



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Ανάπτυξη νέων χημειοθεραπευτικών για την στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου»

Κουφού Θεοδώρα (ΑΜ:35)

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Σωτήριος Χατζηκακού

Ιωάννινα, 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

(Δ.Π.Μ.Σ.)

«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

***«Ανάπτυξη νέων χημειοθεραπευτικών για την στοχευμένη
θεραπεία του καρκίνου»***

Κουφού Θεοδώρα (ΑΜ:35)

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Σωτήριος Χατζηκακού

Ιωάννινα, 2024

**Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
(Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

Της Θεοδώρας Κουφού

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Δρ Σωτήριος Χατζηκακού

Θέμα: «Ανάπτυξη νέων φωτοενεργοποιούμενων χημειοθεραπευτικών για την στοχευμένη
θεραπεία του καρκίνου».

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.:.....^A /...-...-.....

1. Χατζηκακού Σωτήριος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
(Επιβλέπων)
2. Κουτσολέλος Αθανάσιος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Μέλος)
3. Μητσοπούλου Χριστιάνα, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών (Μέλος)

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.
Καθηγητής Σωτήριος Χατζηκακού

Ο/Η Γραμματέας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» του τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Βιολογικής Ανόργανης Χημείας υπό την επίβλεψη του Δρ. Σωτήριου Χατζηκακού.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Σωτήριο Χατζηκακού, Καθηγητή του τμήματος Χημείας και Διευθυντή του διδρυματικού μεταπτυχιακού προγράμματος της «Ανόργανης Βιολογικής Χημείας» για την καθοδήγηση, την επιμονή και το ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι και την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κα Χριστίνα Μπαντή, Μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Βιολογικής Ανόργανης Χημείας και Διδάσκουσα Βιολογίας του τμήματος Χημείας, για την καθοδήγηση, την βοήθεια και την συμβολή της στα βιολογικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, Κουτσολέλο Αθανάσιο και την καθηγήτρια του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Μητσοπούλου Χριστιάνα, που συμφώνησαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω πολύ τους φίλους και συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Ανόργανης Βιολογικής Χημείας για τη συνεργασία, τη βοήθεια και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής μου.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου και τους φίλους μου που με στηρίζουν σε κάθε βήμα μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν καθ' όλη την διάρκεια των ακαδημαϊκών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί έναν από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους τύπους καρκίνου, κυρίως στις γυναίκες. Παγκοσμίως, το ποσοστό θανάτων λόγω αυτού είναι αρκετά αυξημένο, ενώ στην Ελλάδα αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτων λόγω καρκίνου στο γυναικείο πληθυσμό. Λόγω αυτών των δεδομένων, λοιπόν, δημιουργήθηκε η ανάγκη να αναπτυχθούν νέα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, εκλεκτικά ως προς τα καρκινικά κύτταρα, αποφεύγοντας κατά το δυνατόν τις παρενέργειες από την χρήση τους. Σκοπός, της παρούσας διπλωματικής, αποτελεί η σύνθεση μεταλλοφαρμάκων, ο χαρακτηρισμός τους και η μελέτη της βιολογικής τους δράσης.

Για την σύνθεση των μεταλλοφαρμάκων CuMToN_A και CuMToN_B, χρησιμοποιήθηκαν τριένυδρος νιτρικός χαλκός $[Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O]$ και ο μιτοχονδριοτροπικός παράγοντας tri-m-tolylphosphine σε αναλογίες 1:2 για το $[Cu(NO_3)(tmtP)_2]$ (CuMToN_A) που αποτελείται από δύο ισομερή (CuMToN_A_1 και CuMToN_A_2) και 1:3 για το $[Cu(NO_3)(tmtP)_3]$ (CuMToN_B). Τα σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν με προσδιορισμό του σημείου τήξης, με προσδιορισμό της διαλυτότητας τους και με τις φασματοσκοπικές τεχνικές της Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας Μετασχηματισμού Fourier Ολικής Εσωτερικής Ανάκλασης (ATR-FT-IR), της Απορρόφησης Υπέρυθρης-Ορατής Ακτινοβολίας (UV-Vis), Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (1H -NMR), φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X και το μοριακό τους βάρος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της κρυοσκοπίας.

Με μελέτη *ex vivo* προσδιορίστηκε ο τρόπος δέσμευσης των CuMToN_A και CuMToN_B στο calf thymus DNA (CT-DNA) και οι σταθερές σύνδεσης τους με αυτό, με χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis, φασματοσκοπίας φθορισμού και με την μέθοδο προσδιορισμού του ιξώδους. Επιπλέον, η φωτοδραστικότητά τους και η δέσμευση τους στο

DNA μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας ακτινοβολία UVB. Τέλος, ερευνήθηκε η *in vivo* τοξικότητά τους έναντι του ζωοπλαγκτού *Artemia salina*.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common types of cancer, especially in women. Worldwide, the death rate due to this is quite high, while in Greece it is the first cause of death, due to cancer, in the female population. Due to these data, therefore, the need arose to develop new chemotherapeutic drugs, selective for cancer cells, avoiding as much as possible the side effects from their use. The purpose of this thesis is the synthesis of metallodrugs, their characterization and the study of their biological action.

For the synthesis of CuMToN_A and CuMToN_B metallodrugs, copper nitrate trihydrate $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ reacts with the mitochondriotropic agent tri-*m*-tolylphosphine in 1:2 molar ratios for $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{tmtP})_2]$ (CuMToN_A) consisting of two isomers (CuMToN_A_1 and CuMToN_A_2) and 1:3 molar ratios in case of $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{tmtP})_3]$ (CuMToN_B). The complexes were characterized in solid state by melting point, X-ray fluorescence spectroscopy, attenuated total reflectance-Fourier transform infra-red, and Ultraviolet-Visible (UV-Vis) and Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$), spectroscopies in solution. The crystal structure of CuMToN_A and CuMToN_B were determined by single crystal X-ray crystallography in solid state while the molecular weight was calculate with cryoscopy.

The binding affinity of CuMToN_A and CuMToN_B towards calf thymus-DNA(CT-DNA) was, *ex vivo*, studied by UV-Vis, fluorescence spectroscopies and viscosity measurements. Furthermore, their photoreactivity of DNA binding was also study using UVB radiation. Finally, complexes *in vivo* toxicity was determined against the zooplankton *Artemia salina*.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	10
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	13
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	14
1.1 Καρκίνος.....	14
1.2 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων.....	15
1.3 Θεραπεία.....	18
1.4 DNA και χημειοθεραπευτικά φάρμακα.....	19
1.4.1 Δομή του DNA.....	19
1.4.2 Χημειοθεραπευτικά Φάρμακα.....	21
1.4.3 Μεταλλοφάρμακα.....	28
1.4.4 Τρόποι αλληλεπίδρασης των μεταλλοφαρμάκων με το DNA.....	30
1.5 Χαλκός.....	33
1.5.1 Χαλκός και καρκίνος.....	34
1.5.2 Χαλκός και βλάβη στο DNA.....	35
1.5.3 Χαλκός και θεραπεία του καρκίνου.....	37
1.6 Μιτοχόνδριο.....	40
1.6.1 Μιτοχόνδριο-γενικά στοιχεία.....	40
1.6.2 Ο ρόλος του μιτοχονδρίου στα καρκινικά κύτταρα.....	41
1.6.3 Ο ρόλος του μιτοχονδρίου στην θεραπεία του καρκίνου.....	42
1.7 Απόπτωση: Εξωγενής και Ενδογενής οδός απόπτωσης.....	43
1.8 Tri-m-tolyl-phosphine.....	46
ΣΚΟΠΟΣ.....	47
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	48
2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	48
2.2 Χημικό Μέρος.....	49
2.2.1 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού συμπλόκων.....	50
3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	62
3.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των CuMToN_A και CuMToN_B με το calf thymus DNA (CT-DNA) μέσω απορρόφησης UV.....	62
3.2 Μελέτη του DNA με τα CuMToN_A ή CuMToN_B μέσω φθορισμού.....	66
3.2.1 Φασματοσκοπία φθορισμού.....	66
3.3 Μελέτη του DNA με τα CuMToN_A ή CuMToN_B μέσω ιξωδομετρίας.....	68

3.4 Δοκιμή <i>Artemia salina</i>	70
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
4.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των ενώσεων	71
4.1.1 Σύνθεση των CuMToN_A και CuMToN_B.....	71
4.1.2 Σημείο τήξης	71
4.1.3 Διαλυτότητα	72
4.1.4 Κρυσκοπία	73
4.1.5 ATR-FTIR.....	73
4.1.6 XRF	77
4.1.7 Φασματοσκοπία ¹ H-NMR.....	79
4.1.8 Φασματοσκοπία UV-Vis.....	84
4.1.9 XRD.....	86
4.1.10 Φωτοενεργότητα των συμπλόκων CuMToN_A και CuMToN_B με επίδραση UVB ακτινοβολίας.....	90
4.2 Ex vivo.....	95
4.2.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των CuMToN_A και CuMToN_B με το calf thymus DNA (CT-DNA) μέσω απορρόφησης UV.....	95
4.2.2 Φασματοσκοπία Φθορισμού.	99
4.2.3 Ιξωδομετρία	102
4.2.4 Δοκιμή <i>Artemia salina</i>	104
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	105
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	108
7.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	115
8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ	118

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

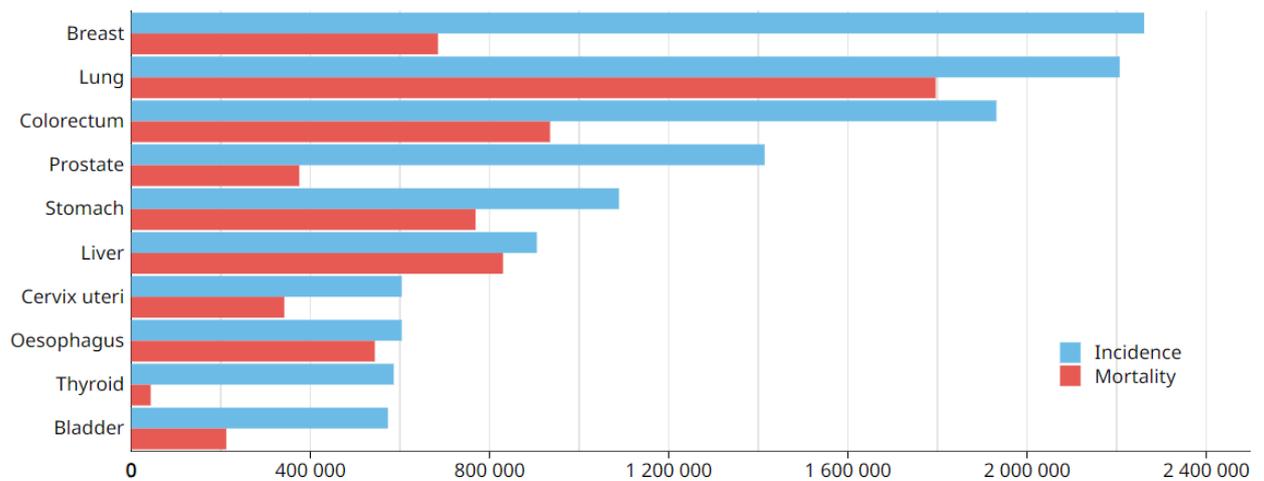
CHCl ₃	Chloroform (χλωροφόρμιο)
CH ₂ Cl ₂	Dichloromethane (διχλωρομεθάνιο)
DMF	Dimethylformamide (διμέθυλ-φορμαμίδιο)
DMSO	dimethyl sulfoxide (διμεθυλ-σουλφοξείδιο)
ddH ₂ O	double distilled water (διπλά απεσταγμένο νερό)
Cu(NO ₃) ₂ · 3H ₂ O	Copper nitrate trihydrate (τριένυδρος νιτρικός χαλκός)
MeCN	Acetonitrile (ακετονιτρίλιο)
MeOH	Methanol (μεθανόλη)
UV-Vis	Ultraviolet-visible spectroscopy (φασματοφωτομετρία υπεριώδους)
XRD	X-ray diffraction (περίθλαση ακτίνων X)
XRF	X-ray fluorescence (φθορισμός ακτίνων X)
tmtP	Tri(m-tolyl)phosphine
EB	Ethidium Bromide
CT-DNA	Calf Thymus DNA

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Καρκίνος

Παγκοσμίως, ο καρκίνος αποτελεί ένα από τα φλέγοντα ζητήματα υγείας που απασχολεί τους επιστήμονες. Βρίσκεται στην δεύτερη θέση της πυραμίδας των βασικών αιτιών θανάτου, μετά τα καρδιολογικά νοσήματα, τόσο σε ανεπτυγμένες όσο και σε αναπτυσσόμενες χώρες. Σύμφωνα με την παρουσίαση των πιο πρόσφατων δεδομένων από τον Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC) GLOBOCAN ο αριθμός των νέων κρουσμάτων, ανεξαρτήτως φύλου, για το 2023 ανέρχεται στα 12 εκατομμύρια με 6,4 εκατομμύρια περιπτώσεις να καταλήγουν σε θάνατο [1]

Estimated number of incident cases and deaths World, both sexes, all ages (excl. NMSC)



Εικόνα 1: Διαγραμματική απεικόνιση των νέων περιπτώσεων και των θανάτων λόγω καρκίνου κατά το έτος 2023 [1]

Ο όρος «καρκίνος» περικλείει μια ομάδα ασθενειών οι οποίες εμφανίζονται σε διαφορετικά όργανα με διαφορετικά συμπτώματα και χαρακτηριστικά. Ωστόσο, όλοι οι τύποι καρκίνου έχουν ένα κοινό γνώρισμα, που είναι ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός

πολλαπλασιασμός [2]. Τα κύτταρα που δεν υφίστανται πλέον τους φυσιολογικούς περιορισμούς στον πολλαπλασιασμό τους, συσσωρεύονται σταδιακά στον ιστό προέλευσης και σχηματίζουν έναν συμπαγή όγκο [2]. Σε αρκετές περιπτώσεις, ένας αριθμός καρκινικών κυττάρων εισέρχεται στο κυκλοφορικό σύστημα και μεταφέρεται σε απομακρυσμένους ιστούς του σώματος, φαινόμενο το οποίο ονομάζεται μετάσταση. Κατά την διαδικασία αυτή τα καρκινικά κύτταρα εγκαθίστανται εκεί και δημιουργούν νέους όγκους.

Είναι πλέον γνωστό πως ο καρκίνος αποτελεί μια νόσο που περιλαμβάνει διαφοροποιήσεις στο γονιδίωμα, οι οποίες δεν επιδιορθώνονται [3]. Οι κυριότεροι παράγοντες που επιφέρουν αυτές τις γονιδιακές αλλαγές είναι κυρίως περιβαλλοντικοί και περιλαμβάνουν εκτός των άλλων, τον τρόπο ζωής, το κάπνισμα, τη διατροφή και την συσσωρευμένη έκθεση σε ακτινοβολία. Επιπρόσθετα, σε κάποια είδη καρκίνου η γενετική προδιάθεση και το οικογενειακό ιστορικό διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου [3].

1.2 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων

Σύμφωνα με πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει προκύψει πως η καρκινογένεση στους ανθρώπους είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων και τα βήματα αυτά αντικατοπτρίζουν γενετικές αλλοιώσεις.

Μελέτες δείχνουν πως υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά που εμφανίζονται στα καρκινικά κύτταρα ανεξαρτήτως ιστού και τύπου καρκίνου [4].

Αυτά παρουσιάζονται παρακάτω:

- Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα.

Κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα απαιτούν συγκεκριμένα σήματα ανάπτυξης ώστε να μεταβούν σε κατάσταση πολλαπλασιασμού. Όπως γίνεται

αντιληπτό, η αναγκαιότητα αυτών των σημάτων είναι τεράστια και αποτελούν βασικό πυλώνα για την έναρξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ωστόσο, δεν ισχύει το ίδιο για τα καρκινικά κύτταρα, διότι η ανάπτυξη τους δεν εξαρτάται από την παραπάνω σηματοδότηση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι παράγουν δικά τους σήματα κυτταρικής ανάπτυξης [5].

- Αντίσταση στα αντιπολλαπλασιαστικά σήματα.

Λόγω του ότι δεν παρουσιάζουν ευαισθησία σε συγκεκριμένα σήματα, που αφορούν στην αναστολή της ανάπτυξής τους αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μένουν ανεπηρέαστα από μηχανισμούς που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και μπορούν είτε να τον διακόψουν ή να τον αναστείλουν [5].

- Αποφυγή απόπτωσης.

Οι καρκινικοί κυτταρικοί πληθυσμοί έχουν την ικανότητα να αυξάνονται αριθμητικά όχι μόνο λόγω του ρυθμού πολλαπλασιασμού αλλά και λόγω του μειωμένου ρυθμού καταστροφής των κυττάρων αυτών. Τα φυσιολογικά κύτταρα εφόσον επιτελέσουν τις λειτουργίες τους ή όταν πλέον πάψουν να είναι απαραίτητα για τον οργανισμό οδηγούνται σε απόπτωση-προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Δεν ισχύει ωστόσο το ίδιο για τα καρκινικά, με πολλές μελέτες να αποδεικνύουν πως η αποφυγή-αντίσταση στην απόπτωση αποτελεί ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των περισσότερων [5].

- Απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού.

Καθοριστικό ρόλο στο δυναμικό πολλαπλασιασμού των κυττάρων παίζουν ορισμένες ειδικές αλληλουχίες που ονομάζονται τελομερή,. Σε κάθε γενιά κυττάρων χάνεται ένα μέρος του τελομερικού DNA από τα άκρα κάθε χρωμοσώματος οδηγώντας το κύτταρο σχεδόν αναπόφευκτα σε κυτταρικό θάνατο. Παρ'όλα αυτά, αυτό δεν συμβαίνει στα καρκινικά κύτταρα, λόγω του ότι διαθέτουν υψηλά επίπεδα

τελομεράσης. Κατά συνέπεια αποφεύγουν την αντιγραφική γήρανση και συνεχίζουν την επ' άοριστον διαίρεσή τους [5].

- Συνεχής αγγειογένεση.

Στον οργανισμό, η παροχή οξυγόνου και των θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα πραγματοποιείται μέσω των αγγείων με την μεταφορά αίματος. Τα καρκινικά κύτταρα καταφέρνουν και ενεργοποιούν την διαδικασία αυτή μέσω τροποποίησης της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση. Το αποτέλεσμα αυτού είναι η συνεχής αιμάτωση και αύξηση του όγκου [5].

- Εισβολή και μετάσταση σε άλλους ιστούς.

Τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να μετακινούνται, να εισβάλλουν σε διπλανούς ιστούς και από εκεί να μεταφέρονται σε απομακρυσμένες θέσεις μέσα στον οργανισμό όπου ιδρύουν νέες αποικίες (μετάσταση) και αποτελεί την αιτία του 90% των θανάτων από καρκίνο στον άνθρωπο [5].

1.3 Θεραπεία

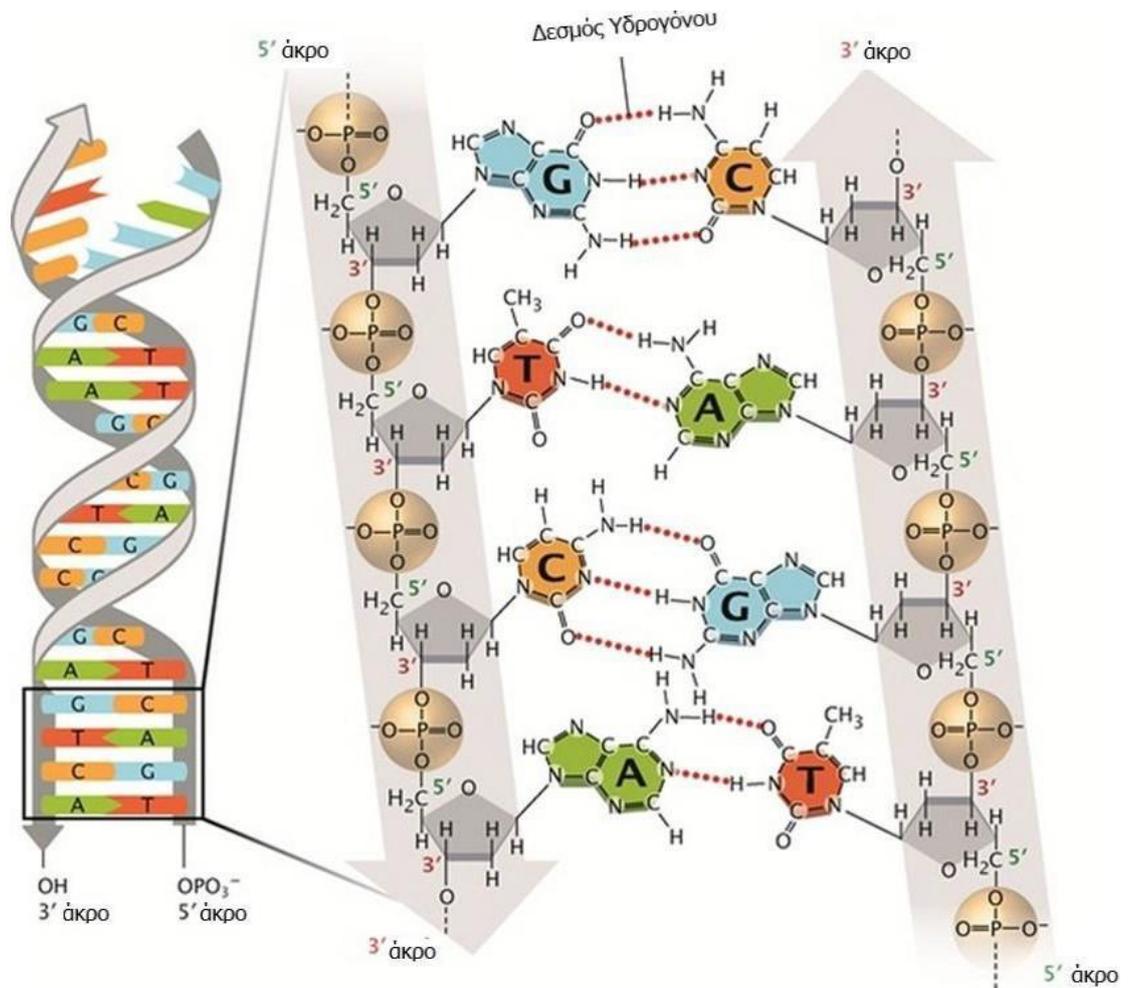
Ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου αλλά και το στάδιο στο οποίο βρίσκεται, οι θεραπευτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι:

- Η χειρουργική επέμβαση, η οποία αποτελεί την πρώτη επιτυχημένη μέθοδο αντιμετώπισης του καρκίνου, η οποία εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ως θεραπευτική προσέγγιση για αφαίρεση συμπαγών όγκων. Προϋποθέσεις για την εφαρμογή της αποτελούν η απουσία τοπικής διήθησης και η μη ύπαρξη μετάστασης σε απομακρυσμένους ιστούς [2].
- Η ακτινοθεραπεία, η οποία πραγματοποιείται με χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών (φωτονίων, ηλεκτρονίων, πρωτονίων κλπ.) για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων με ταυτόχρονη, όσο τον δυνατόν μεγαλύτερη, προφύλαξη των γειτονικών φυσιολογικών ιστών. Κατά την ακτινοβολήση, η παραγόμενη ακτινοβολία ουσιαστικά εναποθέτει ενέργεια στα κύτταρα των ιστών από τους οποίους διέρχεται με σκοπό να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα ή να τους προκαλέσει μεταλλάξεις, οι οποίες θα τα οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο [2].
- Η ορμονοθεραπεία. Η συγκεκριμένη θεραπευτική μέθοδος χρησιμοποιείται σε τύπους καρκίνων που είναι ορμονοεξαρτώμενοι (πχ καρκίνος του μαστού). Επιπλέον, χρησιμοποιείται συνήθως μετά από την χειρουργική επέμβαση μειώνοντας τον κίνδυνο επανεμφάνισης του καρκίνου [2].
- Η χημειοθεραπεία είναι η επικρατέστερη θεραπευτική μέθοδος που ακολουθείται για την αντιμετώπιση της νόσου είτε ως αποκλειστική θεραπεία είτε συνδυαστικά με κάποια άλλη μέθοδο. Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα επιλέγονται προκειμένου να επιτευχθεί αναστολή της συνεχούς διαίρεσης των καρκινικών κυττάρων, η αποφυγή της εισβολής σε γειτονικούς υγιείς ιστούς [2].

1.4 DNA και χημειοθεραπευτικά φάρμακα

1.4.1 Δομή του DNA

Εδώ και αρκετά χρόνια το DNA έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον ως βιολογικός φορέας γενετικής πληροφορίας και συγκεκριμένα για το σχεδιασμό ενώσεων που στοχεύουν στην τροποποίηση της δομής του και κατ'επέκταση και της λειτουργίας του. Το DNA στον ανθρώπινο οργανισμό συναντάται με τη μορφή διπλής έλικας, με κάθε κλώνο της να αποτελείται από έναν συνδυασμό τεσσάρων νουκλεοτιδίων, αδερίνη (A), θυμίνη (T), κυτοσίνη (C) και γουανίνη (G). Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελεί έναν νουκλεοζίτη συνδεδεμένο ομοιοπολικά με μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες με την 3' - και/ή 5' υδροξυλομάδα. Επιπρόσθετα, σε κάθε κλώνο τα νουκλεοτίδια συνδέονται μέσω φωσφοδιεστερικών δεσμών. Πιο συγκεκριμένα, στις δύο 3' - και 5' - υδροξυλομάδες σχηματίζονται δεσμοί μεταξύ των σακχάρων δεοξυριβόζης και των φωσφορικών ομάδων. Οι δύο κλώνοι συγκρατούνται μεταξύ τους κατά κύριο λόγο μέσω των δεσμών υδρογόνου, με την A να σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με την T και την G να σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου με την C [6]. Οι δεσμοί αυτοί, σε συνδυασμό με τις π-π stacking αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νουκλεοοβάσεων, συμβάλλουν στην ακαμψία της διπλής έλικας.



Εικόνα 2: Η μορφή διπλής έλικας του DNA και οι δομικές μονάδες από τις οποίες αποτελείται [8]

Η επιφάνειά της διπλής έλικας είναι αρνητικά φορτισμένη λόγω των κατάλοιπων δεοξυριβόζης και των φωσφορικών ιόντων, σε αντίθεση με το εσωτερικό της το οποίο είναι μη πολικό. Μεταξύ των δύο αλυσίδων του DNA, σχηματίζονται δύο αύλακες, (grooves) που χαρακτηρίζονται ως μικρή (minor), με πλάτος περίπου 12 Å και μεγάλη αύλακα (major groove), πλάτους περίπου 22 Å [9].

1.4.2 Χημειοθεραπευτικά Φάρμακα

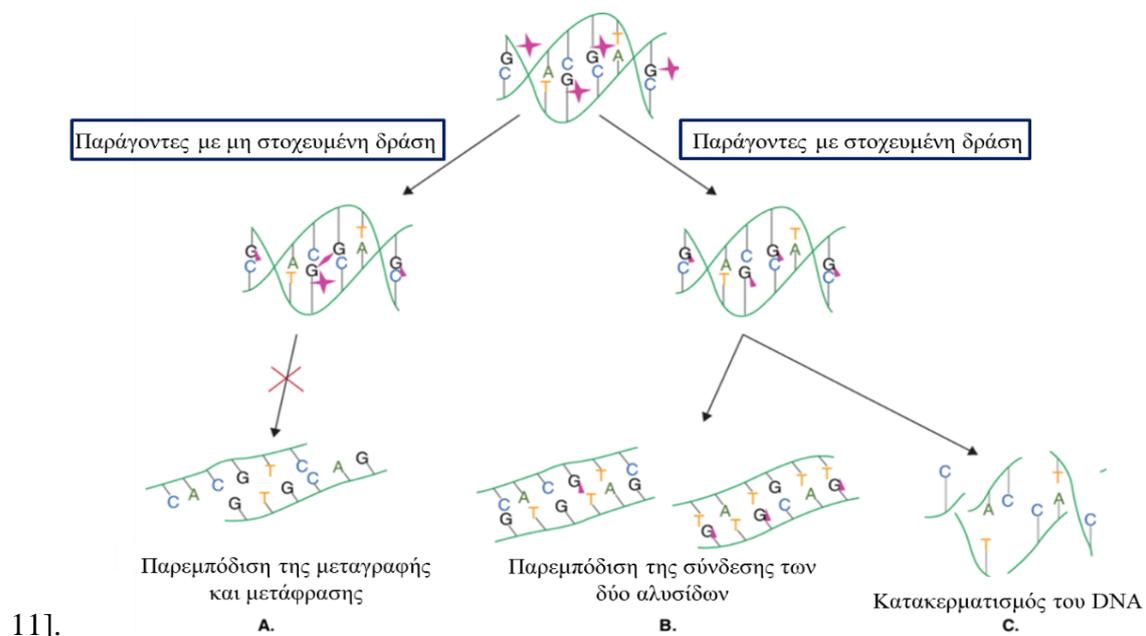
Στην κατηγορία των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων περιλαμβάνονται χημικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του καρκίνου οι οποίοι ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, την προέλευση τους (φυσικά ή εργαστηριακά παράγωγα), την χημική τους δομή και την μορφή με την οποία λαμβάνονται (χάπια, ενέσιμα κα). Ακολουθούνται δύο προσεγγίσεις σχετικά με τον στόχο των θεραπειών: Η πρώτη αφορά σε θεραπείες που στοχεύουν στο DNA ή στις κρίσιμες διεργασίες της κυτταρικής διαίρεσης, ενώ η δεύτερη σε ευάλωτα σημεία της καρκινικής μάζας, συμπεριλαμβάνοντας τροποποιήσεις σε πρωτεΐνες και γονίδια. Ο στόχος των χημειοθεραπευτικών παραγόντων είναι κοινός, και είναι να διακοπεί ο ανώμαλος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων.



Εικόνα 3: Χημειοθεραπευτικά φάρμακα.

