρωμικότητας. Τόσο για το πορφυρινικό παράγωγο, όσο και για το μονομερές πυριδινικό σύμπλοκο εμφανίζεται μείωση της %hyp έως και ~50 % (Πίνακες 8.3 και 8.6) για την ίδια γραμμομοριακή αναλογία [complex]/[DNA] (r=0.1). Αυτό,

πιθανόν να σημαίνει ότι οι τέσσερις μονάδες $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})]^+$ του πορφυρινικού συμπλόκου να προσανατολίζονται στην αύλακα του DNA με έναν ανάλογο τρόπο που προσανατολίζεται και το μονομερές σύμπλοκο.

9.4.2. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD)

Ο κυκλικός διχρωσμός είναι μια σημαντική τεχνική προκειμένου να ανιχνευθούν αλλαγές που συμβαίνουν στη διαμόρφωση του B-DNA. Στις πορφυρίνες, η τεχνική αυτή είναι από τις πρώτες φασματοσκοπικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί ο μηχανισμός δέσμευσης. Όπως αναφέραμε στο θεωρητικό μέρος οι κατιοντικές υδατοδιαλυτές πορφυρίνες εμφανίζουν επαγόμενο σήμα CD (induced CD) στην περιοχή της Soret, μετά από τη δέσμευση τους στο DNA. Συγκεκριμένα, το θετικό ICD οφείλεται στη δέσμευση στην αύλακα, ενώ το αρνητικό ICD στην παρεμβολή.



Σχήμα 9.31. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T.-DNA με το σύμπλοκο $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$.

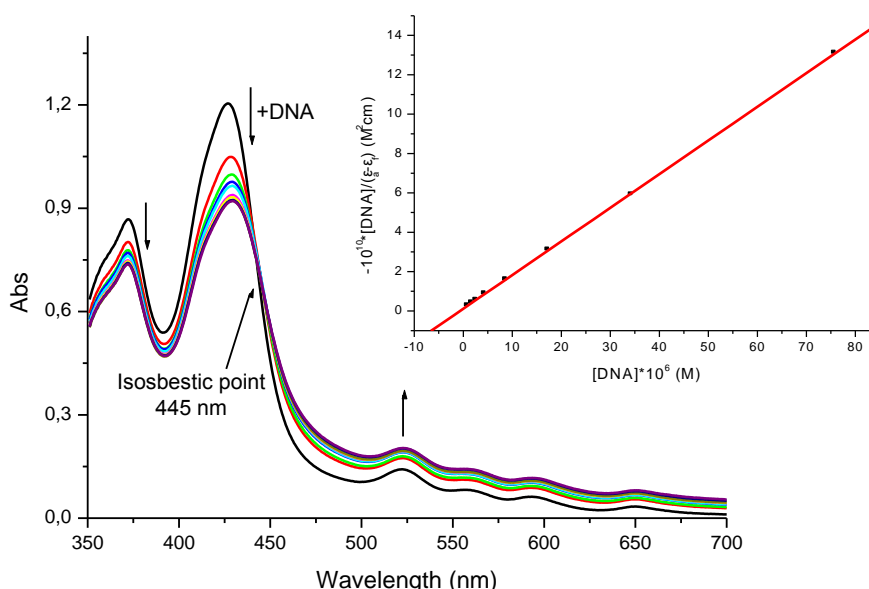
Έτσι, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης του πορφυρινικού συμπλόκου με τη βοήθεια αυτής της τεχνικής. Αρχικά, παρασκευάστηκαν διαλύματα με σταθερή συγκέντρωση DNA (50 μM) (όπως αναφέραμε και προηγουμένως), ώστε να μελετηθεί η επίδραση του συμπλόκου στη διαμόρφωση του B-DNA, και μετρήθηκε το CD στην περιοχή 200-400 nm, προκειμένου να «δούμε» το συντηρητικό φάσμα της B-δομής. Τα φάσματα CD παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων της ένωσης μας (από 2.5 έως 12.5 μM) φαίνονται στο Σχήμα 9.31 και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 8.6.

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 8.6, το σύμπλοκο δεν επιφέρει καμία αλλαγή στο μήκος κύματος της θετικής ή της αρνητικής κορυφής του DNA, σε καμία από τις δοκιμασθείσες συγκεντρώσεις. Αντίθετα, μια αρκετά σημαντική αλλαγή παρατηρείται στην ένταση τους. Πιο αναλυτικά, στη χαμηλότερη συγκέντρωση ($r=0.05$) δεν εμφανίζεται κάποια αξιοσημείωτη αλλαγή, ενώ στον λόγο $r=0.1$ έχουμε αύξηση της θετικής κορυφής (Δε από $3.35 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για το ελεύθερο DNA στα $4.23 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) και σημαντική μείωση της αρνητικής κορυφής (από -3.22 στα $-5.06 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Για το λόγο $r=0.25$ παρατηρείται αλλαγή στη συμπεριφορά, όσον αφορά τουλάχιστον την ελλειπτικότητα της θετικής κορυφής που εμφανίζεται αρκετά μειωμένη. Βέβαια, τα φάσματα CD του DNA παρουσία του συμπλόκου παραμένουν συντηρητικά, δηλαδή όσο είναι το εμβαδόν της θετικής κορυφής τόσο είναι περίπου και της αρνητικής. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA χωρίς όμως προκαλεί κάποια αλλαγή στη διαμόρφωση του.

Προκειμένου να μελετηθεί η περιοχή στη Soret band και το πιθανό επαγόμενο σήμα CD, μετρήθηκαν τα φάσματα στην περιοχή 300-500 nm, κρατώντας σταθερή αυτή την φορά τη συγκέντρωση του συμπλόκου (10 μM). Μετρήθηκε το φάσμα CD του συμπλόκου σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl και κατόπιν τιτλοδοτείται με DNA (από 1 έως 50 μM). Δυστυχώς, όμως δεν παρατηρήθηκε κάποιο επαγόμενο σήμα, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του νουκλεϊκού οξέος, όποτε η τεχνική αυτή δεν δίνει κάποιο ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τον τρόπο αλληλεπίδρασης.

9.4.3. Τιτλοδότηση UV-Vis και Εκπομπής

Αφού με τις παραπάνω τεχνικές, και κυρίως με τον κυκλικό διχρωισμό αδυνατούμε να προσδιορίσουμε με ακρίβεια τον τρόπο δέσμευσης του συμπλόκου με το DNA, η αμέσως πιο χρήσιμη τεχνική είναι αυτή της τιτλοδότησης UV-Vis. Η τεχνική αυτή μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες όχι μόνο για τον τρόπο αλλά και για την ισχύ της δέσμευσης, μελετώντας τις μεταβολές της Soret band παρουσία DNA. Συνήθως, η παρεμβολή των υδατοδιαλυτών πορφυρινών επιφέρει υποχρωμισμό μεγαλύτερο από 30 % και βαθοχρωμική μετατόπιση κατά 10 με 15 nm. Αντίθετα, οι εξωτερικές συνδέσεις επιφέρουν μέτρια επίδραση στην $\pi-\pi^*$ απορρόφηση, ενώ μετατόπιση της Soret band προς το ερυθρό δεν είναι μεγαλύτερη από 5 nm.



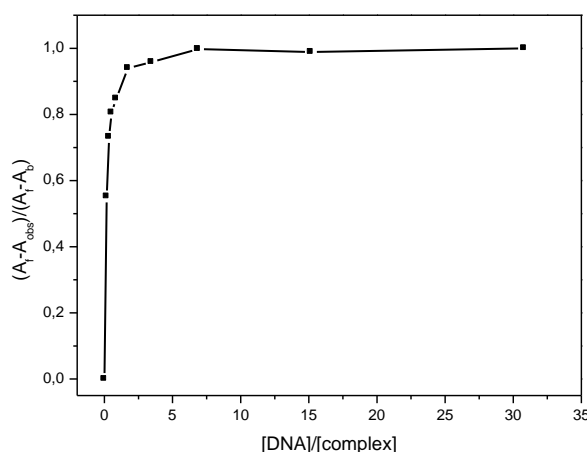
Σχήμα 9.32. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου $H_2TPyP-4Re$ ($5 \mu M$) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Το ένθετο δείχνει τη γραφική παράσταση $-10^{10} * [DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA] * 10^6$ και τη γραμμική προσαρμογή για την τιτλοδότηση απορρόφησης.

Έτσι, το πορφυρινικό σύμπλοκο σταθερής συγκέντρωσης $5 \mu M$ σε μεθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, τιτλοδοτείται με διάλυμα DNA, και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 9.32. Τόσο η Soret band (426 nm) όσο και η $\pi-\pi^*$ μετάπτωση που αποδίδεται στο pq (372 nm) εμφανίζονται μειωμένες σε ένταση μετά από προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων DNA. Ο παρατηρούμενος υποχρωμισμός φτάνει έως και 23.6% για τη Soret και 15% για την IL_{pq} . Αντίθετα, οι Q bands του πορφυρινικού δακτυλίου εμφανίζουν υπερχρωμισμό έως και 25%. Η Soret band εμφανίζει μια μικρή μετατόπιση του μεγίστου μήκους κύματος προς το ερυθρό κατά 2 nm , ενώ τόσο η IL_{pq} όσο και οι Q ταινίες δεν εμφανίζουν καμία απολύτως μεταβολή. Επιπλέον, παρατηρείται ένα ισοβεστικό σημείο στα 445 nm , ενδεικτικό της ύπαρξης ισορροπίας μεταξύ δύο ειδών στο διάλυμα, και πιθανόν να οφείλεται στην ισορροπία του ελεύθερου και του δεσμευμένου στο DNA συμπλόκου. Όπως και στο μονομερές σύμπλοκο του $Re(I)$, έτσι και σε αυτή την περίπτωση έχουμε την εμφάνιση σημείου κορεσμού στο λόγο $[DNA]/[complex]=4$, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9.33.

Η σταθερά ισορροπίας, που υπολογίστηκε με τον τρόπο που αναφέρθηκε και προηγουμένως, βρέθηκε ίση με $1.50(\pm 0.13) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, μελετώντας τις αλλαγές στη Soret band (ένθετο Σχήματος 9.32). Αν και η σταθερά σύνδεσης είναι πολύ μεγάλη και είναι ενδεικτική της παρεμβολής, εντούτοις παρατηρήθηκε μετατόπιση της Soret band μόνο

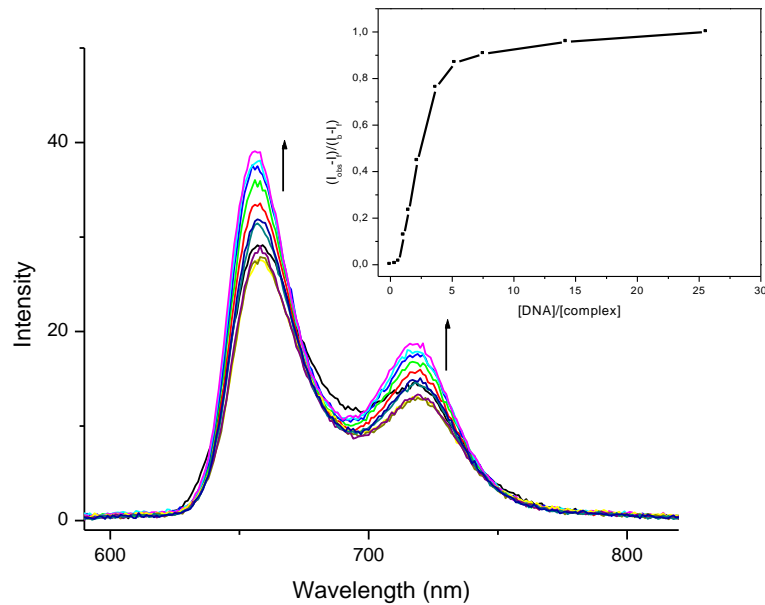
κατά 2 nm και υποχρωμισμός μόνο κατά 23.6 %. Αυτές οι μικρές αλλαγές έρχονται σε αντίθεση με την παρεμβολή. Βέβαια, πρέπει να αναφέρουμε ότι η σταθερά σύνδεσης δεν είναι ασυνήθιστα μεγάλη για πορφυρίνες που συμπλέκονται περιφερειακά με μεταλλικά κέντρα [130,132,133,211].

Επομένως, μπορεί να προταθεί ότι το πορφυρινικό παράγωγο συνδέεται με το DNA με εξωτερικής φύσεως αλληλεπιδράσεις, και πιθανότατα με την αύλακα, όπως υποδεικνύει η ερυθρή μετατόπιση της Soret band.



Σχήμα 9.33. Καμπύλη δέσμευσης τιτλοδότησης UV-Vis του συμπλόκου H₂TPyP-4Re, που παριστάνει τον κορεσμό δέσμευσης.

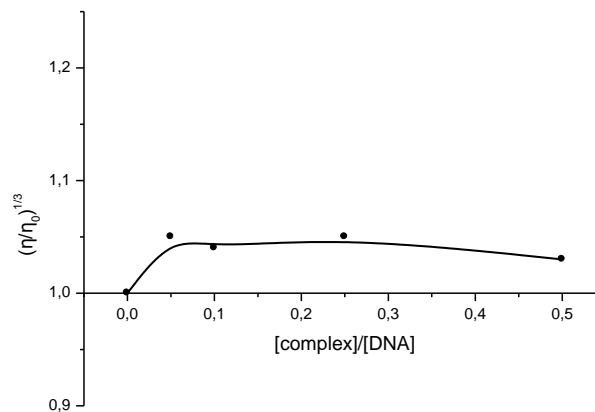
Με ανάλογο τρόπο πραγματοποιήθηκε η τιτλοδότηση φθορισμού του πορφυρινικού παραγώγου με CT-DNA και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 9.34. Το σύμπλοκο (5 μM) σε μεθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl και pH=7.0 εμφανίζει ισχυρό φθορισμό, χαρακτηριστικό του πορφυρινικού δακτυλίου (όπως άλλωστε σχολιάσαμε στην § 8.4.2) με μέγιστα στα 657 και 718 nm. Αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA παρατηρείται αύξηση της έντασης έως και 35%, χωρίς όμως να μετατοπίζεται το μέγιστο της κορυφής φθορισμού. Στο ένθετο του Σχήματος 9.34 φαίνεται η καμπύλη κορεσμού της τιτλοδότησης εκπομπής. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο κορεσμός δέσμευσης εμφανίζεται στο λόγο [DNA]/[complex]=4, στο ίδιο σημείο δηλαδή που βρέθηκε και από την τιτλοδότηση απορρόφησης. Το κλάσμα του δεσμευμένου συμπλόκου υπολογίζεται με ανάλογο τρόπο με την τιτλοδότηση απορρόφησης, και δίνεται από τον τύπο (6.5).



Σχήμα 9.34. Αλλαγές φασμάτων εκπομπής του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου H₂TPyP-4Re (5 μM) αυξανόμενης της συγκέντρωση του DNA. Το ένθετο δείχνει την καμπύλη κορεσμού.

9.4.4. Πειράματα ιξωδομετρίας (Viscosity measurements)

Έχοντας μια πρώτη ένδειξη του τρόπου αλληλεπίδρασης του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου με το DNA, μπορούμε να πραγματοποιήσουμε πειράματα ιξωδομετρίας, με σκοπό να επαληθεύσουμε τα παραπάνω ευρήματα.



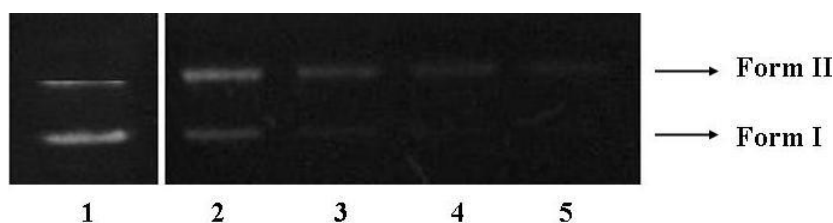
Σχήμα 9.35. Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων του συμπλόκου H₂TPyP-4Re στο σχετικό ιξώδες του DNA.

Έτσι λοιπόν, το DNA από θύμο αδένος βοοειδούς (20 μM) επωάστηκε για 10 min με διάφορες συγκεντρώσεις (από 1 έως 10 μM) του πορφυρινικού παραγώγου, και κατόπιν μετρήθηκε ο χρόνος ροής κάθε διαλύματος σε θερμοκρασία 25 °C. Με τη βοήθεια της

εξίσωσης (6.2) υπολογίστηκε το σχετικό ιξώδες και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 9.35. Παρατηρούμε λοιπόν ότι, το σχετικό ιξώδες του αρχικού διαλύματος (ελεύθερο DNA) δεν αλλάζει σημαντικά παρουσία του συμπλόκου, γεγονός που υποδηλώνει εξωτερική συναρμογή, αφού το μήκος του DNA μένει ανεπηρέαστο. Αυτό έρχεται σε συμφωνία και την τιτλοδότηση ορατού, που αναφέρθηκε παραπάνω.

9.4.5. Μελέτη Διάσπασης του DNA (DNA cleavage studies)

Υδατικά διαλύματα του κυκλικού πλασμιδιακού pBR322 DNA επώαστηκαν και ακτινοβολήθηκαν για 45 min με διάφορες συγκεντρώσεις του πορφυρινικού παραγώγου. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί η ικανότητα της υπό μελέτη ένωσης να φωτο-διασπά το DNA. Το Σχήμα 9.36 απεικονίζει το πείραμα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή, όπου στη lane 1 φαίνεται το κυκλικό υπερελικομένο πλασμίδιο pBR322 απουσία του πορφυρινικού συμπλόκου. Από το παρακάτω σχήμα παρατηρούμε ότι το πορφυρινικό παράγωγο του ρηνίου(I) προκαλεί απόσβεση του φθορισμού του βρωμιδίου του αιθιδίου, κάνοντας έτσι αδύνατο τον προσδιορισμό της θέσης του DNA πάνω στο gel (lane 3-5). Σε συγκέντρωση 15 μM (lane 3), η απόσβεση του φθορισμού είναι μικρότερη και παρατηρείται μια αμυδρή ζώνη DNA, και αποδίδεται στη μορφή II του πλασμιδίου pBR322. Με κάθε επιφύλαξη, θα μπορούσαμε να πούμε ότι σε αυτή τη συγκέντρωση το πορφυρινικό σύμπλοκο προκαλεί διάσπαση του ενός κλώνου του πλασμιδιακού pBR322 DNA. Η διάσπαση αυτή γίνεται περισσότερο εμφανής στη συγκέντρωση 10 μM του συμπλόκου (lane 2), όπου η απόσβεση είναι ακόμα μικρότερη και οι ζώνες του DNA είναι πλέον εμφανείς.



Σχήμα 9.36. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (100 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και $\lambda_{\text{ir}} > 335 \text{ nm}$. Lane 1: DNA control, Lane 2-5: DNA+σύμπλοκο σε 10, 15, 20, 50 μM , αντίστοιχα.

Το πρόβλημα που περιγράψαμε παραπάνω δεν μας επέτρεψε να προσδιορίσουμε με ασφάλεια τα δραστικά είδη οξυγόνου που εμπλέκονται στο μηχανισμό φωτο-διάσπασης.

Ακόμα και στις περιπτώσεις που οι ζώνες ήταν εμφανείς η ένταση τους ήταν αρκετά μειωμένη. Οποιαδήποτε πρόβλεψη λοιπόν είναι εξαιρετικά επισφαλής, αφού δεν μπορούμε να γνωρίζουμε εάν η μειωμένη ένταση οφείλεται στην παρουσία του αναστολέα, ή είναι προϊόν της απόσβεσης του φθορισμού του αιθιδίου.

9.4.6. Συζήτηση

Προκειμένου να βελτιωθεί η φωτο-διασπαστική ικανότητα των τρικαρβόνυλο συμπλόκων του Re(I), αποφασιστήκε να συμπλεχθεί το μεταλλικό κέντρο στα περιφερειακά άζωτα της τετρα-πυριδυλ-πορφυρίνης. Επιλέχθηκε να συμπλεχθεί η ομάδα $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{rq}]^+$ λόγω της ισχυρής κυτταροτοξικής δράσης που έχουν τα rq σύμπλοκα (θα αναφερθούμε στο επόμενο κεφάλαιο), και σε συνδυασμό με την φωτοδυναμική δράση των πορφυρινών, υποθέτουμε το νέο τετρα-ρηνικό πορφυρινικό παράγωγο $\text{H}_2\text{TPyP-4Re}$ να είναι χρήσιμο στην φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου.

Η μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA έδειξε ότι, το νέο αυτό σύμπλοκο αλληλεπιδρά πολύ ισχυρά με τις αύλακες του βιοπολυμερούς. Η σταθερά σύνδεσης που υπολογίστηκε με τη μέθοδο της τιτλοδότησης απορρόφησης βρέθηκε ίση με $1.50 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, και είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με ανάλογα ρουθηνικά πορφυρινικά σύμπλοκα της βιβλιογραφίας [130,132,133,211].

Η σταθερά σύνδεσης του συμπλόκου είναι τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη, συγκριτικά με ότι παρατηρήσαμε προηγουμένως για τα διμινικά σύμπλοκα του Re(I). Μια προφανής εξήγηση θα πρότεινε ότι αυτό οφείλεται στην παρεμβολή του πορφυρινικού δακτυλίου στα ζεύγη βάσεων του DNA. Πράγματι, ο πορφυρινικός δακτύλιος διατηρεί την επιπεδότητα του, σύμφωνα με κρυσταλλογραφικά βιβλιογραφικά δεδομένα για το τετρα-ρηνικό διπυριδινικό πορφυρινικό παράγωγο $[\text{fac}\{-\{\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})\}_4(\text{TPyP})\}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_4]$ [123]. Ως εκ τούτου το σύμπλοκο θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός παρεμβολέας για το DNA. Εντούτοις, τα πειραματικά αποτελέσματα αποκλείουν τον παρεμβολικό τρόπο σύνδεσης, όπως προτείνει ο αμελητέα αλλαγή του ιξώδους και ο μέτριος υποχρωμισμός της Soret band.

