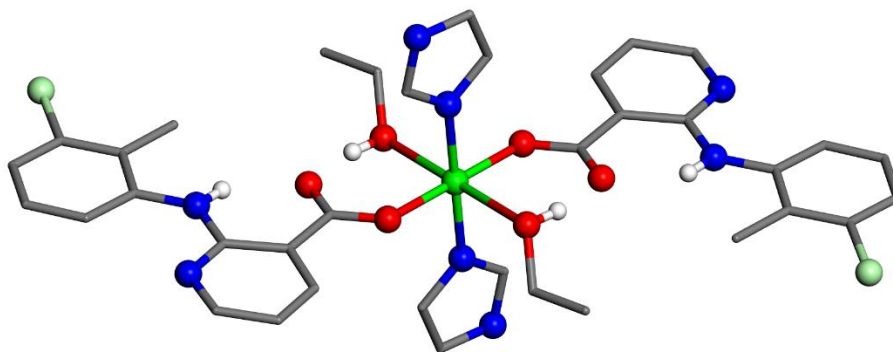




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

**Σύνθεση, χαρακτηρισμός και βιοδραστικότητα συμπλόκων ενώσεων μεταβατικών  
μετάλλων με μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα**



**Γεώργιος Μαλής**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

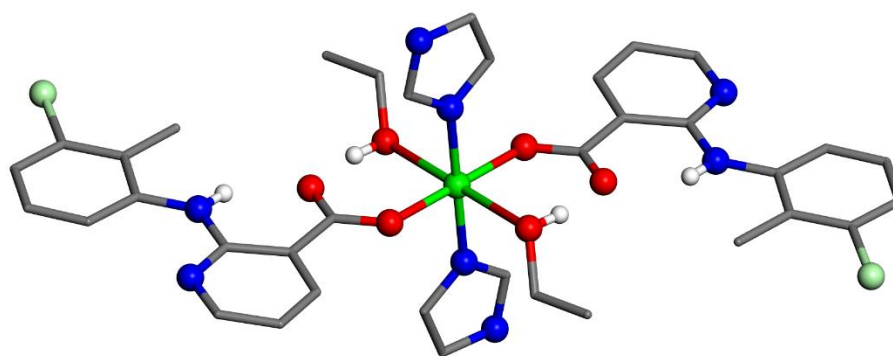




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

**Σύνθεση, χαρακτηρισμός και βιοδραστικότητα συμπλόκων ενώσεων μεταβατικών  
μετάλλων με μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα**



**Γεώργιος Μαλής**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

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

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΨΩΜΑΣ

Θέμα: «Σύνθεση, χαρακτηρισμός και βιοδραστικότητα συμπλόκων ενώσεων μεταβατικών μετάλλων με μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.:...<sup>Α</sup>/...-...-.....

1 ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΨΩΜΑΣ

2 ΣΩΤΗΡΗΣ ΧΑΤΖΗΚΑΚΟΥ

3 ΚΟΥΤΣΟΛΕΛΟΣ ΘΑΝΑΣΗΣ

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

---

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.

Καθηγητής \_\_\_\_\_

Ο/Η Γραμματέας

\_\_\_\_\_

# Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΑΠΘ στα πλαίσια του ΔΠΜΣ Ανόργανη Βιολογική Χημεία. Συγκεκριμένα στα πλαίσια της εργασίας αυτής έγινε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός - προσδιορισμός δομής, και η μελέτη της βιολογικής δράσης συμπλόκων ενώσεων μεταβατικών μετάλλων με μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, παρουσία ετεροκυκλικών ligands ιμιδαζολίου, πυριδίνης και 2,9-διμέθυλ-1,10-φαινανθρολίνης.

Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις μοριακής αγωγιμότητας, φασματοσκοπικές τεχνικές (UV-vis, φασματοσκοπία IR,  $^1\text{H-NMR}$ ), ενώ η περίθλαση ακτίνων-Χ χρησιμοποιήθηκε για την επίλυση των κρυσταλλικών δομών των συμπλόκων.