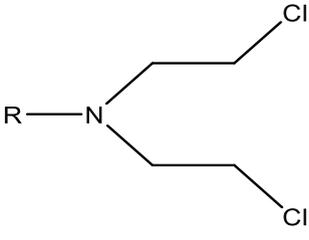
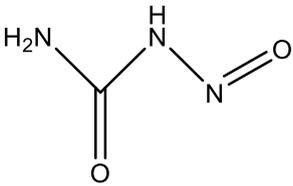
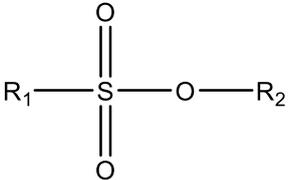
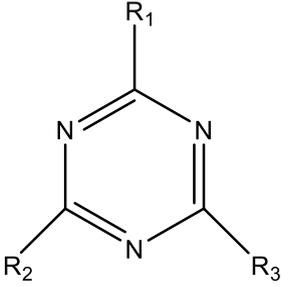
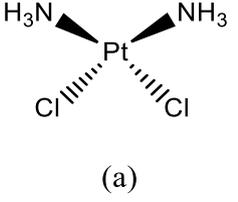
Οι κατηγορίες συμβατικών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων είναι οι εξής:

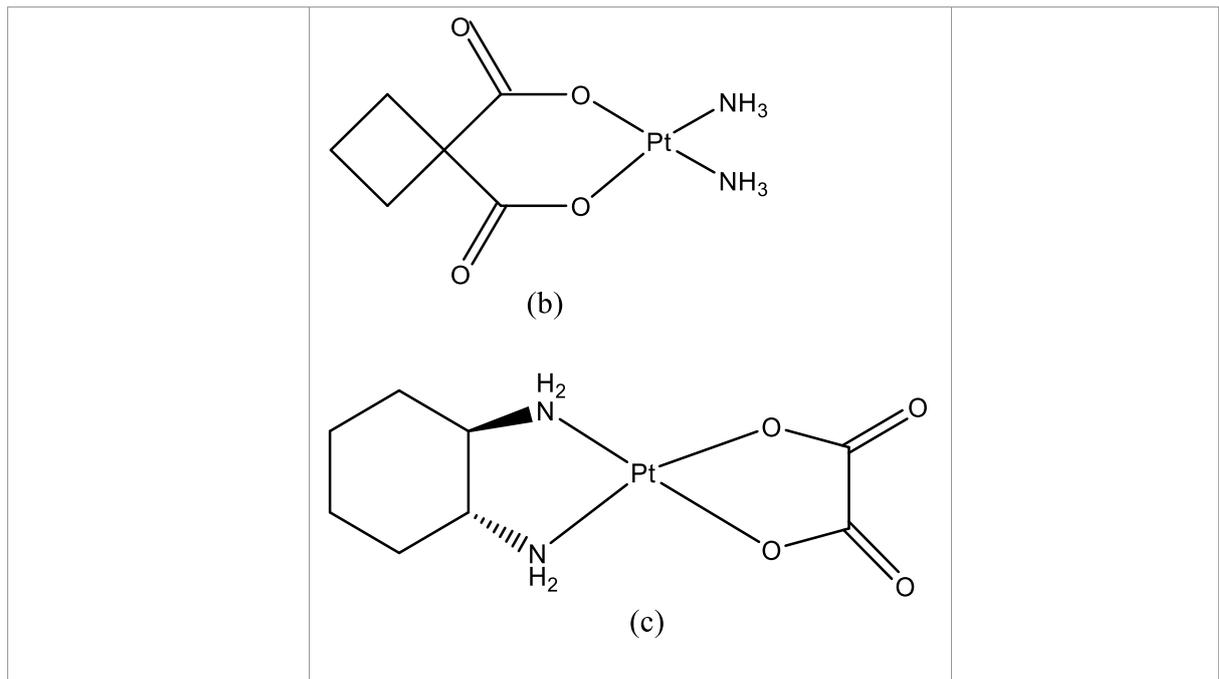
Αλκυλιωτικοί παράγοντες: Είναι χημικές ενώσεις, οι οποίες προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό των καρκινικών κυττάρων, μεταφέροντας ομάδες αλκυλίων σε αμινομάδες, καρβοξυλομάδες, σουλφυδρυλικές ή φωσφορικές ομάδες, βιολογικά σημαντικών μορίων όπως το DNA και το RNA. Επιπλέον, η αναστολή της δράσης της DNA πολυμεράσης δεν επιτρέπει την διόρθωση των βλαβών αυτών και ως εκ τούτου τα λάθη στην μεταγραφή και μετάφραση του γενετικού υλικού οδηγούν το κύτταρο σε παραγωγή παθολογικών πρωτεϊνών, και τελικά σε απόπτωση. Τα συγκεκριμένα φάρμακα δρουν κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και όχι σε μια συγκεκριμένη φάση του. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα εξής φάρμακα [10, 11]: 1.Nitrogen mustards: ενώσεις που εμφανίζουν εξαιρετική δράση ως ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια αντιδρώντας με ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών πυρηνόφιλων, 2.Νιτροζουρίες: πολύ λιποδιαλυτές ενώσεις, οι οποίες περνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, 3.Αλκυλοσουλφονικά άλατα, 4.Τριαζίνες 5.Αιθυλεναμίνες: στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται και τα φάρμακα της οικογένειας των πλατινών [10,



Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης αλκυλιούντων παραγόντων (επεξεργασμένη εικόνα από [12])

Πίνακας 1: Παραδείγματα χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και οι δομές τους.

Χημειοθεραπευτικό φάρμακο	Δομή	Παραδείγματα
Nitrogen mustards		μελφαλάνη, κυκλοφωσφαμίδη, ιφωσφαμίδη, χλωραμβουκίλη κα
Νιτροζουρίες		στρεπτοζοτοκίνη, φοτεμουστίνη, καρμουστίνη, σεμουστίνη κα
Αλκυλοσουλφονικά άλατα		βουσουλφάνη.
Τριαζίνες		Δακαρβαζίνη, τεμοζολαμίδη
Αιθυλεναμίνες	 <p style="text-align: center;">(a)</p>	σισπλατίνη (a), καρβοπλατίνη (b) και οξαλιπλατίνη (c)

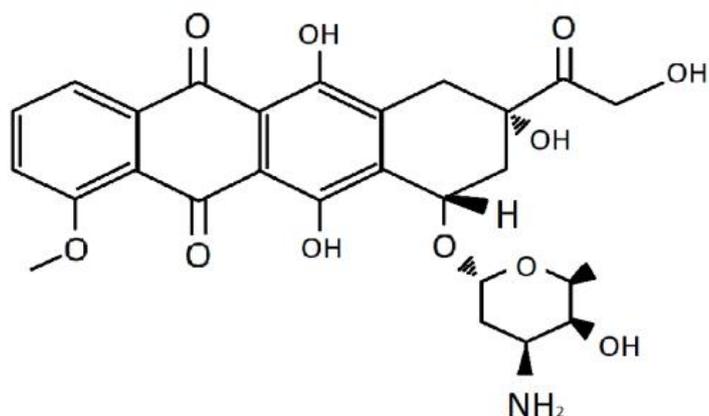


Αντιμεταβολίτες. Οι συγκεκριμένες ενώσεις στοχεύουν στην παρεμπόδιση της σύνθεσης του DNA κυρίως με 2 τρόπους. Ο πρώτος τρόπος δράσης τους αφορά στη διακοπή της σύνθεσης εμποδίζοντας την λειτουργία των ενζύμων που συμμετέχουν στις διαδικασίες αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης, ενώ ο δεύτερος τρόπος δράσης τους συνδέεται με προσθήκη σφαλμάτων στα νουκλεϊκά οξέα, που έχουν ως συνέπεια τη νέκρωση των καρκινικών κυττάρων. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι αντιμεταβολίτες είναι η μεθοτρεξάτη και η 5-φθοριοουρακίλη [10, 11].

Αναστολείς τοποϊσομεράσης: Οι τοποϊσομεράσες είναι απαραίτητα ένζυμα που παίζουν κρίσιμο ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες όπως η αντιγραφή του DNA, ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, η μεταγραφή και ο ανασυνδυασμός. Η κύρια λειτουργία των τοποϊσομερασών είναι να τροποποιούν την τοπολογία του DNA, καταλύοντας την τομή και την επανένωση των κλώνων του DNA, γεγονός που τους δίνει την δυνατότητα να μπορούν να αλλάξουν τη δομική διάταξη του μορίου αυξάνοντας ή μειώνοντας τον βαθμό ξετύλιξης [10, 13]. Με αυτόν τον τρόπο, το υπερσπειρωμένο DNA οδηγείται σε χαλάρωση.

Στα κύτταρα του ανθρώπου, οι κυριότερες τοποϊσομεράσες είναι οι τύπου I (TOPI) και τύπου II (TOPII). Η TOPI διασπά μόνο τον ένα κλώνο του DNA, ενώ η TOPII διασπά και τους δύο κλώνους [10, 13]. Επιπλέον, εκτός από την αποπεριέλιξη του μητρικού DNA, η τοποϊσομεράση τύπου II συμβάλλει και στον διαχωρισμό των νεοσυντιθέμενων μορίων DNA, τα οποία συμπλέκονται [13]. Επίσης, φαίνεται να αποτελεί μέρος της διαδικασίας της συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων, κατά τη διάρκεια της μίτωσης [13]. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό πως, η αναστολή δράσης αυτών των ενζύμων οδηγεί στην αδυναμία αναπαραγωγής των κυττάρων [10, 11]. Στο γεγονός αυτό στηρίζεται η σύνθεση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων που περιλαμβάνουν αναστολείς τοποϊσομερασών [10, 11].

Στόχος τους είναι η αναστολή της δράσης των τοποϊσομερασών, εμποδίζοντας το «ξετύλιγμα» του DNA [10, 11], καθιστώντας αδύνατη τη σωστή αντιγραφή και μεταγραφή του DNA, με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να οδηγούνται σε απόπτωση. Μερικά από τα πιο γνωστά χημειοθεραπευτικά αυτής της κατηγορίας είναι η καμπτοθεκίνη (camptothecin) η οποία δρα ως αναστολέας της TOPI, όπως και η ιρινοτεκάνη (irinotecan) και η τοποτεκάνη (topotecan). Αντίστοιχα, γνωστοί αναστολείς της TOPII είναι η δαουνορουβικίνη (daunorubicin), η δοξορουβικίνη (doxorubicin) και η ετοποσίδη (etoposide) των οποίων στηρίζεται σε μεθόδους παρεμβολής στο DNA και σε τροποποιήσεις ενζύμων.



Εικόνα 5: Χημική δομή δοξορουβικίνης.

Επαγωγείς θραυσμάτων-βλαβών του γενετικού υλικού.

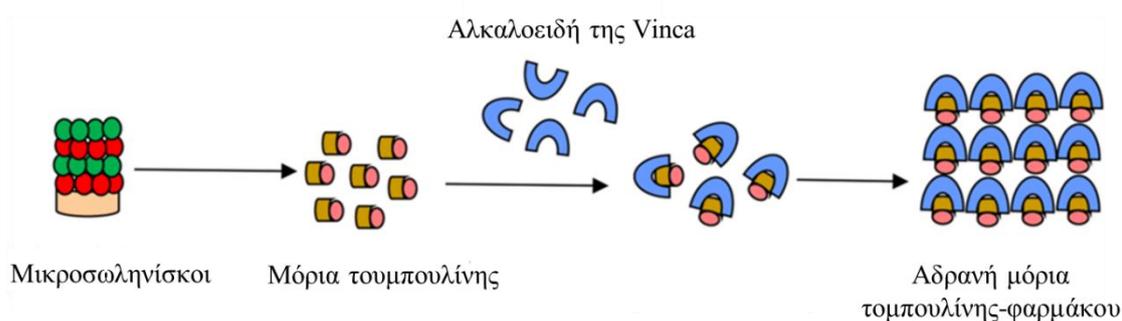
Τοξικοί παράγοντες του κυτταροπλάσματος – επαγωγείς κυτταρικού θανάτου.

Αναστολείς της μιτωτικής ατράκτου: Στην μίτωση των κυττάρων σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι μικροσωληνίσκοι, οι μεγαλύτερες δομές του κυτταρικού σκελετού, καθώς ρυθμίζουν το πρότυπο ανάπτυξης του κυτταρικού τοιχώματος, τον προσανατολισμό των μικροϊνιδίων κυτταρίνης και συντονίζουν την εξέλιξη της διαίρεσης των κυττάρων [14]. Οι συγκεκριμένες δυναμικές δομές υφίστανται συνεχώς συναρμολογήσεις και αποσυναρμολογήσεις εξασφαλίζοντας την δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου και κατ'επέκταση την ομαλή διαίρεση του κυττάρου [14]. Επιπλέον, αντιπροσωπεύουν έναν από τους ενδοκυτταρικούς στόχους ιόντων μετάλλων, χαρακτηριστικό που τους καθιστά κατάλληλους στόχους για χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Συγκεκριμένα, τα φάρμακα της κατηγορίας αυτής δρουν διαταράσσοντας την πρόοδο της διαδικασίας της μίτωσης και το δυναμικό του κυτταροσκελετού. Στις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ενώσεις κατατάσσονται τα αλκαλοειδή της Vinca και οι ταξάνες [10].

Τα αλκαλοειδή της vinca ασκούν τη δράση τους ενωμένα με την τουμπουλίνη των μικροσωληναρίων του κυττάρου και διακόπτουν τη μιτωτική διαίρεσή του (ο μηχανισμός δράσης τους περιγράφεται παρακάτω). Ενδεικτικά φάρμακα της κατηγορίας αυτής που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση διάφορων τύπων καρκίνου, είναι η βινορελμπίνη (vinorelbine), η βινδεσίνη (vinedesine) και η βινκριστίνη (vincristine) [10]. Παράλληλα, οι ταξάνες έχουν συμβάλει στην αντιμετώπιση πολλών τύπων καρκίνων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα φαρμάκου της συγκεκριμένης κατηγορίας την πακλιταξέλη (paclitaxel).

Μηχανισμός δράσης αλκαλοειδών της vinca

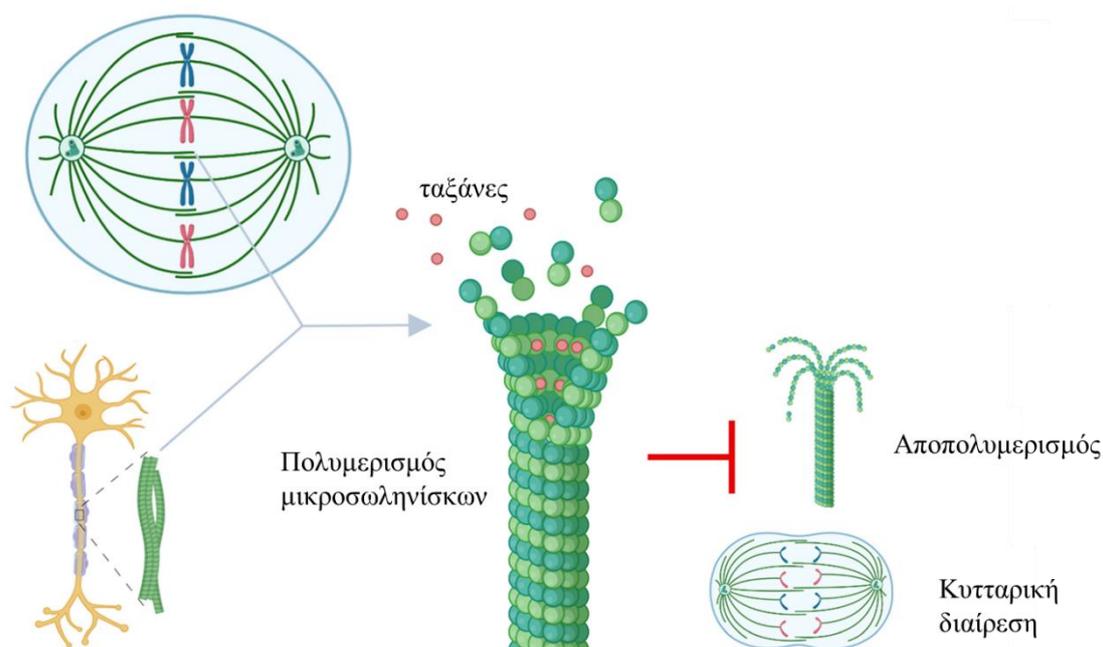
Πρόκειται για αντιμιτωτικά αντινεοπλασματικά φάρμακα που δρουν παρεμβαίνοντας στον πολυμερισμό της τουμπουλίνης, μιας πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνη για την οικοδόμηση του συστήματος μικροσωληνίσκων που εμφανίζεται κατά τη διαίρεση των κυττάρων σε πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα. Ουσιαστικά, οι ενώσεις αυτές συνδέονται με τα μόρια τουμπουλίνης εμποδίζοντας τα να συνδεθούν μεταξύ τους με αποτέλεσμα να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί πολυμερισμός και να κατ'έκταση η κατασκευή των μικροσωληνίσκων [15].



Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης αλκαλοειδών της vinca (τροποποιημένη εικόνα από [15])

Μηχανισμός δράσης ταξανών

Η δράση των ταξανών οφείλεται στην δέσμευση τους στους μικροσωληνίσκους με αποτέλεσμα να υφίστανται αποπολυμερισμό και η μιτωτική άτρακτος να καταστρέφεται.



Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης ταξανών (τροποποιημένη εικόνα από [16])

Σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζεται συνέργεια δύο ή περισσότερων φαρμάκων, όπου το αποτέλεσμα της συγχορήγησης τους είναι μεγαλύτερο από το άθροισμα των αποτελεσμάτων των επί μέρους φαρμάκων, σε σχέση με το να χορηγούνται μεμονωμένα [16].

1.4.3 Μεταλλοφάρμακα

Η δράση αυτών των ενώσεων με το DNA έχει θεραπευτική σημασία, καθώς μπορούν να αλλάξουν την δομή και κατ'επέκταση την λειτουργία του. Τα μεταλλικά σύμπλοκα έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων, διότι οι τρόποι δέσμευσης και η

δραστηκότητά τους μπορούν να ρυθμιστούν σύμφωνα με τον αριθμό συντονισμού, το σχήμα και το φορτίο του ανόργανου ικριώματος. Το πιο διαδεδομένο και περισσότερο μελετημένο μεταλλοφάρμακο είναι η σισπλατίνη ($\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$) και τα παράγωγα της. Οι συγκεκριμένες ενώσεις αντιδρούν με το άτομο αζώτου (N7) των βάσεων πουρίνης, μέσω κυρίως 1,2-ενδοκλωνικής σταυροσύνδεσης ή και με διακλωνική σύνδεση. Η τροποποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την συστρόφη της έλικας του DNA προκαλώντας αναστολή της αντιγραφής και της μεταγραφής του. Τα ευρήματα των ερευνών ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά ωθώντας τους επιστήμονες στην σύνθεση και μελέτη και άλλων μεταλλοφαρμάκων με αντικαρκινική δράση[17].

Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα με βάση το μέταλλο έχουν την δυνατότητα να συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις καθώς και να ενώνονται με έναν αρκετά μεγάλο αριθμό προσδεμάτων. Τα περισσότερα από αυτά έχουν σχεδιαστεί για να αλληλεπιδρούν με το γονιδιωματικό DNA και να οδηγούν το κύτταρο σε κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης. Παρ'όλα αυτά και τα μιτοχόνδρια αποτελούν έναν κύριο στόχο για την θεραπεία του καρκίνου.

Πλέον, πολλά μέταλλα όπως το Ru(III, IV), Fe(II,III), Cu(I,II) κα έχουν αντικαταστήσει τον Pt(II,IV). Τα μέταλλα αυτά λόγω του ότι έχουν οξειδοαναγωγικό χαρακτήρα παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες μέσω της οξειδωτικής οδού διασπών το DNA. Επιπλέον, από διάφορες μελέτες για άλλα ιόντα μετάλλων όπως για παράδειγμα το Ce(III,IV) διαπιστώθηκε πως η διάσπαση του DNA πραγματοποιείται μέσω της υδρολυτικής οδού.[17]

1.4.4 Τρόποι αλληλεπίδρασης των μεταλλοφαρμάκων με το DNA.

Τα δομικά χαρακτηριστικά και οι χημικές ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων ευνοούν την ύπαρξη αρκετών πιθανών θέσεων αλληλεπίδρασης με ενώσεις μικρού μοριακού βάρους. Οι κυριότεροι λόγοι είναι πρώτον ότι το φορτίο του φωσφοδιεστέρα παρέχει μια ιδανική θέση δέσμευσης για θετικά φορτισμένες ενώσεις όπως σύμπλοκα μετάλλων, πολυκατιονικά μόρια ή αλυσίδες αμινοξέων. Δεύτερον, το υδρόφοβο περιβάλλον που δημιουργείται λόγω των νουκλεοβάσεων επιτρέπει τη δέσμευση μορίων μέσω μη ομοιοπολικών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων όπως οι αλληλεπιδράσεις π-π stacking μεταξύ των ζευγών βάσεων και των επίπεδων αρωματικών υποκαταστατών, δηλαδή της ένωσης που δεσμεύεται στο DNA [17]. Η σύνδεση αυτών των ενώσεων με το DNA οδηγεί συνήθως σε τροποποίησης της έλικας, με τον βαθμό τροποποίησης να εξαρτάται από τον τύπο αλλά και την έκταση της αλληλεπίδρασης.

Οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του DNA και των μεταλλοφαρμάκων μπορεί να είναι είτε ομοιοπολικές είτε μη ομοιοπολικές (Εικόνα 8)

Οι ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις αφορούν σε χημική αντίδραση με το DNA, η οποία προκαλεί μόνιμη αλλοίωση της δομής του και επηρεάζει την λειτουργία του γονιδιώματος δημιουργώντας μη αντιστρεπτή αναστολή της αντιγραφής του DNA, της μεταγραφής σε RNA και της μετάφρασης σε πρωτεΐνες. Οι κατηγορίες χημικών αντιδράσεων παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Αλκυλίωση. Πυρηνόφιλη αντίδραση με ετεροάτομα πουρινών προκαλώντας το σχηματισμό ομοιοπολικών προϊόντων προσθήκης που αναστέλλουν την αντιγραφή του DNA και τη μεταγραφή του RNA [17].
2. Συναρμογή. Ορισμένοι υποκαταστάτες μεταλλικών συμπλόκων σχηματίζουν μη αναστρέψιμες ενδοκλωνικές ή διακλωνικές ενώσεις προσθήκης με το

DNA, με γνωστότερο παράδειγμα αυτό της σισπλατίνης (και των παραγώγων της). Παρ'όλα αυτά υπάρχουν και σύμπλοκα άλλων μεταλλικών ιόντων που όπως μπορούν να συνδεθούν απευθείας στο DNA, όπως για παράδειγμα σύμπλοκα του Ni(II) και Ru(II) [17].

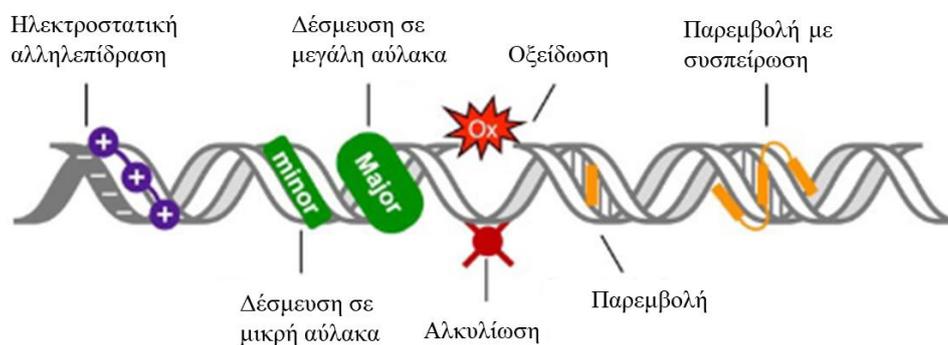
3. Οξειδωση. Με την οξειδωση παράγονται δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) οι οποίες δρουν στην διεπιφάνεια του DNA. Η παραγωγή ROS καταλύεται συνήθως από ένα οξειδοαναγωγικό μέταλλο που ενεργοποιεί ένα μόριο οξυγόνου μέσω της αναγωγής [17].

Οι κατηγορίες των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων είναι οι εξής:

1. Αλληλεπιδράσεις εξωτερικής ηλεκτροστατικής φύσεως που πραγματοποιούνται μεταξύ του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού του DNA και των θετικά φορτισμένων μορίων. Κατιονικά είδη όπως για παράδειγμα ιόντα μετάλλων ή πολυαμίνες διαχέονται κατά μήκος του DNA και αλληλεπιδρούν μη ειδικά με τις φωσφορικές ομάδες στην μικρή αύλακα. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση φαρμάκου με το γονιδίωμα δεν προκαλεί σημαντική διαταραχή στη δομή του DNA. Αρκετά σύνηθες είναι το γεγονός πως μόρια που αλληλεπιδρούν με ηλεκτροστατικό τρόπο με το DNA, χρησιμοποιούνται ως παράγοντες συμπύκνωσης του DNA ή ως σταθεροποιητές τριτοταγών δομών νουκλεϊκών οξέων.
2. Αλληλεπιδράσεις με δέσμευση στην αύλακα. Σε αυτή την περίπτωση η δέσμευση των μορίων γίνεται είτε στην μικρή είτε στην μεγάλη αύλακα του DNA μέσω δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων Van der Waals [17]. Η κατηγορία φαρμάκων που δεσμεύονται στις μικρές αύλακες έχουν τυπικά πολλούς αρωματικούς δακτυλίους, όπως πυρρόλιο, φουράνιο ή βενζόλιο και διαθέτουν ένα στενό καμπυλωτό σχήμα, το οποίο διευκολύνει την σύνδεση

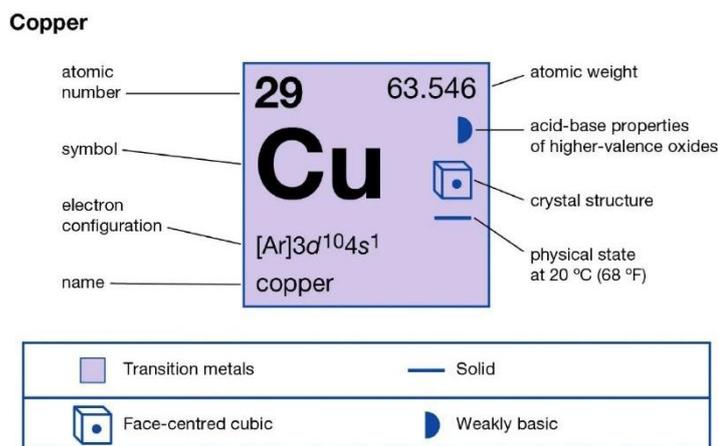
αυξάνοντας τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Επίσης, τα φάρμακα αυτά σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με βάσεις, συνήθως με το N(3) της αδενίνης και το O(2) της θυμίνης [18].

3. Αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής. Η παρεμβολή επιτυγχάνεται μέσω επίπεδων αρωματικών υποκαταστατών οι οποίοι παρεμβάλλονται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις. Η παρεμβολή προκαλεί επιμήκυνση της δομής του DNA που ακολουθείται από αύξηση του βήματος της έλικας και εκτύλιξη της ελίκωσης. Επιπρόσθετα, υπάρχει και ένας εναλλακτικός τύπος παρεμβολής, η παρεμβολή με συσπείρωση (Threading intercalation), η οποία εμφανίζεται στα επίπεδα αρωματικά συστήματα που αποτελούνται από ογκώδεις υποκαταστάτες [17].



Εικόνα 8: Τρόποι αλληλεπίδρασης φαρμάκου με το DNA (τροποποιημένη εικόνα [17])

1.5 Χαλκός



Εικόνα 9: Χαλκός και κάποιες ιδιότητες του [36]

Ο χαλκός είναι χημικό στοιχείο της 1^{ης} σειράς των στοιχείων μετάπτωσης και ανήκει στην 4^η περίοδο και IB ομάδα του περιοδικού πίνακα. Αποτελεί ενδογενές και άμεσα διαθέσιμο μέταλλο. Μια βασική χημική ιδιότητα του χαλκού είναι ότι συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, μεταβάλλοντας τον αριθμό οξείδωσης του από την ανηγμένη Cu(I) στην οξειδωμένη μορφή Cu(II) και αντίστροφα. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας, συγκαταλέγεται μεταξύ των καταλληλότερων συμπαραγόντων για ποικίλα μόρια και ένζυμα, που συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες του οργανισμού [19, 21]. Επιπλέον, ο χαλκός εμπλέκεται στη λειτουργία πολλών μεταλλοενζύμων τα οποία ρυθμίζουν τον ενεργειακό μεταβολισμό όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες όπου είναι βασικός καταλυτικός/δομικός συμπαραγόντας της υπεροξειδωτικής δισμουτάσης χαλκού/ψευδαργύρου (Cu/Zn) ή της οξειδάσης του κυτοχρώματος c που παίζει σημαντικότατο ρόλο στην διαδικασία της μιτοχονδριακής αναπνοής, [19, 22].

Αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τον ανθρώπινο οργανισμό [19, 20] και εντοπίζεται σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο για τη φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξή τους. Εντοπίζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και αυτό

οφείλεται στο γεγονός πως ως οξειδοαναγωγικό μέταλλο έχει την ιδιότητα να αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο παράγοντας δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) που εμφανίζουν αυξημένη τοξικότητα. Επιπλέον, τα επίπεδα του χαλκού υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο και ρύθμιση μέσω εξελιγμένων μηχανισμών ελέγχου και ρύθμισης πρόσληψης, διανομής, εκροής και αποθήκευσης του χαλκού, διότι η περίσσεια ελεύθερων ιόντων του, δύναται να αποδειχθεί ιδιαίτερα επιβλαβής για το κύτταρο, οδηγώντας το μέχρι και σε κυτταρικό θάνατο [19, 21].

Διαταραχές στην ομοιόστασή του είναι υπεύθυνες για πληθώρα ασθενειών όπως για παράδειγμα οι νόσοι Menkes και Wilson, που αφορούν γενετικές διαταραχές και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι Alzheimer, Huntington, Parkinson, αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση και ασθένειες prion [21, 23].

1.5.1 Χαλκός και καρκίνος

Εκτός από τις παθολογίες που αναφέρονται παραπάνω, έρευνες έχουν δείξει πως διαταραχές στα επίπεδα χαλκού στον οργανισμό συνδέονται και με πληθώρα κακοηθειών [21]. Έχει αποδειχθεί από πολλές μελέτες πως η συγκέντρωση χαλκού τόσο στον ορό όσο και σε ιστούς από όγκους καρκινοπαθών συγκριτικά με υγιείς ανθρώπους είναι αυξημένη [21,24]. Είδη νεοπλασματικών ασθενειών που έχουν συσχετιστεί με τα αυξημένα επίπεδα χαλκού αποτελούν ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας, της ουροδόχου κύστης, του παγκρέατος, των ωοθηκών, του στομάχου, του στόματος, του θυρεοειδούς, της κεφαλής και του τραχήλου [21, 24]. Μάλιστα, στις περιπτώσεις του καρκίνου του μαστού και του παχέος εντέρου έχει επιβεβαιωθεί πως τα υψηλά επίπεδα χαλκού συσχετίζονται άμεσα με το στάδιο καθώς και με την εξέλιξη της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, ο χαλκός συμμετέχει στη ρύθμιση της δραστηριότητας αρκετών πρωτεϊνών και ενζύμων των καρκινικών κυττάρων [21,24] με τα υψηλά επίπεδα του μετάλλου να

ενισχύουν την ώθηση της αγγειογένεσης και την ενίσχυση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης αυτών των κυττάρων σε γειτονικούς ιστούς και όργανα, με αποτέλεσμα να προκαλείται μετάσταση του καρκίνου [21,24].