Επιπλέον, οι ογκώδεις ομάδες του ρηνίου φαίνεται να εμποδίζουν την παρεμβολή του δακτυλίου στα ζεύγη βάσεων του νουκλεϊκού οξέος, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Οι στερεοχημικές παρεμποδίσεις, διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο τρόπο αλληλεπίδρασης των κατιοντικών υδατοδιαλυτών πορφυρινών, όπως συζητήσαμε στο κεφ. 4.5.2. Έτσι, η επικρατέστερη αλληλεπίδραση πρέπει να είναι εξωτερικής φύσεως, με τις

$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})]^+$ ομάδες να προσεγγίζουν την αύλακα του DNA. Αυτό θα οδηγούσε το κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου να εισαχθεί μερικώς στις αύλακες του DNA, δίνοντας αφορμή για υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, όπως αντανακλάται από το παρατηρούμενο υποχρωμισμό της Soret band. Συνεπώς, η υψηλή δεσμευτική ισχύς του πορφυρινικού παραγώγου οφείλεται πιθανότατα στο υψηλό θετικό φορτίο της ένωσης (+4) κάτι που κάνει τις εξωτερικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες οξυγόνου του φωσφορικού σκελετού του DNA, πολύ ισχυρές [127].

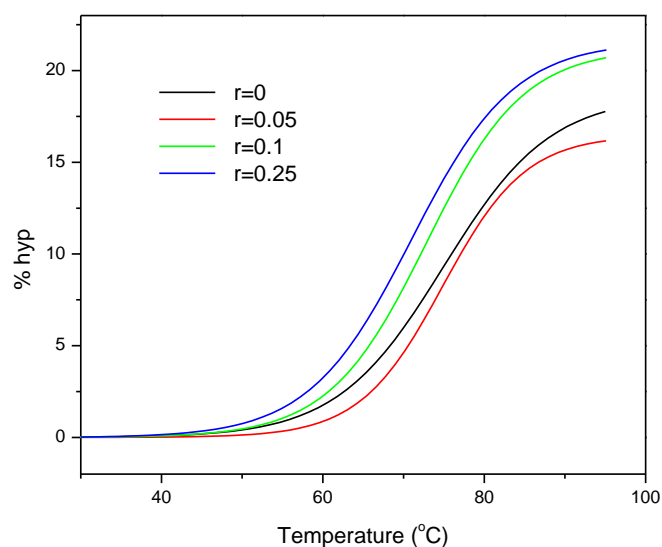
Από την τεχνική της κυκλικής βολταμετρίας δεν μπορέσαμε να πάρουμε αξιόπιστα αποτελέσματα καθώς το σύμπλοκο σε υψηλές συγκεντρώσεις και παρουσία υδατικού διαλύματος καταβυθίζεται. Σε συγκέντρωση 10 μM που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα του CV, το σήμα ήταν πολύ ασθενές και τα συμπεράσματα μη ασφαλή. Αυτός ίσως είναι και ο λόγος που δεν παρατηρήσαμε επαγόμενο σήμα κυκλικού διχρωισμού, αφού τα σήματα αυτά γενικά είναι πολύ ασθενή.

Η μελέτη της φωτο-διασπαστικής ικανότητας του πορφυρινικού παραγώγου έγινε με πειράματα ηλεκτρόφορησης. Δυστυχώς, ο φθορισμός του βρωμιδίου του αιθιδίου αποσβένεται παρουσία του πορφυρινικού συμπλόκου, κάνοντας αδύνατο τον εντοπισμό των ζωνών του DNA στο gel. Στη συγκέντρωση 10 μM που η απόσβεση είναι μικρότερη, το σύμπλοκο προκαλεί διάσπαση του πλασμιδιακού DNA. Τα προβλήματα της απόσβεσης δεν μας επέτρεψαν να προσδιορίσουμε με ακρίβεια τα δραστικά είδη οξυγόνου που εμπλέκονται στο μηχανισμό.

9.5. Αλληλεπίδραση της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl με DNA

9.5.1. Πειράματα θερμικής μετουσίωσης, T_m

Τα πειράματα θερμικής μετουσίωσης του DNA παρουσία της μεταλλοπορφυρίνης του γαλλίου(III) πραγματοποιήθηκαν μελετώντας τις αλλαγές της απορρόφησης στα 258 nm συναρτήσει της θερμοκρασίας. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl με pH=7.0. Τα δείγματα που μετρήθηκαν είχαν λόγους $r=[\text{complex}]/[\text{DNA}]=0, 0.05, 0.1, 0.25$ και προέκυψαν με κατάλληλη προσθήκη διαλύματος μεταλλοπορφυρίνης σε MeOH. Το DNA σε κάθε δείγμα είχε συγκέντρωση 20 μM . Οι καμπύλες που προκύπτουν (φαίνονται στο Σχήμα 9.37) έχουν σιγμοειδή μορφή, και με την κατάλληλη προσαρμογή σε υπολογιστικό πρόγραμμα υπολογίζεται το σημείο θερμικής μετουσίωσης T_m . Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 9.7.



Σχήμα 9.37. Καμπύλες θερμικής μετουσίωσης της αλληλεπίδρασης της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl με το DNA.

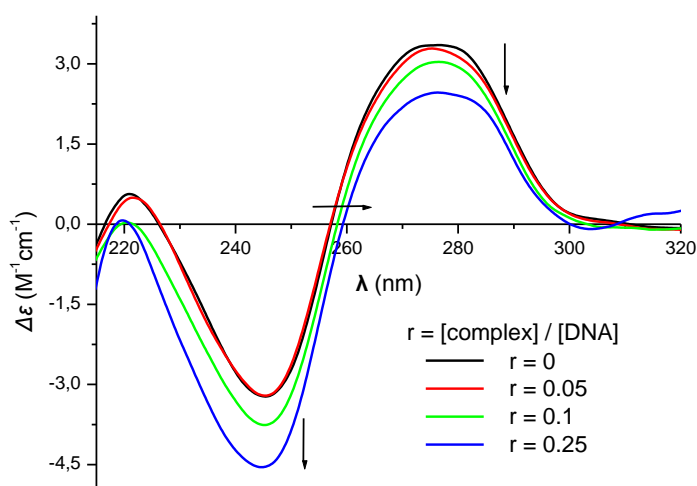
Πίνακας 9.7. Δεδομένα θερμικής μετουσίωσης και κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl με το DNA.

	Θερμική Μετουσίωση			Κυκλικός Διχρωισμός	
	T_m (°C)	ΔT_m	%hyp	λ (nm)	$\Delta\epsilon$ ($M^{-1}cm^{-1}$)
r=0	74.97 (± 0.37)	0	17.8	277	3.35
				246	-3.22
r=0.05	74.85 (± 0.27)	-0.12	16.2	277	3.28
				246	-3.21
r=0.1	72.83 (± 0.26)	-2.14	20.7	277	3.04
				245	-3.76
r=0.25	70.99 (± 0.22)	-3.98	21.1	277	2.46
				245	-4.55

Όπως διαπιστώνουμε, η παρουσία της μεταλλοπορφυρίνης προκαλεί αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας του DNA, αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της. Η μεταβολή του T_m , αλλά και της % υπερχρωμικότητας για το λόγο 0.05 είναι αμελητέα (μέσα στα πλαίσια του στατιστικού λάθους). Αντίθετα, η μεγαλύτερη μεταβολή παρατηρείται για τη γραμμομοριακή αναλογία 0.25 και είναι -3.98 °C, ενώ έχουμε και μικρή αύξηση της % hyp (από 17.8% για το ελεύθερο DNA φτάνει στο 21.1%).

9.5.2. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού (CD)

Όπως έχουμε είδη συζητήσει, οι καντιοντικές πορφυρίνες και μεταλλοπορφυρίνες δίνουν επαγόμενο σήμα κυκλικού διχρωισμού στη Soret περιοχή, ανάλογα με τον μηχανισμό δέσμευσης τους στο νουκλεϊκό οξύ. Οι περισσότερο μελετημένες πορφυρίνες στη βιβλιογραφία είναι αυτές που έχουν μεθυλιομενά τα περιφερειακά άζωτα της τετρα-πυριδιλοπορφυρίνης, κάτι που τις κάνει υδατοδιαλυτές. Η δομική ομοιότητα της υπό μελέτη μεταλλοπορφυρίνης μας με τις υδατοδιαλυτές, την καθιστά ενδιαφέρουσα στην μελέτη αλληλεπίδρασης και φωτο-επαγόμενης διάσπασης του DNA. Η σύμπλεξη του Ga(III) στην τετρα-πυριδιλοπορφυρίνη, βελτίωσε κατά πολύ τη διαλυτότητα της ελεύθερης πορφυρίνης κάτι που μας επιτρέπει να την μελετήσουμε.



Σχήμα 9.38. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της αλληλεπίδρασης του C.T.-DNA με την μεταλλοπορφυρίνη (TPyP)GaCl₃. Τα βέλη δείχνουν τη σταδιακή μετατόπιση του φάσματος.

Η περιοχή της διπλέτας του DNA μελετάται διαφορετικά από την Soret περιοχή. Αρχικά λοιπόν, παρασκευάζονται διαλύματα DNA (50 μM) κατά τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκαν και για τα πειράματα θερμικής μετουσίωσης. Εν συνεχεία καταγράφεται το φάσμα CD από 200-400 nm, απουσία και παρουσία της μεταλλοπορφυρίνης. Τα φάσματα φαίνονται στο Σχήμα 9.38, ενώ στον Πίνακα 9.7 καταγράφονται τα δεδομένα των φασμάτων αυτών. Όπως παρατηρούμε το σύμπλοκο σε χαμηλές συγκεντρώσεις ($r=0.05$) δεν επιφέρει καμιά ουσιαστική διαφορά στο διπλή κορυφή του B-δομής του DNA. Κάτι ανάλογο είχαμε παρατηρήσει και από τα πειράματα T_m . Με επιπλέον αύξηση της συγκέντρωσης της ένωσης μας, παρατηρούμε μείωση τόσο της θετικής όσο και της αρνητικής κορυφής. Η μεγαλύτερη μεταβολή της ελλειπτικότητας παρατηρείται για το λόγο $r=0.25$, που φτάνει

στα -4.55 και $+2.46 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (από -3.22 και $3.35 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για το ελεύθερο DNA). Επιπλέον, παρατηρείται και μια πολύ μικρή μετατόπιση προς το υπεριώδες κατά 1 nm για την αρνητική κορυφή. Ενδιαφέρον επίσης προκαλεί και το σημείο αλλαγής του φάσματος κυκλικού διχρωισμού του DNA. Από 258 nm που είναι για το ελεύθερο DNA (στο μέγιστο της κορυφής UV) μετατοπίζεται σταδιακά προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Μάλιστα, η μετατόπιση φτάνει έως και 2 nm για το λόγο $r=0.25$.

Συμπερασματικά, παρατηρούμε ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης της μεταλλοπορφυρίνης το CD φάσμα γίνεται σταδιακά μη συντηρητικό, αφού πλέον το εμβαδόν της αρνητικής κορυφής είναι σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό της θετικής. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με την *σταδιακή* μετατόπιση του σημείου αλλαγής τους φάσματος, υποδηλώνει την B→C μετάπτωση του DNA.

Στο σημείο αυτό αξίζει να κάνουμε μια μικρή αναφορά για τη C μορφή του DNA. Το CD φάσμα του C-DNA έχει μια αρνητική κορυφή, όπου το σχήμα, η θέση και το μέγεθος είναι παρόμοια με εκείνα της B μορφής, αλλά η θετική κορυφή πρακτικά απουσιάζει. Η C διαμόρφωση έχει παρατηρηθεί ότι λαμβάνει χώρα σταδιακά με προσθήκη μεθανόλης (από 25 έως 90 %) σε ίνες DNA και ιοντική ισχύς 0.1 M [212]. Η μετάπτωση από την B στη C διαμόρφωση λαμβάνει χώρα *σταδιακά*, σε αντίθεση με την B→A που γίνεται σχετικά απότομα σε ένα στενό εύρος συγκεντρώσεων αιθανόλης (από 65 έως 78 % v/v) [213].

Φυσικά πρέπει να τονιστεί ότι στο πείραμα μας, η συγκέντρωση της μεθανόλης σε όλα τα διαλύματα είναι ίδια και μόλις 4%, ενώ η ιοντική ισχύς ήταν 50 mM . Επομένως, οποιαδήποτε μετάπτωση οφείλεται αποκλειστικά στην αλληλεπίδραση της μεταλλοπορφυρίνης με το DNA.

Η Soret περιοχή στα πειράματα κυκλικού διχρωισμού μελετήθηκε διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση του συμπλόκου ($10 \mu\text{M}$) και προσθέτοντας DNA, κατά τον ίδιο τρόπο με το τετρα-ρηνικό πορφυρινικό σύμπλοκο. Και σε αυτήν την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε κάποιο επαγόμενο σήμα αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA.

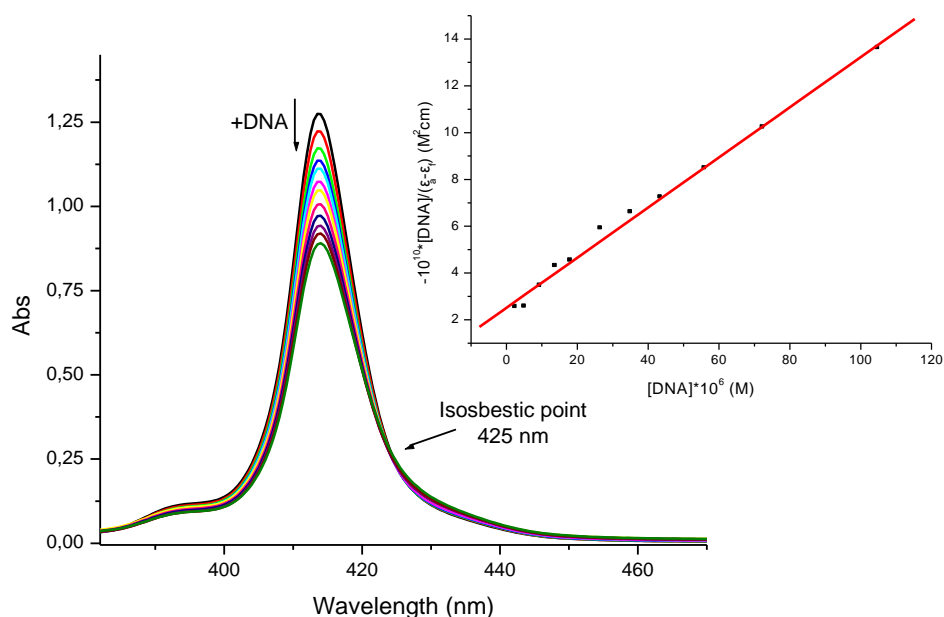
9.5.3. Τιτλοδότηση UV-Vis και Εκπομπής

Η πλέον χρήσιμη τεχνική μετά τον κυκλικό διχρωισμό για την μελέτη αλληλεπίδρασης πορφυρινών είναι η τιτλοδότηση ορατού-υπεριώδους. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν στους $25 \text{ }^\circ\text{C}$ σε μεθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH=7.0. Σε σταθερή συγκέντρωση μεταλλοπορφυρίνης ($5 \mu\text{M}$) προστίθεται όγκος διαλύματος DNA

και μετράται το φάσμα UV-Vis. Πριν από κάθε μέτρηση το σύστημα αφέθηκε προς επώαση για 3 min.

Μετά από προσθήκη CT- DNA η Soret band εμφανίζει έντονο υποχρωμισμό (έως 30%), αλλά καμία μετατόπιση του μήκους κύματος, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.39. Η εμφάνιση ενός ισοσβεστικού σημείου στα 425 nm υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μόνο αλληλεπιδρώντος συμπλόκου. Στο Σχήμα 9.40 φαίνεται ο κορεσμός του DNA από την μεταλλοπορφυρίνη. Ο έντονος υποχρωμισμός σε συνδυασμό με την μηδενική αλλαγή στο μέγιστο της Soret κορυφής προτείνει την εξωτερική σύνδεση με αυτό-στοίβαγμα (self-stacking) της μεταλλοπορφυρίνης.

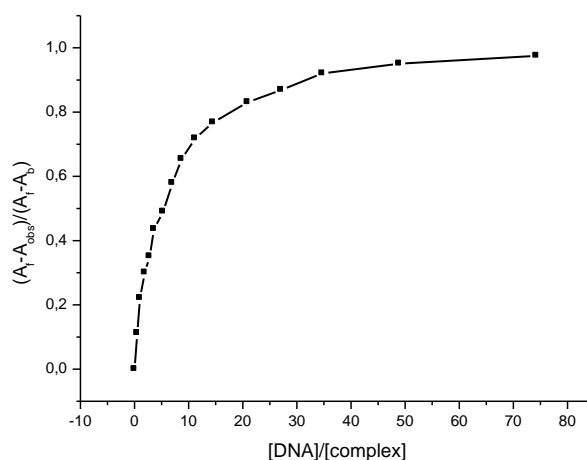
Μελετώντας τις αλλαγές της Soret band, η σταθερά σύνδεσης υπολογίστηκε ίση με $4.26(\pm 2.67) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (ένθετο Σχήματος 9.39). Η τιμή αυτή είναι αρκετά χαμηλή, κάτι που αναμένουμε λόγω της εξωτερικής σύνδεσης με αυτο-στοίβαγμα.



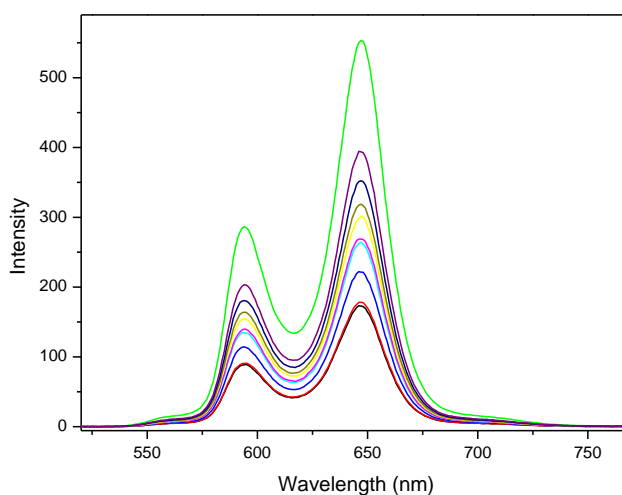
Σχήμα 9.39. Αλλαγές φασμάτων απορρόφησης της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl (5 μM) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Το ένθετο δείχνει τη γραφική παράσταση $-10^{10} * [\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[\text{DNA}] * 10^6$ και τη γραμμική προσαρμογή για την τιτλοδότηση απορρόφησης.

Η μεταλλοπορφυρίνη (5 μM) εμφανίζει έντονο φθορισμό σε μεθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα με μέγιστο στα 594 και 647 nm. Αυξανόμενης της ποσότητας του DNA παρατηρείται αύξηση της έντασης της εκπομπής και μηδενική μετατόπιση του μεγίστου των κορυφών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9.41. Από τα δεδομένα της τιτλοδότησης

φθορισμού δεν προέκυψε η κατάλληλη καμπύλη για τον αξιόπιστο υπολογισμό της σταθεράς δέσμευσης με το DNA.



Σχήμα 9.40. Καμπύλη δέσμευσης τιτλοδότησης UV-Vis της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl, που παριστάνει τον κορεσμό δέσμευσης.

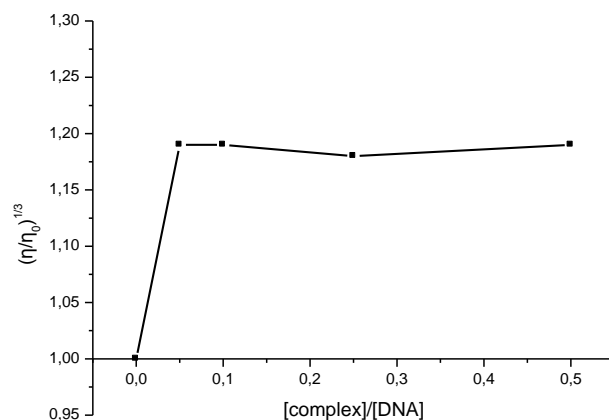


Σχήμα 9.41. Αλλαγές φασμάτων εκπομπής της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl (5 μM) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του DNA.

9.5.4. Πειράματα ιξωδομετρίας (Viscosity measurements)

Τα πειράματα ιξωδομετρίας πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C σε μεθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, σε διαλύματα που παρασκευάστηκαν όπως αναφέρθηκε στις τεχνικές T_m και CD, δηλαδή με σταθερή συγκέντρωση ως προς DNA 20μM και λόγους r=0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.50. Τα αποτελέσματα, που φαίνονται στο Σχήμα 9.42, δείχνουν σαφή αύξηση του ιξώδους του DNA από 1 σε 1.19, που είναι ίδια για όλους τους λόγους.

Η αύξηση αυτή δεν πρέπει να μας παραπλανά και να την αποδώσουμε στη παρεμβολή του πορφυρινικού δακτυλίου στα ζεύγη βάσεων του DNA. Η παρεμβολή μπορεί εύκολα να αποκλειστεί λόγω της ύπαρξης του αξονικού υποκαταστάτη Cl, που είναι συμπλεγμένος στο μέταλλο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο δακτύλιος να χάνει την επιπεδότητα του, κάτι που αυτομάτως αποκλείει την παρεμβολή. Άλλωστε, οι κρυσταλλογραφικές δομές της τετρα-φαινυλοπορφυρίνης του γαλλίου(III) με διάφορους αξονικούς υποκαταστάτες έδειξαν ότι το μεταλλικό κέντρο βρίσκεται υψηλότερα από το επίπεδο της πορφυρίνης έως και 0.530 Å [194,197]. Εξάλλου, όπως έχουμε ήδη αναφέρει στο θεωρητικό μέρος, πορφυρίνες μετάλλων που έχουν αξονικούς υποκαταστάτες δεν μπορούν δεσμευθούν μέσω παρεμβολής.



Σχήμα 9.42. Επίδραση αυξανόμενων ποσοτήτων της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl στο σχετικό ιξώδες του DNA.