Η βιολογική δράση των ενώσεων μελετήθηκε μέσω της μελέτης αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA (calf-thymus DNA) με φασματοσκοπία UV-vis, κυκλική βολταμετρία και ιξωδομετρία. Επιπλέον μελετήθηκε η ικανότητα των ενώσεων να αντικαθιστούν το αιθίδιο βρωμίδιο αλλά και η αλληλεπίδραση των εκάστοτε ενώσεων με την ανθρώπινη και βοοειδή αλβουμίνη ορού αίματος (HSA–BSA).

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον αναπληρωτή καθηγητή και επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μου εργασίας, Γ. Ψωμά, για τη βοήθεια, την καθοδήγηση και γενικότερα την άψογη συνεργασία κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας, καθώς επίσης και για τις συμβουλές και διορθώσεις του πάνω στην συγκεκριμένη εργασία, σε μία δύσκολη περίοδο εν μέσω του κορωνοϊού. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον καθηγητή Σ. Χατζηκακού, που από την πρώτη στιγμή που έδειξα ενδιαφέρον για το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα μέχρι το τέλος του, με βοήθησε και με ενθάρρυνε. Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Θ. Κουτσολέλο που δέχθηκε χωρίς δισταγμό να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής μου. Βεβαίως θα ήθελα να δώσω θερμές ευχαριστίες στον αναπληρωτή καθηγητή Α. Χατζηδημητρίου για την άμεση και γρήγορη επίλυση των κρυσταλλικών δομών.

Τέλος, δεν θα ήθελα να παραλείψω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους συναδέλφους που εργαστήκαμε μαζί στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, για το ιδιαίτερα ευχάριστο και θερμό κλίμα που υπήρχε, αλλά και για τη βοήθεια και τις χρήσιμες συμβουλές που μου προσέφεραν σε όλη την διάρκεια της παρούσας εργασίας.

<<Έτσι, μετά από πολλά χρόνια, η νίκη έχει έρθει, και ο έρωτας της εξερεύνησης, με μεγάλες ελπίδες και πικρή απογοήτευση, θα καταγραφεί σε λίγα χρόνια απλώς στα βιβλία χημείας σε λίγες σύντομες προτάσεις.>>

- **Sir Ian Morris Heilbron**

## Περιεχόμενα

<b>A. Θεωρητικό Μέρος</b> .....	1
<b>A.1 Χαλκός</b> .....	2
A.1.1 Εισαγωγή.....	2
A.1.2 Φυσιολογία του Χαλκού.....	3
A.1.3 Απορρόφηση και μεταφορά του χαλκού.....	4
A.1.4 Αντλίες Χαλκού.....	5
A.1.5 Ο Χαλκός στο αίμα.....	6
A.1.6 Πρόσληψη χαλκού από τα ηπατοκύτταρα.....	8
A.1.7 ΑΤΡάσες ATP7A & ATP7B.....	11
A.1.8 Κατανομή χαλκού σε περιφερειακούς ιστούς.....	12
A.1.9 Κατανομή χαλκού στον εγκέφαλο.....	12
A.1.10 Χαλκός και πλακούντας.....	13
A.1.11 Χαλκός στους νεφρούς.....	14
A.1.12 Χαλκός στο κεντρικό νευρικό σύστημα.....	14
A.1.13 Χαλκός στον αμφιβληστροειδή.....	15
A.1.14 Χαλκός ως προ-οξειδωτικό.....	16
<b>A.2 Μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα</b> .....	18
A.2.2 Μηχανισμός Δράσεως.....	18
A.2.3 Η σύνθεση προσταγλανδινών και θρομβοξανών.....	19
A.2.4 Βιολογική δράση των προστανοειδών.....	20
A.2.5 Κυκλοξυγενάση.....	20
A.2.6 Ταξινόμηση και φαρμακοκινητική.....	22
A.2.7 Φαρμακολογία.....	23
A.2.8 Αναλγησία και αντιφλεγμονώδης δράση.....	24
A.2.9 Η αναλγητική δράση των ΜΣΑΦ-Γενικά.....	24
A.2.10 ΜΣΑΦ και νεφρική λειτουργία.....	25
A.2.11 Αγγειακός τόνος.....	26
A.2.12 ΜΣΑΦ και γαστρεντερικό σύστημα (ΓΕΣ).....	27
A.2.13 Αντιπηκτική δράση των ΜΣΑΦ.....	27
A.2.14 Δράση στην ηπατική λειτουργία.....	28
A.2.15 Δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ).....	28
A.2.16 Αντικαρκινική δράση.....	29
A.2.17 Ιβουπροφαίνη.....	29
A.2.18 Φαινοπροφαίνη.....	32
A.2.19 Λοξοπροφαίνη.....	34