1.5.2 Χαλκός και βλάβη στο DNA

Το μέταλλο του χαλκού, όπως έχει προαναφερθεί, έχει την ικανότητα να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και τα ιόντα του μπορούν να επάγουν την παραγωγή ROS στο εσωτερικό του κυττάρου [21, 24]. Με δεδομένο πως ο Cu βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων, σχετίζεται με την χρωματίνη και σε μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλεί αναδίπλωση του DNA και μεταβάλλει τη δομή και τον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Η αλληλεπίδραση του DNA- Cu οφείλεται στην δέσμευση του Cu με την αζωτούχα βάση, γουανίνη. Περαιτέρω βλάβη στο DNA προκαλείται με αναγωγικά μέσα όπως το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη (GSH) που ανάγουν τον δισθενή χαλκό σε μονοσθενή [24].

Η αποικοδόμηση του DNA λόγω της οξειδοαναγωγικής δράσης του χαλκού πραγματοποιείται με τρεις τρόπους:

- (1) Οξείδωση αζωτούχων βάσεων του DNA.
- (2) Σχηματισμός δεσμών μεταξύ αντίθετων γειτονικών βάσεων (Γουανίνη-Θυμίνη).
- (3) Ρήξη της διπλής αλυσίδας που οφείλεται στην αναγωγή Cu(II) σε Cu(I).

Όπως γίνεται λοιπόν αντιληπτό, οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις αποτέλεσαν το έναυσμα για πολλούς επιστήμονες να στραφούν στην μελέτη και το σχεδιασμό νέων αντικαρκινικών μεταλλοφαρμάκων με χαλκό.

Οι ρίζες υδροξυλίου που προκαλούν τη διάσπαση του δίκλωνου DNA, προέρχονται από μια σειρά αντιδράσεων οξειδοαναγωγής μεταξύ του Cu(II) και Cu(I) και του οξυγόνου.

Τα ηλεκτρόνια προέρχονται είτε από την GSH είτε από το ασκορβικό οξύ, μέσω αντιδράσεων γνωστές ως Fenton ή Haber-Weiss [24].

Οι ρίζες ROS παράγονται:

A) Απευθείας από ιόντα υπεροξειδίου, τα οποία προέρχονται από την κυτταρική αναπνοή και μετατρέπονται σε υπεροξείδια. Το υπεροξείδιο οξειδώνει τον μονοσθενή χαλκό σε δισθενή και σχηματίζεται η δραστική ρίζα OH[·] (Σχήμα 1)

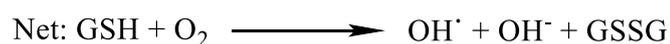
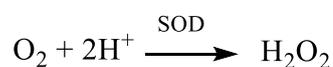
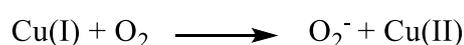
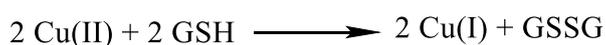
B) Από την οξείδωση της GSH σε δισουλφίδιο (GSSG), οπότε ο μονοσθενής χαλκός αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο και παράγεται το ανιόν υπεροξειδίου (O₂⁻) το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου με ενζυμική δράση Cu/Zn και Mn-SOD (Σχήμα

1)

(I)



(II)



Σχήμα 1: Αντιδράσεις με χαλκό που οδηγούν σε σχηματισμό ROS.

1.5.3 Χαλκός και θεραπεία του καρκίνου

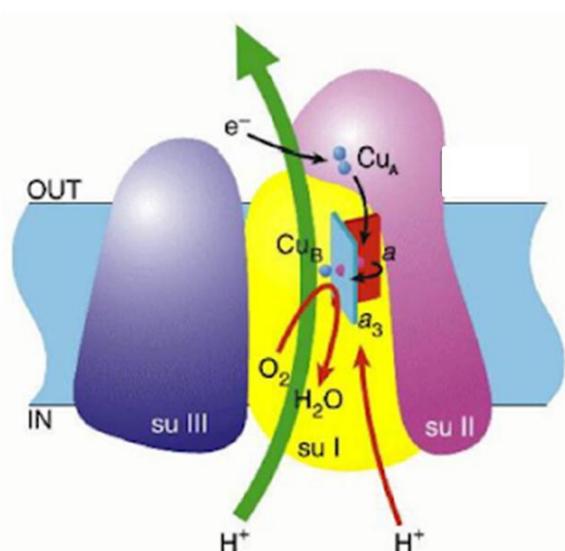
Τα σύμπλοκα του χαλκού διαθέτουν τρεις βασικές ιδιότητες που τα καθιστά κατάλληλα για ιατρικές εφαρμογές [26]. Αυτές είναι (i) το μεγάλο εύρος διαθέσιμων καταστάσεων οξειδωσης, (ii) ο ρυθμός ανταλλαγής προσδέματος και (iii) η ικανότητα του χαλκού να μιμείται το μέταλλο του σιδήρου, για την επιτυχημένη σύνδεσή του σε συγκεκριμένα βιολογικά μόρια στόχους [26]. Για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων έχουν ερευνηθεί σύμπλοκα κυρίως δισθενούς χαλκού (II).

Ο χαλκός συναντάται στα σύμπλοκα συνήθως στις οξειδωτικές καταστάσεις Cu(II) και Cu(I), με τον δισθενή χαλκό να εμφανίζεται συχνότερα σε αυτού του είδους τις ενώσεις [27]. Τα σύμπλοκα Cu (I / II) είναι οξειδοαναγωγικά ενεργά, συχνά ασταθή, και προτιμούν παραμορφωμένες δομές συντονισμού [27]. Επιπλέον, το δυναμικό οξειδοαναγωγής των φυσιολογικά προσβάσιμων ζευγών μονοσθενούς και δισθενούς χαλκού (I / II) ποικίλλει ανάλογα με το περιβάλλον του υποκαταστάτη (ligand). Αυτό οφείλεται τόσο στις ηλεκτρονιακές και στερεοχημικές επιδράσεις των υποκαταστατών, στη γεωμετρία τους, όσο και στο σύνολο των δοτών και των χηλικών επιδράσεων [27]. Ο μονοσθενής χαλκός (I) προτιμά υποκαταστάτες με μαλακά άτομα-δότες, όπως θείο (S), φώσφορο (P), άνθρακα (C) και αρωματικές αμίνες [27].

Εκτός από τα παραπάνω, τα σύμπλοκα του χαλκού (Cu) έχουν αποδειχτεί ιδιαίτερα αποτελεσματικά μεταλλοφάρμακα στην αντιμετώπιση του καρκίνου λόγω του ότι ο χαλκός μπορεί να συντονίσει τα μόρια που προσδέονται μαζί του σε ακριβείς τρισδιάστατες διαμορφώσεις [19]. Αυτό καθιστά την αλληλεπίδραση των μεταλλοφαρμάκων με συγκεκριμένους μοριακούς στόχους ευκολότερη. Ένα ακόμα πλεονέκτημα αποτελεί η επίπεδη τετράγωνη γεωμετρία που εμφανίζουν ορισμένα σύμπλοκα χαλκού, η οποία είναι

κατάλληλη για την πρόκληση βλαβών στο DNA παρόμοιων με αυτές που προκαλεί το Cisplatin [24].

Η θέση του χαλκού ως μέταλλο που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου κυτοχρωμική οξειδάση, τερματικό ένζυμο το οποίο καταλύει την μεταφορά ηλεκτρονίων από το ανοιγμένο κυτόχρωμα C προς το μοριακό οξυγόνο, προσδίδει στο συγκεκριμένο μέταλλο εξέχουσα σημασία. Το γεγονός ότι το μέταλλο αυτό εντοπίζεται στο κυτόχρωμα C, δηλαδή στο μιτοχόνδριο, οδήγησε τους επιστήμονες στο συμπέρασμα πως νέα μεταλλοφάρμακα με βάση τον χαλκό μπορούν να στοχεύσουν το μιτοχόνδριο, προκαλώντας δυσλειτουργίες και οδηγώντας το σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης [56, 57]



Εικόνα 10: Κυτόχρωμα C

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ο χαλκός διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο στην εμφάνιση και στην εξέλιξη του καρκίνου, με την ρύθμιση των επιπέδων της ομοιόστασής του να προσελκύει το ενδιαφέρον και να εξελίσσεται σε έναν νέο στόχο για την θεραπεία της νόσου [21,24]. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, τα αυξημένα επίπεδα χαλκού οδηγούν στην αύξηση της έκφρασης του παράγοντα PDL1 (programmed death ligand 1) στα κύτταρα

του όγκου και ρυθμίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μεσολαβούν στην καθοδηγούμενη από PDL ανοσοδιαφυγή των καρκινικών κυττάρων [24].

Ένα καίριο ζήτημα που απασχολεί τους επιστήμονες στην ανάπτυξη νέων μεταλλοφαρμάκων είναι η τοξικότητα που παρουσιάζει ο εκάστοτε παράγοντας. Όσον αφορά στα σύμπλοκα του χαλκού, αυτά έχουν παρουσιάσει μικρότερη τοξικότητα έναντι των υγιών κυττάρων συγκριτικά με τα χημειοθεραπευτικά μεταλλοφάρμακα της πλατίνας. Επιπρόσθετα, το ευρύτερο φάσμα δράσης και οι διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης που παρουσιάζουν αποτελούν μεγάλο πλεονέκτημα, διότι πέρα από την ομοιοπολική τους σύνδεση και πρόκληση βλάβης στο DNA [27], θέτουν ως νέους πιθανούς στόχους κάποια κυτταρικά συστατικά, όπως οι τοποϊσομεράσες. Υπάρχουν ερευνητικές αναφορές που προσδίδουν στα σύμπλοκα του χαλκού δράση νουκλεασών με ικανότητα να κόβουν την έλικα του DNA σε διάφορα σημεία, καθώς και της πιθανής χρήση τους ως αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες για τον περιορισμό παροχής αίματος και αγγειογένεσης στους όγκους [26].

Συγκεντρώνοντας λοιπόν, όλα τα παραπάνω οι έρευνες πλέον στοχεύουν στην ανάπτυξη νέων χημειοθεραπευτικών μεταλλοφαρμάκων με βάση τον χαλκό έχοντας ως στόχους διαδικασίες όπως η αγγειογένεση, η αναστολή της δραστηριότητας του πρωτεασώματος, η ρύθμιση των επιπέδων ROS και η επαγωγή της απόπτωσης μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνών και γονιδίων και των κασπασών [22].

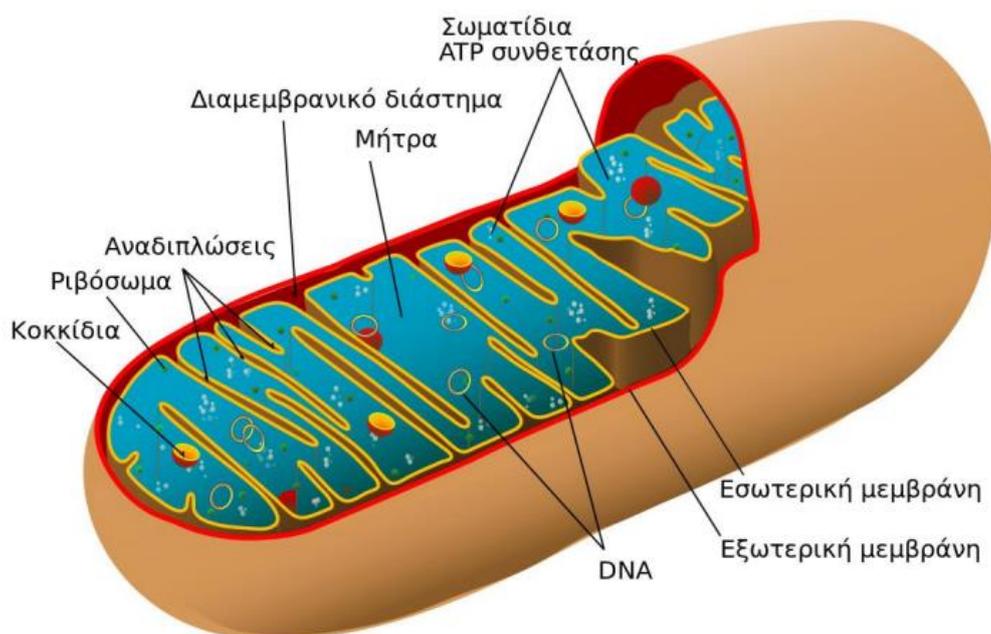
1.6 Μιτοχόνδριο

1.6.1 Μιτοχόνδριο-γενικά στοιχεία

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν κλειστά κυτταρικά οργανίδια που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων, ο αριθμός και το μέγεθος των οποίων ποικίλει από κύτταρο σε κύτταρο και έχουν σχήμα επίμηκες, σφαιρικό ή ωοειδές [28]. Η βασική τους λειτουργία αφορά στην παραγωγή ενέργειας με τη μορφή μορίων τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Η παραγωγή των μορίων αυτών επιτυγχάνεται με την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων [29], ενώ ταυτόχρονα λειτουργούν και ως παραγωγοί δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) [28]. Μια εξίσου σημαντική βιολογική λειτουργία των οργανιδίων αυτών είναι η απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων, όπως το κυττόχρωμα C (Cyt C), στο ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι.

Η δομή τους περιγράφεται από τέσσερα στρώματα: 1) την εξωτερική και 2) εσωτερική μεμβράνη, 3) τον μεσομεμβρανικό χώρο και 4) τη μήτρα [28]. Οι μεμβράνες αποτελούνται από διπλή στιβάδα φωσφολιπιδίων και πρωτεΐνες. Η εξωτερική μεμβράνη είναι λεία, ενώ στην εσωτερική εντοπίζεται παρουσία ακρολοφιών και η ίδια διαιρεί το μιτοχόνδριο στον μεσομεμβρανικό χώρο και τη μιτοχονδριακή θεμέλια ουσία [28]. Ο μεσομεμβρανικός χώρος ταυτίζεται με το στενό διάστημα μεταξύ των δύο μεμβρανών, ενώ η θεμέλια ουσία περιέχει το DNA του μιτοχονδρίου, τα ριβοσώματα και διάφορα ένζυμα, που συμμετέχουν στη διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής [28]. Επιπρόσθετα, η δομή των μιτοχονδρίων αποτρέπει την είσοδο πολλών μορίων στο εσωτερικό τους και κριτήριο για να πραγματοποιηθεί η τελευταία είναι τα μόρια να είναι λιπόφιλα ώστε να έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις μιτοχονδριακές μεμβράνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων [30].

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία οφείλεται συνήθως είτε σε γενετικές μεταλλάξεις μιτοχονδριακών πρωτεϊνών είτε στο οξειδωτικό στρες και είναι υπεύθυνη για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, το σύνδρομο Kearns-Sayre, η κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber και ο διαβήτης [29].



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση μιτοχονδρίου.

1.6.2 Ο ρόλος του μιτοχονδρίου στα καρκινικά κύτταρα.

Τα καρκινικά κύτταρα λόγω του ότι πολλαπλασιάζονται διαρκώς και ανεξέλεγκτα παρουσιάζουν αυξημένες ανάγκες για ενέργεια, όπως αποδείχθηκε από τον Otto Warburg κατά τη δεκαετία του 1920 (γνωστό και ως φαινόμενο Warburg) . Η βασική τροφοδοσία ενέργειας των κυττάρων αυτών γίνεται από τα μιτοχόνδρια, γι' αυτό και συμπεριλαμβάνονται στους βασικούς στόχους της θεραπευτικής προσέγγισης του καρκίνου [31]. Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρούνται αρκετά συχνά μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια, οι οποίες μεταβάλλουν τη μιτοχονδριακή βιοενεργειακή και βιοσυνθετική

κατάσταση αλλά δεν αδρανοποιούν τον μεταβολισμό της ενέργειας. Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια, στους καρκινικούς ιστούς, έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν το μεταβολικό τους φαινότυπο, ώστε να ανταποκριθούν στις προκλήσεις της υψηλής ζήτησης ενέργειας [32]. Μάλιστα, ορισμένοι μιτοχονδριακοί μεταβολίτες επαρκούν για την πρόκληση καρκινογένεσης, ενώ κάποια μιτοχονδριακά μονοπάτια προσαρμόζονται, ώστε να εξυπηρετούνται οι υψηλής ενέργειας λειτουργίες των κακοηθών κυττάρων, προσφέροντάς τους σημαντική μεταβολική πλαστικότητα [33].

Υπάρχουν τρεις κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους συμβάλλουν τα μιτοχόνδρια στο σχηματισμό καρκινικού όγκου:

- Τα μιτοχονδριακά ROS ευνοούν τη συσσώρευση ογκογόνων ελαττωμάτων του DNA, καθώς και την ενεργοποίηση ογκογόνων σηματοδοτικών μονοπατιών,
- Η ανώμαλη συσσώρευση συγκεκριμένων μιτοχονδριακών μεταβολιτών οδηγεί σε εμφανή μετασχηματιστικά αποτελέσματα,
- Τα λειτουργικά ελλείμματα ή οι μεταβολές στην διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι απαραίτητα για την επιβίωση των νεοσχηματισμένων κακοήθων προδρόμων, τα οποία υπό άλλες συνθήκες θα υπέκυπταν σε ρυθμιζόμενο κυτταρικό θάνατο [33].

1.6.3 Ο ρόλος του μιτοχονδρίου στην θεραπεία του καρκίνου.

Σύμφωνα με όλα παραπάνω γίνεται αντιληπτό πως ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός αποτελεί για την έρευνα, πολλά υποσχόμενο αρωγό στην αντιμετώπιση του καρκίνου [33].

Από την αρχή των ερευνών για σύνθεση αντικαρκινικών φαρμάκων μέχρι και σήμερα, στόχο αποτελεί ο θάνατος των καρκινικών κυττάρων. Μετά από την ανακάλυψη του ρόλου του μιτοχονδρίου στην εξέλιξη και στην θεραπεία της νόσου, τα νέα μεταλλοφάρμακα στοχεύουν στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων, συγκεκριμένα μέσω της αποπτωτικής οδού όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

1.7 Απόπτωση: Εξωγενής και Ενδογενής οδός απόπτωσης.

Ως απόπτωση καλείται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που έχει ως αποτέλεσμα την μορφολογική αλλαγή και αποικοδόμηση του DNA. Κατά την διαδικασία αυτή συρρικνώνεται και κατακερματίζεται τόσο ο πυρήνας όσο και τα υπόλοιπα μέρη του κυττάρου, με εξαίρεση την κυτταρική μεμβράνη η οποία σε αντίθεση με την νέκρωση, κατά την απόπτωση δεν διασπάται.

Διακρίνονται δύο μονοπάτια απόπτωσης: η εξωγενής και η ενδογενής οδός. Πιο συγκεκριμένα, η εξωγενής οδός ενεργοποιείται μέσω υποδοχέα θανάτου. Ο υποδοχέας νέκρωσης όγκου-1 (TNF-1), που βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου, αλληλεπιδρά με έναν ligand που σχετίζεται με τον TNF-1 (TRAIL) με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες προσαρμογής όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη Fas που σχετίζεται με την περιοχή θανάτου FADD και η πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον TNF-1 και την περιοχή θανάτου TRADD. Η περιοχή θανάτου (DD) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και αποτελείται από 80 αμινοξέα (κυρίως κυστεΐνη), και είναι υπεύθυνη για την μετάδοση του σήματος από την εξωτερική επιφάνεια στις ενδοκυττάρειες οδούς σηματοδότησης. Έπειτα, ακολουθεί η ενεργοποίηση των προκασπασών-8/10 σε κασπάσες-8/10, οι οποίες

παρουσιάζουν διττό ρόλο. Η δράση τους περιγράφεται ως εξής: Μπορούν είτε να ενεργοποιήσουν την μετατροπή της προκασπάσης-3 σε κασπάση-3 και να προκληθεί απευθείας απόπτωση, είτε ενεργοποιούν την ενδογενή αποπτωτική οδό, απελευθερώνοντας την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BID.

Όσον αφορά στην ενδογενή οδό της απόπτωσης, η απόπτωση σηματοδοτείται από την διάνοιξη του αγωγίμου πόρου μετάβασης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας λόγω προ-αποπτωτικού ή παθολογικού ερεθίσματος, όπως η ακτινοβολία και τα ROS [34]. Το παραπάνω έχει ως αποτέλεσμα η διαπερατότητα της μεμβράνης του μιτοχονδρίου να αυξάνεται απότομα, οδηγώντας σε απώλεια του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού, διάσπαση της εξωτερικής μεμβράνης, διόγκωση της μήτρας, και απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες πρωτεϊνών που ξεκινούν την σηματοδότηση του κυτταρικού θανάτου, μέσω κατακερματισμού του DNA και συμπύκνωσης της χρωματίνης. Η πρώτη κατηγορία αφορά στο κυτόχρωμα C και την ενεργοποίηση των κασπασών [34]. Στις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες κατατάσσονται οι Bak, Bax και στις αντι-αποπτωτικές οι Bcl-2, Bcl-XL και Mcl-1. Κατά την διαδικασία αυτή το Cyt C απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Ακολουθεί η σύνδεση του Cyt C και της δεοξυ-τριφωσφορικής αδενοσίνης (dATP) με τον παράγοντα ενεργοποίησης της αποπτωτικής πρωτεάσης 1 (APAF) σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό αποτελεί οδηγό για την υδρόλυση του ATP, μέσω της οποίας διασπάται και ενεργοποιείται η μετατροπή της προκασπάσης-9 σε κασπάση-9. Η κασπάση-9 με την σειρά της ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες-3/6/7. Οι κασπάσες-3/7 αναστέλλουν την επιδιόρθωση του DNA και επάγουν τον κατακερματισμό του, ενώ η κασπάση-6 διασπά τον κυτταροσκελετό. Παράλληλα το μιτοχόνδριο εκκρίνει μια πρωτεΐνη (Smac/DIABLO) στο κυτταρόπλασμα, η οποία σταματά την δράση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (IAPs). Στα καρκινικά κύτταρα, ενεργοποιείται η προ-αποπτωτική

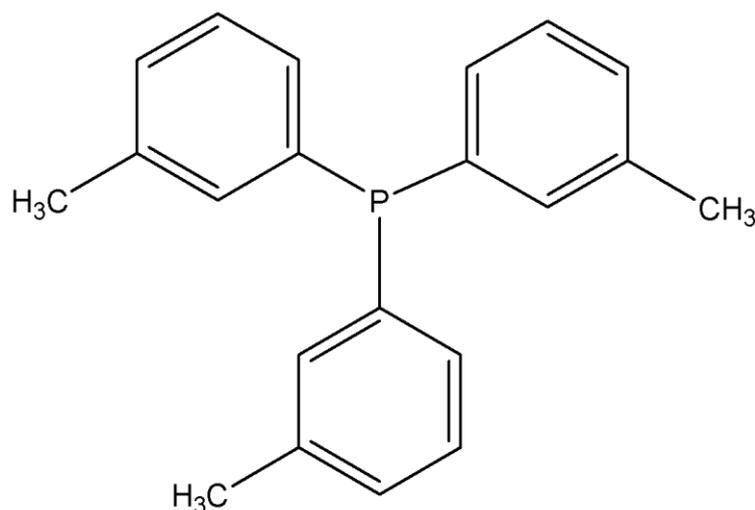
πρωτεΐνη Bax, έπειτα από εντολή του ογκοκατασταλτικού παράγοντα p53, η οποία σχηματίζει ετερομερή με την Bcl-2, οδηγώντας τα σε απόπτωση. Η αναλογία των Bcl-2/Bax καθορίζει την επιβίωση ή τον κυτταρικό θάνατο [35].

Η δεύτερη κατηγορία πρωτεϊνών σχετίζεται με τον παράγοντα που επάγει την απόπτωση (apoptosis-inducing factor, AIF) και με τον, ανεξάρτητο από τις κασπάσες, κυτταρικό θάνατο [34]. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-XL αναστέλλουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C, αποτρέποντας τον σχηματισμό μιτοχονδριακών πόρων και προστατεύοντας την ακεραιότητα της μεμβράνης, μέσω αλληλεπιδράσεων με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες [34]. Σε αντίθεση με το παραπάνω, η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax φεύγει από το κυτοσόλιο και εισέρχεται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου μέσω της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, έπειτα από ένα αποπτωτικό σήμα [34]. Σε αυτό το σημείο είναι πιθανόν να σχηματιστούν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με άλλες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η Bak και να προκληθεί αύξηση στην διαπερατότητα της μεμβράνης.

Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα στοχεύουν κατά κύριο λόγο στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού. Αν και κάποια είδη καρκινικών κυττάρων αντιστέκονται στα χημειοθεραπευτικά μεταλοφάρμακα, λόγω κάποιων αλλαγών στον παράγοντα p53, η ενδογενής οδός της απόπτωσης αντιπροσωπεύει έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για νέα χημειοθεραπευτικά φάρμακα.

1.8 Tri-m-tolyl-phosphine

Η tri(m-tolyl)phosphine είναι ένας μιτοχονδριοτροπικός παράγοντας, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως ως υποκαταστάτης μετάλλων για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων μεταλλοφαρμάκων με αντικαρκινική δράση. Τα παράγωγα πνικτιδίων όπως η tri(m-tolyl)phosphine είναι γνωστό, ότι αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Αυτό συμβαίνει λόγω της περίσσειας θετικού φορτίου της φωσφίνης και της λιποφιλικότητας που εμφανίζουν. Η ιδιότητα τους αυτή τα καθιστά κατάλληλα, διότι η σύζευξη προσδεμάτων φωσφίνης με χαλκό μπορεί να μεταφέρει μιτοχονδριοτροπικούς παράγοντες στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων προκαλώντας απόπτωση.



Εικόνα 12: Δομή της tri(m-tolyl)phosphine (tmtP)

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός ενός νέου χημειοθεραπευτικού μεταλλοφαρμάκου με στόχο το μιτοχόνδριο των καρκινικών κυττάρων, για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Για τη σύνθεση του φαρμάκου χρησιμοποιήθηκε ο τριένυδρος νιτρικός χαλκός (II) ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), καθώς αποτελεί ένα αρκετά υποσχόμενο μέταλλο με αντικαρκινική δράση και η tri(m-tolyl)phosphine, η οποία αποτελεί έναν γνωστό μιτοχονδριοτροπικό παράγοντα. Επιπλέον μελετάται η βιολογική δράση του φαρμάκου στο DNA. Πιο συγκεκριμένα προσδιορίζεται πειραματικά *ex vivo* ο τρόπος αλληλεπίδρασης του με το DNA, μελετήθηκε *in vivo* η τοξικότητα που εμφανίζει και η φωτοενεργότητά του, με τελικό στόχο την εξαγωγή συμπερασμάτων για την αντικαρκινική δράση της ένωσης.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και μέθοδοι

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατάλληλοι ως αντιδραστήρια και δεν υποβλήθηκαν σε περαιτέρω καθαρισμό. Ο τριένυδρος νιτρικός χαλκός και το DMF αγοράστηκαν από την Merck. Το MeCN, το CT-DNA και το EB αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich. Το DMSO, η MeOH αγοράστηκαν από την Honeywell, ο Et₂O από την Riedel-de Haën και η Tmtp, αγοράστηκε από την TCI. Τα αυγά της Αρτέμια (brine shrimp eggs) αγοράστηκαν από την Ocean Nutrition, ενώ το θαλασσίνο αλάτι από την Tropic Marin.

Για την μέτρηση του σημείου τήξης χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδή σωληνάκια και η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Stuart Scientific (STUART SMP30) χωρίς κάποια διόρθωση. Για την καταγραφή του φάσματος IR (απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας) χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο ATR-FT-IR (Cary 630 FTIR) με μέση υπέρυθρη ακτινοβολία (4000- 370 cm⁻¹) της εταιρείας Agilent. Για τα φάσματα ¹H-NMR τα σύμπλοκα διαλυτοποιήθηκαν με διάλυμα DMSO-d₆ και λήφθηκαν σε όργανο Bruker C 400 MHz FT-NMR. Το όργανο XRF (NEXQC) της Rigaku χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των φασμάτων XRF. Όσον αφορά στην προσεγγιστική μέτρηση του μοριακού βάρους των ενώσεων, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της κρυσκοπίας με χρήση οσμόμετρου σημείου πήξης Osmomat 3000 basic. Φασματοφωτόμετρο UV/Vis σειράς PC UV-1600 της VWR χρησιμοποιήθηκε για τα φάσματα ηλεκτρονικής απορρόφησης και για την λήψη των φασμάτων φθορισμού χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο φθορισμού της JASCO Spectrofluorometer FP-8200. Για την μέτρηση του κινηματικού ιξώδους χρησιμοποιήθηκε ιξωδόμετρο Ostwald. Επιπλέον όργανα και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν για τη

διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν ο αναλυτικός ζυγός της εταιρείας Scatec, θερμαινόμενοι μαγνητικοί αναδευτήρες, πιπέτες ακριβείας (1000, 100 και 10 μL , Vortex από την εταιρεία Sanichem, μια ειδική πρέσα για παστίλιες και πεχάμετρο (pH meter Basic 20) της εταιρείας CRISON.

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

ΑΝΤΙΑΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τριένυδρος Νιτρικός Χαλκός [Cu(NO ₃) ₂ · 3H ₂ O]	n-hexane
Tri(m-tolyl)phosphine (tmtP)	Τολουόλιο (Toluene)
Ακετονιτρίλιο (MeCN)	Διχλωρομεθάνιο (CH ₂ Cl ₂)
Μεθανόλη (MeOH)	Χλωροφόρμιο (CHCl ₃)
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	Ακετόνη (Acetone)
Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)	Νερό (ddH ₂ O)
Βορικό οξύ (Boric Acid)	

2.2 Χημικό Μέρος

Το χημικό μέρος περιλαμβάνει τη σύνθεση των ενώσεων CuMToN_A και CuMToN_B, την εύρεση του σημείου τήξης, της διαλυτότητας και του μοριακού βάρους με τη μέθοδο της κρυοσκοπίας. Επιπλέον, λαμβάνονται τα φάσματα υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier (ATR-IR), φθορισμού ακτίνων X (XRF), απορρόφησης υπέρυθρης-ορατής ακτινοβολίας (UV-Vis) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (¹H-NMR) (και για σταθερότητα). Τέλος, μελετήθηκε και η φωτοδραστικότητα των συμπλόκων με επίδραση UVB ακτινοβολίας.

Πίνακας 3: Μέθοδοι χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2.1 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού συμπλόκων.