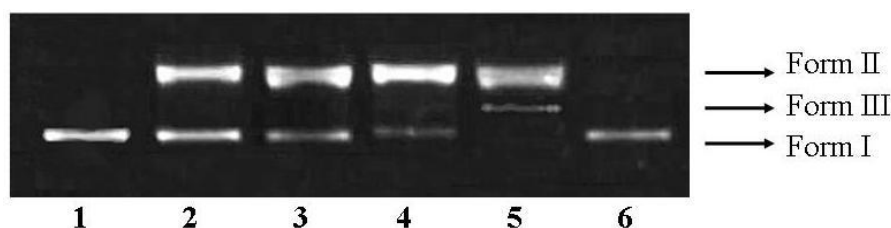
9.5.5. Μελέτη Διάσπασης του DNA (DNA cleavage studies)

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει οι πορφυρίνες είναι εξαιρετικά φωτο-δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν πολύ ενδιαφέρουσες φωτοχημικές αντιδράσεις. Ίσως, η σημαντικότερη εφαρμογή τους να είναι η χρήση τους ως φωτοευαίσθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου.

Για να διαπιστωθεί λοιπόν η φωτο-δραστικότητα της υπό μελέτη μεταλλοπορφυρίνης, μελετήθηκε η κινητικότητα του υπερελικομένου κυκλικού πλασμιδιακού pBR322 DNA, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων της ένωσης μας, με πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζη. Έτσι λοιπόν, το pBR322 DNA επωάζεται με διάφορες συγκεντρώσεις της γαλλίου(III) πορφυρίνης σε αερόβιες συνθήκες, και ακτινοβολείται για 30 min με

ακτινοβολία μήκους κύματος >335 nm. Οι μάντες του DNA πάνω στο gel εμφανίζονται με βρωμιούχο αιθίδιο, και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 9.43.

Από το Σχήμα 9.43 (lane 6) παρατηρούμε ότι η πορφυρίνη του γαλλίου(III) δεν προκαλεί καμία απολύτως διάσπαση του διπλόκλωνου υπερελικομένου πλασμιδιακού pBR322 DNA σε συνθήκες σκότους. Όμως υπό την επίδραση UV-A ακτινοβολίας για 30 min, παρατηρούμε την εμφάνιση της μορφής II του πλασμιδίου και τη σταδιακή μείωση της έντασης της μορφής I (lane 2-5). Μάλιστα, σε συγκέντρωση 10 μ M (lane 4) παρατηρούνται και ίχνη της γραμμικής μορφής III του πλασμιδιακού pBR322 DNA. Η γραμμική μορφή του πλασμιδίου γίνεται έντονα εμφανής σε συγκέντρωση 20 μ M (lane 5) του πορφυρινικού παραγώγου, ενώ η μορφή I έχει εξαφανιστεί τελείως. Έτσι λοιπόν, σε συγκεντρώσεις 2 μ M (lane 2) και 5 μ M (lane 3) το σύμπλοκο προκαλεί διάσπαση του ενός κλώνου (nicking) του πλασμιδιακού DNA, ενώ σε συγκέντρωση 20 μ M παρατηρείται πλήρες nicking του DNA (αφού η υπερελικομένη μορφή I έχει εξαφανιστεί) αλλά και σπάσιμο της διπλής έλικας (double strand break) του pBR322 DNA.

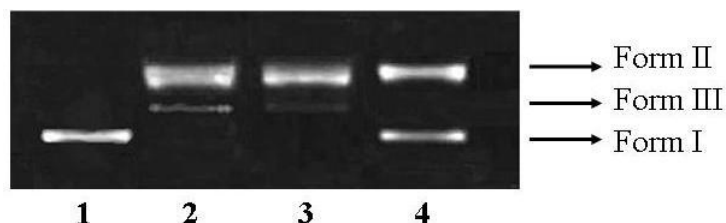


Σχήμα 9.43. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης του pBR322 DNA (100 ng) με διάφορες συγκεντρώσεις της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl σε ρυθμιστικό Tris-HCl/NaCl, pH = 7.2 και $\lambda_{ir}>335$ nm. Lane 1: DNA control, Lane 2-5: DNA+σύμπλοκο σε 2, 5, 10, 20 μ M, αντίστοιχα, Lane 6: DNA+20 μ M συμπλόκου στο σκοτάδι.

9.5.6. Μηχανιστικές μελέτες (Mechanistic studies)

Σε μια προσπάθεια εύρεσης των δραστικών ειδών οξυγόνου που εμπλέκονται στο μηχανισμό φωτο-επαγόμενης διάσπασης του DNA, πραγματοποιήθηκαν τα εξής πειράματα. Το υπερελικομένο κυκλικό πλασμιδιακό pBR322 DNA επώαστηκε με την Ga(III) μεταλλοπορφυρίνη παρουσία ROS αναστολέων και ακτινοβολήθηκε υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν και τα παραπάνω πειράματα. Τα αποτελέσματα, που φαίνονται στο Σχήμα 9.44, δείχνουν ότι παρουσία του γνωστού αναστολέα ριζών υδροξειλίου, DMSO (lane 3), δεν παρατηρείται καμία απολύτως αναστολή στην ικανότητα διάσπασης του κλώνου του DNA από την μεταλλοπορφυρίνη.

Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η υδροξυλική ρίζα OH^\bullet δεν εμπλέκεται με κανένα τρόπο στο μηχανισμό διάσπασης. Αντίθετα, παρουσία NaN_3 (lane 4), ενός γνωστού αναστολέα μονήρους οξυγόνου, παρατηρείται αισθητή μείωση της διασπαστικής ικανότητας του συμπλόκου, κάτι που υποδηλώνει την κρισιμότητα του $^1\text{O}_2$ στη μηχανιστική οδό.



Σχήμα 9.44. Φωτο-διάσπαση του pBR322 DNA από 20 μM της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl παρουσία διαφόρων αναστολέων. Lane 1: DNA control, Lane 2: DNA επωασμένο με 20 μM συμπλόκου, Lane 3: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 500 mM DMSO, Lane 4: DNA επωασμένο με συμπλόκο + 4 mM NaN_3 .

9.5.7. Συζήτηση

Η εξαιρετική φωτοδυναμική δράση των πορφυρινών σε συνδυασμό με το έντονο βιολογικό ενδιαφέρον του Ga(III), μας ώθησε να συνθέσουμε ένα νέο γάλλιο-πορφυρινάτο σύμπλοκο. Η παρουσία του μετάλλου στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου βελτιώνει την διαλυτότητα της πορφυρίνης, διευκολύνοντας έτσι την μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA.

Η μεταλλοπορφυρίνη του γαλλίου(III), βρέθηκε ότι συνδέεται στο DNA με εξωτερικής φύσεως αλληλεπιδράσεις, που περιλαμβάνουν αυτό-στοίβαγμα του ενός πορφυρινικού δακτυλίου με έναν άλλο. Αυτό το είδος της αλληλεπίδρασης είναι χαρακτηριστικό για πορφυρινικά μόρια [109,112,214]. Αυτό το συμπέρασμα προτείνεται από το έντονο υποχρωμισμό της Soret band σε συνδυασμό με την μηδενική αλλαγή του μήκους κύματος, αλλά και από την χαμηλή σταθερά σύνδεσης της υπό μελέτη μεταλλοπορφυρίνης, συγκριτικά με τις υδατοδιαλυτές πορφυρίνες [109]. Το ένα ισοσβεστικό σημείο που παρατηρήθηκε στην τιτλοδότηση UV-Vis υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μόνο είδους αλληλεπίδρασης. Από τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού, αν και δεν παρατηρήθηκε κάποιο επαγόμενο σήμα που θα επιβεβαίωνε την παραπάνω πρόταση, φαίνεται να προκαλείται μια B→C μετάπτωση της διαμόρφωσης του DNA παρουσία της Ga(III) πορφυρίνης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι πολύ σημαντικό ρόλο στη δεσμευτική ικανότητα των πορφυρινικών παραγώγων με το DNA διαδραματίζει το φορτίο των περιφερειακών ατόμων αζώτου της πυριδυλοπορφυρίνης H_2TPyP , είτε αυτό προέρχεται από την περιφερειακή σύμπλεξη μετάλλων (όπως το πορφυρινικό παράγωγο που σχολιάσαμε στην § 8.4), είτε μέσω της N-αλκυλίωσης [109], κάτι που μετατρέπει την H_2TPyP σε υδατοδιαλυτή. Και στις δύο περιπτώσεις η συγγένεια δέσμευσης με το DNA είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την υπό μελέτη πορφυρίνη, ενώ στην περίπτωση των υδατοδιαλυτών πορφυρινών έχει αποδειχθεί και η εκλεκτικότητα ως προς τα ζεύγη βάσεων [109].

Όπως αποδείχθηκε με πειράματα ηλεκτροφόρησης η Ga(III) πορφυρίνη προκαλεί αποδοτική φωτο-διάσπαση της διπλής έλικας του DNA. Αυτή η εξαιρετική ικανότητα της μεταλλοπορφυρίνης παρατηρήθηκε ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (2 μM), αλλά και πολύ λιγότερο χρόνο ακτινοβόλησης, συγκριτικά με τις ενώσεις που μελετήθηκαν προηγουμένως, αποδεικνύοντας την εξαιρετική φωτο-δραστικότητα των πορφυρινών. Η αποδόμηση του DNA φαίνεται να συμβαίνει μέσω μηχανισμού τύπου II, όπως προτείνεται από την συμμετοχή του μονήρους οξυγόνου στη πορεία διάσπασης, επιβεβαιώνοντας την ικανότητα των πορφυρινικών παραγώγων να παράγουν μονήρες οξυγόνο [215]. Έχει βρεθεί, ότι οι κατιοντικές πορφυρίνες που παρεμβάλλονται στα ζεύγη βάσεων του DNA προστατεύονται από το διαλυμένο οξυγόνο, με αποτέλεσμα την χαμηλότερη κβαντική απόδοση 1O_2 , συγκριτικά με τις εξωτερικά δεσμευμένες πορφυρίνες [216,217]. Επομένως, η εξωτερική, μέσω στοιβάγματος, σύνδεση της μεταλλοπορφυρίνης του γαλλίου(III) με το DNA και η σχετικά χαμηλή σταθερά δέσμευσης, δεν φαίνεται να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στη φωτο-διασπαστική ικανότητα της, το αντίθετο μάλιστα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

In Vitro ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

10.1. Εισαγωγή

Η αποτίμηση της κυτταροτοξικότητας των υποκαταστατών και των συμπλόκων που συντέθηκαν, έγινε με τη γνωστή μέθοδο ανάλυσης MTT [170,218]. Για τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} κατασκευάζεται γραφική παράσταση της % βιωσιμότητας των κυττάρων (εξίσωση 6.6) συναρτήσει του λογαρίθμου της συγκέντρωσης, και με προσαρμογή των δεδομένων σε σιγμοειδή καμπύλη υπολογίζεται η τιμή IC_{50} . Η τιμή αυτή είναι η συγκέντρωση (σε μM) στην οποία παρατηρείται θνησιμότητα των κυττάρων σε ποσοστό 50%, και εκφράζει το μέτρο της κυτταροτοξικότητας μιας ένωσης. Είναι προφανές λοιπόν, ότι όσο χαμηλότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο τοξικότερο θεωρείται ένα παράγωγο. Για τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} με σιγμοειδή προσαρμογή είναι απαραίτητη η ύπαρξη δύο πλατό (όπου στο πάνω έχουμε 100% βιωσιμότητα και στο κάτω περίπου 0% βιωσιμότητα κυττάρων) και μιας ενδιάμεσης γραμμικής περιοχής (όπου δίνει την τιμή 50% της βιωσιμότητας). Στις περιπτώσεις των παραγώγων που δεν επιτυγχάνεται το κάτω πλατό (λόγο κακής διαλυτότητας του παραγώγου και χαμηλής τοξικότητας) είναι αδύνατος ο προσδιορισμός της IC_{50} με ακρίβεια. Στην περίπτωση αυτή δίνεται προσεγγιστικά η τιμή όπου το παράγωγο προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 50% [219].

Όλα τα παράγωγα δοκιμάστηκαν σε τρεις ανθρώπινες καρκινικές σειρές, την **MCF-7** (breast cancer), **PC-3** (prostate cancer) και **T98G** (glioblastoma) και συγκρίνονται με το γνωστό αντικαρκινικό φάρμακο cisplatin (positive control). Η κάθε κυτταρική σειρά επώαστηκε για 72 h με ένα εύρος συγκεντρώσεων (από 0.01 έως 250 μM) και προσδιορίζεται το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας σε κάθε συγκέντρωση. Κάθε σημείο της γραφικής παράστασης (όπως αυτή που απεικονίζεται στο Σχήμα 10.1) εμφανίζεται ως η μέση τιμή \pm την τυπική απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι τιμές IC_{50} όλων των παραγώγων που μελετήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 10.1.

Πίνακας 10.1. Κυτταροτοξικές μελέτες των δοκιμασθέντων ενώσεων έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών T98G, PC3 και MCF-7. Οι τιμές IC₅₀ (σε μM) παριστάνονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.

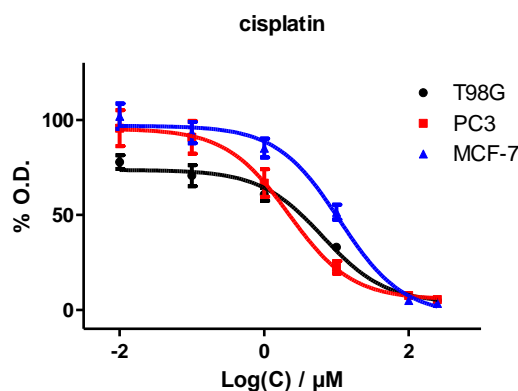
Ενώσεις	IC ₅₀ ± S.D. (μM)		
	T98G	PC3	MCF-7
phendione	4.91 ± 2.06	3.01 ± 1.72	2.45 ± 0.71
dppz	6.39 ± 0.69	3.64 ± 2.04	7.08 ± 1.26
dppz-ester	~50 ^a	~50 ^a	~50 ^a
pq	~200 ^a	~200 ^a	~200 ^a
Re(CO) ₅ Cl	~200 ^a	~200 ^a	~200 ^a
Re(phendione)Cl	~60 ^a	~60 ^a	~50 ^a
Re(dppz-ester)Cl	~50 ^a	~60 ^a	~50 ^a
Repq-Cl	18.57 ± 3.98	15.67 ± 2.79	11.52 ± 2.76
Repq-MeCN	28.97 ± 6.98	22.10 ± 6.99	22.04 ± 7.88
Repq-py	~100 ^a	34.12 ± 6.30	33.36 ± 7.39
H ₂ TPyP-4Re	* ^b	* ^b	* ^b
(TPyP)GaCl	~70 ^a	21.79 ± 6.22	19.14 ± 5.80
cisplatin	6.45 ± 1.64	2.19 ± 0.11	11.06 ± 2.49

^a Συγκέντρωση που απαιτείται για την αναστολή της O.D. κατά περίπου 50%. Δεν προσδιορίστηκε ακριβής τιμή IC₅₀.

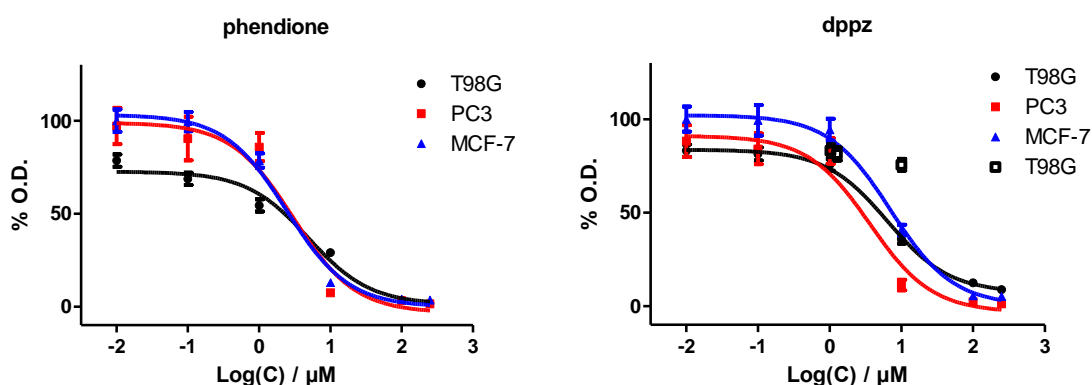
^b Η O.D. είναι μεγαλύτερη από 90% στη συγκέντρωση των 10 μM.

10.2. Κυτταροτοξική μελέτη των συμπλόκων Re(CO)₃(phendione)Cl, Re(CO)₃Cl[dppz-3,6-(COOEt)₂] και των αντίστοιχων υποκαταστατών

Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 2.6, ο υποκαταστάτης phendione παρουσιάζει ισχυρή αντικαρκινική δράση τόσο ελεύθερος όσο και συμπλεγμένος σε κάποιο μεταλλικό κέντρο για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε και συμπλοκοποιήθηκε. Προσδιορίστηκε η κυτταροτοξική δράση του αντίστοιχου Re(I) συμπλόκου, του πρόδρομου μορίου Re(CO)₅Cl και του υποκαταστάτη phendione, έναντι των παραπάνω κυτταρικών σειρών και συγκρίθηκαν με εκείνες του cisplatin (Σχήμα 10.1). Οι καμπύλες της % OD συναρτήσει του λογαρίθμου της συγκέντρωσης του κάθε παραγώγου φαίνονται στα Σχήματα 10.1 και 10.2, ενώ οι τιμές IC₅₀ συνοψίζονται στον Πίνακα 10.1.



Σχήμα 10.1. Καμπύλες δόσης-απόκρισης του cisplatin έναντι των κυτταρικών σειρών T98G (μαύρο χρώμα), PC3 (κόκκινο χρώμα) και MCF-7 (μπλε χρώμα).

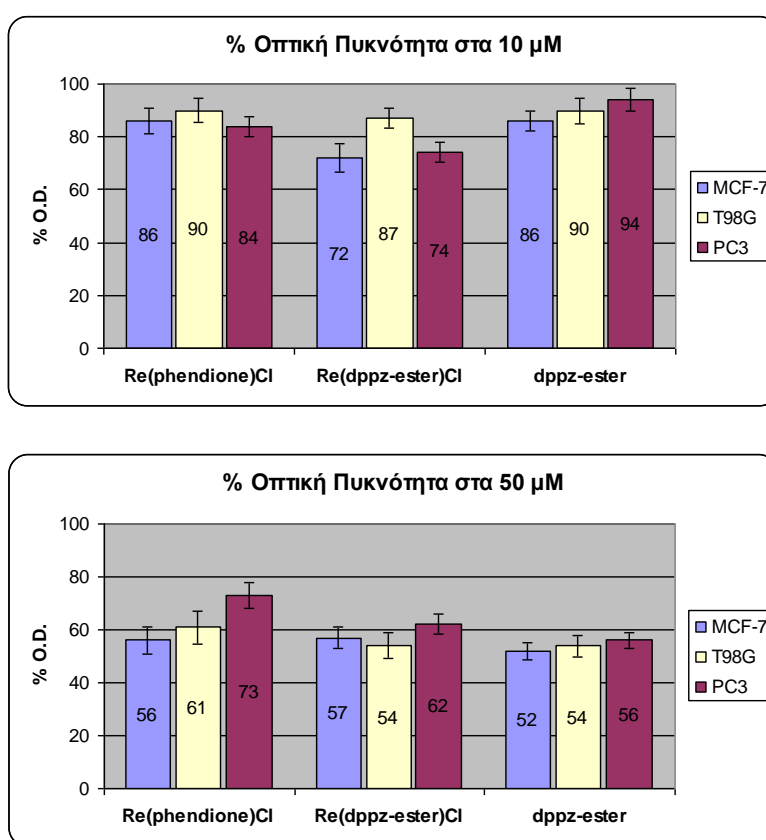


Σχήμα 10.2. Καμπύλες δόσης-απόκρισης των υποκαταστάτων phendione (αριστερά) και dppz (δεξιά) έναντι των κυτταρικών σειρών T98G, PC3 και MCF-7.

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 10.1 ο ελεύθερος υποκαταστάτης είναι εξαιρετικά τοξικός έναντι των κυτταρικών σειρών T98G ($IC_{50}=4.91 \mu M$), PC3 ($IC_{50}=3.01 \mu M$) και MCF-7 ($IC_{50}=2.45 \mu M$), και μάλιστα περισσότερο και από το cisplatin. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα που αναφέρουν την ισχυρή τοξικότητα του εν λόγω υποκαταστάτη έναντι διαφόρων άλλων κυτταρικών σειρών [68-70]. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφέρουμε ότι οι τιμές IC_{50} ως προς τις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές δεν έχουν αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία, και επιβεβαιώνουν τη μη-εκλεκτική τοξικότητα του φαινανθρολινικού παραγώγου.

Η οριακή διαλυτότητα σε συνδυασμό με την χαμηλή τοξικότητα του αντίστοιχου συμπλόκου $Re(CO)_3(phendione)Cl$ δεν μας επέτρεψε τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} , αφού δεν μπορέσαμε να φτάσουμε σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (ώστε να μπορεί να

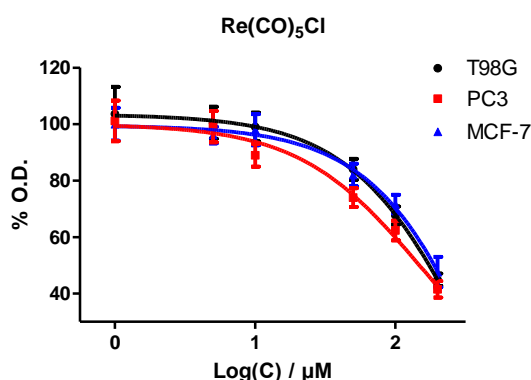
σχηματίζεται το κάτω plateau της σιγμοειδούς καμπύλης). Στο σημείο αυτό πρέπει να θυμίσουμε ότι η συγκέντρωση του DMSO στο τελικό διάλυμα δεν μπορεί να ξεπερνά το 1% (σε υψηλότερα ποσοστά το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα). Όπως φαίνεται από το Σχήμα 10.3 το συγκεκριμένο σύμπλοκο δεν είναι δραστικό σε συγκέντρωση 10 μM . Όμως, σε συγκέντρωση 50 μM του συμπλόκου η % βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται εν συγκρίσει με το control σε ποσοστό τουλάχιστον 45%, 40% και 27% για τα MCF-7, T98G και PC3 κύτταρα, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το πρόδρομο μόριο $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ προκαλεί, σε ποσοστό περίπου 50% μείωση της οπτικής πυκνότητας, μόνο στην πολύ υψηλή συγκέντρωση των 200 μM (Σχήμα 10.4).