A.2.20 Κλωνιξίνη .....	35
A.2.21 Τρόπος σύνδεσης ΜΣΑΦ μέσω του καρβοξυλίου.....	35
A.2.21 Ο ρόλος των co-ligands.....	36
A.4 Σύμπλοκα Cu(II)-ΜΣΑΦ.....	37
A.4.1 Σύμπλοκα Cu(II)-ΜΣΑΦ με co-ligands O-δότες.....	37
A.4.2 Σύμπλοκα Cu(II)-ΜΣΑΦ με co-ligands N-δότες.....	40
A.4.3 Σύμπλοκα Cu(II)-ΜΣΑΦ με N,N'-δότες ως co-ligands.....	42
B. Πειραματικό Μέρος.....	44
Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής.....	45
B.1 Υλικά - Αντιδραστήρια- Όργανα Μέτρησης – Μελέτες αλληλεπίδρασης.....	45
B.1.1 Ligands .....	45
B.1.2 Ετεροκυκλικές ενώσεις - Αζωτοδότες.....	46
B.1.3 Διαλύτες – Αντιδραστήρια.....	46
B.1.4 Όργανα και πειραματικές διατάξεις.....	47
B.1.4.1 Επίλυση κρυσταλλικών δομών .....	47
B.1.4.2 Φάσματα υπέρυθρου (IR).....	47
B.1.4.3 Φάσματα UV-visible (UV-vis).....	48
B.1.4.5 Κυκλική βολταμμετρία.....	48
B.1.4.6 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( <sup>1</sup> H NMR).....	48
B.1.5 Μελέτες βιολογικής δράσης.....	49
B.1.5.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης ενώσεων με αλβουμίνες ορού αίματος ...	49
B.1.5.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με DNA.....	50
B.1.5.2.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA με φασματοσκοπία UV-vis.....	50
B.1.5.2.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA με ιξωδομετρία .....	51
B.1.5.2.3 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA με κυκλική βολταμμετρία.....	51
B.1.5.2.4 Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης των συμπλόκων με το βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide – EB) .....	51
B.2 Σύνθεση των συμπλόκων ενώσεων.....	53
B.2.1 Σύνθεση συμπλόκων χαλκού με το ΜΣΑΦ Loxoprofen .....	53
B.2.1.1 Σύνθεση του συμπλόκου [Cu <sub>2</sub> (Ioxo) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (I) .....	53
B.2.2 Σύνθεση συμπλόκων με το ΜΣΑΦ fenoprofen .....	53
B.2.2.1 Σύνθεση του συμπλόκου [Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ] (II).....	53
B.2.2.2 Σύνθεση του συμπλόκου [Zn(feno) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> ] (III).....	53
B.2.3 Σύνθεση συμπλόκων χαλκού με το ΜΣΑΦ Ibuprofen.....	53