Φασματοσκοπία Υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)	Στοιχειακή Ανάλυση X-ray fluorescence (XRF)
Μέτρηση σημείου Τήξεως (Melting Point)	Σταθερότητα συμπλόκων
Διαλυτότητα	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)
Κρυοσκοπία	Προσδιορισμός Κρυσταλλικής Δομής με την Μέθοδο Περίθλασης Ακτινών Χ (XRD, X Rays Diffraction)

2.2.1.1 Σύνθεση των συμπλόκων

Σύνθεση Μεταλλοφαρμάκων CuMToN_A και CuMToN_B

Για το **CuMToN_A**: Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται 0,048g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.2mmol), προστίθενται 10 ml MeCN και υπόκειται σε ανάδευση με θέρμανση στους 50 °C έως ότου διαλυθεί ο νιτρικός χαλκός. Σε ένα δεύτερο ποτήρι ζέσεως προστίθενται 0.122g tri(m-tolyl)phosphine (0.4 mmol), 10 ml MeOH και αυτό αναδεύεται υπό θέρμανση στους 50 °C έως ότου διαλυθεί πλήρως η φωσφίνη. Όταν ο νιτρικός χαλκός διαλυθεί πλήρως το περιεχόμενο του πρώτου ποτηριού ζέσεως απορρίπτεται στο δεύτερο. Η θέρμανση παραμένει έως ότου το διάλυμα από υποκίτρινο να γίνει άχρωμο και να διαυγάσει. Στη συνέχεια πραγματοποιείται διήθηση του διαλύματος με διπλό ηθμό σε ευρύλαιμη κωνική φιάλη. Μετά το πέρας μερικών ημερών σχηματίστηκε προϊόν, στο οποίο προστέθηκαν 5 ml διαιθυλαιθέρα. Το προϊόν συλλέχθηκε μετά την εξάτμιση του διαιθυλαιθέρα. Μέχρι και αυτό το σημείο η σύνθεση για τα δύο σύμπλοκα ακολουθεί την ίδια διαδικασία, με την διαφορά πως για το **CuMToN_B** χρησιμοποιούνται 0,048g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.2mmol) και 0.183g tri(m-tolyl)phosphine (0.6 mmol)

Από τις παραπάνω συνθέσεις παραλήφθηκαν δύο προϊόντα :

Για το **CuMToN_A**: Πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωση σε DMF. Η ποσότητα του προϊόντος που παραλείφθηκε, μετά την ξήρανση με διαιθυλαιθέρα, διαλύθηκε σε 1 ml DMF. Μετά το πέρας μερικών ημερών σχηματίστηκαν κρύσταλλοι.

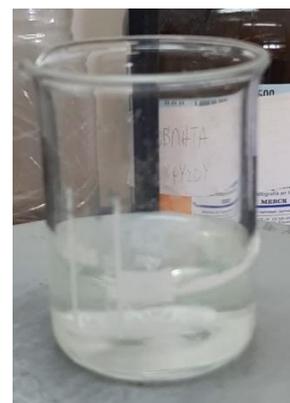
Για το **CuMToN_B** : Πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωση σε DMSO. Η ποσότητα του προϊόντος που παραλείφθηκε, μετά την ξήρανση με διαιθυλαιθέρα, διαλύθηκε σε 1 ml DMSO. Μετά το πέρας μερικών ημερών σχηματίστηκαν κρύσταλλοι.

Αναλυτικά στοιχεία **CuMToN_A**: άχρωμοι κρύσταλλοι; σημείο τήξεως: 73.5-74.6°C; MW = 733.44 g·mol⁻¹. IR (cm⁻¹): 3033 (m), 2918 (m), 1659 (m), 1591 (m), 1444 (m), 1285 (s), 1172 (m), 1105 (s), 1027 (m), 891 (m), 780 (s), 691 (vs), 545 (s), 451 (s); ¹H-NMR (ppm) in DMSO-d₆: 7.277, 7.165, 6.994 H[C_{aromatic} of tmtP], 2.118 (methyl protons of tmtP); UV-vis (DMSO): λ= 268 nm (logε= 4.22)

Αναλυτικά στοιχεία **CuMToN_B** : άχρωμοι κρύσταλλοι; σημείο τήξεως: 150.3-151.0°C; MW = 1037.54 g·mol⁻¹, IR (cm⁻¹): 3032 (m), 2918 (m), 1659 (m), 1591 (m), 1443 (m), 1285 (s), 1172 (m), 1106 (m), 1022 (s), 780 (s), 691 (s), 546 (m), 452 (m); ¹H-NMR (ppm) in DMSO-d₆: 7.287, 7.173, 7.003 H[C_{aromatic} of tmtP], 2.547, 2,128 (methyl protons of tmtP); UV-vis (DMSO): λ= 270 nm (logε= 4.14)



(a)



(b)

Εικόνα 13: (a) Ανάμειξη νιτρικού χαλκού και της tri(m-tolyl)phosphine, χρώμα διαλύματος: πράσινο και (b) Το διάλυμα μετά το πέρας 5 λεπτών υπό ανάδευση, χρώμα διαλύματος: άχρωμο και διαυγές.

2.2.1.2 Σημείο τήξης των CuMToN_A και CuMToN_B (T_m)

Για τη μέτρηση του σημείου τήξεως χρησιμοποιήθηκαν ανοιχτά τριχοειδή σωληνάκια BRIS micro haematocrit tubes (Soda Lime Glass, Vitrex Medical A/S). Με τη χρήση της συσκευής Stuart Scientific μετρήθηκε το σημείο τήξεως με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας. Στο σημείο τήξεως δεν έχει γίνει καμία διόρθωση.



Εικόνα 14: Συσκευή Stuart Scientific.

2.2.1.3 Διαλυτότητα

Προκειμένου να διαπιστωθεί ο καταλληλότερος διαλύτης για τα μεταλλοφάρμακα **CuMToN_A** και **CuMToN_B** πραγματοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Για κάθε ένα μεταλλοφάρμακο προστέθηκε ίση και μικρή ποσότητα του δείγματος σε δέκα διαφορετικούς σωλήνες στους οποίους προστέθηκαν διαδοχικά ίσοι όγκοι από τους ακόλουθους διαλύτες: 1) εξάνιο (n-hexane), 2) διαιθυλαιθέρα ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 3) διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), 4) χλωροφόρμιο (CHCl_3), 5) μεθανόλη (MeOH), 6) ακετονιτρίλιο (MeCN), 7) διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), 8) διμέθυλο-φορμαμίδιο (DMF) και 9) δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Έπειτα, ακολούθησε ανάδευση των διαλυμάτων στο vortex, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ακολούθησε και ήπια θέρμανση του διαλύματος. Τέλος, ελέγχθηκε η διαλυτότητα των συμπλοκών σε κάθε έναν από τους παραπάνω διαλύτες.

2.2.1.4 Κρυοσκοπία

Με την μέθοδο της κρυοσκοπίας μελετώνται φαινόμενα που σχετίζονται με την πήξη των διαλυμάτων και με τεχνικές μέτρησης του μοριακού βάρους. Με την μέθοδο αυτή λοιπόν, προσδιορίστηκαν οι σχετικές μοριακές μάζες των δύο συμπλόκων (**CuMToN_A** και **CuMToN_B**). Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο οι διαλυμένες ουσίες μειώνουν τα σημεία πήξεως διαφόρων διαλυτών. Επομένως, ανάλογα με την ταπείνωση του σημείου πήξεως του διαλύτη μπορεί να βρεθεί το μοριακό βάρος της ουσίας που προστίθεται σε αυτόν. Αυτό προκύπτει από δύο σχέσεις:

Η ταπείνωση του σημείου πήξεως του διαλύτη ισούται με $\Delta T_f = K_f \times m$, όπου K_f η κρυοσκοπική σταθερά, η οποία είναι συγκεκριμένη για κάθε διαλύτη και αντιστοιχεί στην μοριακή ταπείνωση του σημείου πήξεως του διαλύτη που προκαλείται από την διάλυση 1 mole διαλυμένης ουσίας σε 1000g διαλύτη. Ως m ορίζεται η μοριακότητα κατά βάρος του διαλύματος και υπολογίζεται από την σχέση $m = [(1000 \times m_1 / M_r \times m_2)]$ (m_1 : μάζα διαλυμένης

ουσίας, m_2 : μάζα διαλύτη και M_r : το μοριακό βάρος της διαλυμένης ουσίας). Οι πειραματικές μετρήσεις βασίζονται στην παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta T_f = K_f \times m = K_f \frac{m_{\text{διαλυμένης ουσίας}} \times 1000}{M_r \text{ διαλυμένης ουσίας} \times m_{\text{διαλύτη}}}$$

Πειραματικά, λοιπόν, το δείγμα διαλύεται με DMSO σε συγκέντρωση 10mg/1ml. Ακολούθησε αραιώση 1 μL του συμπυκνωμένου δείγματος σε 49 μL ddH₂O. Η οσμωτικότητα του διαλύματος μετρήθηκε στη συσκευή OSMOMAT 3000 Freezing Point Osmometer της Gonotec και καταγράφηκαν οι τιμές εκφρασμένες σε mOsmol/kg. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται και για τα δύο σύμπλοκα.



Εικόνα 15: Συσκευή OSMOMAT 3000 Freezing Point Osmometer της Gonotec

2.2.1.5 Υπέρυθρη Φασματοσκοπία Μετασχηματισμού Fourier Ολικής Εσωτερικής Ανάκλασης (ATR-FTIR)

Η μέθοδος της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (ATR-FTIR) βασίζεται στην αλληλεπίδραση των μορίων των ουσιών με την υπέρυθρη ακτινοβολία τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες

δόνησης ή περιστροφής, προκαλώντας χαρακτηριστικές δονήσεις, οι οποίες είναι ανάλογες με το είδος των δεσμών της ένωσης που μελετάται [37]. Χρησιμοποιείται για την λήψη φασμάτων σε υγρή, στερεή, ημιστερεή ή αέρια κατάσταση ή σε σκόνη.

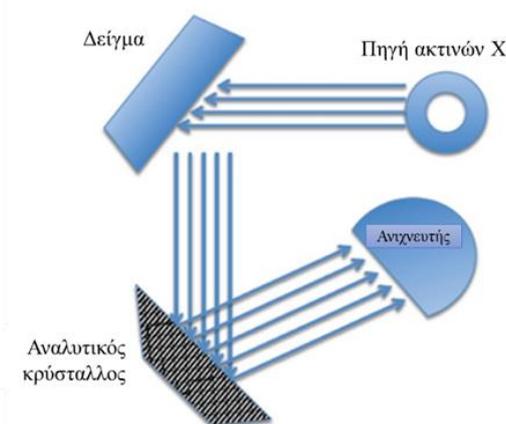
Ο όρος FTIR αναφέρεται σε οποιαδήποτε μέθοδος υπέρυθρης φασματοσκοπίας στην οποία χρησιμοποιείται ο μετασχηματισμός Fourier. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να λαμβάνονται βελτιωμένα φάσματα σε σχέση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα. Επιπρόσθετα, ανάπτυξη της τεχνικής της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (ATR) ενίσχυσε την ευαισθησία της φασματοσκοπίας και αποτελεί πλέον την πιο διαδεδομένη μέθοδο λήψης φασμάτων υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier για άγνωστα δείγματα σε στερεή και υγρή κατάσταση.

Για την λήψη των φασμάτων IR των ενώσεων **CuMToN_A** και **CuMToN_B** τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα ουσίας στον διαφανή κρύσταλλο με υψηλό δείκτη διάθλασης του ATR-FTIR (Cary 630 FTIR) της Agilent. Τέλος, λήφθηκαν και μελετήθηκαν τα φάσματα των ενώσεων με το φάσμα συχνοτήτων της ακτινοβολίας να κυμαίνεται στα 4000-400 cm^{-1} , εφαρμόζοντας το πρόγραμμα MicroLab Expert.

2.2.1.6 Φθορισμός ακτίνων X (X-ray Fluorescence, XRF)

Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μία μη καταστρεπτική αναλυτική τεχνική μεγάλης ακρίβειας και χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η στοιχειακή ανάλυση των υλικών [38]. Η μέθοδος βασίζεται στη διέγερση του δείγματος μέσω μιας πρωτογενούς πηγής ακτίνων X και έπειτα στη μέτρηση της φθορίζουσας ακτινοβολίας X που εκπέμπεται από το δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, ένα ηλεκτρόνιο της ένωσης απορροφάει ενέργεια από την πηγή του οργάνου και μεταπηδά σε διαφορετική ενεργειακή κατάσταση. Προφανώς για να επιτευχθεί αυτό η ενέργεια αυτή θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια με την οποία ο

πυρήνας συγκρατεί το ηλεκτρόνιο στη συγκεκριμένη στιβάδα [39]. Στην περίπτωση που ένα ηλεκτρόνιο εσωτερικού τροχιακού φεύγει από ένα άτομο, τότε ένα ηλεκτρόνιο από μία κατάσταση υψηλότερης ενεργειακής στάθμης θα μεταφερθεί σε μια στιβάδα χαμηλότερης ενέργειας στη θέση που έμεινε κενή. Κατά την διάρκεια της αποδιέγερσης του δεύτερου ηλεκτρονίου, εκπέμπεται φωτόνιο [39]. Αυτό το φθορίζον φως αποτελεί την χαρακτηριστική ακτίνα X του στοιχείου. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία κάθε στοιχείου είναι χαρακτηριστική και αποτελεί ένα είδος δακτυλικού αποτυπώματος για το κάθε ένα. Αυτό το γνώρισμα των στοιχείων εκμεταλλεύεται η μέθοδος φθορισμού ακτίνων X και βρίσκει ευρεία εφαρμογή τόσο για ποιοτική, όσο και για ποσοτική ανάλυση της σύστασης μιας άγνωστης ένωσης.



Εικόνα 16: Απλοποιημένο διάγραμμα ανάλυση XRF (επεξεργασμένη εικόνα από [39])

Η πειραματική πορεία για την λήψη φασμάτων XRF περιγράφεται ως εξής:

Αρχικά, δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη νιτρικού χαλκού $[Cu(NO_3)_2]$ για τον προσδιορισμό του Cu στα **CuMToN_A** και **CuMToN_B**. Η μέτρηση XRF των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε σε μορφή παστίλιων, οι οποίες περιείχαν συγκεκριμένη ποσότητα του εκάστοτε συμπλόκου και βορικού οξέος (H_3BO_3) (Πίνακας 4). Οι παστίλιες δημιουργήθηκαν μετά την κονιοποίηση των ουσιών σε γουδί και την συμπίεση του

κονιοτοποιήματος σε ειδική πρέσα (Scatec). Ο αναλυτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Rigaku NEX QC EDXRF.

Πίνακας 4: Ποσότητες CuMToN_A, CuMToN_B και βορικού οξέος που περιείχαν οι παστίλες για την φασματοσκοπία XRF.

Μάζα CuMToN_A	Μάζα H₃BO₃
0.00815	0.50936
0.00805	0.52435
0.00819	0.50911

Μάζα CuMToN_B	Μάζα H₃BO₃
0.00819	0.50911
0.00794	0.52434
0.00819	0.50912

2.2.1.7 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός Πρωτονίου (¹H-NMR)

Στην φασματοσκοπία του ¹H-NMR το δείγμα βρίσκεται υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου απορροφώντας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συγκεκριμένων συχνοτήτων, χαρακτηριστικές για κάθε δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, όταν ένας πυρήνας τοποθετείται μέσα σε ισχυρό, εξωτερικό, μαγνητικό πεδίο, παρατηρείται απορρόφηση ενέργειας ραδιοσυχνότητας [40]. Οι πυρήνες απορροφούν ενέργεια, δηλαδή συντονίζονται

σε διαφορετικά μήκη κύματος ο καθένας [40]. Για την λήψη των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ των **CuMToN_A** και **CuMToN_B** ζυγίστηκαν 10mg από το κάθε σύμπλοκο και διαλύθηκαν σε 400μl δευτεριωμένου DMSO ($\text{DMSO-}d_6$). Τα διαλύματα αυτά μεταφέρθηκαν σε ειδικά σωληνάκια για το NMR και μετρήθηκαν στο όργανο της Bruker AC 400 MHz FT-NMR. Τα διαλύματα μετρήθηκαν μετά από 48 ώρες και μετά από μία εβδομάδα προκειμένου να διαπιστωθεί η σταθερότητα τους. Τέλος, μελετήθηκαν και ερμηνεύτηκαν τα φάσματα.

2.2.1.8 Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπέρουθρης-Ορατής Ακτινοβολίας (UV-Vis)

Η τεχνική της φασματοφωτομετρίας μοριακής απορρόφησης UV-Vis βασίζεται στην απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από το δείγμα προκαλώντας ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις σε υψηλότερης ενέργειας μοριακά τροχιακά [41]. Κάθε δείγμα απορροφά φως, το οποίο μετράται μέσω του φασματοφωτόμετρου και καταγράφεται το φάσμα της απορρόφησης του [41]. Η υπεριώδης (UV) περιοχή αναφέρεται σε μήκη κύματος 185-380 nm, ενώ η ορατή (Vis) περιοχή αναφέρεται σε μήκη κύματος 380-780 nm [41].

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση και τον έλεγχο της σταθερότητας (0 και 48 ώρες) των **CuMToN_A** και **CuMToN_B**, καθώς και των ligands $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και tmtP. Προκειμένου να ληφθούν φάσματα απορρόφησης υπέρυθρης-ορατής ακτινοβολίας παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 10^{-2}M με διαλύτη DMSO. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε DMSO. Έπειτα παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης $5 \times 10^{-5}\text{ M}$ σε κυψελίδα των 2 mL, με αραιώση. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα M. Wave Professional 1.0 στο UV-Vis φασματοφωτόμετρο σειράς PC UV 1600 της εταιρείας VWR.

2.2.1.9 Περίθλαση Ακτινών X (X-ray Diffraction, XRD)

Η τεχνική της περίθλασης ακτίνων X έχει ως στόχο την επίλυση της δομής μια άγνωστης ένωσης, συγκεκριμένα στον προσδιορισμό της ατομικής και μοριακής δομής της. Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η ουσία να βρίσκεται σε μορφή κρυστάλλου. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη διάθλαση μιας προσπίπτουσας δέσμης ακτίνων-X στα άτομα του κρυστάλλου σε διάφορες καθορισμένες κατευθύνσεις. Προσδιορίζοντας τη γωνία και την ένταση των διαθλώμενων δεσμών μπορεί να ληφθεί μια τρισδιάστατη εικόνα της πυκνότητας των ηλεκτρονίων στον κρύσταλλο, με αποτέλεσμα να προσδιορίζονται οι μέσες θέσεις των ατόμων και οι χημικοί δεσμοί μεταξύ των ατόμων. Για τον προσδιορισμό των τρισδιάστατων δομών των συμπλόκων συλλέχθηκαν κατάλληλοι κρύσταλλοι σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 5: Κρυσταλλικά δεδομένα των CuMToN_A και CuMToN_B.

	CuMToN_A	CuMToN_B
Μοριακός Τύπος	C ₄₂ H ₄₂ CuNO ₃ P ₂	C ₆₃ H ₆₃ CuNO ₃ P ₃
Μοριακό Βάρος (g/mol)	733.44	1037.54
Κρυσταλλικό σύστημα	Tetrahedral	Tetrahedral
Space Group	P c a 2 ₁	P 2 ₁ /c
a(Å)	20.5014(11)	22.0146(7)
b(Å)	10.9874(8)	10.9051(4)
c(Å)	33.168(2)	23.8047(7)
Volume (Å³)	7471.33	5298.47
Z	4	4
F (000)	3440	2748

2.2.1.10 Μελέτη της φωτοενεργότητας των συμπλόκων CuMToN_A και CuMToN_B με επίδραση UVB ακτινοβολίας.

Το συγκεκριμένο πείραμα βασίζεται στην μεταβολή της απορρόφησης των διαλυμάτων των συμπλόκων πριν και μετά την φωτοβόλυση τους με UVB ακτινοβολία προκειμένου να διαπιστωθεί αν διασπώνται, υπολογίζοντας την κβαντική απόδοση κάθε ένωσης. Η κβαντική απόδοση (quantum yield), $\varphi(\lambda)$ μιας φωτοχημικής αντίδρασης είναι μια από τις πιο σημαντικές παραμέτρους η οποία καθορίζει την απόδοση μιας φωτοχημικής διεργασίας. Ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων της ένωσης τα οποία υφιαντιδρούν προς τον αριθμό των φωτονίων (einstein) τα οποία απορροφώνται από το σύστημα σε μήκος κύματος λ , ανά μονάδα χρόνου:

$$\varphi(\lambda) = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\varepsilon}\right) \times N_A}{N \times t}$$

Όπου ΔA : διαφορά απορροφήσεων, ε : συντελεστής μοριακής απορρόφησης συμπλόκου, N_A : αριθμός Avogadro, N : αριθμός φωτονίων, t :χρόνος (1 sec).

Μονάδες μέτρησης: Einstein

Η κβαντική απόδοση εξαρτάται από τα μήκος κύματος της ακτινοβολίας, το pH του διαλύματος, τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας, τη θερμοκρασία, το διαλύτη και τη συγκέντρωση το διαλυμένου οξυγόνου.

Για την πραγματοποίηση του πειράματος ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των συμπλόκων συγκέντρωσης 10^{-2} M και δημιουργήθηκαν δύο δείγματα όγκου 2 ml (ένα για κάθε σύμπλοκο) τα οποία περιείχαν 1990 μ l CT-DNA (η παρασκευή του διαλύματος περιγράφεται στην ενότητα 3.1.B) και 10 μ l συμπλόκου. Μετράται η απορρόφηση για κάθε δείγμα πριν την φωτοβόλυση και μετά από

αυτήν. Στη συνέχεια φωτοβολούνται για 1 λεπτό, 2 λεπτά, 3 λεπτά, 4 λεπτά, 5 λεπτά, 10 λεπτά, 15 λεπτά, 30 λεπτά και 1 ώρα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το UV-Vis φασματοφωτόμετρο σειράς PC UV 1600 της εταιρείας VWR με το πρόγραμμα M. Wave Professional 1.0. Η ισχύς της ληχνίας είναι 15 W και ο αριθμός των φωτονίων που εκπέμπει η ληχνία ανά 1 δευτερόλεπτο υπολογίστηκε ως εξής:

$$P = \frac{W}{t} = \frac{N \times h \times c}{\lambda \times t}$$

P: ισχύς της ληχνίας (15 W), N: αριθμός των φωτονίων, h: σταθερά Planck (6.63×10^{-34} J×s), c: ταχύτητα του φωτός (3×10^8 m/s), λ: μήκος κύματος (280 nm), t: χρόνος (1sec).

Τέλος, τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν κατάλληλα προκειμένου να υπολογιστούν οι κβαντικές αποδόσεις των ενώσεων.

3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο βιολογικό μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκαν *ex vivo* πειράματα με τα οποία μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των **CuMToN_A** και **CuMToN_B** με το CT-DNA μέσω φθορισμού, απορρόφησης UV και ιξωδομετρίας. Πραγματοποιήθηκε επιπλέον και *in vivo* μελέτη με *Artemia salina* (ή Brine shrimp) για τον προσδιορισμό της τοξικότητας των συμπλόκων.

Ex vivo

3.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των **CuMToN_A** και **CuMToN_B** με το calf thymus DNA (CT-DNA) μέσω απορρόφησης UV

A. Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer)

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος, σε μια γυάλινη φιάλη μεταφέρονται 2,2 g κιτρικό νάτριο (15 mM), 4,38 g χλωριούχο νάτριο (150 mM) και προστίθενται 500 ml dd H₂O. Με πεχάμετρο της CRISON ελέγχεται και ρυθμίζεται το pH του διαλύματος να είναι ίσο με 7. Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο.

B. Παρασκευή πρότυπου διαλύματος DNA

Για την παρασκευή του διαλύματος DNA ζυγίζεται μικρή ποσότητα CT-DNA (ίνες CT-DNA) και μεταφέρεται σε καθαρή κωνική φιάλη. Σε αυτήν προστέθηκαν 19 ml buffer και 1 ml dd H₂O. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εξαντλητική ανάδευση για τρεις μέρες σε παγόλουτρο (4°C), προκειμένου να απογευχθεί η μετουσίωση. Το διάλυμα του CT-DNA αποθηκεύεται πάντα στο ψυγείο. Για να ελέγξουμε την καθαρότητα του πρότυπου διαλύματος CT-DNA λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης του διαλύματος CT-DNA σε κυψελίδα των 2 ml, από τα 200-450 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε buffer. Από τον λόγο

των απορροφήσεων στα 260 nm (όπου απορροφά το DNA) και 280 nm (όπου απορροφούν οι πρωτεΐνες) τεκμηριώνεται η καθαρότητα του δείγματος [44]. Πιο συγκεκριμένα:

- Αν ο λόγος των απορροφήσεων είναι μεταξύ των τιμών $1.8 < A_{260}/A_{280} < 2.0$ αποδεικνύεται πως το διάλυμα είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις πρωτεϊνών και φαινολών.
- Όταν ο λόγος $\frac{A_{260}}{A_{280}} = 2$, πρόκειται για καθαρό RNA ενώ όταν ισούται με 1.8 πρόκειται για καθαρό DNA.
- Αν ο λόγος των απορροφήσεων είναι $\frac{A_{260}}{A_{280}} \leq 1.7$ αυτό υποδηλώνει πως στο διάλυμα υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών και φαινολών [45].

Τέλος, η συγκέντρωση του διαλύματος CT-DNA καθορίζεται από τον νόμο Lambert-Beer:

$$A_{260} = \epsilon_{260} \times b \times c$$

Η A_{260} προσδιορίζεται από το φάσμα απορρόφησης, όπου ϵ είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης που ισούται με $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και όπου b το μήκος της κυψελίδας είναι $b=1 \text{ cm}$

C. Φασματοφωτομετρία απορρόφησης UV με CT-DNA και **CuMToN_A** ή **CuMToN_B**

Κατά την μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA μέσω της φασματοσκοπίας απορρόφησης UV-Vis διεξήχθησαν δύο πειράματα:

1) Τιτλοδότηση CT-DNA με το σύμπλοκο (**CuMToN_A** ή **CuMToN_B**)

Σε αυτήν τη μέθοδο εξετάζεται ο τρόπος με τον οποίον μεταβάλλεται το $\lambda_{\max(\text{απορ.})} = 258 \text{ nm}$ του CT-DNA κατά την προσθήκη αυξανόμενης ποσότητας συμπλόκου, με στόχο να προσδιοριστεί το είδος της δέσμευσης της ένωσης στο DNA. Αναλυτικότερα, στα πειράματα τιτλοδότησης, τα φάσματα καταγράφονται για μια σταθερή συγκέντρωση CT-

DNA, απουσία και παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης συμπλόκου με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου UV-Vis σειράς PC UV-1600 της VWR.

Καθώς προστίθεται η ποσότητα του συμπλόκου και ανάλογα με το είδος της αλληλεπίδρασης, το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης $\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$ μετατοπίζεται είτε σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (βαθυχρωμία), είτε προς μικρότερα μήκη κύματος (υψιχρωμία), ενώ η απορρόφηση είτε μειώνεται (υποχρωμία) ή αυξάνεται (υπερχρωμία).

Πριν την έναρξη του πειράματος παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των συμπλόκων συγκέντρωσης 10^{-2} M . Για την λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα των 2 ml στην οποία προστέθηκε κάθε φορά η κατάλληλη αναλογία r (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10), όπου $r = [\text{complex}] / [\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 10^{-4} \text{ M}$. Ο υπόλοιπος όγκος (μέχρι τα 2 ml) συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα buffer [44].

Το είδος της μεταβολής υποδηλώνεται με οποιαδήποτε μεταβολή στο μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης του CT-DNA. Πιο συγκεκριμένα:

- ✚ Η μείωση της απορρόφησης, δηλαδή υποχρωμία, υποδηλώνει παρεμβολή.
- ✚ Η αύξηση της απορρόφησης, δηλαδή υπερχρωμία, συνεπάγεται παρεμβολή στην αύλακα, ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή ρήξη του DNA.
- ✚ Η μετατόπιση του λ_{\max} προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, δηλαδή βαθυχρωμία, υποδηλώνει σταθεροποίηση της δομής του DNA.
- ✚ Η μετατόπιση του λ_{\max} προς μικρότερα μήκη κύματος, δηλαδή υψιχρωμία, συνδέεται με αποσταθεροποίηση της δομής του DNA.

Πίνακας 6: Μεταβολή της απορρόφησης και τρόποι αλληλεπίδρασης των ουσιών με το DNA.

Μείωση απορρόφησης	Υποχρωμία	Παρεμβολή
Αύξηση απορρόφησης	Υπερχρωμία	Παρεμβολή στην αύλακα, Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή ρήξη του DNA.
Μετατόπιση λ_{\max} σε μεγαλύτερα λ	Βαθυχρωμία	Σταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA
Μετατόπιση λ_{\max} σε μικρότερα λ	Υψιχρωμία	Αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA

2) Τιτλοδότηση συμπλόκου **CuMToN_A** ή **CuMToN_B** με CT-DNA

Με αυτήν την τεχνική μπορούμε να λάβουμε πληροφορίες για την ισχύ της δέσμευσης του συμπλόκου με το DNA, μέσω της εύρεσης της σταθερά σύνδεσης συμπλόκου-DNA (K_b). Η ισχύς δέσμευσης μιας ένωσης καθορίζεται από την τιμή K_b (M^{-1}), η οποία αντιπροσωπεύει τη σταθερά σύνδεσης ανά ζεύγος βάσεων DNA και μπορεί να ληφθεί παρακολουθώντας τις αλλαγές στην απορρόφηση ενός φάσματος UV της εκάστοτε ένωσης με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CT- DNA. Ο προσδιορισμός της K_b γίνεται με την εξίσωση Wolf-Shimer:

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

Όπου $[DNA]$: συγκέντρωση του DNA σε ζεύγη βάσεων, ε_A : συντελεστής μοριακής απορρόφησης $A_{\text{obs}}/[\text{complex}]$, ε_f : συντελεστής απόσβεσης για το ελεύθερο σύμπλοκο, ε_b : συντελεστής απόσβεσης για την πλήρως δεσμευμένη μορφή του συμπλόκου. Η K_b

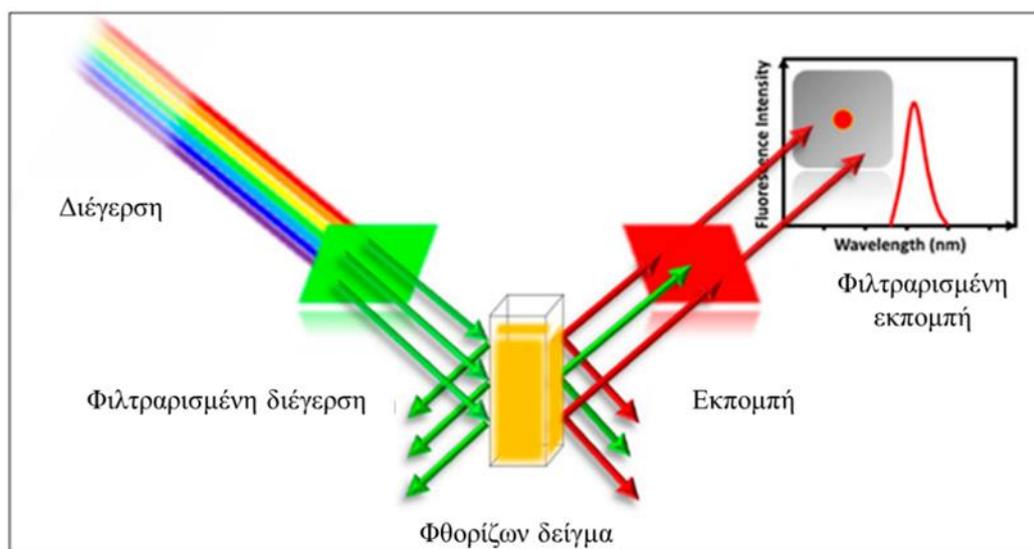
λαμβάνεται από την αναλογία της κλίσης προς την τεταγμένη επί την αρχή των αξόνων σε γραφικές παραστάσεις $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ συναρτήσει $[DNA]$ [44].