Σχήμα 10.3. Επίδραση της συγκέντρωσης 10 μM (πάνω) και 50 μM (κάτω) των παραγώγων $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$, $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ και dppz-ester στην % οπτική πυκνότητα MCF-7, PC3 και T98G. Ο αριθμός μέσα στις μπάρες δείχνει το % ποσοστό των ζωντανών κυττάρων παρουσία της υπό μελέτη ένωσης.

Όμοια με το $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$, το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ εμφανίζει μέτρια κυτταροτοξική δράση και σε συνδυασμό με την οριακή διαλυτότητα του σε DMSO, ήταν αδύνατος ο προσδιορισμός της IC_{50} . Από το Σχήμα 10.3 παρατηρούμε ότι και το $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ σύμπλοκο είναι μη δραστικό στη συγκέντρωση των 10 μM , ενώ στη συγκέντρωση

των 50 μM η OD μειώθηκε περίπου κατά 50%. Ο ελεύθερος υποκαταστάτης dprz-ester εμφανίζει όμοια τοξικότητα με το αντίστοιχο σύμπλοκο (Σχήμα 10.3). Αντίθετα, ο μη υποκατεστημένος dprz υποκαταστάτης επιδεικνύει ισχυρή τοξικότητα (Σχήμα 10.2), παρόμοια με του cisplatin, όπως φαίνεται στον Πίνακα 10.1. Εξίσου ισχυρή τοξικότητα εμφανίζει ο dprz υποκαταστάτης και σε άλλες καρκινικές σειρές, όπως τον καρκίνο του παχέος εντέρου (colon cancer – WIDR και HT-29 cells), του πνεύμονα (lung cancer – H266 cells) ή του νεφρού (renal cancer – A498 cells), όπως αναφέρθηκε πρόσφατα στη βιβλιογραφία [67,220].



Σχήμα 10.4. Καμπύλες δόσης-απόκρισης του $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$, έναντι των T98G, PC3 και MCF-7 κυττάρων.

Το dprz έχει περίπου την ίδια τοξικότητα με το παράγωγο rhendione, σε όλες τις δεικμασθείσες κυτταρικές σειρές. Το παράγωγο που προκύπτει από την περαιτέρω τροποποίηση του εκτεταμένου επίπεδου αρωματικού υποκαταστάτη με δύο εστερομάδες (dprz-ester) έχει συγκριτικά με το παράγωγο rhendione πολύ μικρή τοξικότητα. Οι συμπλοκοποιημένοι υποκαταστάτες με $\text{Re}(\text{I})$ έχουν μικρότερη τοξικότητα. Σύμφωνα με πρόσφατως δημοσιευμένα αποτελέσματα, σημαντική μείωση παρατηρήθηκε ακόμα και όταν οι rhendione και dprz υποκαταστάτες συμπλέκονται στον $\text{Pt}(\text{II})$ [67].

10.3. Κυτταροτοξική μελέτη του υποκαταστάτη rh και των αντίστοιχων $\text{Re}(\text{I})$ συμπλόκων

Ο κιννοξαλινικός δακτύλιος απαντάται σε ένα μεγάλο αριθμό φυσικών ενώσεων όπως στη ροβοφλαβίνη (riboflavin – Βιταμίνη Β2), στα φλαβοένζυμα (flavoenzymes) και άλλα. Επιπλέον, κιννοξαλινικά παράγωγα έχουν έντονη βιολογική δράση, και χρησιμοποιούνται σαν αντιβακτηριακοί, αντικαρκινικοί, αντικαρκινικοί και αντιμυκητιακοί παράγοντες [221-223].

Μάλιστα, η αντιβιοτική τους δράση φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της παρεμβολής στο DNA. Επιπλέον, αλογονο-υποκατεστημένοι κινοξαλινικοί δακτύλιοι είναι ανάμεσα στους πιο δραστικούς αντικαρκινικούς φορείς, σε ευρύ φάσμα μορφών καρκίνου [224]. Μελέτες έχουν δείξει ότι ακόμα και μια μικρή υποκατάσταση στον κινοξαλινικό δακτύλιο μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Το πυριδύλ-υποκατεστημένο κινοξαλινικό παράγωγο (pq), αν και είναι γνωστό από το 1993 και έχει συμπλεχθεί σε ένα πολύ μεγάλο αριθμό μετάλλων, εντούτοις η βιολογική του δράση δεν έχει ακόμα μελετηθεί. Στην παρούσα διατριβή γίνεται μια πρώτη προσπάθεια να μελετηθεί η *in vitro* τοξικότητα τόσο του ελεύθερου υποκαταστάτη, όσο και συμπλόκων του με ρήνιο(I), σε διαφορετικές καρκινικές σειρές.

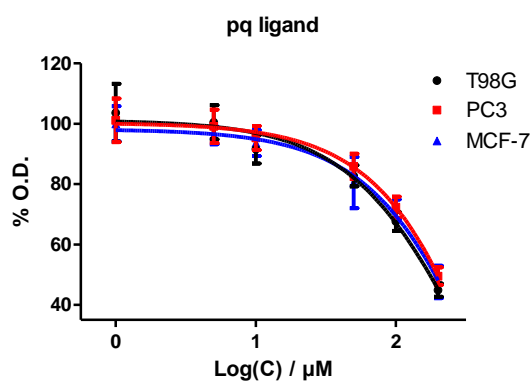
Έτσι λοιπόν, χρησιμοποιώντας την MTT μέθοδο, μελετήθηκε η κυτταροτοξική δραστηριότητα του ελεύθερου υποκαταστάτη και των αντίστοιχων συμπλόκων του Re(I), έναντι τριών καρκινικών σειρών, T98G, PC3 και MCF-7. Για λόγους σύγκρισης μελετήθηκε και το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})\text{Cl}$, που χρησιμοποιήθηκε σαν πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των δύο κατιοντικών συμπλόκων. Οι τιμές IC_{50} συνοψίζονται στον Πίνακα 10.1 και οι καμπύλες δόσης-απόκρισης φαίνονται στα Σχήματα 10.5-10.7. Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται αμέσως εμφανές ότι, ο pq υποκαταστάτης παρουσιάζει, συγκριτικά με το cisplatin και τους άλλους υποκαταστάτες, αμελητέα κυτταροτοξική επίδραση και στις τρεις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκε, προκαλώντας περίπου 50% μείωση της OD στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 200 μM .

Αντίθετα, όταν ο υποκαταστάτης συμπλεχθεί στο ρήνιο παρατηρείται σημαντική αύξηση της τοξικότητας, και των τριών συμπλόκων με τους διαφορετικούς αξονικούς υποκαταστάτες. Το ουδέτερο χλωρο-σύμπλοκο (Repq-Cl) έχει τιμές IC_{50} συγκρίσιμες με εκείνες του cisplatin, και μάλιστα για τα καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF-7) η τοξικότητα βρέθηκε ίδια με εκείνη του αντικαρκινικού φαρμάκου. Συγκεκριμένα, οι τιμές IC_{50} είναι 18.57, 15.67 και 11.52 μM έναντι των T98G, PC3 και MCF-7 κυττάρων, αντίστοιχα. Στο μόριο που προκύπτει αντικαθιστώντας το χλώριο από την αξονική θέση με MeCN, παρατηρείται μείωση της τοξικότητας κατά περίπου 1.5-φορά για τα T98G ($\text{IC}_{50}=28.97 \mu\text{M}$) και PC3 ($\text{IC}_{50}=22.10 \mu\text{M}$) κύτταρα και κατά ~2-φορές για τα MCF-7 ($\text{IC}_{50}=22.04 \mu\text{M}$). Παρόλα αυτά, και αυτό το σύμπλοκο είναι περισσότερο τοξικό έναντι της MCF-7 κυτταρικής σειράς, με τιμή IC_{50} περίπου 2-φορές μεγαλύτερη από του cisplatin. Το πυριδινικό σύμπλοκο είναι ακόμα λιγότερο τοξικό από τα δύο προηγούμενα. Οι τιμές IC_{50} έναντι των MCF-7 (33.59 μM) και PC3 (34.12 μM) κυττάρων είναι παρόμοιες μεταξύ τους. Εντύπωση όμως προκαλεί το γεγονός ότι το σύμπλοκο είναι μη

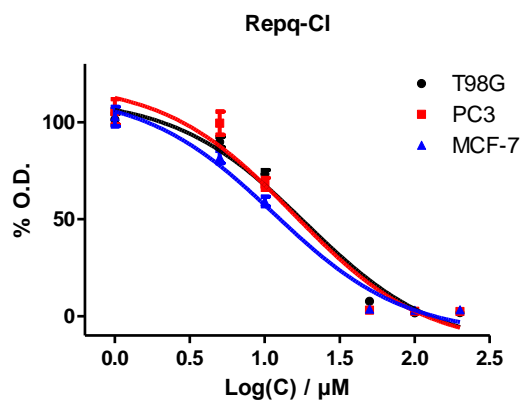
τοξικό έναντι των T98G κυττάρων, με το IC_{50} να είναι περίπου 100 μM . Αυτό πιθανόν να υποδηλώνει διαφοροποιημένη συμπεριφορά του συγκεκριμένου παραγώγου σε κάποιες κυτταρικές σειρές, που μπορεί να οφείλεται σε παράγοντες όπως το pH της καλλιέργειας, στην κυτταρική πρόσληψη κλπ.

Η πολύ μεγάλη διαφορά στην τοξικότητα του ελεύθερου υποκαταστάτη και στα αντίστοιχα σύμπλοκα, μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι σε διάλυμα ο ρq βρίσκεται σε cis-διαμόρφωση (Σχήμα 8.8), ενώ όπως έχει αποδειχθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, ο υποκαταστάτης αποκτά επίπεδη διαμόρφωση μετά από τη σύμπλεξη του με το ρήνιο(I). Η επίπεδη διαμόρφωση πιθανόν να δίνει τη δυνατότητα για μια πιο ισχυρή δέσμευση με το DNA, βελτιώνοντας έτσι τη δραστηριότητα των συμπλόκων.

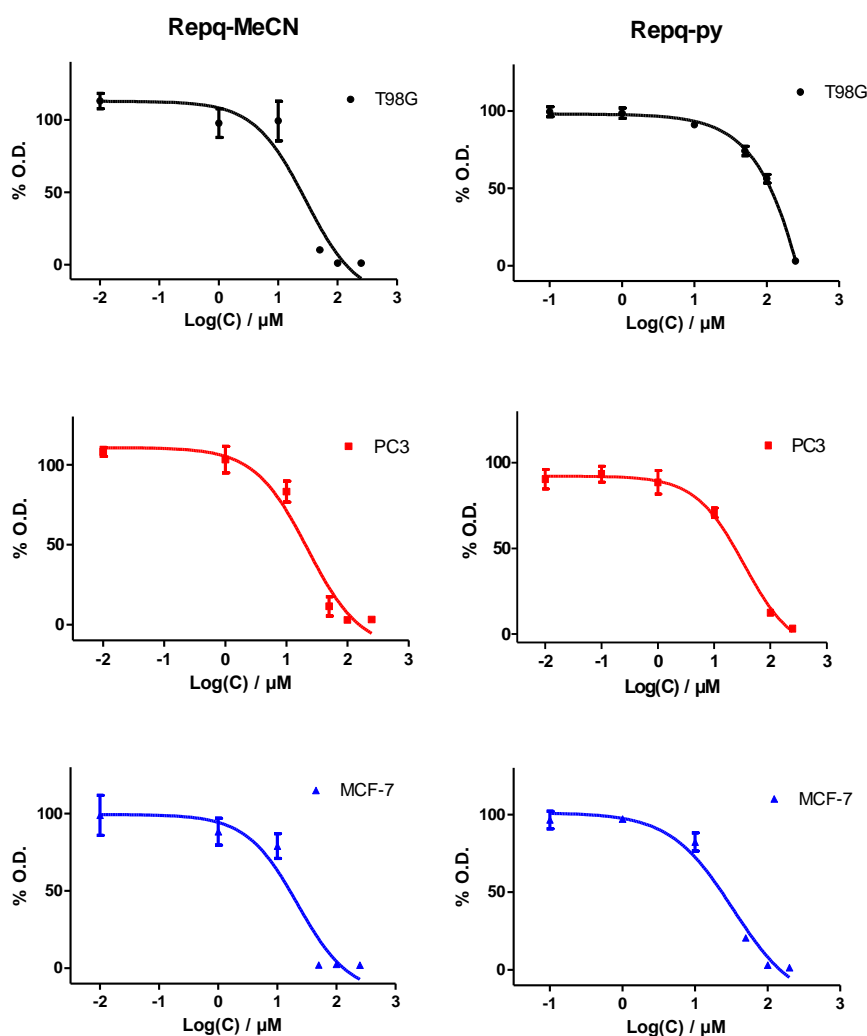
Η μελέτη των τριών ρq συμπλόκων φανερώνει την κρισιμότητα τόσο του αξονικού υποκαταστάτη, όσο και του φορτίου του συμπλόκου στο κυτταρικό περιβάλλον. Να θυμίσουμε ότι το ουδέτερο $-\chi\lambda\omega\rho -\rho q$ σύμπλοκο είναι περισσότερο τοξικό από τα κατιοντικά $-\rho q$ σύμπλοκα. Βέβαια ο μηχανισμός δράσης δεν είναι γνωστός. Περαιτέρω πειράματα σταθερότητας στο πλάσμα, σε υπερκείμενα καλλιιεργειών ή πειράματα κυτταρικής πρόσληψης και εντοπισμού θα βοηθούσαν στην κατανόηση της επίδρασης του αξονικού υποκαταστάτη και του φορτίου του συμπλόκου.



Σχήμα 10.5 Καμπύλες δόσης-απόκρισης του ρq υποκαταστάτη, έναντι των T98G, PC3 και MCF-7 κυττάρων.



Σχήμα 10.6. Καμπύλες δόσης-απόκρισης του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})\text{Cl}$ (Repq-Cl) έναντι των κυτταρικών σειρών T98G, PC3 και MCF-7.



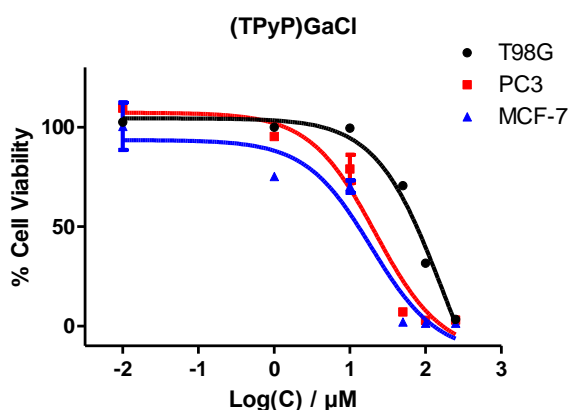
Σχήμα 10.7. Καμπύλες δόσης-απόκρισης των κατιοντικών συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{MeCN})]^+$ (Repq-MeCN) (αριστερά) και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]^+$ (Repq-py) (δεξιά) έναντι των κυτταρικών σειρών T98G, PC3 και MCF-7.

10.4. Κυτταροτοξική μελέτη του τετρα-ρηνικού πορφυρινικού συμπλόκου H₂TPyP-4Re

Ο σχηματισμός συσσωματωμάτων (aggregation) του πορφυρινικού παραγώγου σε υδατικά διαλύματα, που συζητήσαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, περιόρισε πολύ την δυνατότητα κυτταροτοξικής μελέτης του συμπλόκου. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10 μM το σύμπλοκο καταβυθιζόταν, χρωματίζοντας τα plates που έγινε το πείραμα. Αυτό εμπόδιζε την ακριβή μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος των κρυστάλλων φορμαζάνης. Στη συγκέντρωση των 10 μM το πορφυρινικό παράγωγο δεν προκαλεί κάποια αξιοσημείωτη αναστολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα, για όλες τις κυτταρικές σειρές η κυτταρική βιωσιμότητα είναι περίπου 90 % παρουσία 10 μM του παραγώγου.

10.5. Κυτταροτοξική μελέτη της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl

Η τοξικότητα του συγκεκριμένου παραγώγου εκτιμήθηκε με τη βοήθεια της MTT μεθόδου έναντι των T98G, PC3 και MCF-7 καρκινικών κυττάρων. Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης της Ga(III) πορφυρίνης φαίνονται στο Σχήμα 10.8 και οι τιμές IC₅₀ που υπολογίστηκαν με προσαρμογή των δεδομένων σε σιγμοειδή καμπύλη συνοψίζονται στον Πίνακα 10.1. Η μεταλλοπορφυρίνη επιδεικνύει αρκετά ισχυρή τοξική δράση έναντι των MCF-7 και PC3 κυττάρων με τιμές IC₅₀ ίσες με 19.14 και 21.79 μM , ενώ η κυτταροτοξικότητα της είναι μειωμένη έναντι τις κυτταρικής σειράς T98G (IC₅₀>50 μM). Η περιορισμένη διαλυτότητα δεν επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της τιμής IC₅₀ για τα T98G κύτταρα.

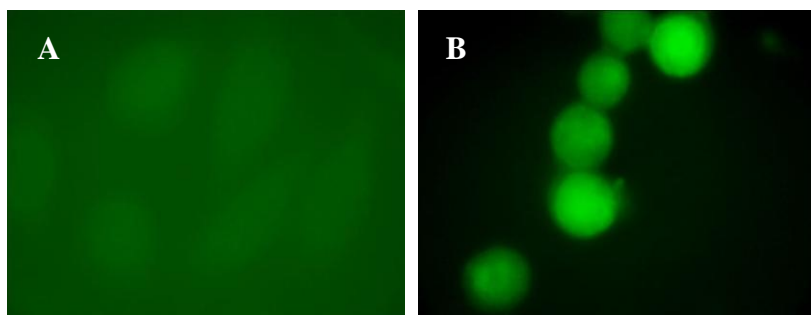


Σχήμα 10.8. Καμπύλες δόσης-απόκρισης της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl έναντι των κυτταρικών σειρών T98G, PC3 και MCF-7.

Μια σύγκριση της *ουδέτερης* μεταλλοπορφυρίνης με τις κατιοντικές υδατοδιαλυτές πορφυρίνες (TMPyP) και μεταλλοπορφυρίνες (TMPyP·M) θα ήταν πολύ χρήσιμη, ώστε να διαπιστωθεί η κρισιμότητα του φορτίου στην τοξικότητα των πορφυρινών. Έτσι λοιπόν, με μια πρώτη ματιά διαπιστώνουμε ότι η υπό μελέτη ουδέτερη μεταλλοπορφυρίνη (TPyP)GaCl, είναι περισσότερο τοξική από τις υδατοδιαλυτές που έχουν μελετηθεί στη βιβλιογραφία [111]. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η TMPyP αλλά και οι αντίστοιχες μεταλλοπορφυρίνες του Pt(II), Cu(II) και In(III), είναι μη τοξικές τόσο σε καρκινικά όσο και σε φυσιολογικά κύτταρα, με τις τιμές IC₅₀ για την υδατοδιαλυτή πορφυρίνη του In(III) (που βρίσκεται στην ίδια ομάδα με το Ga) να είναι μεγαλύτερες από 100 και 200 μM για τα MCF-7 και PC3 κύτταρα, αντίστοιχα. Επιπλέον, ενδεικτικό της μειωμένης τοξικότητας των κατιοντικών πορφυρινών είναι ότι τα κύτταρα επώαστηκαν με το εκάστοτε παράγωγο για 7-10 ημέρες [111], σε αντίθεση με το δικό μας πείραμα που η επώαση διήρκησε μόλις 3 ημέρες. Βέβαια, οι κατιοντικές πορφυρίνες που αναφέραμε [111], προκαλούν ικανοποιητική αναστολή της τελομεράσης (ενός ενζύμου που εκφράζεται στο 85% των καρκινικών όγκων, αλλά όχι στους φυσιολογικούς ιστούς), και σε συνδυασμό με τη μη τοξικότητα τους, καθίστανται πολύ ενδιαφέρουσες στην θεραπεία του καρκίνου μέσω αναστολής της τελομεράσης, μια νέα θεραπευτική προσέγγιση κατά της ασθένειας [225,226].

Κυτταρική Πρόσληψη

Όπως συζητήσαμε στην § 8.5.2 το σύμπλοκο του Ga(III) φθορίζει, οπότε βλέποντας τον φθορισμό του, μπορούμε να διαπιστώσουμε αν η μεταλλοπορφυρίνη διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και εισέρχεται στον ενδοκυττάριο χώρο ή συσσωρεύεται εξωτερικά της μεμβράνης. Πραγματοποιήθηκαν, λοιπόν, πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού με την (TPyP)GaCl σε PC3 κύτταρα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 24 h σε διάλυμα συμπλόκου σε θρεπτικό υλικό συγκέντρωσης 25 μM. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό ξεπλένονται τα κύτταρα με PBS και μονιμοποιούνται ή όχι με την προσθήκη παγωμένης MeOH. Τα πρώτα αποτελέσματα (Σχήμα 10.9) δείχνουν πράσινο φθορισμό, ο οποίος δεν κατανέμεται ομοιόμορφα μέσα και σε όλο το κύτταρο, αλλά εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα.



Σχήμα 10.9. Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού PC3 κυττάρων επωασμένων για 24h (A) απουσία της μεταλλοπορφυρίνης και (B) παρουσία 25 μM της μεταλλοπορφυρίνης (TPyP)GaCl.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ PAF

11.1. Εισαγωγή

Μέχρι στιγμής, έχουν γίνει αρκετές μελέτες όσον αφορά τον κυτταρικό εντοπισμό και τις κυτταροτοξικές ιδιότητες των τρικαρβόνυλο συμπλόκων του Re(I) [18,227,228], αλλά πολύ λίγα είναι γνωστά για την αντι-φλεγμονώδη και αντι-θρομβωτική επίδραση τέτοιων συμπλόκων. Μάλιστα, σε κακοήθεις καταστάσεις καρκίνου, όπου συμβαίνει αγγειογένεση και μεταστατική διαδικασία, παράγονται έντονα αρκετοί φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως η θρομβίνη, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) και εμπλέκεται το φαινόμενο της θρόμβωσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο PAF εκφράζεται σε καρκινικά και ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η παρουσία του στο μικροκαρκινικό περιβάλλον επάγει διαδικασίες που οδηγούν στην αύξηση του μιτωτικού πολλαπλασιασμού αλλά και στη μεταστατική αγγειογένεση των κυττάρων [229,230].