B.2.3.1	Σύνθεση της πρόδρομης ένωσης [Cu(ibu) <sub>2</sub> ] .....	53
B.2.3.2	Σύνθεση του συμπλόκου [Cu(ibu) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] (IV).....	54
B.2.3.3	Σύνθεση του συμπλόκου [Cu(ibu) <sub>2</sub> (neoc)(H <sub>2</sub> O)] (VII).....	54
B.2.4	Σύνθεση συμπλόκων χαλκού με το ligand clonixin.....	54
B.2.4.1	Σύνθεση του συμπλόκου [Cu(clon) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> (EtOH) <sub>2</sub> ] (V) .....	54
B.2.4.2	Σύνθεση του συμπλόκου [Cu(clon) <sub>2</sub> (neoc)] (VI).....	54
B.3	Φυσικοχημικές τεχνικές μελέτης συμπλόκων .....	55
B.4	Φασματοσκοπική μελέτη των συμπλόκων I – VI.....	56
B.4.1	Μελέτη των συμπλόκων με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).....	56
B.4.2	Μελέτη συμπλόκων με φασματοσκοπία UV–vis .....	61
B.4.3	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( <sup>1</sup> H NMR) - [Zn(feno) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> ] (III) .....	64
B.5	Χαρακτηρισμός της δομής συμπλόκων .....	66
B.5.1	Κρυσταλλική δομή της ένωσης [Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ] (II).....	66
B.5.2	Κρυσταλλική δομή της ένωσης [Cu(ibu) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] (IV).....	67
B.5.3	Κρυσταλλική δομή της ένωσης [Cu(clon) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> (EtOH) <sub>2</sub> ] (V) .....	69
B.5.4	Κρυσταλλική δομή της ένωσης [Cu(ibu) <sub>2</sub> (neoc)(H <sub>2</sub> O)] (VII).....	71
B.5.5	Προτεινόμενη δομή της ένωσης [Cu <sub>2</sub> (Ioxo) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (I) .....	73
B.5.6	Προτεινόμενη δομή της ένωσης [Zn(feno) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> ] (III) .....	74
B.5.7	Προτεινόμενη δομή της ένωσης [Cu(clon) <sub>2</sub> (neoc)] (VI) .....	75
B.6	Αλληλεπίδραση συμπλόκων με το DNA .....	76
B.6.1	Γενικές πληροφορίες .....	76
B.6.1.1	Επίδραση των μεταλλικών ιόντων στη δομή και λειτουργία των νουκλεϊνικών οξέων .....	76
B.6.1.2	Σταθεροποίηση - Αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA.....	77
B.6.2	Μελέτες αλληλεπίδρασης συμπλόκων με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV–vis) .....	79
B.6.3	Μελέτες αλληλεπίδρασης συμπλόκων με ιξωδομετρία .....	83
B.6.5	Μελέτες κυκλικής βολταμμετρίας .....	85
B.6.4	Μελέτη ανταγωνιστικής δράσης μεταξύ των συμπλόκων και του αιθιδίου βρωμιδίου (EB).....	87
B.6.6	Συμπεράσματα .....	93
B.7	Μελέτες αλληλεπίδρασης συμπλόκων με τις αλβουμίνες ορού αίματος (HSA – BSA).....	94
B.7.1	Μελέτες αλληλεπίδρασης με BSA .....	95
B.7.2	Μελέτες αλληλεπίδρασης με HSA .....	100
B.8	Συμπεράσματα.....	105

<b>Βιβλιογραφία</b> .....	106
<b>Παράρτημα</b> .....	113
<b>Συντομογραφίες</b> .....	113
<b>Φάσματα IR – Ligands</b> .....	113
<b>Κρυσταλλογραφικά δεδομένα</b> .....	116

## **A. Θεωρητικό Μέρος**

## A.1 Χαλκός

### A.1.1 Εισαγωγή

Ο χαλκός είναι το ατομικό στοιχείο με σύμβολο Cu (προέρχεται από την λατινική ονομασία Cuprum) με ατομικό αριθμό 29. Ανήκει στην 4 περίοδο και στην 11<sup>η</sup> ομάδα του περιοδικού πίνακα. Είναι ένα μαλακό και εύπλαστο μέταλλο, με μεγάλη ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα. Αποτελεί ένα από τα ελάχιστα μέταλλα που εντοπίζονται στην φύση σε μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας, για αυτό η πρώτη χρήση του από τον άνθρωπο χρονολογείται από το 8000 π.Χ σε διάφορες περιοχές του κόσμου.