Στα πειράματα προσδιορισμού της K_b , διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση του συμπλόκου ενώ μεταβάλλεται η συγκέντρωση του CT-DNA. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι οι αναλογίες είναι $r=[\text{complex}]/[\square\square-\square\square\square]$ (0, 0.5, 0.25, 0.17, 0.125). Η καταγραφή των φασμάτων γίνεται με το φασματοφωτομέτρο UV-Vis σειράς PC UV-1600 της VWR.

3.2 Μελέτη του DNA με τα CuMToN_A ή CuMToN_B μέσω φθορισμού.

3.2.1 Φασματοσκοπία φθορισμού.

Ο φθορισμός ως φαινόμενο αποτελεί μια φυσικοχημική ανταλλαγή ενέργειας, όπου τα φωτόνια μικρού μήκους κύματος απορροφώνται από ένα μόριο και επανεκπέμπονται ως φωτόνια μεγαλύτερου μήκους κύματος [42]. Αυτή η επανεκπομπή φωτός μεγαλύτερου μήκους κύματος ονομάζεται φθορισμός [42].



Εικόνα 17: : Σχηματική αναπαράσταση φθορισμού (επεξεργασμένη εικόνα από [43])

Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου βασίζεται στην μεταβολή του φθορισμού που προκαλείται από την σύνδεση μιας φαινανθριδίνης με φθορίζουσες ιδιότητες, του αιθιδίου βρωμιδίου (EB: ethidium bromide, 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide) με το DNA. Το EB συνδέεται με το DNA μέσω παρεμβολής μεταξύ δύο γειτονικών βάσεων της έλικας, λόγω του επίπεδου δακτυλίου της φαινανθριδίνης. Πιο συγκεκριμένα, εάν με την προσθήκη ενός μεταλλοφαρμάκου, στην προκειμένη περίπτωση, παρατηρείται μείωση του φθορισμού του συμπλόκου EB-DNA στο $\lambda_{\max(\text{εκπομπ.})} = 588 \text{ nm}$, αυτό συνεπάγεται ότι η ένωση αντικαθιστά το EB. Επομένως, γίνεται σαφές πως η αλληλεπίδραση του συμπλόκου που μελετάμε με το DNA είναι είτε παρεμβολή, είτε δέσμευση στην αύλακα. Σε αυτό το σημείο σημαντικό είναι να επισημανθεί πως δεν πρέπει σε καμία περίπτωση η ένωση να φθορίζει στο $\lambda_{\max(\text{εκπομπ.})}$ του EB-DNA, διότι θα εντοπίζονται σοβαρά σφάλματα στις μετρήσεις.

Η παρασκευή του πρότυπου διαλύματος CT-DNA και του buffer γίνεται με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως και παραπάνω. Επιπλέον, παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα για κάθε σύμπλοκο με συγκέντρωση 10^{-2} M . Στη συνέχεια παρασκευάζονται 7 διαφορετικά διαλύματα τα οποία περιέχουν σταθερή συγκέντρωση αιθιδίου βρωμιδίου $2,33 \mu\text{M}$ και σταθερή συγκέντρωση CT-DNA $26 \mu\text{M}$. Οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου είναι μεταβαλλόμενες και είναι 10^{-4} M , $2 \times 10^{-4} \text{ M}$, $3 \times 10^{-4} \text{ M}$, $4 \times 10^{-4} \text{ M}$, $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ και $6 \times 10^{-4} \text{ M}$ σε κυψελίδα όγκου 2 ml . Για την λήψη των φασμάτων φθορισμού των 7 αυτών διαφορετικών μειγμάτων πραγματοποιείται διέγερση στα 527 nm , διότι είναι το $\lambda_{\max(\text{απορρόφησης})}$ του αιθιδίου βρωμιδίου και λαμβάνεται το φάσμα εκπομπής (από τα $550\text{-}750\text{nm}$) με $\lambda_{\max(\text{εκπομπής})} = 588\text{nm}$. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται με φασματοφωτόμετρο φθορισμού (FP-8200) της JASCO και μελετώνται τα φάσματα. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τα δύο σύμπλοκα (**CuMToN_A** και **CuMToN_B**).

3.3 Μελέτη του DNA με τα CuMToN_A ή CuMToN_B μέσω ιξωδομετρίας.

Η ιξωδομετρία αποτελεί μία από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους εύρεσης του τρόπου αλληλεπίδρασης ενός συμπλόκου-φαρμάκου με το DNA. Το σχετικό ιξώδες του DNA είναι ανάλογο του σχετικού μήκους του, επομένως μελετώντας την μεταβολή του ιξώδους του προσδιορίζουμε την επίδραση που εμφανίζει το σύμπλοκο στο μήκος του DNA αλλά και τον τρόπο αλληλεπίδρασης του τελευταίου με το DNA. Αναλυτικότερα:

- ✚ Η αύξηση του ιξώδους του DNA συνδέεται με επιμήκυνση της έλικας του DNA, επομένως το είδος της αλληλεπίδρασης είναι παρεμβολή.
- ✚ Η μείωση του ιξώδους του DNA συνεπάγεται μείωση στο μήκος της έλικας του, άρα η ένωση προκαλεί ρήξη του DNA.
- ✚ Η λιγότερο έντονη αύξηση ή μείωση του ιξώδους, υποδηλώνει κάμψη ή στρέψη στην έλικα του DNA, συνεπώς το σύμπλοκο δεσμεύεται στις αύλακες του DNA.
- ✚ Καμία μεταβολή στο ιξώδες υποδηλώνει καμία μεταβολή στο μήκος του DNA, και παρατηρείται ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση της ένωσης με το DNA [46].

Η παρασκευή του πρότυπου διαλύματος CT-DNA και του buffer είναι επίσης ίδια με την υποενότητα 3.1.A και 3.1.B. Ακόμα, παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα συμπλόκου συγκέντρωσης 10^{-3} M. Αρχικά πραγματοποιείται μέτρηση του ιξώδους του CT-DNA, απουσία συμπλόκου. Στη συνέχεια προστίθεται αυξανόμενη ποσότητα συμπλόκου με αναλογία $r = [complex]/[DNA]$, για $r = 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20, 0.22, 0.24, 0.26, 0.28, 0.30, 0.32$ και 0.35 . Συνολικά, λαμβάνονται 18 αναλογίες, συμπεριλαμβανομένου και του CT-DNA απουσία συμπλόκου με κάθε αναλογία να μετριέται 3 φορές. Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιείται με την διαφορά ότι η ποσότητα του CT-DNA αντικαθίσταται με buffer. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται με

την χρήση γυάλινου τριχοειδούς ιξωδομέτρου τύπου Ubbelohde και οι χρόνοι ροής των διαλυμάτων καταγράφονται με την χρήση του προγράμματος Debut Video Capture Software. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται και για τα δύο σύμπλοκα (CuMTοN_A και CuMTοN_B).

Πίνακας 7: Μεταβολή του ιξώδους και τρόποι αλληλεπίδρασης των ουσιών με το DNA.

Μεταβολή Ιξώδους DNA	Τρόπος αλληλεπίδρασης συμπλόκου- DNA
Αύξηση Ιξώδους	Επιμήκυνση της έλικας του DNA → ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ
Μείωση Ιξώδους	Μείωση του μήκους της έλικας → ΡΗΞΗ ΤΟΥ DNA
Λιγότερο έντονη αύξηση ή λιγότερο έντονη μείωση του ιξώδους	Κάμψη ή στρέψη στην έλικα → ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΣΤΙΣ ΑΥΛΑΚΕΣ ΤΟΥ DNA
Καμία μεταβολή στο ιξώδες	Καμία μεταβολή στο μήκος του DNA → ΗΛΕΚΤΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ

In vivo

3.4 Δοκιμή *Artemia salina*

Η δοκιμή *Artemia salina* (ή Brine shrimp) πραγματοποιείται με την καλλιέργεια του μικρού καρκινοειδούς *Artemia salina* από αυγά του συγκεκριμένου είδους. 1 g ενυδατώνονται σε 500 mL εμφιαλωμένου νερού για 1 h σε μία 2-λιτρη διαχωριστική χοάνη. Μετά το πέρας της μίας ώρας, προστίθενται στην χοάνη 17 g θαλασσινό αλάτι το οποίο διαλύεται. Ο αερισμός των αυγών επιτεύχθηκε με τη χρήση μιας αντλίας αέρα. Τα αυγά επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή φωτισμό και αερισμό για 48 h.

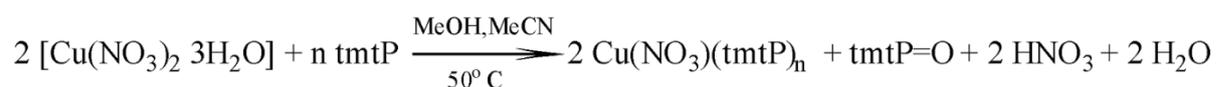
Όταν τα αυγά εκκολάφθηκαν, συλλέχθηκαν μικρές προνύμφες *Artemia salina*, οι οποίες επώαστηκαν παρουσία 0.1 μM , 1 μM , 10 μM και 100 μM συμπλόκου σε τελικό όγκο 1 mL NaCl 0.9%, για 24 h σε θερμοκρασία 25°C. Μετά τις 24 h, οι νύμφες παρατηρήθηκαν στο στερεοσκόπιο. Ο θάνατος μιας νύμφης συμπεραίνεται όταν σε 10 s παρατήρησής της δεν καταγράφεται καμία εσωτερική ή εξωτερική κίνηση. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές [47].

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των ενώσεων

4.1.1 Σύνθεση των CuMToN_A και CuMToN_B

Το CuMToN_A λαμβάνεται από την αντίδραση του τριένυδρου νιτρικού χαλκού (II) με tmtP σε αναλογία 1:2 σε σύστημα διαλυτών MeOH/ MeCN με ήπια θέρμανση (50 °C) και ανάδευση. Στην οξειδοαναγωγική αντίδραση του CuMToN_A συμβαίνει αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I) κατά την οποία παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από υποκίτρινο σε άχρωμο. Το προϊόν που παραλαμβάνεται από αυτή την αντίδραση, μετά από ξήρανση του με διαιθυλαιθέρα, ανακρυσταλλώνεται σε DMF. Οι κρύσταλλοι διατηρούνται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Για το σύμπλοκο CuMToN_B πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία με παραπάνω με την διαφορά πως η αναλογία τριένυδρου νιτρικού χαλκού (II) με tmtP είναι 1:3. Επιπλέον, το προϊόν που παραλαμβάνεται μετά την ξήρανση με διαιθυλαιθέρα, στην περίπτωση του CuMToN_B ανακρυσταλλώνεται σε DMSO.



Εικόνα 18: Αντίδραση σύνθεσης των CuMToN_A και CuMToN_B. Για το CuMToN_A, όπου n=2 και για το CuMToN_B, όπου n=3.

4.1.2 Σημείο τήξης

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των σημείων τήξεως των ενώσεων CuMToN_A, CuMToN_B και tmtP. Τα σημεία τήξεως δεν υποβλήθηκαν σε κάποια διόρθωση. Η ολική τήξη του CuMToN_A παρατηρήθηκε στους 73.5-74.6 °C και του CuMToN_B στους 150.3-151.0 °C. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι τιμές των T_m των

συμπλόκων αλλά και του ligand. Ο σχηματισμός των ενώσεων επιβεβαιώνεται διότι οι τιμές των σημείων τήξης τους είναι διαφορετικές από το σημείο τήξεως του υποκαταστάτη.

Πίνακας 8: Σημεία τήξης των συμπλόκων CuMToN_A και CuMToN_B και του υποκαταστάτη tmtP.

Ένωση	T _m (°C)
CuMToN_A	73.5-74.6 °C
CuMToN_B	150.3-151.0 °C
tmtP	100 °C

4.1.3 Διαλυτότητα

Ο έλεγχος της διαλυτότητας των ενώσεων είναι εξαιρετικά σημαντικός, προκειμένου να επιλεγθεί ο κατάλληλος διαλύτης για τα βιολογικά πειράματα. Τα σύμπλοκα είναι πολύ διαλυτά σε DMF, DMSO και διαλυτά σε CH₂Cl₂, CHCl₃, MeOH, MeCN και CH₃CH₂OCH₂CH₃.

Πίνακας 9: Διαλυτότητα των CuMToN_A και CuMToN_B

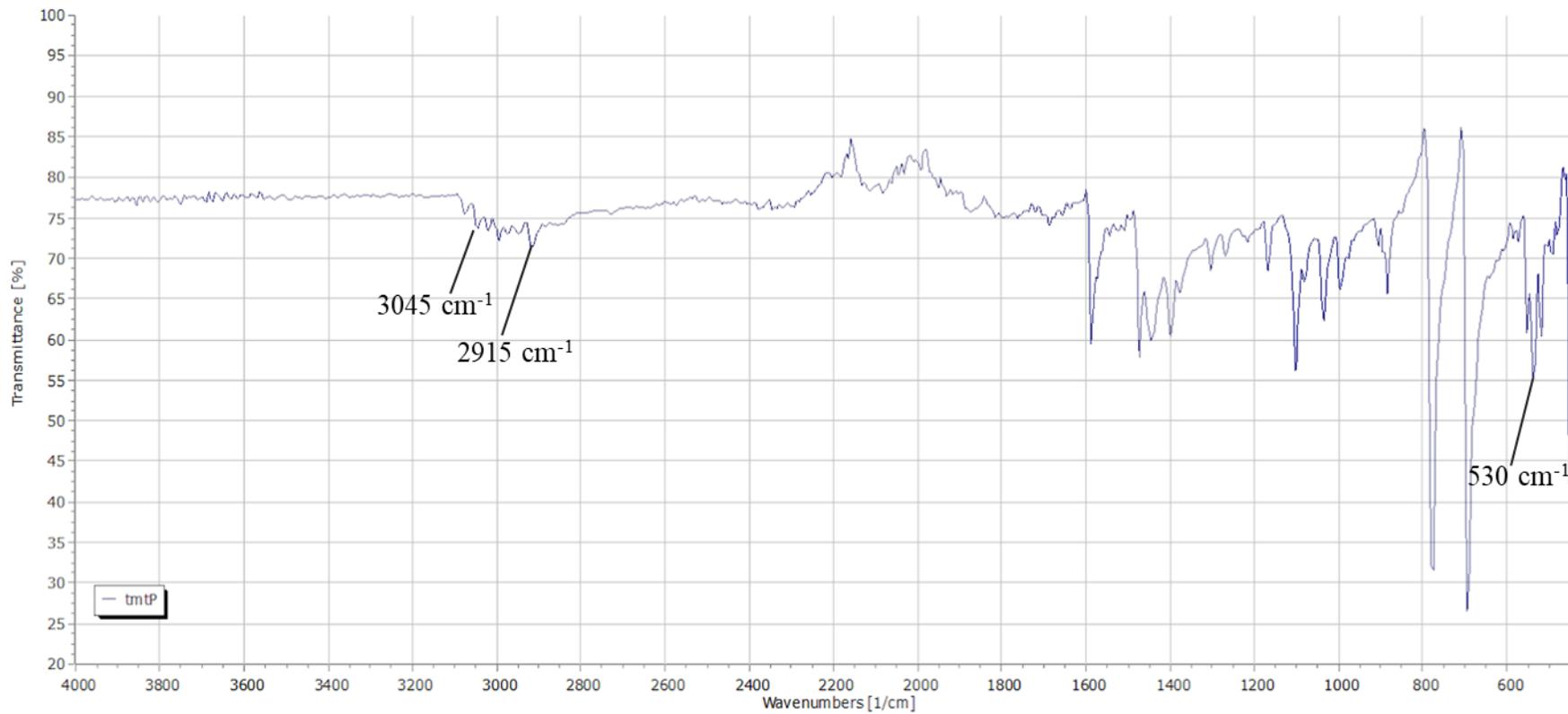
Διαλυτότητα	
DMF	++
DMSO	++
CH ₂ Cl ₂	+
CHCl ₃	+
MeOH	+
MeCN	+
CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃	+
n-C ₆ H ₁₄	-
dd H ₂ O	-

4.1.4 Κρυοσκοπία

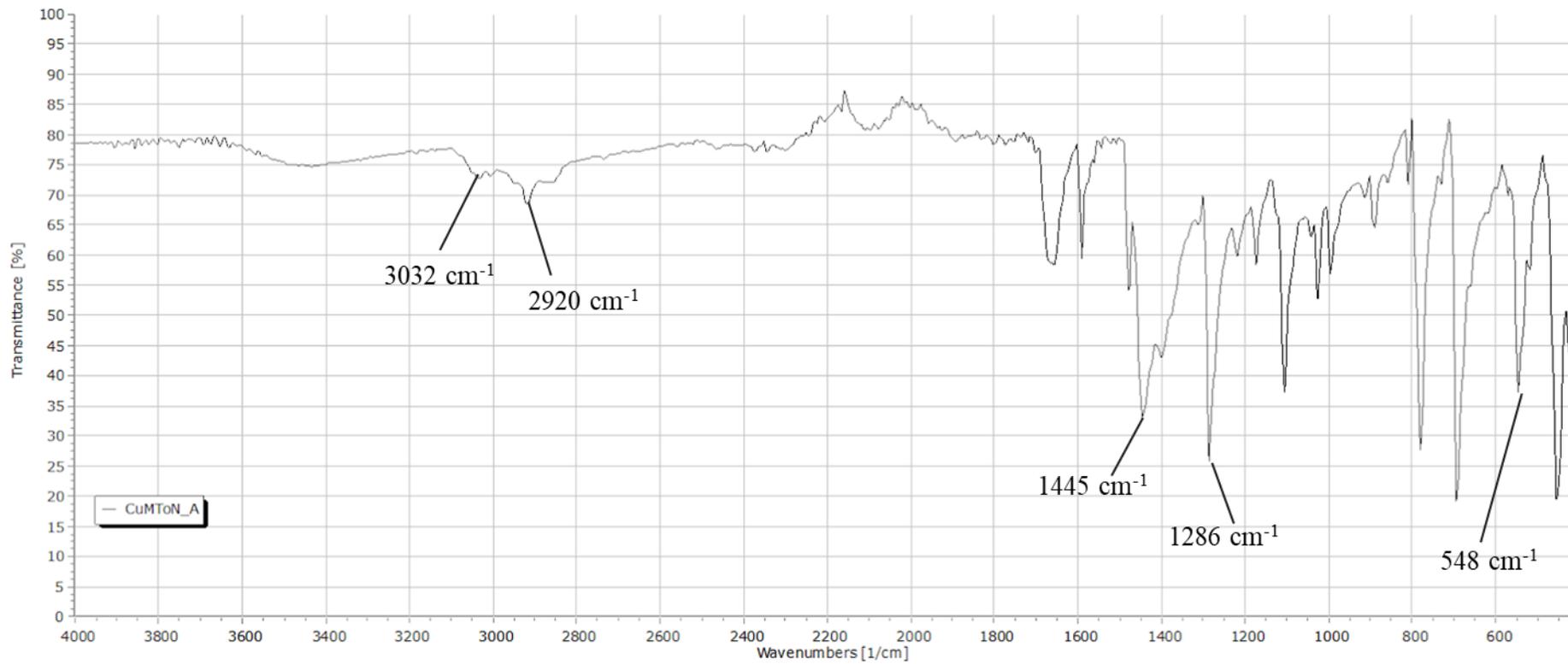
Το MW των συμπλόκων προσδιορίστηκε με την μέθοδο της κρυοσκοπίας η οποία βασίζεται στην ταπείνωση του σημείου πήξεως της διαλυμένης ουσίας (**CuMToN_A** ή **CuMToN_B**) στον διαλύτη. Το MW του **CuMToN_A** βρέθηκε $730.65 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ που αντιστοιχεί τον μοριακό τύπο $[\text{C}_{63}\text{H}_{63}\text{CuNO}_3\text{P}_3]$ (θεωρητικό $733.44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) και για το **CuMToN_B** βρέθηκε $1010.50 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ που αντιστοιχεί τον μοριακό τύπο $[\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{CuNO}_3\text{P}_2]$ (θεωρητικό $1037.54 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

4.1.5 ATR-FTIR

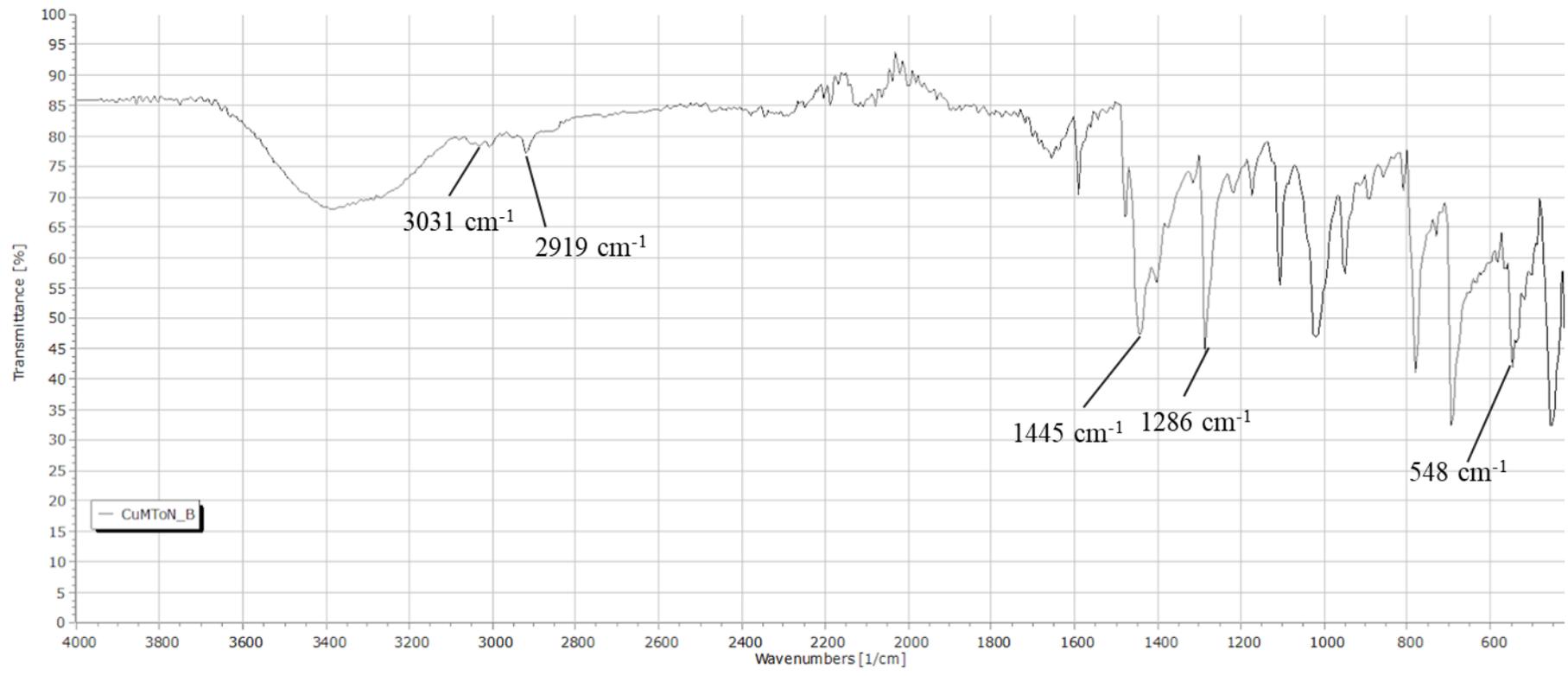
Τα φάσματα υπερύθρου των **CuMToN_A** και **CuMToN_B** παρουσιάζονται στις Εικόνες 20 και 21. Η δόνηση τάσης του δεσμού $\text{H-C}_{\text{aromatic}}$ στην *tmtP* εντοπίζεται στους 3045 cm^{-1} . Η συγκεκριμένη δόνηση εμφανίζεται στα φάσματα των **CuMToN_A** και **CuMToN_B** μετατοπισμένη στους 3032 cm^{-1} στην περίπτωση του **CuMToN_A** και στους 3031 cm^{-1} στο φάσμα του **CuMToN_B** υποδεικνύοντας τον συντονισμό του φωσφόρου του υποκαταστάτη με τον Cu(I) . Επιπλέον, η δόνηση τάσης του δεσμού $\text{H-C}_{\text{saturated}}$, στο φάσμα της *tmtP* εμφανίζεται στους 2915 cm^{-1} [48]. Η κορυφή αυτή στα φάσματα των συμπλόκων παρατηρείται στους 2920 cm^{-1} στο **CuMToN_A** και στους 2919 cm^{-1} στο **CuMToN_B**. Στους 1387 cm^{-1} και στους 1554 cm^{-1} στο φάσμα FTIR του $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ αποδίδονται η συμμετρική $\nu_s(\text{N-O})$ και η ασύμμετρη δόνηση τάσης $\nu_{\text{as}}(\text{N-O})$ της νίτροομάδας [49]. Στα φάσματα των συμπλόκων η συμμετρική δόνηση τάσης μετατοπίζεται κατά 109 cm^{-1} (στους 1445 cm^{-1}) και η ασύμμετρη μετατοπίζεται κατά 98 cm^{-1} (στους 1286 cm^{-1}). Οι τιμές $\Delta\nu(\nu_{\text{as}}-\nu_s)$ υπολογίστηκαν ίσες με 167 cm^{-1} . Τέλος, η χαρακτηριστική δόνησης της ομάδας P-Ph στο φάσμα της *tmtP* που εμφανίζεται στους 530 cm^{-1} παρατηρείται μετατοπισμένη στα φάσματα των **CuMToN_A** και **CuMToN_B** στους 548 cm^{-1} . Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν τον σχηματισμό συμπλόκων.



Εικόνα 19: Φάσμα FT-IR της tmtP.



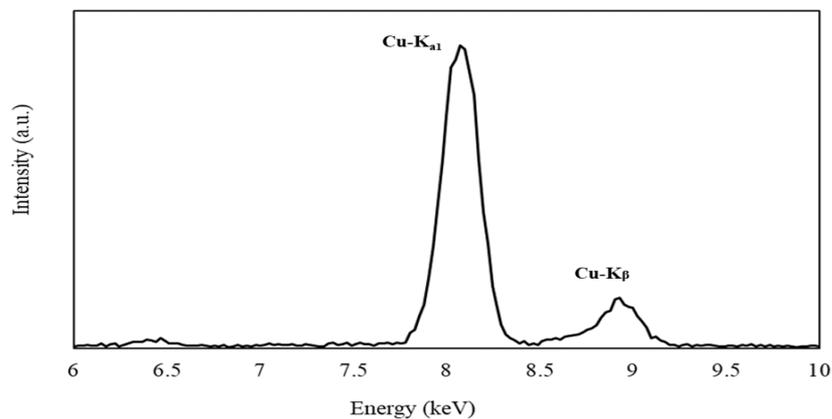
Εικόνα 20: Φάσμα FT-IR του CuMToN_A.



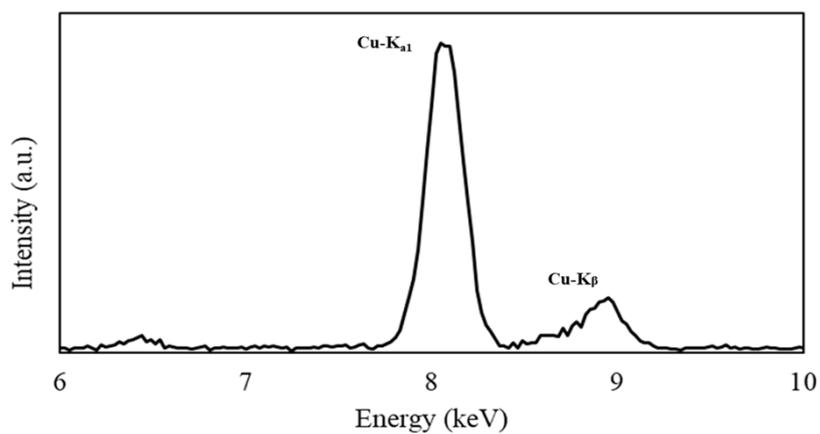
Εικόνα 21: Φάσμα FT-IR του CuMToN_B.

4.1.6 XRF

Όπως έχει αναφερθεί και στο πειραματικό κομμάτι η μέθοδος XRF χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό στοιχείων στο εκάστοτε δείγμα. Για κάθε στοιχείο εμφανίζονται κορυφές διαφορετικών εντάσεων οι οποίες οφείλονται σε μεταβάσεις ηλεκτρονίου από τις στιβάδες L και M στην στιβάδα K. Πιο συγκεκριμένα, η ταυτοποίηση των στοιχείων της ένωσης πραγματοποιείται μέσω της χαρακτηριστικής ενέργειας του φωτονίου που εκπέμπει το ηλεκτρόνιο του κάθε στοιχείου κατά την αποδιέγερσή του σε στιβάδα ενεργειακά χαμηλότερη ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός του μέσω της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας. Η χαρακτηριστική ενέργεια του εκπεμπόμενου φωτονίου κατά την αποδιέγερση του ηλεκτρονίου από την στιβάδα L στην κενή από ηλεκτρόνιο στιβάδα K ονομάζεται φασματική γραμμή K-άλφα ($K_{\alpha 1}$) ενώ η χαρακτηριστική ενέργεια του εκπεμπόμενου φωτονίου κατά την αποδιέγερση ηλεκτρονίου από τη στιβάδα M στην K, ονομάζεται φασματική γραμμή K-βήτα (K_{β}). Η παρουσία του χαλκού στα σύμπλοκα CuMToN_A και CuMToN_B επιβεβαιώνεται από τα φάσματα XRF τους (Εικόνα 24). Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε Cu στο CuMToN_A βρέθηκε ίση με 8.57 (± 0.09) % w/w, τιμή η οποία συμφωνεί με το θεωρητικά υπολογισμένο ποσοστό για τον τύπο $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{tmp}t\text{P})_2]$: 8.66 % w/w. Στην περίπτωση του CuMToN_B η περιεκτικότητα σε Cu βρέθηκε ίση με 6.25 (± 0.09) % w/w. Και αυτή η τιμή συμφωνεί με το θεωρητικά υπολογισμένο ποσοστό για τον τύπο $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{tmp}t\text{P})_3]$: 6.12 % w/w.