Πρόσφατα διερευνάται η μείωση της καρκινικής ανάπτυξης και της αγγειογένεσης, με την μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραγόντων που αναστέλλουν την δράση ή/και μειώνουν τα επίπεδα του PAF στα κύτταρα με πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα [229]. Επιπλέον, η κατεργασία κυττάρων μελανώματος με το αντικαρκινικό φάρμακο cisplatin οδήγησε σε υπερ-έκφραση του υποδοχέα του PAF και στη συσσώρευση του. Παρουσία εξωγενούς PAF, τα κύτταρα μελανώματος ήταν πολύ ανθεκτικά στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το cisplatin. Αντίθετα, η θεραπεία των κυττάρων με cisplatin σε συνδυασμό με το γνωστό αναστολέα WEB2086 του υποδοχέα του PAF, οδήγησε σε σημαντική μείωση της ανάπτυξης του όγκου, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [229,231]. Έτσι λοιπόν, στη θεραπεία κατά του καρκίνου θα ήταν πολύ ενδιαφέροντα η σύνθεση νέων ενώσεων με ταυτόχρονη αντικαρκινική και αντι-PAF δράση.

Η αναστολή της δράσης του PAF μπορεί να γίνει με ενώσεις που επιδρούν στον υποδοχέα του PAF. Η μείωση των επιπέδων του PAF μπορεί να γίνει είτε μέσω αναστολής των βιοσυνθετικών ενζύμων του PAF, όπως η PAF-CPT (χολινοφωσφοτρανσφεράση του PAF) και η Lyso-PAF-AT (ακετυλοτρανσφεράση του PAF), είτε μέσω ενεργοποίησης του αποικοδομητικού ενζύμου του PAF, PAF-AH (PAF-ακετυλοϋδρολάση) [232].

11.2. Επίδραση αναστολής των συμπλόκων στη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF

Σε αυτήν την προσπάθεια λοιπόν, νέα σύμπλοκα του Re(I) εξετάζονται ως προς την *in vitro* βιολογική τους δράση έναντι του PAF. Τα τρικαρβόνυλο σύμπλοκα Re(dppz-ester)Cl και Re(phendione)Cl, καθώς και οι ελεύθεροι υποκαταστάτες, μελετήθηκαν ως προς τη ικανότητα τους στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF και συγκρίνονται με την αντίστοιχη δράση του cisplatin. Όλες οι ενώσεις μελετήθηκαν ως προς την αναστολή του PAF σε WRPs (πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού), και η επίδραση τους εκφράζεται ως IC₅₀. Η τιμή αυτή αναφέρεται στη συγκέντρωση δείγματος που αναστέλλει κατά 50% τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από συγκεκριμένη ποσότητα PAF ($2.5 \cdot 10^{-11}$ M, τελική συγκέντρωση στην κυψελίδα). Επομένως χαμηλότερη τιμή IC₅₀ συνεπάγεται ισχυρότερη αναστολή για μια δεδομένη συγκέντρωση της ένωσης.

Οι τιμές IC₅₀ των ενώσεων έναντι της συσσώρευσης αιμοπεταλίων από τον PAF παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.1. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ελεύθεροι υποκαταστάτες παρουσιάζουν μέτρια ανασταλτική δραστηριότητα έναντι του PAF. Επιπλέον, η τροποποίηση του dppz υποκαταστάτη με δύο εστερομάδες βελτιώνει την ανασταλτική του δράση, αντίθετα με ότι είχαμε παρατηρήσει από τα κυτταροτοξικά πειράματα (§ 10.2).

Πίνακας 11.1. Αναστολή του PAF σε WRPs για τις υπό μελέτη ενώσεις. Οι τιμές IC₅₀ (μM) παριστάνονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.

Ενώσεις	IC ₅₀ (±S.D.)
phendione	0.925 (±0.13)
dppz	4.15 (±0.043)
dppz-ester	1.87 (±0.17)
Re(CO) ₅ Cl	0.170 (±0.09)
Re(phendione)Cl	0.862 (±0.15)
Re(dppz-ester)Cl	0.468 (±0.034)
cisplatin	0.55 (±0.22)

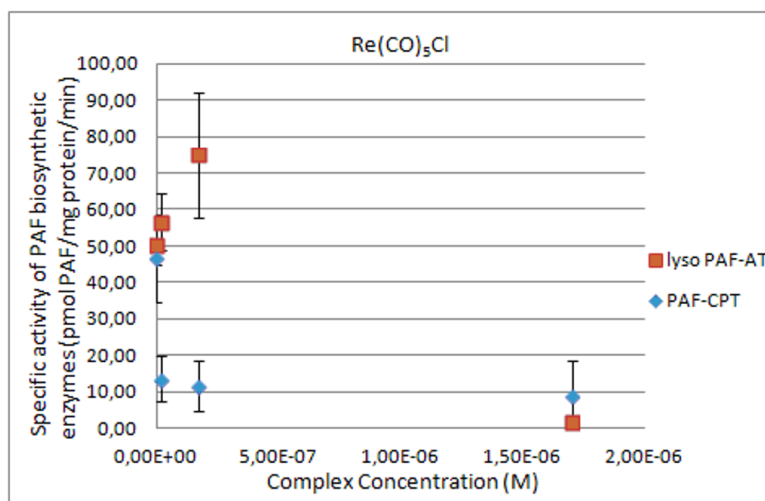
Η συμπλοκοποίηση των υποκαταστατών phendione και dppz-ester στο μεταλλικό κέντρο του Re(I) αυξάνει τη ανασταλτική τους δράση έναντι του PAF. Μάλιστα, το σύμπλοκο Re(dppz-ester)Cl παρουσιάζει έως και 4-φορές μεγαλύτερη δραστικότητα σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη, με τις τιμές IC₅₀ να είναι 0.468 μM και 1.87 μM, αντίστοιχα. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο εμφανίζει καλύτερη αντι-PAF δράση τόσο από το σύμπλοκο Re(phendione)Cl όσο και από το cisplatin. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το πρόδρομο μόριο Re(CO)₅Cl είναι καλύτερος αναστολέας του PAF και από τους ελεύθερους υποκαταστάτες αλλά και από τα σύμπλοκα, έχοντας τιμή IC₅₀=0.17 μM, ελαφρώς χαμηλότερη από τους γνωστούς αναστολείς του PAF, BN52021 και WEB2086.

11.3. Επίδραση των συμπλόκων στη δραστικότητα των βασικών μεταβολικών ενζύμων του PAF

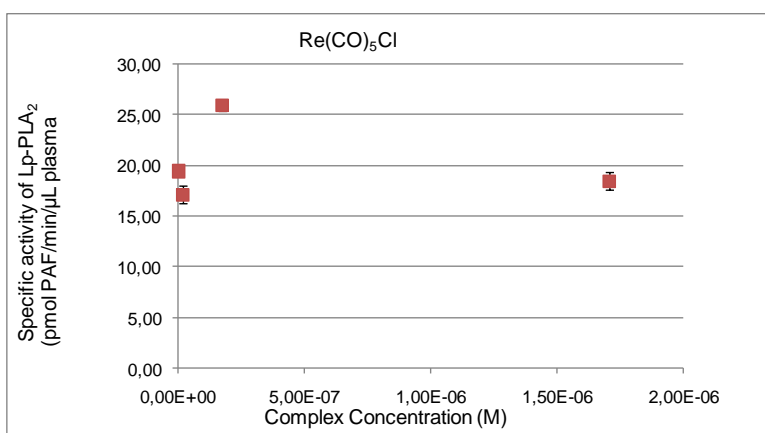
Προκειμένου να προσδιοριστεί η πιθανή αλληλεπίδραση των υπό μελέτη ενώσεων με το μεταβολισμό του PAF, μελετήθηκε η *in vitro* επίδραση αυτών των ενώσεων στη δραστικότητα των βασικών μεταβολικών ενζύμων του PAF, lyso-PAF-AT και PAF-CPT. Όσον αφορά τον καταβολισμό του PAF, το βασικό ένζυμο είναι η PAF-AH, με την ισόμορφη του στο πλάσμα γνωστή και ως Lp-PLA₂ [232].

Το σύμπλοκο Re(CO)₅Cl

Τα αποτελέσματα της επίδρασης στα βασικά μεταβολικά ένζυμα του PAF, παρουσιάζονται στα Σχήματα 11.1 και 11.2. Από το Σχήμα 11.1 γίνεται εμφανές ότι το πρόδρομο σύμπλοκο Re(CO)₅Cl επιδρά στη βιοσύνθεση του PAF, εμφανίζοντας ισχυρή αναστολή της δραστικότητας της PAF-CPT (Σχήμα 11.1). Από το Σχήμα 11.2 φαίνεται ότι η συγκεκριμένη ένωση δεν μεταβάλλει σημαντικά τη δραστικότητα της Lp-PLA₂.



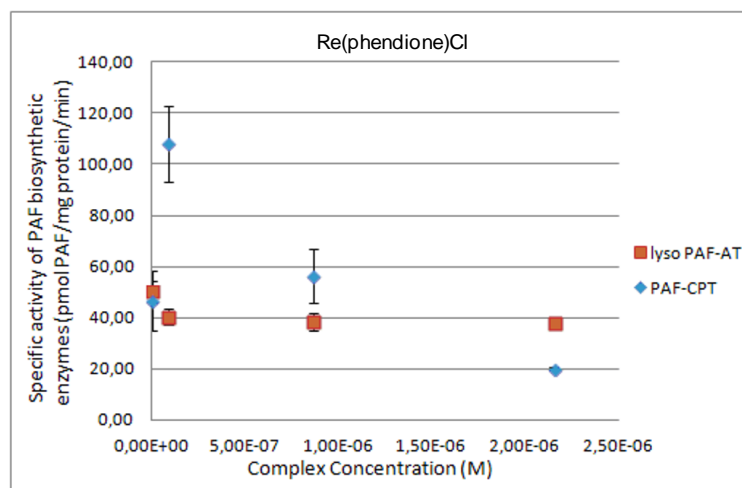
Σχήμα 11.1. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT (♦) και lyso-PAF-AT (■).



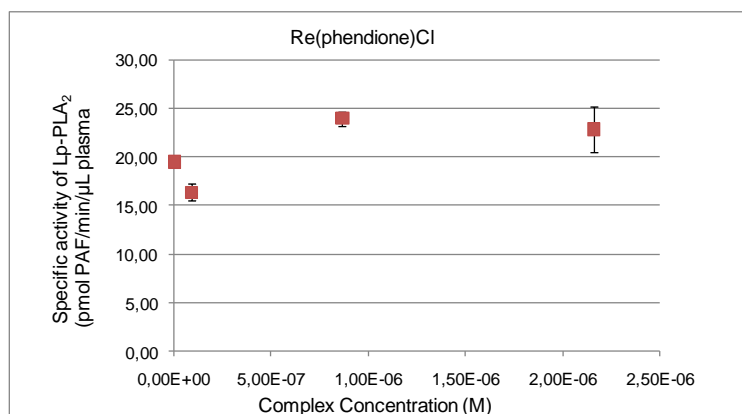
Σχήμα 11.2. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA₂.

Το σύμπλοκο $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$

Στα Σχήματα 11.3 και 11.4 φαίνονται τα αποτελέσματα της δραστηριότητας του συμπλόκου $\text{Re}(\text{phendione})\text{Cl}$ στα βασικά μεταβολικά ένζυμα του PAF, PAF-CPT και lyso-PAF-AT, καθώς επίσης και στο κύριο καταβολικό ένζυμο Lp-PLA₂, αντίστοιχα. Από το Σχήμα 11.3 παρατηρείται μια τάση μείωσης της δραστηριότητας της PAF-CPT παρουσία του συμπλόκου. Αντίθετα, το παράγωγο δεν επιδρά ουσιαστικά στη δραστηριότητα του ενζύμου lyso-PAF-AT, όπως γίνεται σαφές από το Σχήμα 11.3. Από το Σχήμα 11.4 φαίνεται ότι αυξάνεται ελαφρώς η δραστηριότητα του καταβολικού ενζύμου Lp-PLA₂.



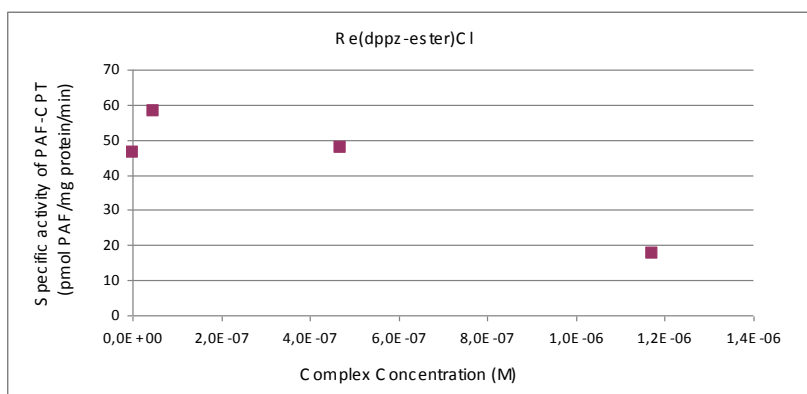
Σχήμα 11.3. Επίδραση του συμπλόκου Re(phendione)Cl στην ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT (♦) και lyso-PAF-AT (■).



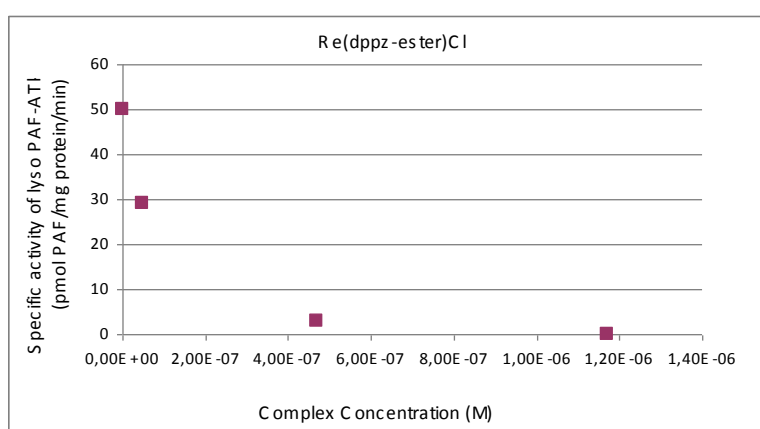
Σχήμα 11.4. Επίδραση του συμπλόκου Re(phendione)Cl στην ειδική δραστηριότητα της Lp-PLA₂.

Το σύμπλοκο Re(dppz-ester)Cl

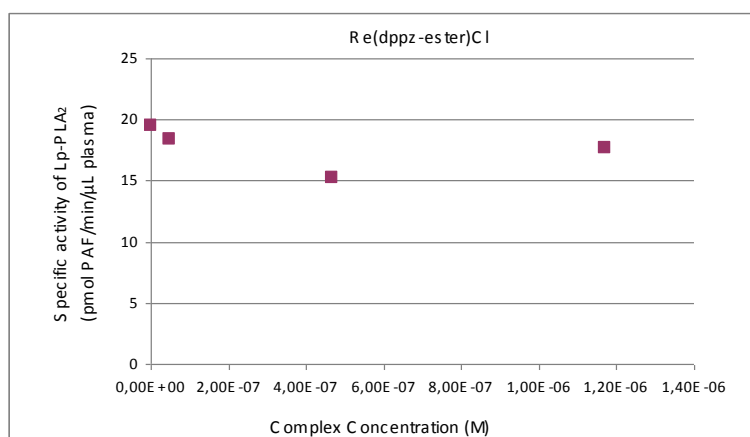
Από το Σχήμα 11.5 παρατηρούμε ότι το dppz παράγωγο παρουσιάζει μια δοσο-εξαρτώμενη επίδραση στο ένζυμο PAF-CPT εμφανίζοντας μια τάση μείωσης, ενώ μειώνει σημαντικά την δραστηριότητα της lyso-PAF-AT, όπως φαίνεται στο Σχήμα 11.6. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύμπλοκο Re(dppz-ester)Cl δεν μεταβάλλει τη δραστηριότητα του κύριου καταβολικού ενζύμου του PAF, Lp-PLA₂ (Σχήμα 11.7).



Σχήμα 11.5. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα της PAF-CPT.



Σχήμα 11.6. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα της lyso-PAF-AT.



Σχήμα 11.7. Επίδραση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ στην ειδική δραστηριότητα Lp-PLA_2 .

Η ανασταλτική δράση των παραπάνω συμπλόκων στη βιοσύνθεση του PAF, σε συνδυασμό με την ισχυρή αντι-PAF επίδραση στα αιμοπετάλια, καθιστά τις ενώσεις αυτές ως δυνητικούς αντι-φλεγμονώδεις παράγοντες. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο PAF είναι ένας

βασικός μεσολαβητής σε φλεγμονώδη κακοήθη καρκινικά κύτταρα, η ικανότητα των υπό μελέτη συμπλόκων να επηρεάζουν και να αλληλεπιδρούν άμεσα τόσο με τον PAF όσο και με τα βασικά βιοσυνθετικά του ένζυμα, παρέχουν μια νέα προοπτική στην αντι-καρκινική χρήση αυτών των ενώσεων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα διατριβή είχε ως στόχο τη σύνθεση νέων συμπλόκων ενώσεων που να μπορούν να αλληλεπιδρούν με το DNA, σε μια προσπάθεια εύρεσης νέων πιθανών χημειοθεραπευτικών παραγόντων, αλλά και αποτελεσματικών φωτοευαίσθητοποιητών στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Στην προσπάθεια αυτή, συντέθηκε μια σειρά νέων συμπλόκων του Re(I) και του Ga(III) και μελετήθηκε πλήρως η αλληλεπίδραση τους με το DNA, η *in vitro* αντικαρκινική δραστηριότητα καθώς και η *in vitro* βιολογική τους δράση έναντι του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων.

Η σύνθεση και η φασματοσκοπική μελέτη των συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{L})]^+$ (όπου $\text{L}=\text{MeCN}$, py) οδήγησε σε χρήσιμα συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, η κρυσταλλογραφική μελέτη του συμπλόκου $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})(\text{py})]\text{PF}_6$ καταδεικνύει την επιπεδότητα του pq υποκαταστάτη, με το μόριο της πυριδίνης να βρίσκεται σχεδόν κάθετα σε αυτό το επίπεδο. Τα δύο νέα κατιοντικά σύμπλοκα δεν εμφανίζουν διαλυτοχρωμισμό, σε αντίθεση με τα ουδέτερα σύμπλοκα $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})\text{Cl}]$ και $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}]$. Τα δύο pq σύμπλοκα εκπέμπουν φωταύγεια μετατοπισμένη σε μεγαλύτερα μήκη κύματος συγκριτικά με παρόμοια διμινικά σύμπλοκα του τύπου αυτού, και άμεσα εξαρτώμενη από τη φύση του διαλύτη, με τη κβαντική απόδοση φθορισμού να μειώνεται αυξανόμενης της πολικότητας του διαλύτη. Η φωταύγεια του πορφυρινικού συμπλόκου $\{\text{H}_2\text{TPyP}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{pq})]_4\} \cdot 4\text{PF}_6$ βρέθηκε ότι έχει χαρακτήρα πορφυρίνης και ως εκ τούτου δεν επηρεάζεται από τον διαλύτη, εν αντιθέσει με το μονομερές σύμπλοκο.

Τα σύμπλοκα του τύπου $\text{fac}-[\text{Re}(\text{CO})_3(\alpha\text{-diimine})\text{L}]^{0/+}$ (όπου όταν $\alpha\text{-διμίνη}=\text{phendione}$, $\text{L}=\text{Cl}$ και όταν $\alpha\text{-διμίνη}=\text{pq}$, $\text{L}=\text{MeCN}$ ή py) δεσμεύονται ισχυρά στην αύλακα του DNA. Παρά την ισχυρή συγγενεία τους με το νουκλεϊκό οξύ δεν μπορούν να λειτουργήσουν ως μοριακοί διακόπτες φωτός, αφού η φωταύγεια δεν μεταβάλλεται παρουσία DNA. Αντίθετα, το $\text{dppz}(\text{COOEt})_2$ -σύμπλοκο που παρεμβάλλεται στα ζεύγη βάσεων δρα ως μοριακός διακόπτης, λόγω του άπολου περιβάλλοντος του DNA. Στο τετρα-ρηνικό πορφυρινικό παράγωγο οι θετικά φορτισμένες ομάδες του Re(I) προσεγγίζουν την αύλακα του DNA, σταθεροποιώντας τη δομή DNA-σύμπλοκο λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Παρουσία υδατικού διαλύματος, στο σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phendione})\text{Cl}]$ πραγματοποιείται ενυδάτωση του καρβονυλίου του φαινανθρολινικού υποκαταστάτη. Η ενυδάτωση αυτή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διάσπαση του ενός κλώνου του

DNA μετά από ακτινοβόληση. Τα δύο κατιοντικά ρq-σύμπλοκα προκαλούν φωτοδιάσπαση του DNA, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει το σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου. Η διαδικασία μεταφοράς ενέργειας από τα διεγερμένα σύμπλοκα στο μοριακό οξυγόνο προς σχηματισμό μονήρους οξυγόνου είναι πιο αποδοτική από τη μεταφορά ηλεκτρονίου προς σχηματισμό δραστικών ριζών. Το σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_3[\text{dppz}(\text{COOEt})_2]\text{Cl}]$ αν και επιδεικνύει επίδραση μοριακού διακόπτη και εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με το DNA, εντούτοις δεν μπορεί να προκαλέσει την άμεση φωτοδιάσπαση του. Αυτό οφείλεται στο μικρό χρόνο ζωής και τη χαμηλή οξειδωτική ικανότητα της διεγερμένης κατάστασης. Το τετρα-ρηνικό πορφυρινικό παράγωγο είναι περισσότερο φωτο-δραστικό από τα μονομερή σύμπλοκα του Re(I). Η μεταλλοπορφυρίνη του Ga(III), αν και εμφανίζει μειωμένη συγγένεια με το DNA, είναι εξαιρετικά φωτο-δραστική ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, παράγοντας μονήρες οξυγόνο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με τα πειράματα αλληλεπίδρασης υποδεικνύουν ότι στη φωτο-επαγομένη οξείδωση του DNA τον κρίσιμότερο ρόλο διαδραματίζει η δραστικότητα της διεγερμένης κατάστασης, ενώ η δεσμευτική συγγένεια με το νουκλεϊκό οξύ έχει ένα βοηθητικό κυρίως ρόλο.

Τα *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι ο phendione υποκαταστάτης είναι εξαιρετικά τοξικός έναντι των καρκινικών σειρών T98G, PC3, MCF-7, ενώ η σύμπλεξη του στο Re(I) οδηγεί σε σημαντική απώλεια της τοξικότητας του. Το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι αποθαρρυντικό στη χρήση του συμπλόκου $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phenidione})\text{Cl}$ ως φωτοευαίσθητοποιητή στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Ο ρq υποκαταστάτης, αν και είναι μη τοξικός ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, τα αντίστοιχα σύμπλοκα του Re(I) εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα ελαφρώς χαμηλότερη από του cisplatin. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν τον κρίσιμο ρόλο του αξονικού υποκαταστάτη, τόσο στην κυτταροτοξικότητα όσο στον τρόπο δέσμευσης τους με το DNA. Η γαλλιο(III) πορφυρίνη βρέθηκε ότι διαχέεται μέσα στο κύτταρο και εμφανίζει σημαντική τοξικότητα.

Η σύμπλεξη των υποκαταστατών phendione και dppz-ester στο τρικαρβόνυλο κέντρο Re(I) έχει αντίθετα αποτελέσματα στην αναστολή έναντι του PAF, με το πρόδρομο σύμπλοκο $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$ να είναι καλύτερος αναστολέας από το $\text{Re}(\text{dppz-ester})\text{Cl}$ και αυτό με τη σειρά του από το $\text{Re}(\text{phenidione})\text{Cl}$, αλλά και τους ελεύθερους υποκαταστάτες. Η μη τοξικότητα των συμπλόκων $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phenidione})\text{Cl}]$ και $[\text{Re}(\text{CO})_3[\text{dppz}(\text{COOEt})_2]\text{Cl}]$ σε συνδυασμό με την ισχυρή αντι-PAF επίδραση τους και την ικανότητα τους να

αναστέλλουν τα βιοσυνθετικά ένζυμα του PAF, θα μπορούσε να οδηγήσει στη χρήση τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες με αντι-φλεγμονώδη δράση.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

A	Αδενίνη
A498	human renal cancer (καρκίνος νεφρού ανθρώπινης προέλευσης)
appt	2-amino-4-phenylamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη
ATX-70	7,12-bis(1-decyloxyethyl)-2,18-bispropionylaspartic acid 3,8,13,17-tetramethyl-porphynate gallium(III) salt
bpy	2,2'-διπυριδίνη
C	Κυτοσίνη
C.T.-DNA	Calf Thymus DNA (DNA από θύμο αδένος βοοειδούς)
CD	Circular Dichroism (Κυκλικός Διχρωισμός)
cisplatin	cis-diamminedichloroplatinum(II) (<i>cis</i> -Pt(NH) ₃ Cl ₂)
COSY	correlation spectroscopy
CV	Cyclic Voltammerty (Κυκλική Βολταμετρία)
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium (Θρεπτικό υλικό)
DMF	διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dppn	βενζο[ι]διπυριδο[3,2-a:2'3'-c]φαιναζίνη
dppz	dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine
dppz-ester	διπυριδο[3,2-a:2',3'-c]φαιναζινο-3,6-διαιθυλεστέρας
dprq	dipyrido[3,2-d:2',3'-f]quinoxaline
dprp	pyrazino[2',3':5,6]pyrazino-[2,3-f][1,10]phenanthroline
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	αιθανόλη
FBS	Fetal Bovine Serum (εμβρυικός ορός μόσχου)
G	Γουανίνη
H266	human lung cancer (καρκίνος του πνεύμονα ανθρώπινης προέλευσης)
H₂TMPyP	<i>meso</i> -τέτρα-4-N-μεθυλπυριδιλ-πορφυρίνη
H₂TPyP	<i>meso</i> -τέτρα-4-πυριδιλ-πορφυρίνη
HaCaT	human keratinocyte (κερατινοκύτταρα ανθρώπινης προέλευσης)
hat	1,4,5,8,9,12-hexaazatriphenylene
HeLa	human cervix epithelial carcinoma (επιθηλιακός ιστός καρκίνου της μήτρας ανθρώπινης προέλευσης)

HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (υψηλότερο κατειλημμένο μοριακό τροχιακό)
HT-29	human colon adenocarcinoma (καρκίνος παχέος εντέρου ανθρώπινης προέλευσης)
IL	Intraligand (ενδομοριακή μετάπτωση)
IR	Infrared (Υπέρυθρη φασματοσκοπία)
LLCT	Ligand to Ligand Charge Transfer
Lp-PLA₂	Lipoprotein-associated phospholipase A ₂
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (χαμηλότερο μη κατειλημμένο μοριακό τροχιακό)
MCF-7	human breast cancer (καρκίνος μαστού ανθρώπινης προέλευσης)
MeCN	Ακετονιτρίλιο
MeOH	Μεθανόλη
MLCT	Metal to Ligand Charge Transfer
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance – πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
PAF	Platelet Activating Factor (Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων)
PAF-AH	PAF-acetylhydrolase (ακετυλοϋδρολάση του PAF)
PAF-AT	PAF-acetyltransferase (ακετυλοτρανσφεράση του PAF)
PAF-CPT	PAF-cholinephosphotransferase (χολινοφωσφοτρανσφεράση του PAF)
pBR322	πλασμιδιακό DNA 4363 ζευγών βάσεων απομονωμένο από <i>Escherichia coli</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)
PC-3	human prostate cancer (καρκίνος προστάτη ανθρώπινης προέλευσης)
PDT	Photodynamic Therapy (Φωτοδυναμική Θεραπεία)
phehat	1,10-phenanthroline[5,6-b]-1,4,5,8,9,12-hexaazatriphenylene
phen	1,10-φαινανθρολίνη
phendione	1,10-φαινανθρολίνη-5,6-διόνη
phi	9,10-phenanthrenequinone
pq	2-(2'-πυριδυλ)κινοξαλίνη
py	πυριδίνη
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
T	Θυμίνη
T98G	human glioblastoma (καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος ανθρώπινης προέλευσης)

tap	1,4,5,8-tetra-aza-phenanthrene
terpy	2,2',2''-terpyridine
THF	τετραυδροφουράνιο
tpm	tris(1-pyrazoyl)methane
TPP	<i>meso</i> -τετρα-(φαινυλ)πορφυρίνη
Tris	tris-[hydroxymethyl]-aminomethane
U	ουρακίλη
UV-Vis	Ultra Violent-Visible (Φασματοσκοπία υπεριώδους- ορατού)
WIDR	colon cancer (καρκίνος παχέος εντέρου)
WRPs	Washed rabbit platelets (πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού)
ε	συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας, σε $M^{-1}cm^{-1}$
λ	μήκος κύματος

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. L. Stryer (μετάφραση: Α. Αλετράς, Θ. Βαλκανά, Δ. Δραΐνας, Κ. Δραΐνας, Η. Κούβελας, Γ. Κ. Παπαδόπουλος, Μ. Γ. Παπαδόπουλος, Μ. Φράγκου-Λαζαρίδη), *Βιοχημεία* 3η έκδοση, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 1997, τόμος 1&2.
2. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1984.
3. J. D. Watson., F. H. C. Crick, *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, *Nature*, 171 (1953) 737-738.
4. S. Arnott, D. W. L. Hukins, *Refinement of the Structure of B-DNA and Implications for the Analysis of X-ray Diffraction Data from Fibers of Biopolymers*, *J. Mol. Biol.*, 81 (1973) 93-105.
5. R. E. Franklin, R. G. Gosling, *The structure of sodium thymonucleate fibers. I. the influence of water content*, *Acta. Cryst.*, 6 (1953) 673–677.
6. D. A. Marvin, M. Spencer, M. H. F. Wilkins, L. D. Hamilton, *The Molecular Configuration of Deoxyribonucleic Acid III. X-ray Diffraction Study of the C form of the Lithium Salt*, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 547-565.
7. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2008.
8. L. Streckowski, B. Wilson, *Noncovalent Interactions with DNA: An overview*, *Mutation Research*, 623 (2007) 3-13.
9. L. S. Lerman, *Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines*, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 18-30.
10. M. Howe-Grant, K. C. Wu, W. R. Bauer, S. J. Lippard, *Binding of Platinum and Palladium Metallointercalation Reagents and Antitumor Drugs to Closed and Open DNAs*, *Biochemistry*, 15 (1976) 4339-4346.
11. J. K. Barton, S. J. Lippard, *Cooperative Binding of a Platinum Metallointercalation Reagent to Poly(A)·Poly(U)*, *Biochemistry*, 12 (1979) 2661-2668.
12. J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Cooperative and Non-cooperative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice*, *J. Mol. Biol.*, 86 (1974) 469-489.
13. S. E. Sherman, S. J. Lippard, *Structural Aspects of Platinum Anticancer Drug Interactions with DNA*, *Chem. Rev.*, 87 (1987) 1153-1181.
14. E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin – DNA*, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2467-2498.

15. J. Reedijk, *Metal-Ligand Exchange Kinetics in Platinum and Ruthenium Complexes. Significance for Effectiveness as Anticancer Drugs*, *Platinum Metals Rev.*, 52 (2008) 2–11.
16. K. E. Erkkila, D. T. Odem, J. K. Barton, *Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA*, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2777-2796.
17. C. Metcalfe, J. A. Thomas, *Kinetically inert transition metal complexes that reversibly bind to DNA*, *Chem. Soc. Rev.*, 32 (2003) 215-224.
18. K. K.-W. Lo, K. Y. Zhang, S. P. Y. Li, *Recent Exploitation of Luminescent Rhenium(I) Tricarbonyl Polypyridine Complexes as Biomolecular and Cellular Probes*, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (2011) 3551–3568.
19. A. W. McKinley, P. Lincoln, E. M. Tuite, *Environmental effects on the photophysics of transition metal complexes with dipyrido[2,3-*a*:3',2'-*c*]phenazine (dppz) and related ligands*, *Coord. Chem. Rev.*, 255 (2011) 2676-2692.
20. J. A. Smith, M. W. George, J. M. Kelly, *Transient spectroscopy of dipyridophenazine metal complexes which undergo photo-induced electron transfer with DNA*, *Coord. Chem. Rev.*, 255 (2011) 2666-2675.
21. J. K. Barton, E. D. Olmon, P. A. Sontz, *Metal complexes for DNA-mediated charge transport*, *Coord. Chem. Rev.*, 255 (2011) 619-634.
22. J. C. Genereux, J. K. Barton, *Mechanisms for DNA Charge Transport*, *Chem. Rev.*, 110 (2010) 1642–1662.
23. J. K. Barton, A. T. Danishefsky, J. M. Goldberg, *Tris(phenanthroline)ruthenium(II): Stereoselectivity in Binding to DNA*, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 2172-2176.
24. S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak, J. B. Chaires, *Neither Δ - nor Λ -Tris(phenanthroline)ruthenium(II) Binds to DNA by Classical Intercalation*, *Biochemistry*, 31 (1992) 9319-9324.
25. D. Z. M. Coggan, I. S. Haworth, P. J. Bates, A. Robinson, A. Rodger, *DNA Binding of Ruthenium Tris(1,10-phenanthroline): Evidence for the Dependence of Binding Mode on Metal Complex Concentration*, *Inorg. Chem.*, 38 (1999) 4486-4497.
26. A. E. Friedman, J. C. Chambron, J. P. Sauvage, N. J. Turro, J. K. Barton, *Molecular “light switch” for DNA: $Ru(bpy)_2(dppz)^{2+}$* , *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 4960-4962.
27. C. Hiort, P. Lincoln, B. Nordén, *DNA Binding of Δ - and Λ - $[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$* , *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 3448-3454.
28. H. Song, J. T. Kaiser, J. K. Barton, *Crystal structure of Δ - $[Ru(bpy)_2dppz]^{2+}$ bound to mismatched DNA reveals side-by-side metalloinsertion and intercalation*, *Nature Chemistry*, 4 (2012) 615-620.

29. H. Niyazi, J. P. Hall, K. O'Sullivan, G. Winter, T. Sorensen, J. M. Kelly, C. J. Cardin, *Crystal structures of Λ -[Ru(phen)₂dppz]²⁺ with oligonucleotides containing TA/TA and AT/AT steps show two intercalation modes*, Nature Chemistry, 4 (2012) 621-628.
30. J. P. Hall, K. O' Sullivan, A. Naseer, J. A. Smith, J. M. Kelly, C. J. Cardin, *Structure determination of an intercalating ruthenium dipyridophenazine complex which kinks DNA by semiintercalation of a tetraazaphenanthrene ligand*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 108 (2011) 17610-17614.
31. C. Turro, S. H. Bossmann, Y. Jenkins, J. K. Barton, N. J. Turro, *Proton Transfer Quenching of the MLCT Excited State of Ru(phen)₂dppz²⁺ in Homogeneous Solution and Bound to DNA*, J. Am. Chem. Soc., 117 (1995) 9026-9032.
32. E. J. C. Olson, D. Hu, A. Hörmann, A. M. Jonkman, M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, P. F. Barbara, *First Observation of the Key Intermediate in the "Light-Switch" Mechanism of [Ru(phen)₂dppz]²⁺*, J. Am. Chem. Soc., 119 (1997) 11458-14467.
33. C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, J. M. Kelly, *Photoreactions of ruthenium(II) and osmium(II) complexes with deoxyribonucleic acid (DNA)*, J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 40 (1997) 91-106
34. E. D. A. Stemp, M. R. Arkin, J. K. Barton, *Oxidation of Guanine in DNA by Ru(phen)₂(dppz)³⁺ Using the Flash-Quench Technique*, J. Am. Chem. Soc., 119 (1997) 2921-2925.
35. B. Elias, A. Kirsch-De Mesmaeker, *Photo-reduction of polycyclic aromatic Ru(II) complexes by biomolecules and possible applications*, Coord. Chem. Rev., 250 (2006) 1627-1641.
36. I. Ortmans, B. Elias, J. M. Kelly, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, *[Ru(TAP)₂(dppz)]²⁺: a DNA intercalating complex, which luminesces strongly in water and undergoes photo-induced proton-coupled electron transfer with guanosine-5'-monophosphate*, Dalton Trans., (2004) 668-676.
37. B. Elias, C. Creely, G.W. Doorley, M.M. Feeney, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, J. Dyer, D.C. Grills, M.W. George, P. Matousek, A.W. Parker, M. Towrie, J.M. Kelly, *Photooxidation of Guanine by a Ruthenium Dipyridophenazine Complex Intercalated in a Double-Stranded Polynucleotide Monitored Directly by Picosecond Visible and Infrared Transient Absorption Spectroscopy*, Chem. Eur. J., 14 (2008) 369-375.
38. C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, S. Choua, *Photophysics of Ru(phen)₂(PHEHAT)²⁺: A Novel "Light Switch" for DNA and Photo-oxidant for Mononucleotides*, Inorg. Chem., 36 (1997) 584-592.

39. Y. Sun, S. N. Collins, L. E. Joyce, C. Turro, *Unusual Photophysical Properties of a Ruthenium(II) Complex Related to $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$* , *Inorg. Chem.*, 49 (2010) 4257-4262.
40. Y. Sun, L. E. Joyce, N. M. Dickson, C. Turro, *Efficient DNA photocleavage by $[Ru(bpy)_2(dppn)]^{2+}$ with visible light*, *Chem. Commun.*, 46 (2010) 2426-2428.
41. N. B. Thornton, K. S. Schanze, *A Chromophore-Quencher-Based Luminescence Probe for DNA*, *Inorg. Chem.*, 32 (1993) 4994-4995.
42. H. D. Stoeffler, N. B. Thornton, S. L. Temkin, K. S. Schanze, *Unusual Photophysics of a Rhenium(I) Dipyridophenazine Complex in Homogenous Solution and Bound to DNA*, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995) 7119-7128.
43. V. W. W. Yam, K. K. W. Lo, K. K. Cheung, R. Y. C. Kong, *Synthesis, Photophysical Properties and DNA Binding Studies of Novel Luminescent Rhenium(I) Complexes. X-Ray Crystal Structure of $[Re(dppn)(CO)_3(py)](OTf)$* , *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1995) 1191-1193.
44. V. W. W. Yam, K. K. W. Lo, K. K. Cheung, R. Y. C. Kong, *Deoxyribonucleic acid binding and photocleavage studies of rhenium(I) dipyridophenazine complexes*, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1997) 2067-2072.
45. C. Metcalfe, M. Webb, J. A. Thomas, *A facile synthetic route to bimetallic Re^I complexes containing two dppz DNA intercalating ligands*, *Chem. Commun.*, (2002) 2026-2027.
46. S. P. Foxon, T. Phillips, M. R. Gill, M. Towrie, A. W. Parker, M. Webb, J. A. Thomas, *A Multifunctional Light Switch: DNA Binding and Cleavage Properties of a Heterobimetallic Ruthenium-Rhenium Dipyridophenazine Complex*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46 (2007) 3686-3688.
47. E. D. Olmon, P. A. Sontz, A. M. Blanco-Rodríguez, M. Towrie, I. P. Clark, A. Vlček Jr, J. K. Barton., *Charge Photoinjection in Intercalated and Covalently Bound $[Re(CO)_3(dppz)(py)]^+$ - DNA Constructs Monitored by Time-Resolved Visible and Infrared Spectroscopy*, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (2011) 13718-13730.
48. F. Shao, B. Elias, W. Lu, J. K. Barton, *Synthesis and Characterization of Iridium(III) Cyclometalated Complexes with Oligonucleotides: Insights into Redox Reactions with DNA*, *Inorg. Chem.*, 46 (2007) 10187-10199.
49. E. D. Olmon, M. G. Hill, J. K. Barton, *Using Metal Complex Reduced States to Monitor the Oxidation of DNA*, *Inorg. Chem.*, 50 (2011) 12034-12044.
50. G. T. Ruiz, M. P. Juliarena, R. O. Lezna, E. Wolcan, M. R. Feliz, G. Ferraudi, *Intercalation of $fac-[(4,4'-bpy)Re^I(CO)_3(dppz)]^+$, $dppz = dipyridyl[3,2-a:2'3'-$*

- c]*phenazine, in polynucleotides. On the UV-vis photophysics of the Re(I) intercalator and the redox reactions with pulse radiolysis-generated radicals, Dalton Trans., (2007) 2020-2029.
51. F. L. Thorp-Greenwood, M. P. Coogan, L. Mishra, N. Kumari, G. Rai, S. Saripella, *The importance of cellular localisation of probes: synthesis, photophysical properties, DNA interactions and cellular imaging properties of rhenium dppz complexes with known cellular localisation vectors*, New J. Chem., 36 (2012) 64-72.
52. K. K. W. Lo, K. H. K. Tsang, *Bifunctional Luminescent Rhenium(I) Complexes Containing an Extended Planar Diimine Ligand and a Biotin Moiety*, Organometallics, 23 (2004) 3062-3070.
53. D. L. Ma, C. M. Che, F. M. Siu, M. Yang, K. Y. Wong, *DNA Binding and Cytotoxicity of Ruthenium(II) and Rhenium(I) Complexes of 2-Amino-4-phenylamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine*, Inorg. Chem., 46 (2007) 740-749.
54. A. M. Angeles-Boza, P. M. Bradley, P. K. L. Fu, S. E. Wicke, J. Bacsá, K. R. Dunbar, C. Turro, *DNA Binding and Photocleavage in Vitro by New Dirhodium(II) dppz Complexes: Correlation to Cytotoxicity and Photocytotoxicity*, Inorg. Chem., 43 (2004) 8510-8519.
55. L. E. Joyce, J. D. Aguirre, A. M. Angeles-Boza, A. Chouai, P. K. L. Fu, K. R. Dunbar, C. Turro, *Photophysical Properties, DNA Photocleavage, and Photocytotoxicity of a Series of Dppn Dirhodium(II,II) Complexes*, Inorg. Chem., 49 (2010) 5371-5376.
56. D. S. Sigman, D. R. Graham, V. D'Aurora, A. M. Stern, *Oxygen-dependent Cleavage of DNA by the 1,10-Phenanthroline Cuprous Complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I*, J. Biol. Chem., 254 (1979) 12269-12272.
57. W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety*, Chem. Rev., 98 (1998) 1089-1107.
58. N. J. Lundin, P. J. Walsh, S. L. Howell, J. J. McGarvey, A. G. Blackman, K. C. Gordon, *Complexes of Functionalized Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]-phenazine: A Synthetic, Spectroscopic, Structural, and Density Functional Theory Study*, Inorg Chem., 44 (2005) 3551-3560.
59. D. R. McMillin, K. M. McNett, *Photoprocesses of Copper Complexes That Bind to DNA*, Chem. Rev., 98 (1998) 1201-1219.
60. C. Liu, M. Wang, T. Zhang, H. Sun, *DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes*, Coord. Chem. Rev., 248 (2004) 147-168.