(A)



(B)

Εικόνα 22: Φάσματα XRF του CuMToN_A (A) και CuMToN_B (B).

Πίνακας 10: Εκπεμπόμενες ενέργειες χαλκού στο CuMToN_A.

Emission lines	Energy (keV)
$K_{\alpha 1}$	8.01
K_{β}	8.9

Πίνακας 11: Εκπεμπόμενες ενέργειες χαλκού στο CuMToN_B.

Emission lines	Energy (keV)
K _{α1}	8.01
K _β	8.9

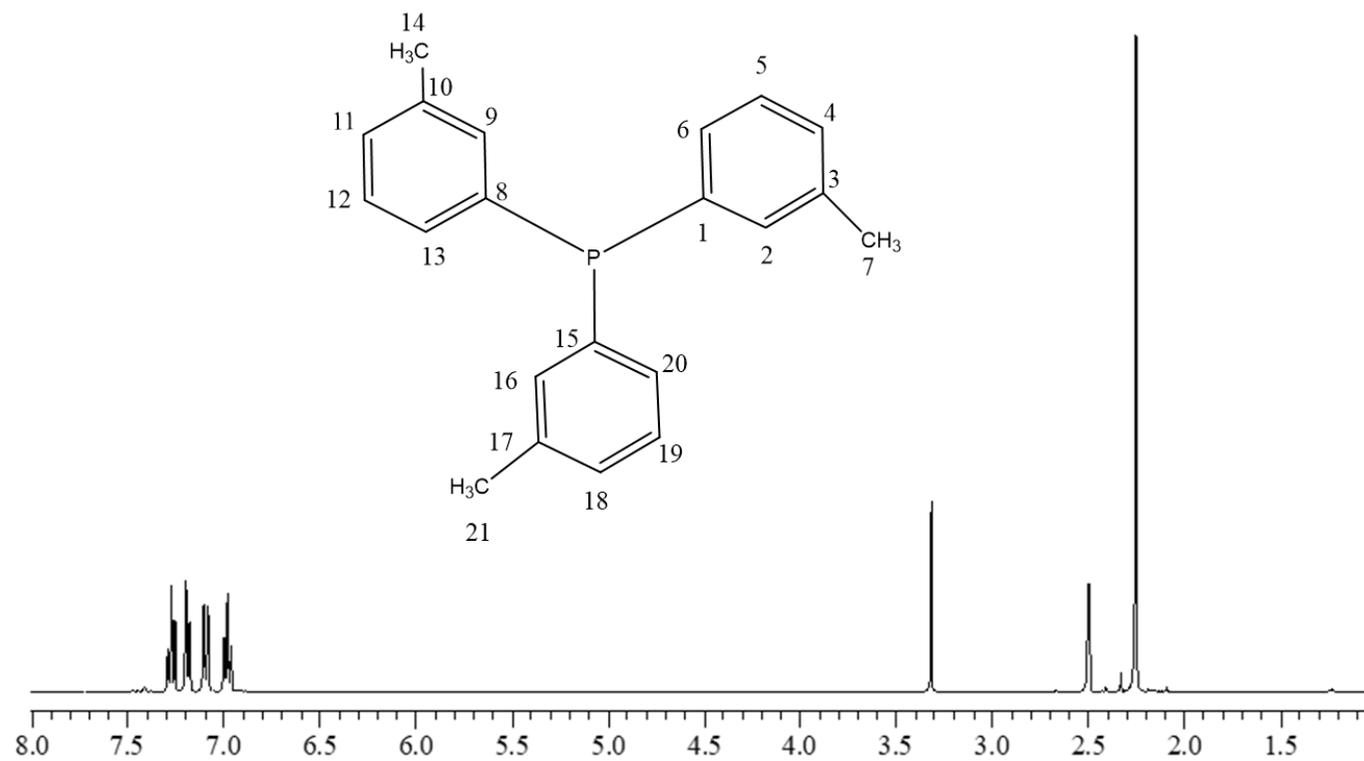
4.1.7 Φασματοσκοπία ¹H-NMR

Η φασματοσκοπία ¹H-NMR χρησιμοποιήθηκε τόσο για τον προσδιορισμό της δομής των ενώσεων σε διάλυμα αλλά επιβεβαιώθηκε και η σταθερότητα των συμπλόκων σε 0 ώρες και 48 ώρες. Τα φάσματα ¹H-NMR των ενώσεων tmtP, CuMToN_A και CuMToN_B σε διάλυμα DMSO-d₆ απεικονίζονται στις εικόνες 25, 26 και 27.

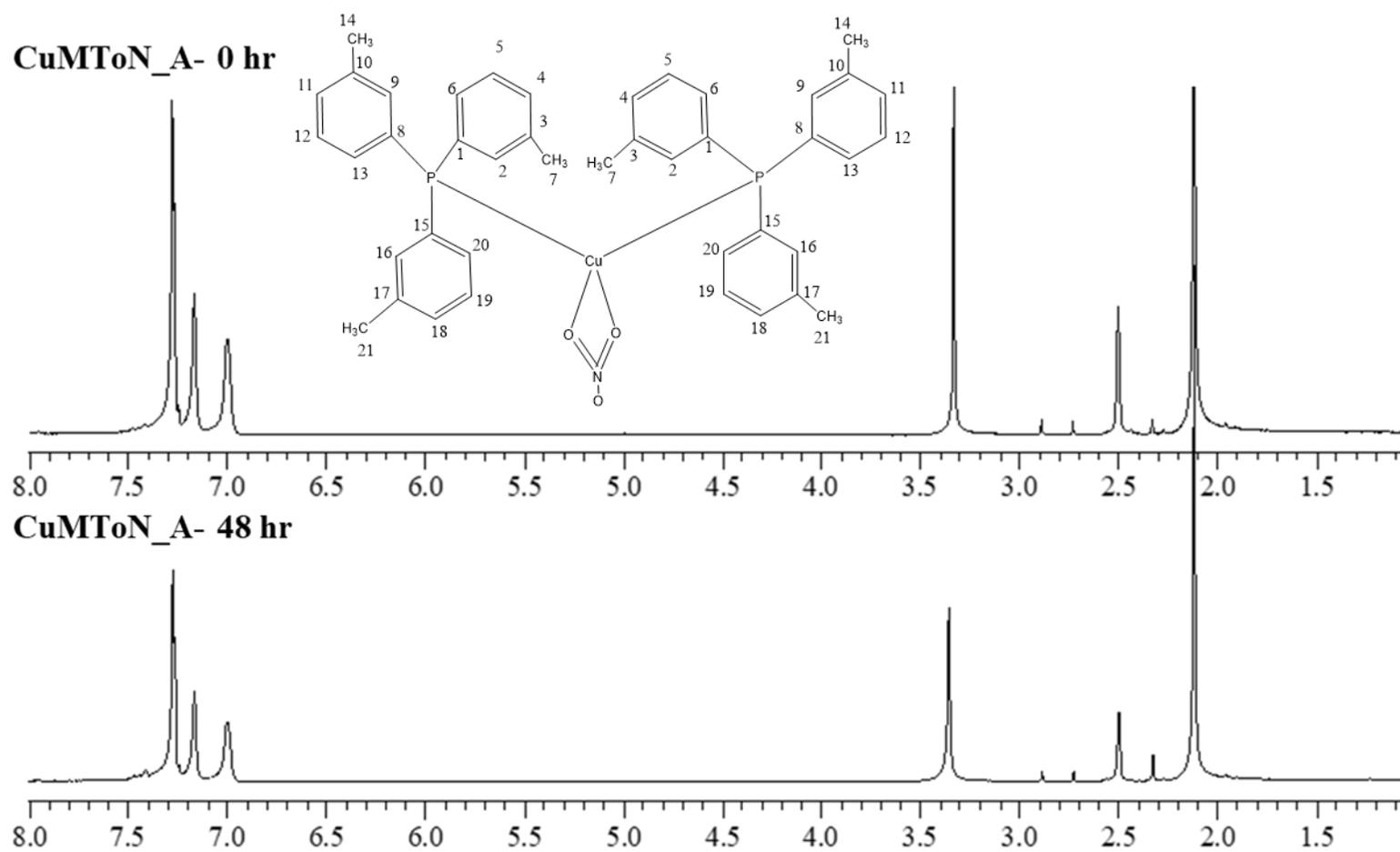
Αρχικά, το γεγονός πως υπάρχουν φάσματα ¹H-NMR των συμπλόκων αποδεικνύει την αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I). Σε περίπτωση που δεν είχε πραγματοποιηθεί η αναγωγή δεν θα ήταν εφικτό να ληφθεί φάσμα διότι ο Cu(II) είναι παραμαγνητικό στοιχείο. Όσον αφορά στο φάσμα του υποκαταστάτη tmtP, εμφανίζονται σήματα συντονισμού στα 7.283-7.009 ppm και στα 7.461-7.033 ppm, τα οποία αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια. Παρατηρείται ένα επιπλέον σήμα στα 2.26 ppm το οποίο αντιστοιχεί στα μεθυλενικά πρωτόνια των δακτυλίων της φωσφίνης H[C(7),C(14),C(21)]. Η μετατόπιση αυτού του σήματος στα 2.118 ppm H[C(7),C(14),C(21)] στο φάσμα του CuMToN_A υποδεικνύει τον συντονισμό του tmtP με το μεταλλικό ιόν. Τα πολλαπλά σήματα που εμφανίζονται από 7.440 έως 7.040 ppm αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια των δακτυλίων. Αναλυτικότερα, τα σήματα από 7.220 έως 7.040 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια H[C(11),

C(18),C(4)] και στα σήματα από 7.440 έως 7.220 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια H[C(10),C(16), C(2),C(9)].

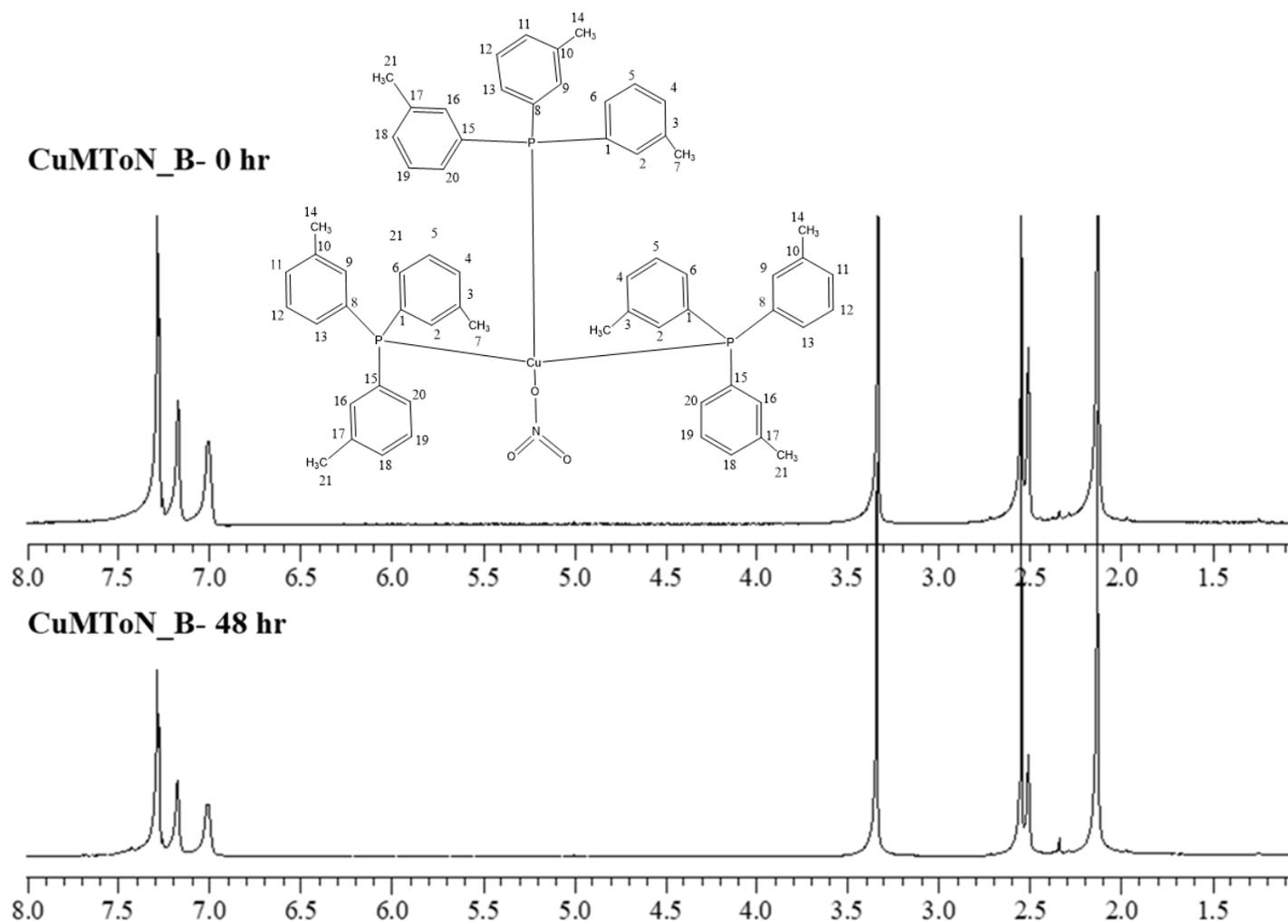
Στην περίπτωση του CuMTοN_B υπάρχει μία, από τις τρεις που έχει συνολικά το σύμπλοκο, ανισοδύναμη φωσφίνη που επηρεάζει τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων NMR. Τα σήματα συντονισμού των μεθυλενικών πρωτονίων του υποκαταστάτη (στα 2.26 ppm) είναι μετατοπισμένα στα 2.547 και στα 2.128 ppm. Από την ολοκλήρωση των σημάτων αυτών επιβεβαιώνεται η γραμμομοριακή αναλογία 1:2 της ανισοδύναμης φωσφίνης προς τις ισοδύναμες. Τα πολλαπλά σήματα στα 7.287 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια H[C(7), C(12), C(19)], τα σήματα στα 7.173 ppm στα πρωτόνια H[C(4), C(11), C(18)] και στα 7.003 ppm αντιστοιχούν τα πρωτόνια H[C(2), C(6), C(9), C(13), C(16), C(20)].



Εικόνα 23: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της tmtP σε DMSO-d_6 .



Εικόνα 24: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του CuMToN_A σε 0 και 48 ώρες σε DMSO- d_6 .



Εικόνα 25: Φάσμα ¹H-NMR του CuMToN_B σε 0 και 48 ώρες σε DMSO-d₆.

4.1.8 Φασματοσκοπία UV-Vis

Η σταθερότητα των συμπλόκων CuMToN_A και CuMToN_B μελετάται και με φασματοσκοπία UV-Vis σε χρονικό διάστημα 0 ώρες έως 48 ώρες σε διάλυμα DMSO, όσος είναι και ο απαιτούμενος χρόνος επώασης για τα βιολογικά πειράματα. Στα φάσματα τους τα CuMToN_A και CuMToN_B παραμένουν σταθερά μετά από 48 ώρες (Εικόνες 28 και 29). Οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης ($\epsilon \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) είναι χαρακτηριστικοί για κάθε ένωση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και υπολογίζονται από τον Νόμο Lambert-Beer για αραιά διαλύματα (Πίνακας 11)

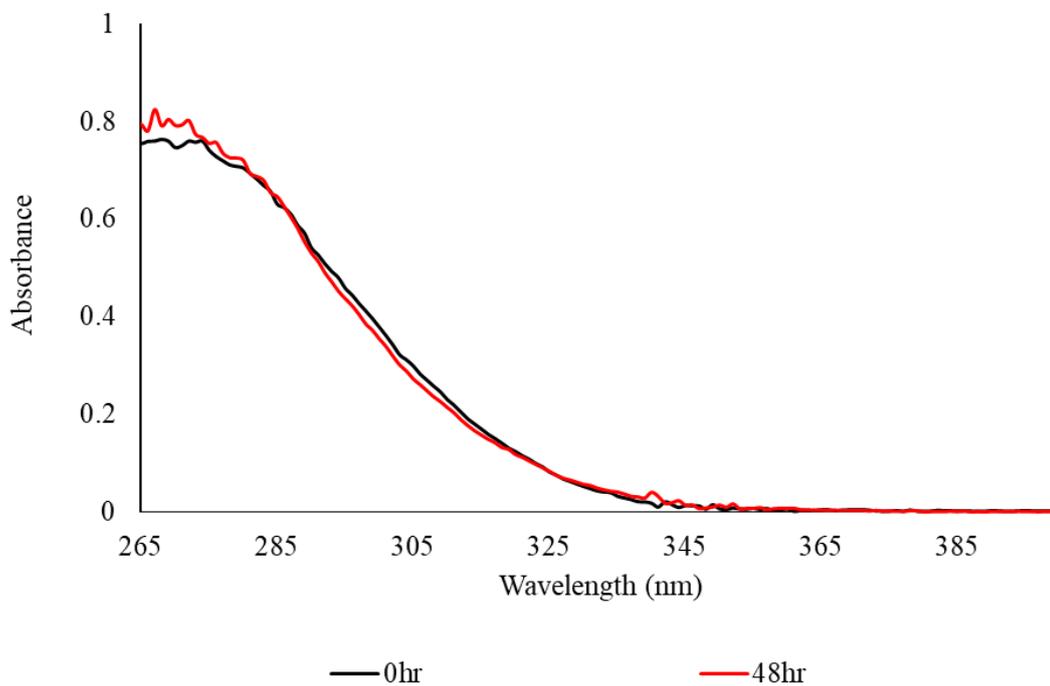
$$A = \epsilon \times b \times c$$

A= απορρόφηση, C= συγκέντρωση του διαλύματος (M), b= το μήκος κυψελίδας =1 cm.

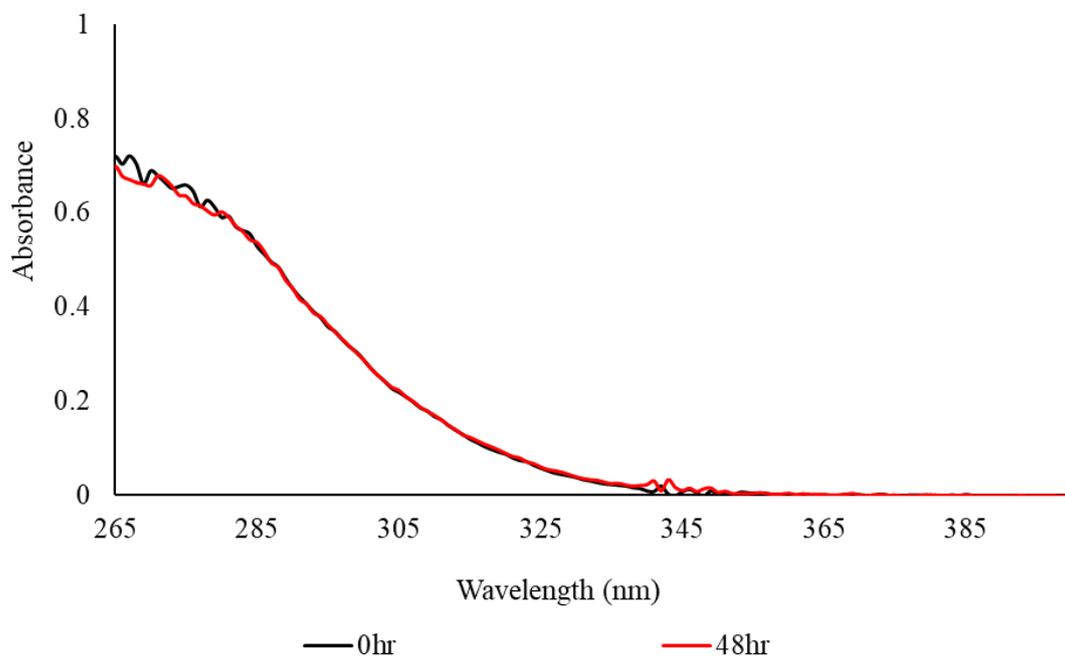
Πίνακας 12: Υπολογισμός των $\epsilon \text{ (cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$ των ενώσεων

Ένωση	λ_{max} (nm)	Απορρόφηση	Συγκέντρωση (M)	b(cm)	$\epsilon \text{ (cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$
tmtP	268	0.5597	5×10^{-5}	1	11195,86
CuMToN_A	268	0.7640	5×10^{-5}	1	15280,1
CuMToN_B	267	0.7212	5×10^{-5}	1	14424,92

Το φάσμα της ελεύθερης tmtP στο DMSO κυριαρχείται από μία ζώνη απορρόφησης στα 268 nm ($\epsilon = 11195,86 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) που αντιστοιχεί σε μεταβάσεις $\pi^* \leftarrow \pi$ ηλεκτρονίων. Τα αντίστοιχα φάσματα των συμπλόκων CuMToN_A και CuMToN_B σε διαλύματα DMSO εμφανίζουν ζώνες απορρόφησης στα 268 nm ($\epsilon = 15280,1 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) (CuMToN_A) και στα 267 nm ($\epsilon = 14424,92 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) (CuMToN_B). Η αύξηση των συντελεστών μοριακής απόσβεσης επιβεβαιώνει τον σχηματισμό των ενώσεων.



Εικόνα 26: Φάσμα UV-Vis του CuMTon_A (50 μM) σε DMSO σε 0 και 48 ώρες.



Εικόνα 27: Φάσμα UV-Vis του CuMTon_B (50 μM) σε DMSO σε 0 και 48 ώρες.

4.1.9 XRD

Η επίλυση των κρυσταλλικών δομών των CuMToN_A και CuMToN_B έγινε με περίθλαση ακτίνων X (XRD). Τα διαγράμματα ORTEP των ενώσεων παρουσιάζονται στις εικόνες 30 και 31. Επιπλέον, οι επιλεγμένες αποστάσεις και οι γωνίες δεσμών φαίνονται στους Πίνακες 12A έως 12F.

Αρχικά, η γεωμετρία γύρω από το μεταλλικό κέντρο είναι τετραεδρική. Στην περίπτωση του CuMToN_A υπάρχουν δύο ισομερή στην κυψελίδα (CuMToN_A_1 και CuMToN_A_2). Δύο άτομα φωσφόρου από τον υποκαταστάτη tmtP συντονίζονται με τον Cu(I) και η νίτρο ομάδα προσδέεται χηλικά στο μέταλλο. Ακόμα, οι δύο δεσμοί Cu-P είναι συμμετρικοί στο CuMToN_A_1 και ασύμμετροι στην περίπτωση του CuMToN_A_2. Οι δύο δεσμοί Cu-O είναι επίσης ασύμμετροι και στις δύο περιπτώσεις (CuMToN_A_1 και CuMToN_A_2).

Όσον αφορά στο CuMToN_B, Το μόριο αποτελείται από τρεις φωσφίνες και μία νίτρο ομάδα. Η σφαίρα ένταξης γύρω από το κέντρο Cu(I) του CuMToN_B περιλαμβάνει τρία άτομα φωσφόρου από υποκαταστάτες τρι-αρυλ-φωσφινών ενώ η τετραεδρική γεωμετρία συμπληρώνεται από ένα άτομο οξυγόνου από την NO₃⁻ ομάδα. Ακόμα, η νίτρο ομάδα εντάσσεται μονοδοντικά και οι αποστάσεις του δεσμού N-O είναι ισοδύναμες. Τέλος, η διαφοροποίηση της γωνίας του δεσμού από την ιδανική τιμή της τετραεδρικής γεωμετρίας, 109°, οφείλεται στις απώσεις των ζευγών ηλεκτρονίων. Σύμφωνα με τη θεωρία Valance Shell Electron Pair Repulsion (VSEPR) οι απώσεις ηλεκτρονίων των δεσμών Cu-P, Cu-P' είναι ισχυρότερες από αυτές που αναπτύσσονται μεταξύ Cu-P, Cu-O, λόγω της υψηλότερης ηλεκτραρνητικότητας του οξυγόνου συγκριτικά με τα άτομα φωσφόρου.

Πίνακας 13: Επιλεγμένα μήκη και γωνίες δεσμών.

Για το CuMToN_A_1.

(A)

Γωνίες Δεσμών (°)	
P1-Cu1-P2	129.30(6)
P1-Cu1-O1	121.28(1)
P1-Cu1-O3	108.5(1)
P2-Cu1-O3	113.49(1)
P2-Cu1-O1	104.6(1)
O1-Cu-O3	58.56(1)

(B)

Αποστάσεις Δεσμών (Å)	
Cu1-P1	2.221(2)Å
Cu1-P2	2.220(1)Å
N1-O1	1.263(6)Å
N1-O2	1.228(6)Å
N1-O3	1.264(6)Å
Cu1-O1	2.239(4)Å
Cu1-O3	2.176(3)Å

Για το CuMToN_A_2.

(C)

Γωνίες Δεσμών (°)	
P3-Cu2-P4	129.82(6)
P4-Cu2-O5	114.5(1)
P4-Cu2-O4	104.6(1)
P3-Cu2-O4	117.3(1)
P3-Cu2-O5	110.4(1)
O4-Cu2-O5	58.9(2)

(D)

Αποστάσεις Δεσμών (Å)	
Cu2-P3	2.215(1)
Cu2-P4	2.226(2)
N2-O4	1.263(7)
N2-O5	1.228(6)
N2-O6	1.234(7)
Cu2-O4	2.221(4)
Cu2-O5	2.172(4)

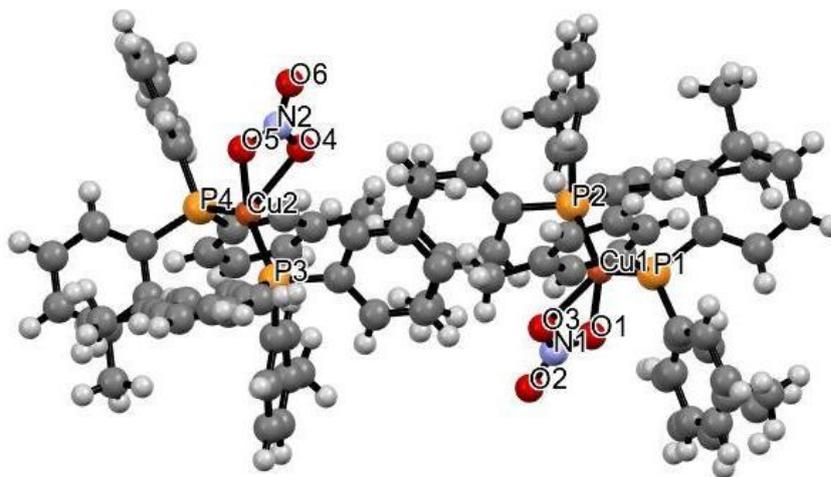
Για το CuMTοN_B

(E)

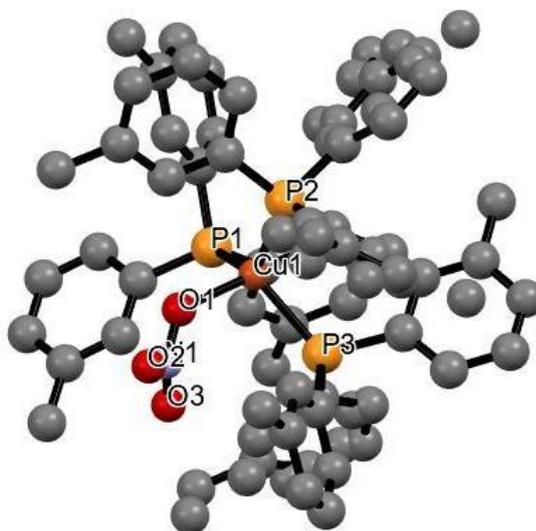
Γωνίες Δεσμών (°)	
P1-Cu-P2	120.30(2)
P1-Cu-P3	114.88(2)
P3-Cu-P2	111.76(2)
P3-Cu-O1	104.40(5)
P2-Cu-O1	98.29(5)
P1-Cu-O1	103.94(5)

(F)

Αποστάσεις Δεσμών (Å)	
Cu-P1	2.3217(7)
Cu-P2	2.3283(5)
Cu-P3	2.2963(6)
Cu-O1	2.118(2)
N1-O1	1.259(3)
N1-O2	1.219(3)
N1-O3	1.230(2)



Εικόνα 28: Διάγραμμα της κρυσταλλικής δομής του CuMToN_A.



Εικόνα 29: Διάγραμμα της κρυσταλλικής δομής του CuMToN_B.

4.1.10 Φωτοενεργότητα των συμπλόκων CuMToN_A και CuMToN_B με επίδραση UVB ακτινοβολίας.

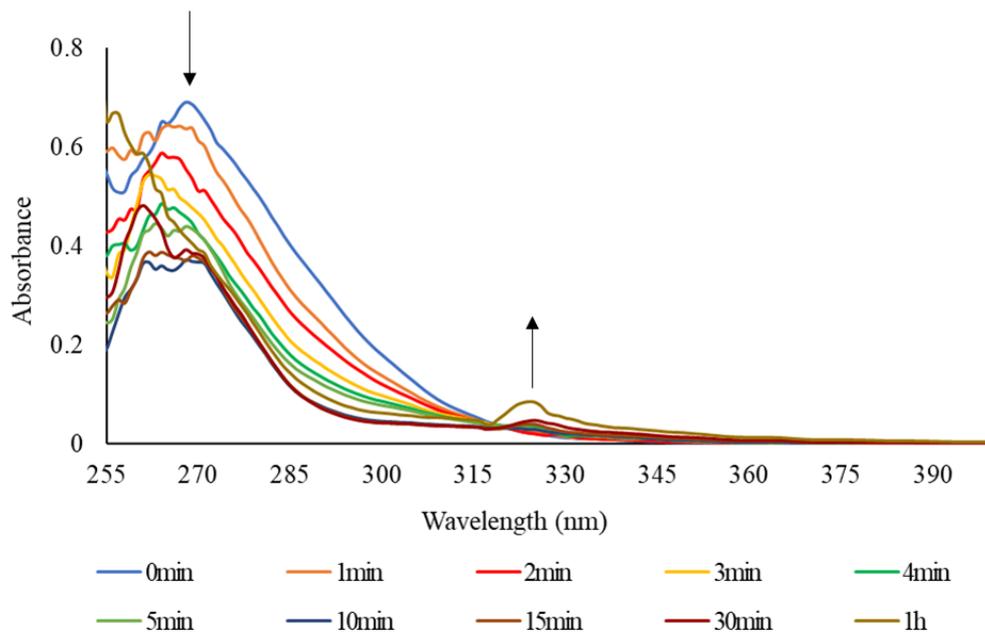
Η ακτινοβόληση των διαλυμάτων των συμπλόκων σε DMSO με ακτινοβολία UVB ($\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$) σε θερμοκρασία δωματίου προκαλεί μονοτονική μείωση των απορροφήσεων στα 290 nm υποδηλώνοντας τη φωτοδιάσπαση των ενώσεων. Οι αλλαγές στα φάσματα των CuMToN_A και CuMToN_B κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας απεικονίζονται στην Εικόνα 32. Οι σχετικές κβαντικές αποδόσεις, δηλαδή οι ρυθμοί φωτοχημικής μετατροπής των ενώσεων έχουν προσδιοριστεί σε θερμοκρασία δωματίου και είναι οι εξής:

Όπου $\phi_A(295)$: η κβαντική απόδοση του CuMToN_A σε DMSO, $\phi_{A1}(295)$: η κβαντική απόδοση του CuMToN_A σε CT-DNA, $\phi_{CT}(258)$: η κβαντική απόδοση του CT-DNA, $\phi_B(295)$: η κβαντική απόδοση του CuMToN_B σε DMSO, $\phi_{B1}(295)$: η κβαντική απόδοση του CuMToN_B σε CT-DNA.

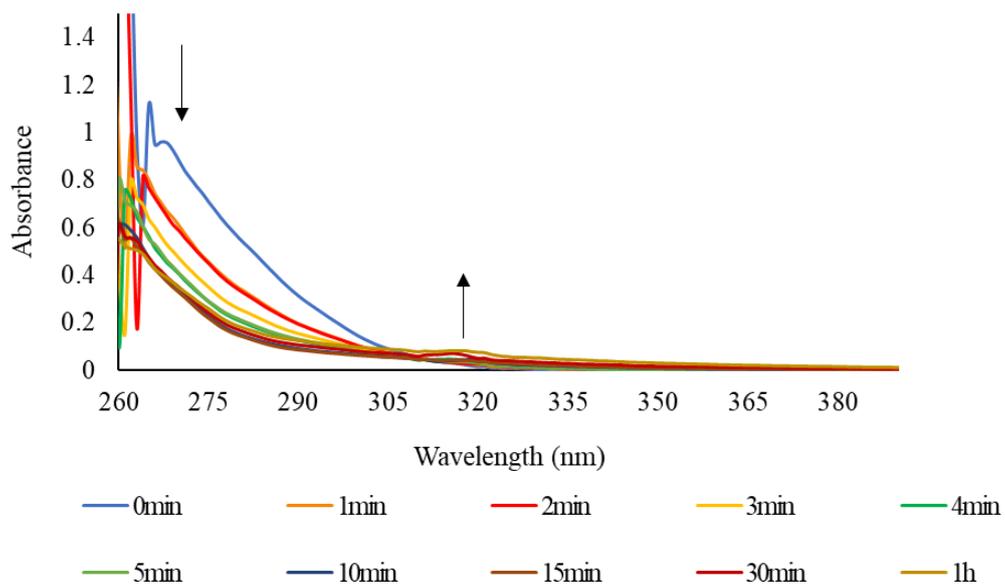
Παρατηρήθηκε λοιπόν, πως η κβαντική απόδοση του συμπλόκου σε DMSO και η κβαντική απόδοση του συμπλόκου σε CT-DNA διαφέρουν και στις δύο περιπτώσεις. Για το CuMToN_A: $\phi_A(295) = 0.264 \text{ Einstein}$ ενώ $\phi_{A1}(295) = 0.059 \text{ Einstein}$ και για το CuMToN_B: $\phi_B(295) = 0.191 \text{ Einstein}$ ενώ $\phi_{B1}(295) = 0.216 \text{ Einstein}$. Το συγκεκριμένο εύρημα επιβεβαιώνει την αλληλεπίδραση των συμπλόκων CuMToN_A και CuMToN_B με το CT-DNA.

Πίνακας 14: Κβαντικές αποδόσεις των CuMToN_A, CuMToN_B και CT-DNA

Κβαντικές αποδόσεις (ϕ) Μονάδες μέτρησης: Einstein
$\phi_A(295) = 0.264$
$\phi_{AI}(295) = 0.059$
$\phi_B(295) = 0.191$
$\phi_{BI}(295) = 0.219$
$\phi_{CT}(258) = 0.043$

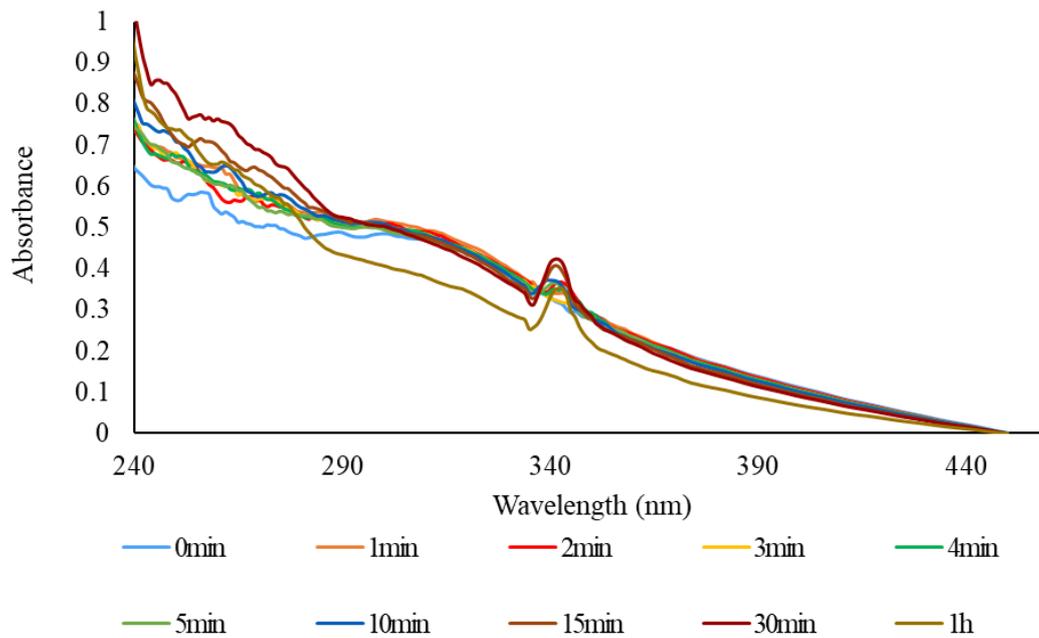


(A)

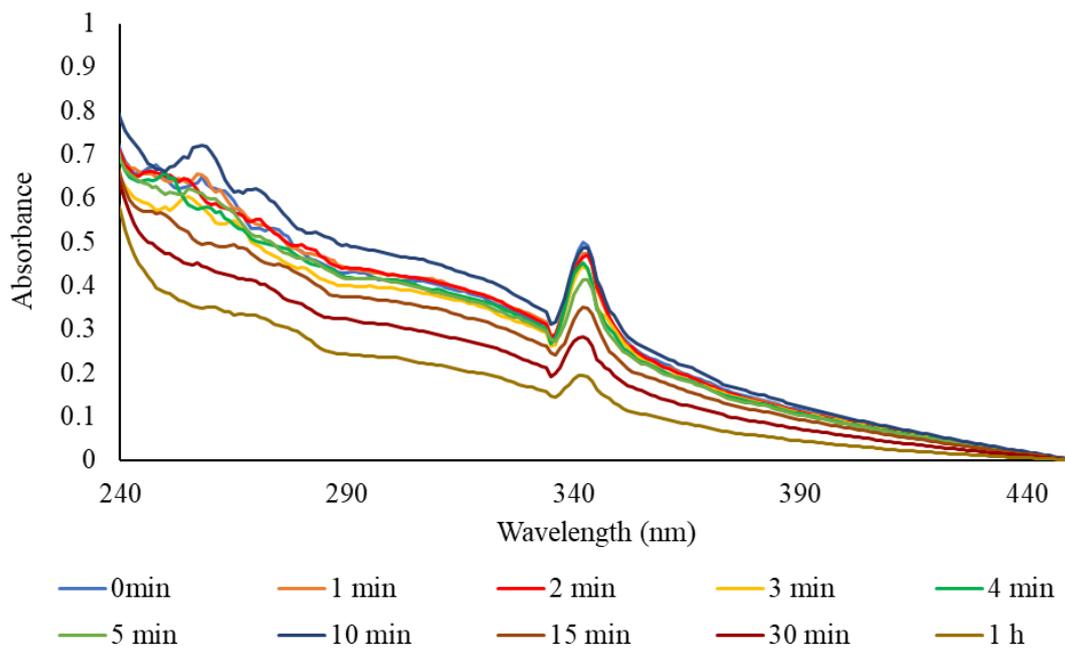


(B)

Εικόνα 30: Φάσμα απορρόφησης UV των ενώσεων (2×10^{-5} M) CuMTon_A (A), CuMTon_B (B) σε DMSO μετά από ακτινοβόληση σε θερμοκρασία δωματίου για 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 και 60 λεπτά.

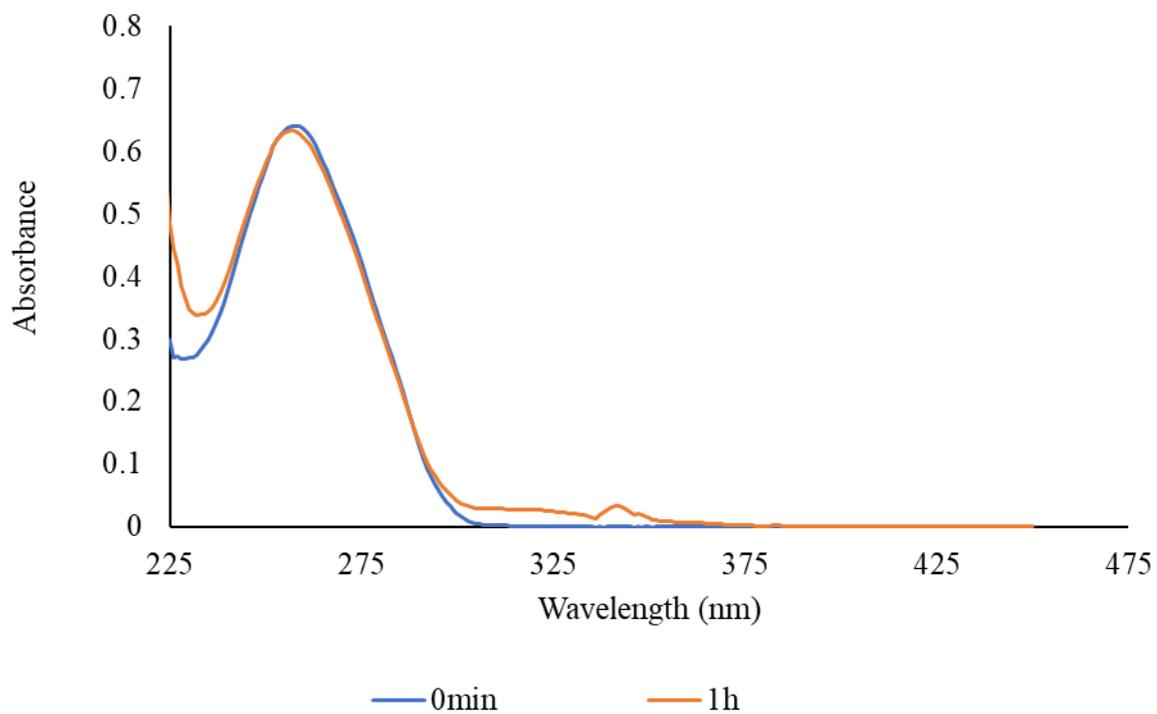


(A)



(B)

Εικόνα 31: Φάσμα απορρόφησης UV των ενώσεων (2×10^{-5} M) CuMTon_A (A), CuMTon_B (B) σε CT-DNA μετά από ακτινοβόληση σε θερμοκρασία δωματίου για 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 και 60 λεπτά.

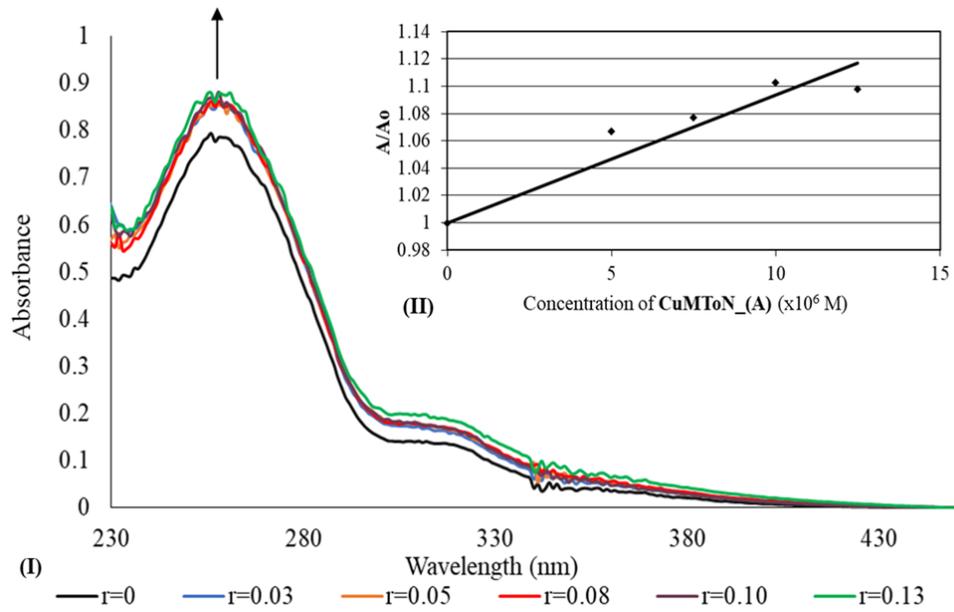


Εικόνα 32: Φάσμα απορρόφησης UV του CT-DNA (10⁻⁴M) μετά από ακτινοβόληση σε θερμοκρασία δωματίου για 0 και 60 λεπτά.

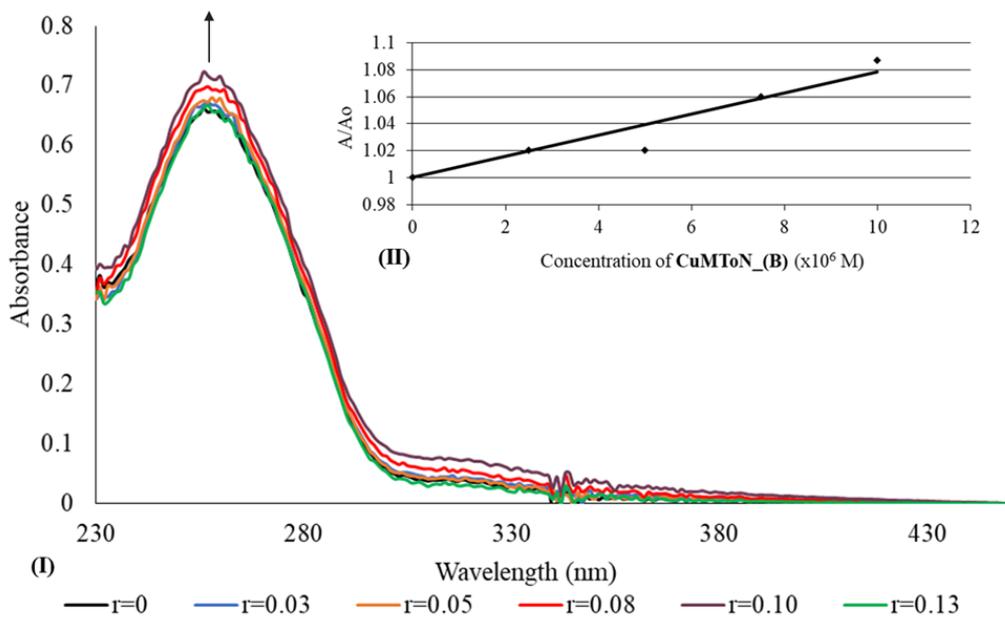
4.2 Ex vivo

4.2.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των CuMToN_A και CuMToN_B με το calf thymus DNA (CT-DNA) μέσω απορρόφησης UV.

Προκειμένου να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα δέσμευσης των συμπλόκων προς το CT-DNA, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία απορρόφησης UV. Υπάρχουν τρεις τύποι μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης συμπλοκών προς το CT-DNA όπως έχει ήδη αναφερθεί. Οι αλλαγές στη διαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA έχουν ως συνέπεια να προκαλείται υποχρωμισμός ή υπερχρωμισμός. Ο υποχρωμισμός δείχνει παρεμβολή ή ηλεκτροστατική δέσμευση του μεταλλοφαρμάκου στο CT-DNA, ενώ ο υπερχρωμισμός δείχνει θραύση δεσμών υδρογόνου ή σύνδεσης στις αύλακες. Στις περιπτώσεις των CuMToN_A και CuMToN_B παρατηρείται υπερχρωμισμός (9,8% για το CuMToN_A, 8,7% για το CuMToN_B) στο $\lambda_{\max}=258$ nm (Εικόνα 33). Αυτές οι τιμές υποδεικνύουν πιθανό τρόπο σύνδεσης των συμπλόκων στις αύλακες του CT-DNA και όχι θραύση δεσμών υδρογόνου, καθώς το ποσοστό υπερχρωτισμού είναι μικρότερο από 40% [50].



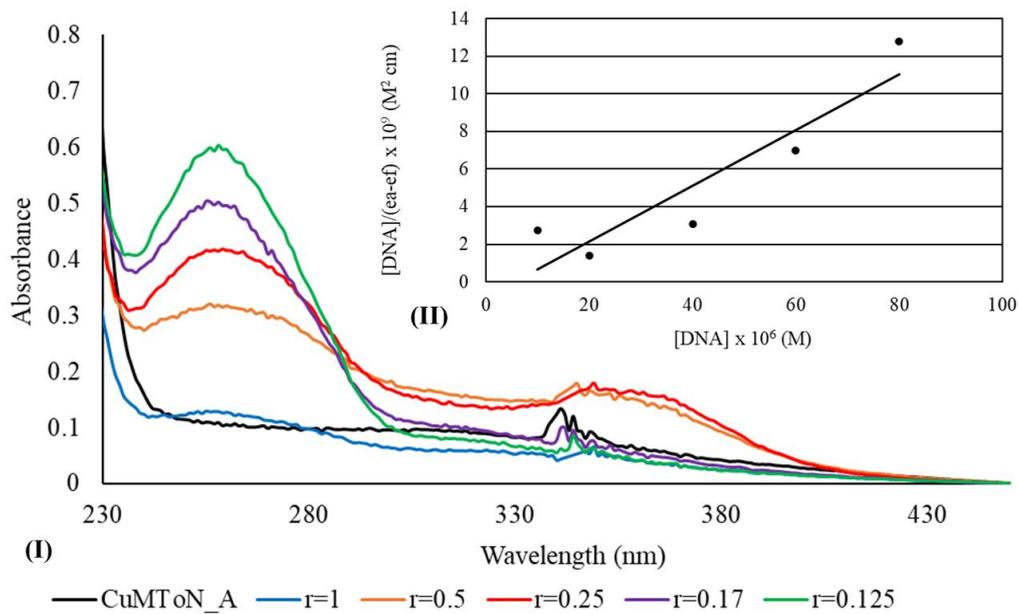
(A)



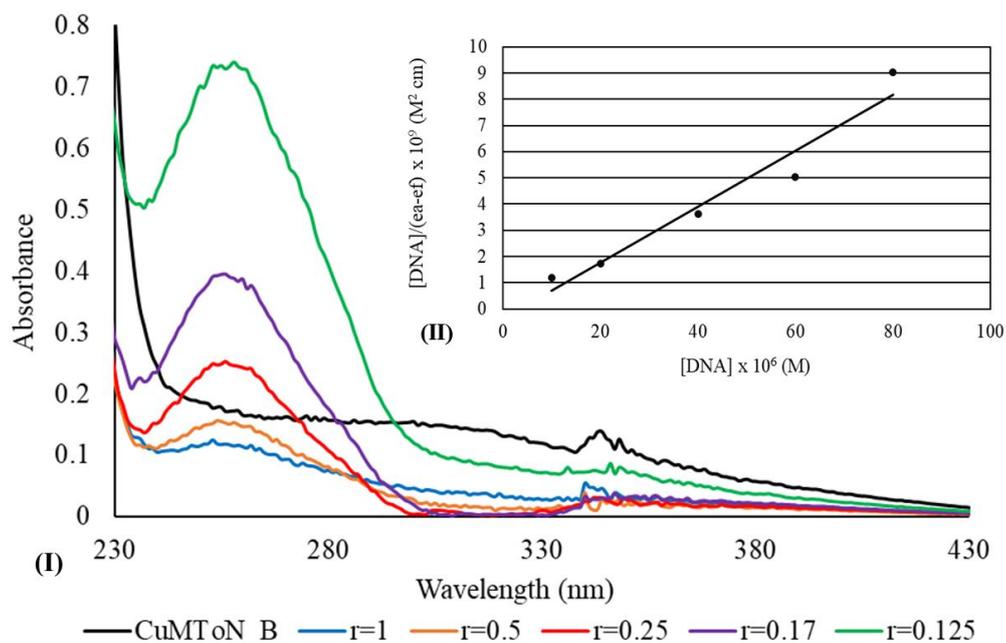
(B)

Εικόνα 33: (I) Φάσματα UV CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία CuMToN_A (A), CuMToN_B (B) σε διάφορες τιμές r (0, 0,03, 0,05, 0,08, 0,10 και 0,13, $r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 10^{-4}\text{M}$) και (II) διάγραμμα A/A_0 συναρτήσει της $[\text{σύμπλοκο}]$ στα 258 nm.

Η σταθερά δέσμευσης (K_b) των συμπλοκών προς το CT-DNA αξιολογήθηκε με παρακολούθηση των αλλαγών στην απορρόφηση των φασμάτων UV των ενώσεων στα 300-310 nm, με αυξανόμενη συγκέντρωση CT-DNA. Η τιμή της K_b λαμβάνεται από την εξίσωση Wolf-Shimer. Όπως έχει αναφερθεί και στην ενότητα 3.1 λαμβάνεται από την αναλογία της κλίσης προς την τεταγμένη επί την αρχή των αξόνων σε γραφικές παραστάσεις $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ συναρτήσει $[DNA]$. Οι τιμές K_b είναι $(14,0 \pm 5,8) \times 10^4 M^{-1}$ στην περίπτωση του CuMTon_A και $(25,7 \pm 4,4) \times 10^4 M^{-1}$ στην περίπτωση CuMTon_B. Στην εικόνα 34 απεικονίζονται τα φάσματα UV των CuMTon_A(AI) και CuMTon_B(BI) απουσία και παρουσία του CT-DNA με αναλογίες $r = 1, 0.5, 0.25, 0.17$ και 0.125 . Όπου $r = [complex]/[DNA]$. Επιπλέον, στα διαγράμματα (AII) και (BII) στην εικόνα 34 παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις του πηλίκου $[DNA]$ ($\epsilon_A - \epsilon_f$) συναρτήσει $[DNA]$ για κάθε σύμπλοκο.



(A)



(B)

Εικόνα 34: (I) Φάσματα UV των CuMTon_A (A) και CuMTon_B (B) απουσία και παρουσία CT DNA σε τιμές r 1, 0,5, 0,25, 0,17, 0,125 ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{σύμπλοκο}] = 35 \mu\text{M}$, $[\text{CT-DNA}] = 10\text{-}100 \mu\text{M}$). (II) Γραφική γραφική παράσταση $[\text{DNA}]/(\epsilon\text{A}-\epsilon\text{f})$ συναρτήσει $[\text{DNA}]$.

4.2.2 Φασματοσκοπία Φθορισμού.

Ο τρόπος σύνδεσης των συμπλόκων CuMToN_A και CuMToN_B με το CT-DNA μελετήθηκε και με φασματοσκοπία φθορισμού, κατά την οποία ανάλογα με την απόσβεση του φθορισμού προσδιορίζεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA. Για την μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης των συμπλόκων με το αιθίδιο βρωμίδιο παρασκευάστηκαν διαλύματα με σταθερή συγκέντρωση αυτού (EB) 2,3 μM , σταθερή συγκέντρωση CT-DNA 26 μM και αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συμπλόκου: 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 μM και λήφθηκαν τα φάσματα τους (από τα 550-750nm) με $\lambda_{\text{max(εκπομπής)}}=588 \text{ nm}$ (Εικόνα 35). Η διέγερση πραγματοποιείται στα 527 nm όπου είναι το μέγιστο απορρόφησης $\lambda_{\text{max(απορρόφησης)}}$ του αιθιδίου βρωμιδίου. Επιπλέον, για τον προσδιορισμό της φαινομενικής σταθεράς σύνδεσης K_{app} , χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος [51], [52], [53], [54] :

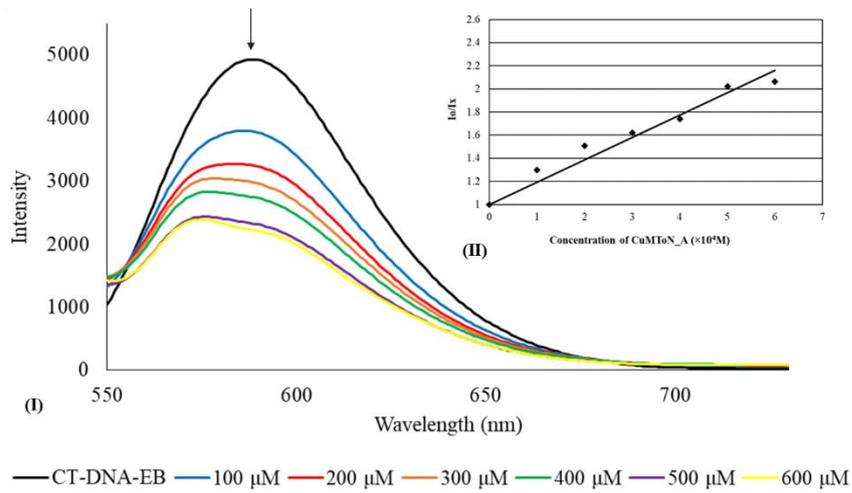
$$K_{\text{EB}} [\text{EB}] = K_{\text{app}} [\text{drug}]$$

όπου $K_{\text{EB}} = 10^7 \text{M}^{-1}$ και αποτελεί την σταθερά σύνδεσης EB-DNA, [drug] η συγκέντρωση του συμπλόκου-αποσβέστη όταν ο φθορισμός του EB-DNA μειώνεται κατά 50%, [EB]= 2,3 μM .

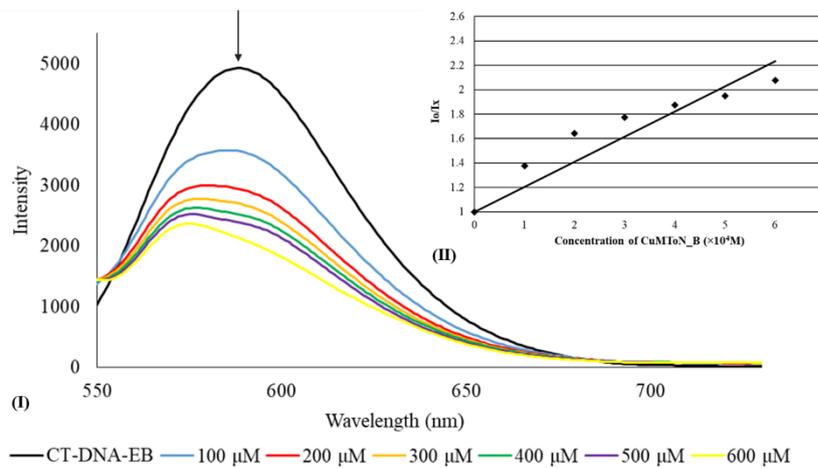
Η σταθερά K_{app} του CuMToN_A ισούται με $(4.3 \pm 0.5) \times 10^4 \text{M}^{-1}$, ενώ η K_{app} του CuMToN_B με $(4.9 \pm 0.3) \times 10^4 \text{M}^{-1}$. Από την τιμή της K_{app} μπορεί να προσδιοριστεί ο τρόπος σύνδεσης του συμπλόκου με το DNA [55]. Όταν η τιμή είναι μεγαλύτερη από 10^6M^{-1} είναι ένδειξη παρεμβολής, ενώ όταν η τιμή κυμαίνεται στην περιοχή $10^4 - 10^5 \text{M}^{-1}$ αποτελεί ένδειξη συναρμογής στην αύλακα [55]. Στην περίπτωση των CuMToN_A και CuMToN_B ο τρόπος που αλληλεπιδρούν με το DNA είναι με σύνδεση στην αύλακα του CT-DNA, εύρημα το οποίο είναι σύμφωνο και με την φασματοσκοπία UV.

Πίνακας 15 : Τρόπος δέσμευσης του φαρμάκου στο CT-DNA σύμφωνα με την τιμή της K_{app} .

Τάξη μεγέθους K_{app} (M^{-1})	Τρόπος δέσμευσης
$>10^6$	Παρεμβολή
10^4-10^5	Δέσμευση στην αύλακα



(A)



(B)

Εικόνα 35: (I) Φάσμα εκπομπής συμπλόκου CT-DNA-EB παρουσία CuMToN_A (A) και CuMToN_B (B) ($[\text{EB}] = 2,3 \mu\text{M}$, $[\text{DNA}] = 26 \mu\text{M}$, $[\text{σύμπλοκο}] = 0 - 600 \mu\text{M}$), $\lambda_{\text{ex}} = 527 \text{ nm}$. Το βέλος δείχνει ότι η ένταση αλλάζει με την αύξηση της συγκέντρωσης του συμπλόκου. (II) Γραφική παράσταση που απεικονίζει τον λόγο των εντάσεων εκπομπής I_0/I_x συναρτήσει της συγκέντρωσης του συμπλόκου.