61. M. P. Fitzsimons, J. K. Barton, *Design of a Synthetic Nuclease: DNA Hydrolysis by a Zinc-Binding Peptide Tethered to a Rhodium Intercalator*, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 3379-3380.
62. P. J. Carter, C. C. Cheng, H. H. Thorp, *Oxidation of DNA and RNA by Oxoruthenium(IV) Metallointercalators: Visualizing the Recognition Properties of Dipyridophenazine by High-Resolution Electrophoresis*, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 632-642.
63. D. F. Zigler, K. J. Brewer, *Toward Photodynamic Therapy of Cancer with Platinum Group Metal Polyazine Complexes*, In *Metal-Complexes-DNA Interactions*, N. Hadjiliadis, E. Slatten editors, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2009.
64. C. A. Puckett, J. K. Barton, *Methods to explore cellular uptake of ruthenium complexes*, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 46-47.
65. G. V. Kalayda, S. Fakih, H. Bertram, T. Ludwig, H. Oberleithner, B. Krebs, J. Reedijk, *Structure-toxicity relationships for different types of dinuclear platinum complexes*, *J. Inorg. Biochem.*, 100 (2006) 1332-1338.
66. S. Kemp, N. J. Wheate, D. P. Buck, M. Nikac, J. G. Collins, J. R. Aldrich-Wright, *The effect of ancillary ligand chirality and phenanthroline functional group substitution on the cytotoxicity of platinum(II)-based metallointercalators*, *J. Inorg. Biochem.*, 101 (2007) 1049–1058.
67. S. Roy, K. D. Hagen, P. U. Maheswari, M. Lutz, A. L. Spek, J. Reedijk, G. P. van Wezel, *Phenanthroline Derivatives with Improved Selectivity as DNA-Targeting Anticancer or Antimicrobial Drugs*, *ChemMedChem.* 3 (2008) 1427-1434.
68. C. Deegan, B. Coyle, M. McCann, M. Devereux, D. Egan, *In vitro anti-tumour effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), [Cu(phendione)₃](ClO₄)₂· 4H₂O and [Ag(phendione)₂]ClO₄ using human epithelial cell lines*, *Chem. Biol. Interact.*, 164 (2006) 115-125.
69. M. Devereux, D.O Shea, A. Kellett, M. McCann, M. Walsh, D. Egan, C. Deegan, K. Kedziora, G. Rosair, H. Muller-Bunz, *Synthesis, X-ray crystal structures and biomimetic and anticancer activities of novel copper(II) benzoate complexes incorporating 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole (thiabenzimidazole), 2-(2-pyridyl)benzimidazole and 1,10-phenanthroline as chelating nitrogen donor ligands*, *J. Inorg. Biochem.*, 101 (2007) 881-892.
70. M. McCann, A.L.S. Santos, B.A. da Silva, M.T.V. Romanos, A.S. Pyrrho, M. Devereux, K. Kavanagh, I. Fichtner, A. Kellett, *In vitro and in vivo studies into the*

- biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its copper(II) and silver(I) complexes*, Toxicol. Res. 1 (2012) 47-54.
71. S. Schäfer, I. Ott, R. Gust, W. S. Sheldrick, *Influence of the Polypyridyl (pp) Ligand Size on the DNA Binding Properties, Cytotoxicity and Cellular Uptake of Organoruthenium(II) Complexes of the Type $[(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{L})(\text{pp})]^{n+}$ [$\text{L} = \text{Cl}$, $n = 1$; $\text{L} = (\text{NH}_2)_2\text{CS}$, $n = 2$]*, Eur. J. Inorg. Chem., (2007) 3034-3046.
 72. U. Schatzschneider, J. Niesel, I. Ott, R. Gust, H. Alborzina, S. Wölfl, *Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Metabolic Profiling of Human Cancer Cells Treated with Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{N-N})]\text{Cl}_2$ with $\text{N-N} = \text{bpy}$, *phen*, *dpq*, *dppz*, and *dppn**, ChemMedChem, 3 (2008) 1104-1109.
 73. J. W. Dobrucki, *Interaction of oxygen-sensitive luminescent probes $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ and $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ with animal and plant cells in vitro. Mechanism of phototoxicity and conditions for non-invasive oxygen measurements*, J. Photochem. Photobiol. B, 65 (2001) 136-144.
 74. S. Saha, R. Majumdar, M. Roy, R. R. Dighe, A. R. Chakravarty, *An Iron Complex of Dipyridophenazine as a Potent Photocytotoxic Agent in Visible Light*, Inorg. Chem., 48 (2009) 2652-2663.
 75. P. K. Sasmal, S. Saha, R. Majumdar, R. R. Dighe, A. R. Chakravarty, *Oxovanadium(IV)-based near-IR PDT agents: design to biological evaluation*, Chem. Commun., (2009) 1703–1705.
 76. S. Banerjee, A. Hussain, P. Prasad, I. Khan, B. Banik, P. Kondaiiah, A. R. Chakravarty, *Photocytotoxic Oxidovanadium(IV) Complexes of Polypyridyl Ligands Showing DNA-Cleavage Activity in Near-IR Light*, Eur. J. Inorg. Chem., (2012) 3899–3908.
 77. H. T. Chifotides, K. R. Dunbar, *Interactions of Metal-Metal-Bonded Antitumor Active Complexes with DNA Fragments and DNA*, Acc. Chem. Res., 38 (2005) 146–156.
 78. A. M. Angeles-Boza, H. T. Chifotides, J. D. Aguirre, A. Chouai, P. K.-L. Fu, K. R. Dunbar, C. Turro, *Dirhodium(II,II) Complexes: Molecular Characteristics that Affect in Vitro Activity*, J. Med. Chem., 49 (2006) 6841-6847.
 79. A. M. Angeles-Boza, P. M. Bradley, P. K. L. Fu, M. Shatruk, M. G. Hilfiger, K. R. Dunbar, C. Turro, *Photocytotoxicity of a new $\text{Rh}_2(\text{II,II})$ complex: Increase in cytotoxicity upon irradiation similar to that of PDT agent hematoporphyrin*, Inorg. Chem., 44 (2005) 7262 – 7264.
 80. D. J. Stufkens, A. Vlček Jr, *Ligand-dependent excited state behaviour of $\text{Re}(\text{I})$ and $\text{Ru}(\text{II})$ carbonyl–diimine complexes*, Coord. Chem. Rev., 177 (1998) 127-179.

81. K. S. Schanze, D. B. MacQueen, T. A. Perkins, L. A. Cabana, *Studies of intramolecular electron and energy transfer using the fac-(diimine)Re^I(CO)₃ chromophore*, *Coord. Chem. Rev.*, 122 (1993) 63-89.
82. A. Vlček Jr, M. Busby, *Ultrafast ligand-to-ligand electron and energy transfer in the complexes fac-[Re^I(L)(CO)₃(bpy)]ⁿ⁺*, *Coord. Chem. Rev.*, 250 (2006) 1755–1762.
83. B. P. Sullivan, T. J. Meyer, *Photoinduced irreversible insertion of CO₂ into a metal-hydride bond*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1984) 1244-1245.
84. V. W. W. Yam, V. C. Y. Lau, L. X. Wu, *Synthesis, photophysical, photochemical and electrochemical properties of rhenium(I) diimine complexes with photoisomerizable pyridyl-azo, -ethenyl or -ethyl ligands*, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1998) 1461-1468.
85. J. R. Dilworth, S. J. Parrott, *The biomedical chemistry of technetium and rhenium*, *Chem. Soc. Rev.*, 27 (1998) 43-55.
86. S. S. Jurisson, J. D. Lydon, *Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals*, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2205-2218.
87. M. Wrighton, D. L. Morse, *The Nature of the Lowest Excited State in Tricarbonylchloro-1,10-phenanthroline-rhenium(I) and Related Complexes*, *J. Am. Chem. Soc.*, 96 (1974) 998-1003.
88. D. K. Orsa, G. K. Haynes, S. K. Pramanik, M. O. Iwunze, G. E. Greco, D. M. Ho, J. A. Krause, D. A. Hill, R. J. Williams, S. K. Mandal, *The one-pot synthesis and the fluorescence and cytotoxicity studies of chlorotricarbonyl(a-diimine)rhenium(I), fac-(CO)₃(a-diimine)ReCl, complexes*, *Inorg. Chem. Commun.*, 11 (2008) 1054–1056
89. M. Casanova, E. Zangrando, F. Munini, E. Iengo, E. Alessio, *fac-[Re(CO)₃(dmsO)₃](CF₃SO₃): a new versatile and efficient Re(I) precursor for the preparation of mono and polynuclear compounds containing fac-[Re(CO)₃]⁺ fragments*, *Dalton Trans.*, (2006) 5033-5045.
90. A. Vlček Jr, *Ultrafast Excited-State Processes in Re(I) Carbonyl-Diimine Complexes: From Excitation to Photochemistry*, *Top Organomet Chem*, 29 (2010) 73–114.
91. M. K. Kuimova, W. Z. Alsindi, J. Dyer, D. C. Grills, O. S. Jina, P. Matousek, A. W. Parker, P. Portius, X. Z. Sun, M. Towrie, C. Wilson, J. Yang, M. W. George, *Using picosecond and nanosecond time-resolved infrared spectroscopy for the investigation of excited states and reaction intermediates of inorganic systems*, *Dalton Trans.*, (2003) 3996-4006.
92. M. K. Kuimova, W. Z. Alsindi, A. J. Blake, E. S. Davies, D. J. Lampus, P. Matousek, J. McMaster, A. W. Parker, M. Towrie, X. Z. Sun, C. Wilson, M. W. George, *Probing the Solvent Dependent Photophysics of fac-[Re(CO)₃(dppz-X₂)Cl] (dppz-X₂=11,12-X₂-*

- dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine); $X=CH_3, H, F, Cl, CF_3$), *Inorg. Chem.*, 47 (2008) 9857-9869
93. P. Chen, T. D. Westmoreland, E. Danielson, K. S. Schanze, D. Anthon, P. E. Neveux Jr, T. J. Meyer, *Intramolecular electron transfer in the reductive chromophore-quencher complex [(bpy)Re(CO)₃(py-PTZ)]⁺*, *Inorg. Chem.*, 26 (1987) 1116-1126.
94. D. J. Stufkens, *Spectroscopy, photophysics and photochemistry of zerovalent transition metal α -diimine complexes*, *Coord. Chem. Rev.*, 104 (1990) 39-112.
95. J. Dyer, W. J. Blau, C. G. Coates, C. M. Creely, J. D. Gavey, M. W. George, D. C. Grills, S. Hudson, J. M. Kelly, P. Matousek, J. J. McGarvey, J. McMaster, A. W. Parker, M. Towrie, J. A. Weinstein, *The photophysics of fac-[Re(CO)₃(dppz)(py)]⁺ in CH₃CN: a comparative picosecond flash photolysis, transient infrared, transient resonance Raman and density functional theoretical study*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2 (2003) 542-554.
96. K. Kalyanasundaram, *Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes*, Academic Press, London; San Diego, 1992.
97. I. Beletskaya, V. S. Tyurin, A. Y. Tsivadze, R. Guillard, C. Stern, *Supramolecular Chemistry of Metalloporphyrins*, *Chem. Rev.*, 109 (2009), 1659-1713.
98. K. Szacilowski, W. Macyk, A. Drzewiecka-Matuszek, M. Brindell, G. Stochel, *Bioinorganic Photochemistry: Frontiers and Mechanisms*, *Chem. Rev.*, 105 (2005) 2647-2694.
99. R. Allison, H. Mota, C. Sibata, *Clinical PD/PDT in North America: An historical Review*, *Photodiagn. Photodyn. Therapy*, 1 (2004) 263-277.
100. M. Triesscheijn, P. Baas, J. H. M Schellens, F. A. Stewart, *Photodynamic Therapy in Oncology*, *Oncologist*, 11 (2006) 1034-1044.
101. T. N. Lomova, B. D. Berezin, *Porphyrin Complexes with p, d, and f Metals in High Oxidation States: Structures, Electronic Absorption, and IR Spectra*, *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 27 (2001) 85-104.
102. S. A. Syrbu, T. A. Ageeva, A. S. Semeikin, O. I. Koifman, *Synthesis of meso-phenyl-substituted porphyrins as starting compounds for the preparation of porphyrin-containing polymers*, *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, 56 (2007) 707-731.
103. J. S. Lindsey, *Synthetic Routes to meso-Patterned Porphyrins*, *Acc. Chem. Res.*, 43 (2009) 300-311.

104. A. D. Adler, E. R. Longo, W. Shergalis, *Mechanistic Investigations of Porphyrin Syntheses. I. Preliminary Studies on meso-Tetraphenylporphin*, J. Am. Chem. Soc., 86 (1964) 3145-3149.
105. P. Rothemund, *Porphyrin Studies. III. The Structure of the Porphine Ring System*, J. Am. Chem. Soc., 61 (1939) 2912-2915.
106. A. D. Adler, F. R. Longo, J. D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff, *A Simplified Synthesis for meso-Tetraphenylporphin*, J. Org. Chem., 32 (1967) 476.
107. J. S. Lindsey, I. C. Scheriman, H. C. Hsu, P. C. Kearney, A. M. Marguerettaz, *Rothemund and Adler-Longo reactions revisited: Synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions*, J. Org. Chem., 52 (1987) 827-836.
108. A. Antipas, M. Gouterman, *Porphyrins. Electronic states of cobalt, nickel, rhodium, and palladium complexes*, J. Am. Chem. Soc., 105 (1983) 4896-4901.
109. D. R. McMillin, A. H. Shelton, S. A. Bejune, P. E. Fanwick, R. K. Wall, *Understanding binding interactions of cationic porphyrins with B-form DNA*, Coord. Chem. Rev., 249 (2005) 1451-1459.
110. R. J. Fiel, J. C. Howard, E. H. Mark, N. Datta-Gupta, *Interaction of DNA with a porphyrin ligand: evidence for intercalation*, Nucl. Acids Res., 6 (1979) 3093-3118.
111. E. Izbicka, R. T. Wheelhouse, E. Raymond, K. K. Davidson, R. A. Lawrence, D. Y. Sun, B. E. Windle, L. H. Hurley, D. D. Von Hoff, *Effects of Cationic Porphyrins as G-Quadruplex Interactive Agents in Human Tumor Cells*, Cancer Research, 59 (1999) 639-644.
112. M. J. Carvlin, N. Datta-Gupta, R. J. Fiel, *Circular Dichroism Spectroscopy of a Cationic Porphyrin Bound to DNA*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 108 (1982) 66-73.
113. L. G. Marzilli, D. L. Banville, G. Zon, W. D. Wilson, *Pronounced ¹H and ³¹P NMR Spectral Changes on meso-Tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin Binding to Poly[d(G-C)]·Poly[d(G-C)] and to three tetradecaoligodeoxyribonucleotides: Evidence for Symmetric, Selective Binding to 5'CG3' Sequences*, J. Am. Chem. Soc., 108 (1986) 4188-4192.
114. S. A. Bejune, A. H. Shelton, D. R. McMillin, *New Dicationic Porphyrin Ligands Suited for Intercalation into B-Form DNA*, Inorg. Chem., 42 (2003), 8465-8475.
115. R. McGuire Jr, D. R. McMillin, *Steric effects direct the binding of porphyrins to tetramolecular quadruplex DNA*, Chem. Commun., (2009) 7393-7395.
116. J. Manono, P. A. Marzilli, L. G. Marzilli, *New Porphyrins Bearing Positively Charged Peripheral Groups Linked by a Sulfonamide Group to meso-*

- Tetraphenylporphyrin: Interactions with Calf Thymus DNA*, Inorg. Chem., 48 (2009) 5636-5647.
117. L. A. Lipscomb, F. X. Zhou, S. R. Presnell, R. J. Woo, M. E. Peek, R. R. Plaskon, L. D. Williams, *Structure of a DNA - Porphyrin Complex*, Biochemistry, 35 (1996) 2818-2823.
118. M. Bennett, A. Krah, F. Wien, E. Garman, R. Mckenna, M. Sanderson, S. Neidle, *A DNA-porphyrin minor-groove complex at atomic resolution: The structural consequences of porphyrin ruffling*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 97 (2000) 9476-9481.
119. P. Lugo-Ponce, D. R. McMillin, *DNA-binding studies of Cu(T4), a bulky cationic porphyrin*, Coord. Chem. Rev., 208 (2000) 169-191.
120. R. F. Pasternack, *Circular Dichroism and the Interactions of Water Soluble Porphyrins with DNA – A Minireview*, Chirality, 15 (2003) 329-332.
121. C. Lottner, K. C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner, *Hematoporphyrin-Derived Soluble Porphyrin-Platinum Conjugates with Combined Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity*, J. Med. Chem., 45 (2002) 2064-2078.
122. M. Ghirotti, C. Chiorboli, M. T. Indelli, F. Scandola, M. Casanova, E. Iengo, E. Alessio, *Energy transfer pathways in pyridylporphyrin Re(I) adducts*, Inorg. Chim. Acta, 360 (2007) 1121-1130.
123. M. Casanova, E. Zangrando, E. Iengo, E. Alessio, M. T. Indelli, F. Scandola, M. Orlandi, *Structural and Photophysical Characterization of Multichromophoric Pyridylporphyrin-Rhenium(I) Conjugates*, Inorg. Chem., 47 (2008) 10407-10418.
124. F. M. Engelmann, P. Losco, H. Winnischofer, K. Araki, H. E. Toma, *Synthesis, electrochemistry, spectroscopy and photophysical properties of a series of meso-phenylpyridylporphyrins with one to four pyridyl rings coordinated to [Ru(bipy)₂Cl]⁺ groups*, J. Porph. Phthalocyanines, 6 (2002) 33-42.
125. J. Onuki, A. V. Ribas, M. H. G. Medeiros, K. Araki, H. E. Toma, L. H. Catalani, P. Di Mascio, *Supramolecular Cationic Tetra-ruthenated Porphyrin Induces Single-Strand Breaks and 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine Formation in DNA in the Presence of Light*, Photochem. Photobiol., 63 (1996) 272-277.
126. J. L. Ravanat, J. Cadet, K. Araki, H. E. Toma, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, *Supramolecular Cationic Tetra-ruthenated Porphyrin and Light-Induced Decomposition of 2'-Deoxyguanosine Predominantly Via a Singlet Oxygen-Mediated Mechanism*, Photochem. Photobiol., 68 (1998) 698-702.

127. K. Araki, C. A. Silva, L. H. Catalani, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, *Zinc tetraruthenated porphyrin binding and photoinduced oxidation of calf-thymus DNA*, *J. Inorg. Biochem.*, 78 (2000) 269-273.
128. W. J. Mei, J. Liu, H. Chao, L. N. Ji, A. X. Li, J. Z. Liu, *DNA-binding and cleavage studies of a novel porphyrin ruthenium mixed complex [MPyTPP-Ru(pip)₂Cl]⁺*, *Transition Met. Chem.*, 28 (2003) 852-857.
129. M. Narra, P. Elliott, S. Swavey, *Synthesis, characterization and DNA interactions of 5,15-(4-pyridyl)-10,20 (pentafluorophenyl)porphyrin coordinated to two [Ru(bipy)₂Cl]⁺ groups*, *Inorg. Chim. Acta*, 359 (2006) 2256-2262.
130. M. Cunningham, A. McCrate, M. Nielsen, S. Swavey, *Highly Efficient Visible-Light-Induced Photocleavage of DNA by a Ruthenium-Substituted Fluorinated Porphyrin*, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (2009) 1521-1525.
131. A. McCrate, M. Carlone, M. Nielsen, S. Swavey, *Anaerobic photocleavage of supercoiled DNA by a ruthenium(II) substituted fluorinated porphyrin*, *Inorg. Chem. Comm.*, 13 (2010) 537-539.
132. Z. Xu, S. Swavey, *Light induced photoreactions with plasmid DNA by Cu/Ru and Cu/Ru/Pt multi-metallic porphyrins*, *Dalton Trans.*, 40 (2011) 7319-7326
133. P. Sweigert, Z. Xu, Y. Hong, S. Swavey, *Nickel, copper, and zinc centered ruthenium-substituted porphyrins: effect of transition metals on photoinduced DNA cleavage and photoinduced melanoma cell toxicity*, *Dalton Trans.*, 41 (2012) 5201-5208.
134. F. Schmitt, P. Govindaswamy, G. Suss-Fink, W. H. Ang, P. J. Dyson, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, *Ruthenium Porphyrin Compounds for Photodynamic Therapy of Cancer*, *J. Med. Chem.*, 51 (2008) 1811-1816.
135. F. Schmitt, P. Govindaswamy, O. Zava, G. Suss-Fink, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, *Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 14 (2009) 101-109.
136. G. S. Smith, B. Therrien, *Targeted and multifunctional arene ruthenium chemotherapeutics*, *Dalton Trans.*, 40 (2011) 10793-10800.
137. M. Pernot, T. Bastogne, N. P. E. Barry, B. Therrien, G. Koellensperger, S. Hann, V. Reshetov, M. Barberi-Heyob, *Systems biology approach for in vivo photodynamic therapy optimization of ruthenium-porphyrin compounds*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 117 (2012) 80-89.

138. L. R. Bernstein, *Therapeutic gallium compounds*, in *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*, M. Gielen, E. R. T. Tiekink, Editors, Wiley, New York, 2005, p. 259-277.
139. C. Levaditi, J. Bardet, A. Tchakirian, A. Vaisman, *Le gallium, propriétés thérapeutiques dans la syphilis et les trypanosomiases expérimentales*, Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences (France), 192 (1931) 1142-1143.
140. M. A. Green, M. J. Welch, *Gallium radiopharmaceutical chemistry*, Nucl. Med. Biol., 16 (1989) 435-448.
141. L. R. Bernstein, *Mechanisms of therapeutic activity for gallium*, Pharmacol. Rev., 50 (1998) 665-682.
142. R. E. Weiner, *The mechanism of ^{67}Ga localization in malignant disease*, Nucl. Med. Biol., 23 (1996) 745-751.
143. G. Kubal, A. B. Mason, S. U. Patel, P. J. Sadler, R. C. Woodworth, *Oxalate and Ga^{3+} -induced structural changes in human serum transferrin and its recombinant N-lobe: ^1H NMR detection of preferential C-lobe Ga^{3+} binding*, Biochemistry, 32 (1993) 3387-3395.
144. P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, *Gallium in cancer treatment*, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 42 (2002) 283-296.
145. C. R. Chitambar, J. Narasimhan, J. Guy, D. S. Sem, W. J. O'Brien, *Inhibition of ribonucleotide reductase by gallium in murine leukemic L1210 cells*, Cancer Res., 51 (1991) 6199-6201.
146. M. M. Hart, C. F. Smith, S. T. Yancey, R. H. Adamson, *Toxicity and antitumor activity of gallium nitrate and periodically related metal salts*, J. Natl. Cancer Inst., 47 (1971) 1121-1127.
147. R. Donnelly, R. S. Bockman, S. B. Doty, A. L. Boskey, *Bone particles from gallium-treated rats are resistant to resorption in vivo*, Bone and Mineral, 12 (1991) 167-179.
148. H. C. Blair, S. L. Teitelbaum, H.-L. Tan, P. H. Schlesinger, *Reversible inhibition of osteoclastic activity by bone-bound gallium (III)*, J. Cell Biochem., 48 (1992) 401-410.
149. L. R. Bernstein, J. J. M. van der Hoeven, R. O. Boer, *Hepatocellular Carcinoma Detection by Gallium Scan and Subsequent Treatment by Gallium Maltolate: Rationale and Case Study*, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 11 (2011) 585-590.
150. I. H. Krakoff, R. A. Newman, R.S. Goldberg, *Clinical toxicologic and pharmacologic studies of gallium nitrate*, Cancer, 44 (1979) 1722-1727.

151. P. Collery, J. L. Domingo, B. K. Keppler, *Preclinical toxicology and tissue gallium distribution of a novel antitumour gallium compound: tris(8-quinolinolato)gallium(III)*, *Anticancer Res.*, 16 (1996) 687-692.
152. L. R. Bernstein, T. Tanner, C. Godfrey, B. Noll, *Chemistry and pharmacokinetics of gallium maltolate, a compound with high oral gallium bioavailability*, *Metal-based Drugs*, 7 (2000) 33-47.
153. A. R. Timerbaev, *Advances in developing tris(8-quinolinolato)gallium(III) as an anticancer drug: critical appraisal and prospects*, *Metallomics*, 1 (2009) 193-198.
154. C. R. Chitambar, D. P. Purpi, J. Woodliff, M. Yang, J. P. Wereley, *Development of Gallium Compounds for Treatment of Lymphoma: Gallium Maltolate, a Novel Hydroxypyrrone Gallium Compound, Induces Apoptosis and Circumvents Lymphoma Cell Resistance to Gallium Nitrate*, *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 322 (2007) 1228-1236.
155. M. A. Jakupec, B. K. Keppler, *Gallium in Cancer Treatment*, *Curr. Top. Med. Chem.*, 4 (2004) 1575-1583.
156. J. A. Lessa, G. L. Parrilha, H. Beraldo, *Gallium complexes as new promising metallodrug candidates*, *Inorg. Chim. Acta*, 393 (2012) 53-63.
157. V. B. Arion, M. A. Jakupec, M. Galanski, P. Unfried, B. K. Keppler, *Synthesis, structure, spectroscopic and in vitro antitumour studies of a novel gallium(III) complex with 2-acetylpyridine ⁴N-dimethylthiosemicarbazone*, *J. Inorg. Biochem.*, 91 (2002) 298-305.
158. C. R. Kowol, R. Berger, R. Eichinger, A. Roller, M. A. Jakupec, P. P. Schmidt, V. B. Arion, B. K. Keppler, *Gallium(III) and Iron(III) Complexes of r-N-Heterocyclic Thiosemicarbazones: Synthesis, Characterization, Cytotoxicity, and Interaction with Ribonucleotide Reductase*, *J. Med. Chem.*, 50 (2007) 1254-1265.
159. I. Stojiljkovic, V. Kumar, N. Srinivasan, *Non-iron metalloporphyrins: potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria*, *Mol. Microbiol.*, 31 (1999) 429-442.
160. K. Begum, H. S. Kim, V. Kumar, I. Stojiljkovic, Y. Wataya, *In vitro antimalarial activity of metalloporphyrins against Plasmodium falciparum*, *Parasitol. Res.*, 90 (2003) 221-224.
161. M. Kuroki, K. Hachimine, H. Abe, H. Shibaguchi, M. Kuroki, S.-I. Maekawa, J. Yanagisawa, T. Kinugasa, T. Tanaka, Y. Yamashita, *Sonodynamic Therapy of Cancer Using Novel Sonosensitizers*, *Anticancer Res.*, 27 (2007) 3673-3678.

162. S. Umemura, N. Yumita, R. Nishigaki, *Enhancement of ultrasonically induced cell damage by a gallium-porphyrin complex, ATX-70*, Jpn J. Cancer Res., 84 (1993) 582-588.
163. M. Maruyama, T. Asano, T. Uematsu, T. Nakagohri, M. Hasegawa, H. Miyauchi, C. Iwashita, K. Isono, *Enhancement of the antitumor effect by combined use of high-energy shock waves and ATX-70*, Jpn J. Cancer Res., 86 (1995) 800-801.
164. N. Yumita, K. Sasaki, S. Umemura, A. Yukawa, R. Nishigaki, *Sonodynamically induced antitumor effect of gallium-porphyrin complex by focused ultrasound on experimental kidney tumor*, Cancer Lett., 112 (1997) 79-86.
165. N. Miyoshi, V. Misik, P. Riesz, *Sonodynamic toxicity of gallium-porphyrin analogue ATX-70 in human leukemia cells*, Radiat. Res., 148 (1997) 43-47.
166. W. F. L. Armarego, in Purification of Laboratory Chemicals, W. F. L. Armarego, D. D. Perrin (eds.), Butterworth Heinemann, Oxford, Boston, 1996.
167. G. M. Sheldrick, SHELX97. Program for Crystal Structure Solution, Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
168. M. F. Reichmann, S. A. Rice, C. A. Thomas, P. Doty, *A Further Examination of the Molecular Weight and Size of Desoxypentose Nucleic Acid*, J. Am. Chem. Soc., 76 (1954) 3047-3053.
169. G. Cohen, H. Eisenberg, *Viscosity and Sedimentation Study of Sonicated DNA-Proflavine Complexes*, Biopolymers, 8 (1969) 45-55.
170. R. Supino, in: S. O'Hare, C. K. Atterwill (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 43, Humana Press, Totowa, NJ, 1995, pp. 137-149.
171. S. Kesselouri, A. Garoufis, A. Katehanakis, G. Kalkanis, S. P. Perlepes, N. Hadjiliadis, *1:1 Metal complexes of 2-(2'-pyridyl)quinoxaline, a ligand unexpectedly formed by the reaction between 2-acetylpyridine and 1,2-phenylenediamine*, Inorg. Chim. Acta, 207 (1993) 255-258.
172. M. Yamada, Y. Tanaka, Y. Yashimoto, S. Kuroda, I. Shima, *Synthesis and Properties of Diamino-Substituted Dipyrido [3,2-a:2',3'-c]phenazine*, Bull. Chem. Soc. Jpn., 65 (1992) 1006-1011.
173. F. Calderazzo, F. Marchetti, G. Pampaloni, V. Passarelli, *Co-ordination properties of 1,10-phenanthroline-5,6-dione towards group 4 and 5 metals in low and high oxidation states*, J. Chem. Soc., Dalton Trans., (1999) 4389-4396.
174. Inorganic Syntheses, Vol 23, Chapter 2, Edited by Stanley Kirschner, 1985 by Inorganic Syntheses Inc., John Wiley & Sons, Inc, 1985, Canada.

175. A. Adler, F. Longo, J. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff, A *Simplified Synthesis for meso-Tetraphenylporphin*, J. Org. Chem., 32 (1967) 476.
176. S. Sugata, S. Yamanouchi, Y. Matsushima, *meso-Tetrapyrrolylporphins and their metal complexes. Syntheses and Physico-Chemical Properties*, Chem. Pharm. Bull., 25 (1977) 884-889.
177. E. B. Fleischer, *$\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetra-(4-pyridyl)-porphine and Some of its Metal Complexes*, Inorg. Chem. 1 (1962) 493-495.
178. W. Paw, R. Eisenberg, *Synthesis, Characterization, and Spectroscopy of Dipyrrodocatecholate Complexes of Platinum*, Inorg. Chem., 36 (1997) 2287-2293.
179. L. Wallace, D. P. Rillema, *Photophysical Properties of Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes Containing Alkyl- and Aryl-Substituted Phenanthrolines as Ligands*, Inorg. Chem., 32 (1993) 3836-3843.
180. Y. Lei, F. C. Anson, *Hydration of the Carbonyl Groups in 1,10-Phenanthroline-5,6-dione Induced by Binding Protons or Metal Cations to the Pyridine Nitrogen Sites*, J. Am. Chem. Soc., 117 (1995) 9849-9854.
181. S. A. Poteet, M. B. Majewski, Z. S. Breitbach, C. A. Griffith, S. Singh, D. W. Armstrong, M. O. Wolf, F. M. MacDonnell, *Cleavage of DNA by Proton-Coupled Electron Transfer to a Photoexcited, Hydrated Ru(II) 1,10-Phenanthroline-5,6-dione Complex*, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 2419-2422.
182. I. Veroni, C.A. Mitsopoulou, F. J. Lahoz, *Synthesis, spectroscopic properties and crystal structure of mononuclear tricarbonylrhenium(I) chloride complexes carrying 6-functionalised quinoxalines*, J. Organomet. Chem., 693 (2008) 2451-2457.
183. S. P. Perlepes, A. Garoufis, J. Sletten, E. G. Bakalbassis, G. Plakatouras, E. Katsarou, N. Hadjiliadis, *Preparation, structural characterization and physical properties of palladium(II) and platinum(II) complexes of the biheteroaromatic ligand 2-(2'-pyridyl)quinoxaline (L)*, Inorg. Chim. Acta, 261 (1997) 93-102.
184. Y. O. Jang, S. W. Lee, *Homoleptic silver-bis(pyridine) coordination polymers: $[Ag(L^1)_2] \cdot (PF_6)$, $[Ag(L^1)_2] \cdot (SbF_6)$, $[Ag(L^1)_2] \cdot (BF_4)$, $[Ag(L^2)] \cdot (PF_6)$, and $[Ag(L^3)_{1.5}] \cdot (CF_3SO_3)(H_2O)_2$ $\{L^1 = (4-py)-CH=N-C_{10}H_6-N=CH-(4-py)$; $L^2 = (2-py)-CH=N-C_{10}H_6-N=CH-(2-py)$; $L^3 = (3-py)-CH=N-C_{14}H_{12}-N=CH-(3-py)\}$* , Polyhedron, 29 (2010) 2731-2738.
185. Ε. Βερώνη, *Σύνθεση, χαρακτηρισμός και μελέτη α -διμινικών συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης*, Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2006.

- 186.** LouAnn Sacksteder, A. P. Zipp, E. A. Brown, J. Streich, J. N. Demas, B. A. DeGraf, *Luminescence Studies of Pyridine α -Diimine Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes*, *Inorg. Chem.*, 29 (1990) 4335-4340.
- 187.** K. Nakamaru, *Synthesis, Luminescence Quantum Yields, and Lifetimes of Trischelated Ruthenium(II) Mixed-ligand Complexes Including 3,3'-Dimethyl-2,2'-bipyridyl*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 55 (1982) 2697-2705.
- 188.** R. Sahai, D.P. Rillema, R. Shaver, S. Van Wallendael, D.C. Jackman, M. Boldaji, *Complexes of Ruthenium(II) with bpmRe(CO)₃Cl and HAT(Re(CO)₃Cl)₂ as Ligands: Syntheses and Redox and Luminescence Properties*, *Inorg. Chem.*, 28 (1989) 1022-1028.
- 189.** E. G. Bakalbassis, J. Mrozinski, S. P. Perlepes, N. Hadjiliadis, F. Lianza, A. Albinati, *2-(2'-pyridyl)quinoxaline (L) as a bidentate ligand: crystal structure, magnetic properties and quantum chemical study of [Cu₂Cl₄L₂]*, *Polyhedron*, 13 (1994) 3209-3218.
- 190.** S. P. Perlepes, S. Kasselouri, A. Garoufis, F. Lutz, R. Bau, N. Hadjiliadis, *Reaction of the biheteroaromatic ligand 2-(2'-pyridyl)quinoxaline (L) with zinc(II) and cadmium(II) halides: Preparation and characterization of the 1 : 1 complexes*, *Polyhedron*, 14 (1995) 1461-1470.
- 191.** K. Araki, H.E. Toma, *Synthesis and characterization of a multibridged porphyrin complex containing peripheral bis(bipyridine)-ruthenium(II) groups*, *J. Coord. Chem.*, 30 (1993) 9-17.
- 192.** J. W. Buchler, L. Puppe, *Synthese und Konfiguration weiterer (α,γ -Dimethyl- α,γ -dihydrooctaäthylporphinato)metallkomplexe*, *Liebigs Ann. Chem.*, 1974, 1046-1062.
- 193.** S. S. Eaton, D. M. Fishwild, G. R. Eaton, *Effect of Para Substituent on Rates of Phenyl Ring Rotation in Gallium Complexes of Para-Substituted Tetraphenylporphyrins*, *Inorg. Chem.*, 17 (1978) 1542-1545.
- 194.** A. Coutsolelos, R. Guilard, D. Bayeul, C. Lecomte, *Gallium(III) porphyrins: synthesis and physicochemical characteristics of halogeno Gallium(III) porphyrins – X-ray crystal structure of chloro-(5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato) Gallium(III)*, *Polyhedron*, 5 (1986), 1157-1164.
- 195.** N. Datta-Gupta, J. C. Fanning, L. L. Dickens, *Some Metal Complexes of α , β , γ , δ -tetra-(4-pyridyl) porphine*, *J. Coord. Chem.*, 5 (1976) 201-207.
- 196.** K. M. Kadish, J. L. Cornillon, A. Coutsolelos, R. Guilard, *Synthesis, Electrochemistry, and Ligand-Addition Reactions of Gallium(III) Porphyrins*, *Inorg. Chem.*, 26 (1987) 4167-4173.

197. A. G. DiPasquale, J. M. Mayer, *Hydrogen Peroxide: A Poor Ligand to Gallium Tetraphenylporphyrin*, J. Am. Chem. Soc., 130 (2008) 1812-1813.
198. O. Ohno, Y. Kaizu, H. Kobayashi, *Luminescence of some metalloporphins including the complexes of the IIIb metal group*, J. Chem. Phys., 82 (1985) 1779-1787.
199. D. A. Lutterman, A. Chouai, Y. Liu, Y. Sun, C. D. Stewart, K. R. Dunbar, C. Turro, *Intercalation Is Not Required for DNA Light-Switch Behavior*, J. Am. Chem. Soc., 130, (2008) 1163-1170.
200. Δ. Κεσίσογλου, Γ. Ψωμάς, *Βιοανόργανη Χημεία*, εκδ. Ζήτη, 2011.
201. Y. F. Song, P. Yang, *Mononuclear tetrapyrido[3,2-a:2',3'-c:3'',2''-h:2''',3'''-j]phenazine (tpphz) cobalt complex*, Polyhedron, 20, (2001) 501–506.
202. G. Psomas, *Mononuclear metal complexes with ciprofloxacin: Synthesis, characterization and DNA-binding properties*, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 1798-1811.
203. C. A. Mitsopoulou, C. E. Dagas, C. Makedonas, *Synthesis, characterization, DFT studies and DNA binding of mixed platinum (II) complexes containing quinoxaline and 1,2-dithiolate ligands*, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 77-86.
204. C. A. Mitsopoulou, C. E. Dagas, C. Makedonas, *Characterization and DNA interaction of the Pt(II)(pq)(bdt) complex: A theoretical and experimental research*, Inorg. Chim. Acta 361 (2008) 1973-1982.
205. A. Chouai, S. E. Wicke, C. Turro, J. Bacsá, K. R. Dunbar, D. Wang, R. P. Thummel, *Ruthenium(II) Complexes of 1,12-Diazaperylene and Their Interactions with DNA*, Inorg. Chem. 44 (2005) 5996-6003.
206. S. A. Lesko, R. J. Lorentzen, P. O. P. Ts'o, *Role of Superoxide in Deoxyribonucleic Acid Strand Scission*, Biochemistry 19 (1980) 3023–3028.
207. S. Ghosh, A. C. Barve, A. A. Kumbhar, A. S. Kumbhar, V. G. Puranik, P. A. Datar, U. B. Sonawane, R. R. Joshi, *Synthesis, characterization, X-ray structure and DNA photocleavage by cis-dichloro bis(diimine) Co(III) complexes*, J. Inorg. Biochem., 100 (2006) 331-343.
208. B. R. Williams, S. R. Dalton, M. Skiba, S. E. Kim, A. Shatz, P. J. Carroll, S. J. Nietter Burgmayer, *Pteridine Cleavage Facilitates DNA Photocleavage by Ru(II) Polypyridyl Compounds*, Inorg. Chem. 51 (2012) 12669-12681.
209. H.-J. Shi, Y. Chen, F. Gao, H.-J. Yu, G.-Y. Li, H. Chao, X.-F. Shi, L.-N. Ji, *Synthesis, DNA-binding and DNA-photocleavage properties of ruthenium(II) mixed-polypyridyl complex $[Ru(tbz)_2(dppz)]^{2+}$* , J. Mol. Struct., 892 (2008) 485-489.

- 210.** S. Dhar, M. Nethaji, A. R. Chakravarty, *Steric Protection of a Photosensitizer in a N,N-Bis[2-(2-pyridyl)ethyl]-2-phenylethylamine-copper(II) Bowl that Enhances Red Light-Induced DNA Cleavage Activity*, Inorg. Chem., 44 (2005) 8876-8883.
- 211.** S. Rani-Beeram, K. Meyer, A. McCrate, Y. Hong, M. Nielsen, S. Swavey, A *Fluorinated Ruthenium Porphyrin as a Potential Photodynamic Therapy Agent: Synthesis, Characterization, DNA Binding, and Melanoma Cell Studies*, Inorg. Chem., 47 (2008) 11278-11283.
- 212.** V. I. Ivanov, E. Minchenkova, K. Schyolkina, I. Poletayev, *Different Conformations of Double-Stranded Nucleic Acid in Solution as Revealed by Circular Dichroism*, Biopolymers, 12 (1973) 89-110.
- 213.** W. A. Baase, W. C. Johnson Jr, *Circular dichroism and DNA secondary structure*, Nucleic Acids Res., 6 (1979) 797-814.
- 214.** M. C. Chalbot, L. Gryllos, K. Kefokeris, N. Manoussakis, C. Verchère-Béaur, M. Perrée-Fauvet, A. G. Coutsolelos, *DNA-Interaction and nuclease activity of porphyrin-hydroxamic acid derivatives in the presence of lanthanides*, J. Porphyrins Phthalocyanines, 15 (2011) 705-717.
- 215.** W. F. Keir, E. J. Land, A. H. MacLennan, D. J. McGarvey, T. G. Truscott, *Section II – Photophysics and Instrumentation: Pulsed radiation studies of Photodynamic Sensitisers: The nature of DHE*, Photochem. Photobiol., 46 (1987) 587-589.
- 216.** V. S. Chirvony, *Primary photoprocesses in cationic 5,10,15,20-meso-tetrakis(4-N-methylpyridiniumyl)porphyrin and its transition metal complexes bound with nucleic acids*, J. Porphyrins Phthalocyanines, 7 (2003) 766-774.
- 217.** X.-J. Zhu, P. Wang, H. W. C. Leung, W.-K. Wong, W.-Y. Wong, D. W. J. Kwong, *Synthesis, Characterization, and DNA-Binding and -Photocleavage Properties of Water-Soluble Lanthanide Porphyrinate Complexes*, Chem. Eur. J., 17 (2011) 7041-7052.
- 218.** T. Mosmann, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*, J. Immunological Methods, 65 (1983) 55-63.
- 219.** A. Bourkoula, M. Paravatou-Petsotas, A. Papadopoulos, I. Santos, H. J. Pietzsch, E. Livaniou, M. Pelecanou, M. Papadopoulos, I. Pirmettis, *Synthesis and characterization of rhenium and technetium-99m tricarbonyl complexes bearing the 4-[3-bromophenyl]quinazoline moiety as a biomarker for EGFR-TK imaging*, Eur. J. Med. Chem., 44 (2009) 4021-4027.

220. M. A. Scharwitz, I. Ott, Y. Geldmacher, R. Gust, W. S. Sheldrick, *Cytotoxic half-sandwich rhodium(III) complexes: Polypyridyl ligand influence on their DNA binding properties and cellular uptake*, J. Organomet. Chem., 693 (2008) 2299–2309.
221. M. M. Ali, M. M. F. Ismail, M. S. A. El-Gabby, M. A. Zahran, T. A. Ammar, *Synthesis and Antimicrobial Activities of Some Novel Quinoxalinone Derivatives*, Molecules 5 (2000) 864-873.
222. H.-R. Park, T.H. Kim, K.-M. Bark, *Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various Environments*, Eur. J. Med. Chem., 37 (2002) 443-460.
223. B. Zarranz, A. Jaso, I. Aldana, A. Monge, *Synthesis and anticancer activity evaluation of new 2-alkylcarbonyl and 2-benzoyl-3-trifluoromethyl-quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives*, Bioorg. Med. Chem. 12 (2004) 3711-3721.
224. S. T. Hazeldine, L. Polin, J. Kushner, K. White, T. H. Corbett, J. Biehl, J. P. Horwitz, *Part 3: Synthesis and biological evaluation of some analogs of the antitumor agents, 2-{4-[(7-chloro-2-quinoxalinyloxy]phenoxy}propionic acid, and 2-{4-[(7-bromo-2-quinolinyloxy]phenoxy}propionic acid*, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 1069-1081.
225. G. Morin, *Is telomerase a universal cancer target?*, J. Natl. Cancer Inst., 87 (1995) 859–861.
226. E. K. Parkinson, *Do telomerase antagonists represent a novel anti-cancer strategy?*, Br. J. Cancer, 73 (1996) 1–4.
227. K. K.-W. Lo, M.-W. Louie, K. Y. Zhang, *Design of luminescent iridium(III) and rhenium(I) polypyridine complexes as in vitro and in vivo ion, molecular and biological probes*, Coord. Chem. Rev., 254 (2010) 2603-2622.
228. F. L. Thorp-Greenwood, R. G. Balasingham, M. P. Coogan, *Organometallic complexes of transition metals in luminescent cell imaging applications*, J. Organomet. Chem., 714 (2012) 12-21.
229. A. B. Tsoupras, C. Iatrou, C. Frangia, C. A. Demopoulos, *The Implication of Platelet Activating Factor in Cancer Growth and Metastasis: Potent Beneficial Role of PAF-Inhibitors and Antioxidants*, Infectious Disorders-Drug Targets, 9 (2009) 390-399.
230. V. Melnikova, M. Bar-Eli, *Inflammation and melanoma growth and metastasis: The role of platelet-activating factor (PAF) and its receptor*, Cancer Metastasis Rev. 26 (2007) 359-371.
231. A. C. Onuchic, C. M. L. Machado, R. F. Saito, F. J. Rios, S. Jancar, R. Chammas, *Expression of PAFR as Part of a Prosurvival Response to Chemotherapy: A Novel*

Target for Combination Therapy in Melanoma, *Mediators Inflamm.*, 2012 (2012)
Article ID 175408, 6 pages.

- 232.** C. A. Demopoulos, R. N. Pinckard, D. J. Hanahan, *Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators)*, *J. Biol. Chem.*, 254 (1979) 9355-9358.