4.2.3 Ιξωδομετρία

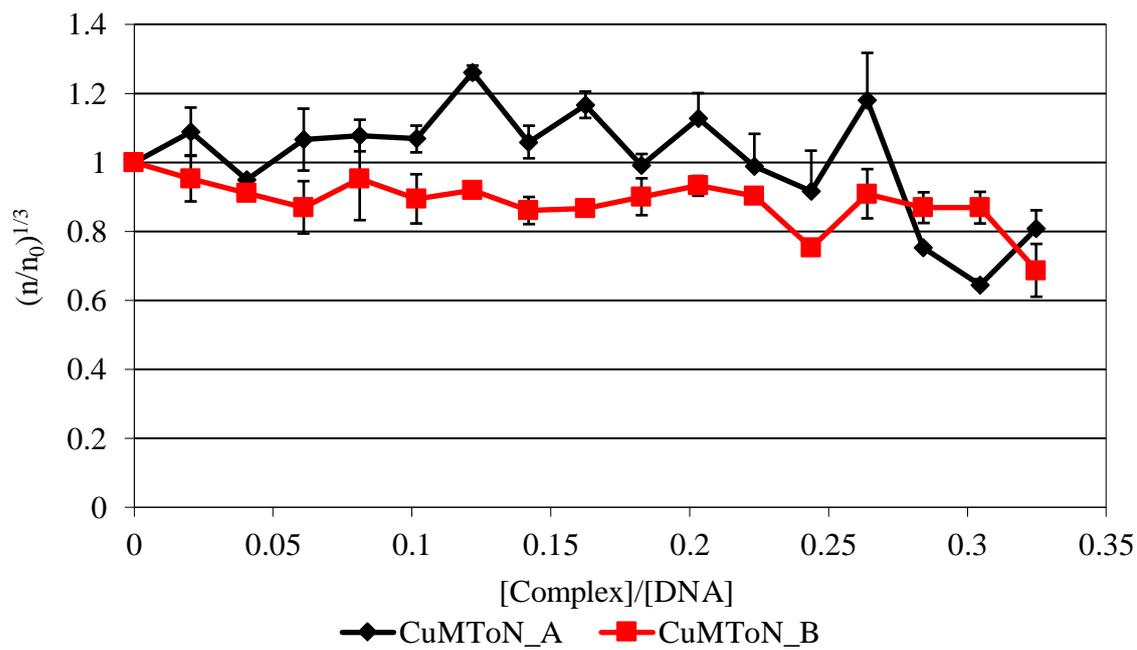
Η τεχνική της ιξωδομετρίας βασίζεται στην αλλαγή του μήκους που υφίσταται η διπλή έλικα του CT-DNA όταν το μεταλλοφάρμακο δεσμευτεί σε αυτήν. Η μεταβολή αυτή αποτυπώνεται στο ιξώδες του διαλύματος.

Η εξίσωση που συσχετίζει το μήκος του DNA με το ιξώδες των διαλυμάτων είναι:

$$\frac{L}{L_0} = \left(\frac{n}{n_0}\right)^{\frac{1}{3}}$$

όπου L: το μήκος του DNA παρουσία συμπλόκου, L₀: μήκος του DNA απουσία συμπλόκου, n: σχετικό ιξώδες παρουσία συμπλόκου, n₀: σχετικό ιξώδες απουσία συμπλόκου.

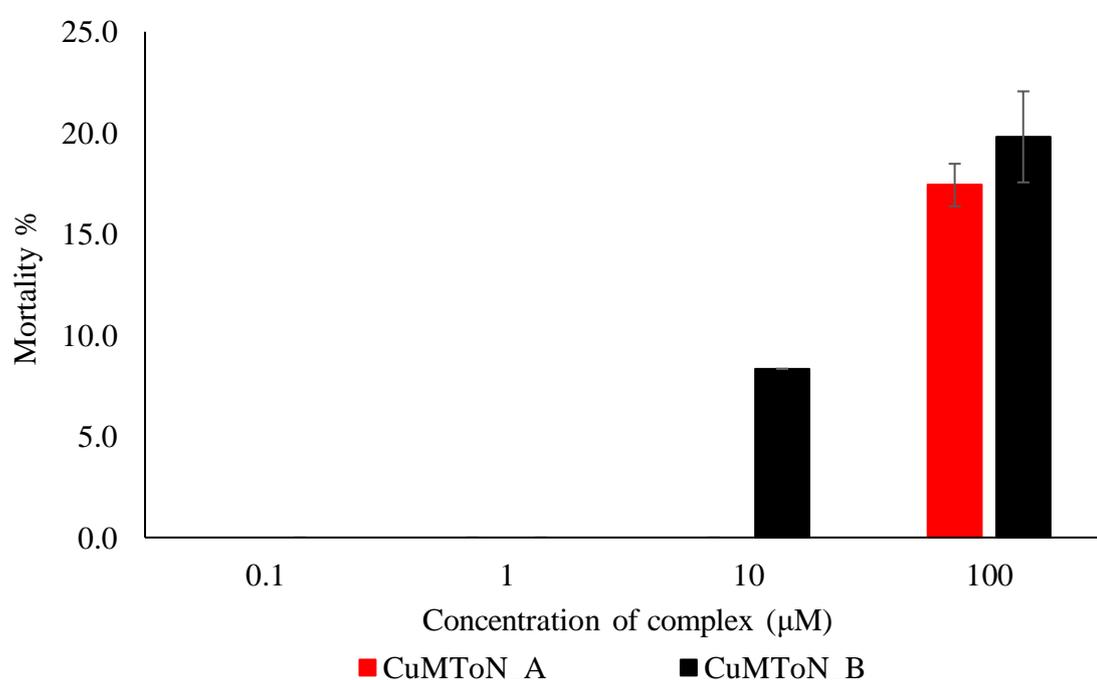
Στην περίπτωση και των δύο ενώσεων CuMTοN_A και CuMTοN_B το ιξώδες παραμένει σχεδόν σταθερό, υποδηλώνοντας σύνδεση στην αύλακα του DNA, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από τα προηγούμενα πειράματα (Μελέτες UV και φθορισμού).



Εικόνα 36: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων συμπλοκών στο σχετικό ιξώδες του CT-DNA στους 25°C. ([DNA]= 10 mM, $r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, n είναι το ιξώδες του DNA παρουσία συμπλοκών και n_0 είναι το ιξώδες του DNA).

4.2.4 Δοκιμή *Artemia salina*

Η *in vivo* τοξικότητα των CuMToN_A και CuMToN_B αξιολογήθηκε με την δοκιμή του *Artemia salina* [47]. Το πείραμα αυτό αποτελεί ένα αρχικό τεστ τοξικότητας το οποίο βασίζεται στην υψηλή ευαισθησία που παρουσιάζει το συγκεκριμένο ζωοπλακτονικό καρκινοειδές. Το ποσοστό επιβίωσης των προνυμφών προσδιορίστηκε από τον αριθμό των νεκρών προνυμφών μετά από 24 ώρες έκθεσή τους σε συγκεντρώσεις 0.1, 1, 10 και 100 μM .



Εικόνα 37: Ποσοστά θνησιμότητας (%) *Artemia salina* συναρήσει συγκεντρώσεων 0.1, 1, 10 και 100 μM των συμπλόκων CuMToN_A και CuMToN_B.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δύο μεταλλοφάρμακα το $[\text{Cu}(\text{tmtP})_2\text{NO}_3]$ (CuMToN_A) και το $[\text{Cu}(\text{tmtP})_3\text{NO}_3]$ (CuMToN_B) με αντίδραση τριένυδρου νιτρικού χαλκού $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ με τον μιτοχονδριοτροπικό παράγοντα tri-m-tolylphosphine (tmtP) σε διαφορετικές αναλογίες.

Ο χαρακτηρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε στερεή και υγρή κατάσταση με προσδιορισμό του σημείου τήξεως, της διαλυτότητας τους και με τις φασματοσκοπικές τεχνικές της Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας Μετασχηματισμού Fourier Ολικής Εσωτερικής Ανάκλασης (ATR-FT-IR), της Απορρόφησης Υπέρυθρης-Ορατής Ακτινοβολίας (UV-Vis), Φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$), φασματοσκοπίας ακτίνων X και ο προσδιορισμός του μοριακού τους βάρους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της κρυοσκοπίας.

Από την μελέτη των ενώσεων με φασματοσκοπία ακτίνων X αποδείχθηκε πως στην περίπτωση του CuMToN_A, το σύμπλοκο αποτελείται από δύο μόρια φωσφινών τα οποία εντάσσονται στην σφαίρα ένταξης του Cu(I) και μια νίτρο ομάδα που προσδέεται χηλικά στο μεταλλικό ιόν. Επιπλέον, υπάρχουν δύο ισομερή στην κυψελίδα (CuMToN_A_1 και CuMToN_A_2), η διαφορά των οποίων έγκειται στο γεγονός πως οι δύο δεσμοί Cu-P στο CuMToN_A_1 είναι συμμετρικοί και ασύμμετροι στην περίπτωση του CuMToN_A_2.

Όσον αφορά στο CuMToN_B, το μεταλλοφάρμακο αποτελείται από τρεις φωσφίνες και μία νίτρο ομάδα. Η σφαίρα ένταξης γύρω από το κέντρο Cu(I) περιλαμβάνει τρία άτομα φωσφόρου ενώ η τετραεδρική γεωμετρία συμπληρώνεται από ένα άτομο οξυγόνου από την NO_3^- ομάδα. Τα δύο μεταλλοφάρμακα εκτός από τον αριθμό των φωσφινών διαφοροποιούνται και στον τρόπο ένταξης της νίτρο ομάδας όπου στο CuMToN_B

εντάσσεται μονοδοντικά με τις αποστάσεις του δεσμού N-O να είναι ισοδύναμες. Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την μέθοδο της κρυοσκοπίας για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών των ενώσεων είναι πολύ κοντά με αυτά που προκύπτουν από την φασματοσκοπία XRD.

Από τις μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών δονήσεων τάσης που παρατηρούνται στα φάσματα ATR-FT-IR και των δύο ενώσεων προκύπτει πως και στις δύο περιπτώσεις τα μόρια των φωσφινών εντάσσονται στο μεταλλικό κέντρο του χαλκού, αποτελέσματα τα οποία συμφωνούν με αυτά που προέκυψαν από την φασματοσκοπία XRD.

Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ και για τα δύο σύμπλοκα επιβεβαιώνουν την ένταξη της tmtpP στο μεταλλικό κέντρο λόγω των μετατοπίσεων των χαρακτηριστικών σημάτων συντονισμού των πρωτονίων της φωσφίνης. Ακόμα, από την ολοκλήρωση των σημάτων επιβεβαιώθηκε και η γραμμομοριακή αναλογία 1:2 για το CuMToN_A και 1:3 για το CuMToN_B .

Συμπερασματικά, όλες οι μελέτες χαρακτηρισμού των μεταλλοφαρμάκων επιβεβαιώνουν την ένταξη του μιτοχονδριοτροπικού παράγοντα $\text{tri-m-tolylphosphine}$ στο μεταλλικό κέντρο του ιόντος χαλκού (Cu(I)).

Η σταθερότητα των ενώσεων που συντέθηκαν επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι *ex vivo* και *in vivo* βιολογικές μελέτες. Η μελέτη της σταθερότητας των νέων ουσιών είναι σημαντική καθώς αποδεικνύει ότι οι ενώσεις δεν διασπώνται σε επιμέρους ομάδες ή σε ιόντα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και συνεπώς η βιολογική δράση που εμφανίζουν οφείλεται σε ολόκληρο το μόριο.

Στη συνέχεια, η φωτοδραστικότητά των ενώσεων και η επίδραση τους στο DNA μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας ακτινοβολία UVB. Από τα πειράματα προέκυψε πως η

κβαντική απόδοση του συμπλόκου σε DMSO και η κβαντική απόδοση του συμπλόκου σε CT-DNA διαφέρουν και στις δύο περιπτώσεις. Για το CuMToN_A: $\phi_A(295) = 0.264$ Einstein ενώ $\phi_{A1}(295) = 0.059$ Einstein και για το CuMToN_B: $\phi_B(295) = 0.191$ Einstein ενώ $\phi_{B1}(295) = 0.216$ Einstein. Το συγκεκριμένο εύρημα επιβεβαιώνει την αλληλεπίδραση των συμπλόκων CuMToN_A και CuMToN_B με το CT-DNA. Επιπλέον, μελετήθηκε η βιολογική δράση των ενώσεων και συγκεκριμένα ελέγχθηκε *ex vivo* η ικανότητα των ενώσεων να αλληλεπιδρούν με το DNA και προσδιορίστηκε ο τρόπος σύνδεσης τους με αυτό με χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis, φασματοσκοπίας φθορισμού και με την μέθοδο προσδιορισμού του ιζώδους. Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας UV-Vis έδειξαν πως τα CuMToN_A και CuMToN_B αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω σύνδεσης στις αύλακες του, αφού παρατηρείται υπερχρωμισμός και στις δύο περιπτώσεις, 9,8% για το CuMToN_A και 8,7% για το CuMToN_B. Οι σταθερές K_b των συμπλόκων βρέθηκαν ίσες με $(14,0 \pm 5,8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ για το CuMToN_A και $(25,7 \pm 4,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ για το CuMToN_B, αποδεικνύοντας πως το CuMToN_B συνδέεται ισχυρότερα στο DNA, λόγω του μεγαλύτερου πλήθους φωσφινών που διαθέτει. Το συγκεκριμένο εύρημα επιβεβαιώνεται και από την φασματοσκοπία φθορισμού όπου οι τιμές των K_{app} των συμπλόκων βρίσκονται μεταξύ των τιμών 10^4 - 10^5 (του CuMToN_A ισούται με $(4.3 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, ενώ η K_{app} του CuMToN_B με $(4.9 \pm 0.3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Από την μέθοδο της ιζωδομετρίας παρατηρήθηκε πως και στις δύο περιπτώσεις το ιζώδες παραμένει σχεδόν σταθερό υποδηλώνοντας συναρμογή των ενώσεων στις αύλακες του DNA, επιβεβαιώνοντας τις προηγούμενες μεθόδους.

Τέλος, ερευνήθηκε η *in vivo* τοξικότητά των συμπλόκων έναντι του ζωοπλαγκτού *Artemia salina* η οποία έδειξε πως τα σύμπλοκα δεν εμφανίζουν τοξικότητα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Global Cancer Observatory- World Health Organization
2. Roy P, Saikia B. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*, 2021; 53: 441-442.
3. Ian A. Cree (ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Second Edition, *Methods in Molecular Biology*, 2011; 731, Chapter 1: Cancer Biology.
4. L.Foulds. The Experimental Study of Tumor Progression: A Review, *American Association Cancer Research*, 1954; 14(5): 327-339.
5. Douglas Hanahan, Robert A. Weinberg, (2000), The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 2020; 100: 54-70
6. Fantoni NZ, Brown T, Kellett A. DNA-targeted metallodrugs: an untapped source of artificial gene editing technology. *ChemBioChem*. 2021; 22(13):2184-205.
7. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013; 124:1-9
8. Pray L. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education*,2008;1(1),
(<https://www.sciencephoto.com/media/540537/view/dnastructure-artwork>)
9. Reginald H. Garrett, Charles M. Grisham. *Biochemistry*. Utopia. 2019
10. M. Shields, Chapter 14 - Chemotherapeutics, *Pharmacognosy*, 2017; 295-313,
11. Donna S. Shewach, Robert D. Kuchta, “Introduction to Cancer Chemotherapeutics”, *Chemical Reviews*, 2009, 109 (7), 2859-2861.
12. Ranju Ralhan, Jatinder Kaur, Alkylating agents and cancer therapy, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2007; 17(9): 1061-1075.

13. Cooper, Geoffrey M., *The cell: a molecular approach*, Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman – 7th Edition, Chapter 7, 247-294.
14. Cooper, Geoffrey M., *The cell: a molecular approach*, Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman – 7th Edition, Chapter 13, 537-597.
15. Kumar, S., Aharwal, R.P., Jain, R. *et al.* Bioactive Molecules of Endophytic Fungi and Their Potential in Anticancer Drug Development. *Curr Pharmacol Rep*, 2021; 7: 27–41.
16. Chmielewski, N.N., Limoli, C.L. Sex Differences in Taxane Toxicities, *Cancers*, 2022; 14: 3325.
17. Fantoni NZ, Brown T, Kellett A. DNA-targeted metallodrugs: an untapped source of artificial gene editing technology. *ChemBioChem*. 2021;22(13):2184-205.
18. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013;124:1-9.
19. Duncan C, White AR. Copper complexes as therapeutic agents. *Metallomics*. 2012;4(2):127-38.
20. Michniewicz F, Saletta F, Rouaen JRC, Hewavisenti RV, Mercatelli D, Cirillo G, Giorgi FM, Trahair T, Ziegler D, Vittorio O. Copper: An Intracellular Achilles' Heel Allowing the Targeting of Epigenetics, Kinase Pathways, and Cell Metabolism in Cancer Therapeutics. *ChemMedChem*. 2021; 16(15):2315-2329.
21. Li Y. Copper homeostasis: Emerging target for cancer treatment. *IUBMB Life*. 2020; 72(9):1900-1908.

22. Zehra S, Tabassum S, Arjmand F. Biochemical pathways of copper complexes: progress over the past 5 years. *Drug Discov Today*. 2021; 26(4): 1086-1096.
23. Wang T, Guo Z. Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr Med Chem*. 2006; 13(5): 525-37.
24. Kannappan V, Ali M, Small B, Rajendran G, Elzhenni S, Taj H, Wang W, Dou QP. Recent Advances in Repurposing Disulfiram and Disulfiram Derivatives as Copper-Dependent Anticancer Agents. *Front Mol Biosci*. 2021; 8: 741316.
25. M. C. Linder, The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans, *Mutation Research*, 2012; 733: 83-91.
26. Shobha Devi C, Thulasiram B, Aerva RR, Nagababu P. Recent Advances in Copper Intercalators as Anticancer Agents. *J Fluoresc*. 2018 S; 28(5): 1195- 1205.
27. Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev*. 2014; 114(1): 815-62.
28. N.A. Campbell, J.B. Reece, L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman, P.V. Minorsky, R.B. Jackson. Βιολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2017, σελ.493-499.
29. Wongrakpanich A, Geary SM, Joiner ML, Anderson ME, Salem AK. Mitochondria-targeting particles. *Nanomedicine (Lond)*. 2014; 9(16): 2531- 43.
30. Battogtokh G, Cho YY, Lee JY, Lee HS, Kang HC. Mitochondrial-Targeting Anticancer Agent Conjugates and Nanocarrier Systems for Cancer Treatment. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 922.
31. Mani S, Swargiary G, Singh KK. Natural Agents Targeting Mitochondria in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(19): 6992.

32. Roth KG, Mambetsariev I, Kulkarni P, Salgia R. The Mitochondrion as an Emerging Therapeutic Target in Cancer. *Trends Mol Med.* 2020; 26(1): 119- 134.
33. Porporato PE, Filigheddu N, Pedro JMB, Kroemer G, Galluzzi L. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res.* 2018; 28(3): 265-280.
34. Erxleben A. Mitochondria-Targeting Anticancer Metal Complexes. *Curr Med Chem.* 2019; 26(4): 694-728.
35. C. Loreto, G.L. Rocca, R. Anzalone, R. Caltabiano, G. Vespasiani, FS. Castorina, D. J. Ralph, S. Celtek, G. Musumeci, S. Giunta, R. Djinovic, D. Basic, S. Sansalone, The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease, *BioMed Research International*, 2014, 61619.
36. <https://www.britannica.com/science/copper>
37. Μ. Κουή, Ν. Αβδελίδης, Π. Θεοδωρακέας, Ε. Χειλάκου, Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση, in: Μη καταστρεπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών [Προπτυχιακό εγχειρίδιο], Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2015. <http://repository.kallipos.gr/handle/11419/6175> (accessed February 8, 2023).
38. S. Nasrazadani, S. Hassani, Chapter 2 - Modern analytical techniques in failure analysis of aerospace, chemical, and oil and gas industries, in: A.S.H. Makhlof, M. Aliofkhazraei (Eds.), *Handbook of Materials Failure Analysis with Case Studies from the Oil and Gas Industry*, Butterworth-Heinemann, 2016: pp. 39–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100117-2.00010-8>.
39. P.J. Potts, X-RAY FLUORESCENCE AND EMISSION | X-Ray Fluorescence Theory, in: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical*

Science (Second Edition), Elsevier, Oxford, 2005: pp. 408–418.
<https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00673-7>.

40. R.A. de Graaf, *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*, 3rd ed., John Wiley & Sons, 2019.
41. Π. Καρκαλούσος, Ζ. Γεωργίου, Χ. Κρούπης, Α. Παπαϊωάννου, Π. Πλαγεράς, Β. Σπυρόπουλος, Γ.Ε. Τσότσου, Χ. Φούντζουλα, Βασικές αρχές φωτομετρίας και χρωματομετρικών αναλύσεων., in: *Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας [Εργαστηριακός Οδηγός]*, Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2015.
<http://repository.kallipos.gr/handle/11419/5383> (accessed February 8, 2023).
42. J. Marshall, S. Johnsen, Fluorescence as a means of colour signal enhancement, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 372 (2017) 20160335. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0335>.
43. N. Siraj, B. El-Zahab, S. Hamdan, T.E. Karam, L.H. Haber, M. Li, S.O. Fakayode, S. Das, B. Valle, R.M. Strongin, G. Patonay, H.O. Sintim, G.A. Baker, A. Powe, M. Lowry, J.O. Karolin, C.D. Geddes, I.M. Warner, Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence, *Anal. Chem.* 88 (2016) 170–202.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04109>.
44. C. N. Banti, A. D. Giannoulis, N. Kourkoumelis, A. M. Owczarzak, M. Poyraz, M. Kubicki, K. Charalabopoulosbe, S. K. Hadjikakou, Mixed ligand–silver(I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis, 2021, 4, 545-560.
45. W. W. Wilfinger, K. Mackey, P. Chomczynski, Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity, *Biotechniques*, 1997, 22, 3, 474-6, 478-81.

46. Shahabadi N, Mohammadi S. Synthesis characterization and DNA interaction studies of a new Zn (II) complex containing different dinitrogen aromatic ligands. *Bioinorganic chemistry and applications*. 2012 Aug 26;2012.
47. C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, Evaluation of Toxicity with Brine Shrimp Assay, *Bio-Protoc*. 11 (2021) e3895–e3895.
48. M.P. Chrysouli, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, N. Panayiotou, G.S. Markopoulos, A.J. Tasiopoulos, S.K. Hadjikakou, Chloro(triphenylphosphine)gold(I) a forefront reagent in gold chemistry as apoptotic agent for cancer cells, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 179, 2018, p.107-120.
49. Hiromichi Hoshina, Mikhail Slipchenko, Kirill Prozument, Deepak Verma, Michael W. Schmidt, Joseph Ivancic, and Andrey F. Vilesov, Infrared Spectroscopy and Structure of (NO)_n Clusters, *J. Phys. Chem. A* 2016, 120, 4, 527–534.
50. *J Photochem Photobiol B* . 2013 Jul 5;124:1-19
51. Christina N. Banti, Constantina Papatriantafyllopoulou, Maria Manoli, Anastasios J. Tasiopoulos, and Sotiris K. Hadjikakou, Nimesulide Silver Metallodrugs, Containing the Mitochondriotropic, Triaryl Derivatives of Pnictogen; Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells, *Inorg. Chem.* 2016, 55, 17, 8681–8696.
52. Marianthi Kapetana, Christina N. Banti, Christina Papachristodoulou, Vassilios Psycharis, Catherine P. Raptopoulou & Sotiris K. Hadjikakou, Conjugation of triphenylantimony(V) with carvacrol against human breast cancer cells, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2022, 27, 373–389.
53. George K. Latsis, Christina N. Banti, Nikolaos Kourkoumelis, Constantina Papatriantafyllopoulou, Nikos Panagiotou, Anastasios Tasiopoulos, Alexios

- Douvalis, Angelos G. Kalampounias, Thomas Bakas, Sotiris K. Hadjikakou, Poly Organotin Acetates against DNA with Possible Implementation on Human Breast Cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(7), 2055.
54. M.E.K. Stathopoulou, N. Zoupanou, C.N. Banti, A.P. Douvalis, C. Papachristodoulou, K.D. Marousis, G.A. Spyroulias, T. Mavromoustakos, S.K. Hadjikakou, Organotin derivatives of cholic acid induce apoptosis into breast cancer cells and interfere with mitochondrion; Synthesis, characterization and biological evaluation, *Steroids*, 2021, (167), 108798.
55. Sheng, X.; Lu, X.-M.; Chen, Y.-T.; Lu, G.-Y.; Zhang, J.-J.; Shao, Y.; Liu, F.; Xu, Q. Synthesis, DNA-Binding, Cleavage, and Cytotoxic Activity of New 1,7-Dioxo-4,10-diazacyclododecane Artificial Receptors Containing Bisguanidinoethyl or Diaminoethyl Double Side Arms. *Chem. – Eur. J.* 2007, 13, 9703–9712.
56. Denis A. Proshlyakov, Michelle A. Pressler, and Gerald T. Babcock, Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome *c* oxidase, *Biophysics and Computational Biology*, 1998, 95, 8020-8025.
57. M. Kelly, P. Lappalainen, G. Talbo, T. Haltia, J. van der Oost, M. Saraste, Two cysteines, two histidines, and one methionine are ligands of a binuclear purple copper center 1993, 268(22), 16871-16787.

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Διαγραμματική απεικόνιση των νέων περιπτώσεων και των θανάτων λόγω καρκίνου κατά το έτος 2023 [1]	14
Εικόνα 2: Η μορφή διπλής έλικας του DNA και οι δομικές μονάδες από τις οποίες αποτελείται [8].....	20
Εικόνα 3: Χημειοθεραπευτικά φάρμακα.	21
Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης αλκυλιούντων παραγόντων (επεξεργασμένη εικόνα από [12]).....	22
Εικόνα 5: Χημική δομή δοξορουβικίνης.	26
Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης αλκαλοειδών της vinca (τροποποιημένη εικόνα από [15] ..	27
Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης ταξανών (τροποποιημένη εικόνα από [16])	28
Εικόνα 8: Τρόποι αλληλεπίδρασης φαρμάκου με το DNA (τροποποιημένη εικόνα [17])..	32
Εικόνα 9: Χαλκός και κάποιες ιδιότητες του [36]	33
Εικόνα 10: Κυτόχρωμα C	38
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση μιτοχονδρίου.	41
Εικόνα 12: Δομή της tri(m-tolyl)phosphine (tmtP).....	46
Εικόνα 13: (a) Ανάμειξη νιτρικού χαλκού και της tri(m-tolyl)phosphine, χρώμα διαλύματος: πράσινο και (b) Το διάλυμα μετά το πέρας 5 λεπτών υπό ανάδευση, χρώμα διαλύματος: άχρωμο και διαυγές.....	52
Εικόνα 14: Συσκευή Stuart Scientific.	52
Εικόνα 15: Συσκευή OSMOMAT 3000 Freezing Point Osmometer της Gonotec	54
Εικόνα 16: Απλοποιημένο διάγραμμα ανάλυση XRF (επεξεργασμένη εικόνα από [39]) ..	56
Εικόνα 17: : Σχηματική αναπαράσταση φθορισμού (επεξεργασμένη εικόνα από [43])	66

Εικόνα 18: Αντίδραση σύνθεσης των CuMToN_A και CuMToN_B. Για το CuMToN_A, όπου n=2 και για το CuMToN_B, όπου n=3.	71
Εικόνα 19: Φάσμα FT-IR της tmtP.	74
Εικόνα 20: Φάσμα FT-IR του CuMToN_A.	75
Εικόνα 21: Φάσμα FT-IR του CuMToN_B.	76
Εικόνα 22: Φάσματα XRF του CuMToN_A (A) και CuMToN_B (B).	78
Εικόνα 23: Φάσμα ¹ H-NMR της tmtP σε DMSO-d ₆	81
Εικόνα 24: Φάσμα ¹ H-NMR του CuMToN_A σε 0 και 48 ώρες σε DMSO-d ₆	82
Εικόνα 25: Φάσμα ¹ H-NMR του CuMToN_B σε 0 και 48 ώρες σε DMSO-d ₆	83
Εικόνα 26: Φάσμα UV-Vis του CuMToN_A (50 μM) σε DMSO σε 0 και 48 ώρες.	85
Εικόνα 27: Φάσμα UV-Vis του CuMToN_B (50 μM) σε DMSO σε 0 και 48 ώρες.	85
Εικόνα 28: Διάγραμμα της κρυσταλλικής δομής του CuMToN_A.	89
Εικόνα 29: Διάγραμμα της κρυσταλλικής δομής του CuMToN_B.	89
Εικόνα 30: Φάσμα απορρόφησης UV των ενώσεων (2×10 ⁻⁵ M) CuMToN_A (A), CuMToN_B (B) σε DMSO μετά από ακτινοβόληση σε θερμοκρασία δωματίου για 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 και 60 λεπτά.	92
Εικόνα 31: Φάσμα απορρόφησης UV των ενώσεων (2×10 ⁻⁵ M) CuMToN_A (A), CuMToN_B (B) σε CT-DNA μετά από ακτινοβόληση σε θερμοκρασία δωματίου για 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 και 60 λεπτά.	93
Εικόνα 32: Φάσμα απορρόφησης UV του CT-DNA (10 ⁻⁴ M) μετά από ακτινοβόληση σε θερμοκρασία δωματίου για 0 και 60 λεπτά.	94
Εικόνα 33: (I) Φάσματα UV CT-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία CuMToN_A (A), CuMToN_B (B) σε διάφορες τιμές r (0, 0,03, 0,05, 0,08, 0,10 και 0,13, r= [σύμπλοκο]/[DNA], [DNA]= 10 ⁻⁴ M) και (II) διάγραμμα A/A ₀ συναρτήσει της [σύμπλοκο] στα 258 nm.	96

Εικόνα 34: (I) Φάσματα UV των CuMTοN_A (A) και CuMTοN_B (B) απουσία και παρουσία CT DNA σε τιμές r 1, 0,5, 0,25, 0,17, 0,125 ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{σύμπλοκο}] = 35 \mu\text{M}$, $[\text{CT-DNA}] = 10-100 \mu\text{M}$). (II) Γραφική γραφική παράσταση $[\text{DNA}]/(\epsilon A - \epsilon f)$ συναρτήσει $[\text{DNA}]$	98
Εικόνα 35: (I) Φάσμα εκπομπής συμπλόκου CT-DNA-EB παρουσία CuMTοN_A (A) και CuMTοN_B (B) ($[\text{EB}] = 2,3 \mu\text{M}$, $[\text{DNA}] = 26 \mu\text{M}$, $[\text{σύμπλοκο}] = 0 - 600 \mu\text{M}$), $\lambda_{\text{ex}} = 527 \text{ nm}$. Το βέλος δείχνει ότι η ένταση αλλάζει με την αύξηση της συγκέντρωσης του συμπλόκου. (II) Γραφική παράσταση που απεικονίζει τον λόγο των εντάσεων εκπομπής I_0/I_x συναρτήσει της συγκέντρωσης του συμπλόκου.	101
Εικόνα 36: Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων συμπλοκών στο σχετικό ιξώδες του CT-DNA στους 25°C . ($[\text{DNA}] = 10 \text{ mM}$, $r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, n είναι το ιξώδες του DNA παρουσία συμπλοκών και n_0 είναι το ιξώδες του DNA).	103
Εικόνα 37: Ποσοστά θνησιμότητας (%) <i>Artemia salina</i> συναρτήσει συγκεντρώσεων 0.1, 1, 10 και $100 \mu\text{M}$ των συμπλοκών CuMTοN_A και CuMTοN_B.	104

8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Development of mitochondrial targeting chemotherapeutics, T.M. Koufou, A.-D.C.

Magklaras, M.S. Ioannou, C.N. Banti, V. Psycharis, C.P. Raptopoulou and S.K.

Hadjikakou, Athens Conference on Advances in Chemistry (ACAC), June 26 – July 1,
2022, Athens, Book of abstract page 53.

Novel anticancer DNA binders, T.M. Koufou, C.N. Banti, C.A. Mitsopoulou and S.K.

Hadjikakou, 2024, in preparation.