Εικόνα 1: Φυσικός χαλκός Jonathan Zander

Οι ενώσεις που απαντώνται συνήθως είναι άλατα χαλκού (II), τα οποία συχνά προσδίδουν μπλε ή πράσινα χρώματα σε ορυκτά όπως ο αζουρίτης, ο μαλαχίτης, και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως και ιστορικά ως χρωστικές. Ο χαλκός που χρησιμοποιείται σε κτίρια, συνήθως για στέγες, οξειδώνεται για να σχηματίσει μια πράσινη βλάστηση. Ο χαλκός χρησιμοποιείται μερικές φορές στη διακοσμητική τέχνη, τόσο στη στοιχειακή του μορφή μετάλλου όσο και σε ενώσεις ως χρωστικές. Οι ενώσεις χαλκού χρησιμοποιούνται ως βακτηριοστατικοί παράγοντες, μυκητοκτόνα και συντηρητικά ξύλου<sup>1</sup>.

## A.1.2 Φυσιολογία του Χαλκού

Ο χαλκός είναι ένα βασικό ιχνοστοιχείο για τους ζωντανούς οργανισμούς, αφού λαμβάνει μέρος σε μία πληθώρα μεταβολικών διαδικασιών, στις οποίες περιλαμβάνονται η μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση, η αποτοξίνωση ελευθέρων ριζών, η σύνθεση νευροδιαβιβαστών, ο σχηματισμός χρωστικών, η σύνθεση συνδετικού ιστού και ο μεταβολισμός του σιδήρου. Στο ανθρώπινο σώμα ο χαλκός βρίσκεται σε σχετικά μεγάλες ποσότητες: σε έναν υγιή ενήλικα 70 kg περιέχονται περίπου 110 mgCu, το μεγαλύτερο μέρος εκ του οποίου (46 mg) εντοπίζεται στον σκελετό και στο μυελό των οστών, 26 mg σε σκελετικούς μυς, 10 mg στο ήπαρ, 8,8 mg στον εγκέφαλο και 6 mg στο αίμα<sup>23</sup>. Το μεγαλύτερο μέρος του χαλκού στο ανθρώπινο σώμα σε φυσιολογικές συνθήκες, είναι λειτουργικό, ως άτομα χαλκού που εμπλέκονται ως συμπαραγόντες σε οξειδοαναγωγικά ένζυμα. Από αυτά τα ένζυμα τα πιο γνωστά είναι η σερουλοπλασμίνη, η οξειδάση του κυτοχρώματος c και η σουπεροξειδικήδισμουτάση (ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο ικανό να αφαιρεί σουπεροξειδικές ρίζες από τους ιστούς. Ο χαλκός έχει και επιπλέον μη-ενζυματικές δράσεις όπως στην αγγειογένεση<sup>4</sup> ή τη νευρική μυελίνωση και τη δραστηριότητα της ενδορφίνης. Επίσης έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, γεγονός που φαίνεται από την παρουσία απομυελίνωσης και νευροεκφυλισμού σε ασθενής που πάσχουν από τη νόσο Menkes, την καλύτερα καταγεγραμμένη εκ γενετής ανεπάρκεια χαλκού στον άνθρωπο<sup>5</sup>. Ο χαλκός είναι απαραίτητος για την αντιγραφή και ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης καθώς και για την φυσιολογική ανάπτυξη. Το ενδιαφέρον σχετικά με το μεταβολισμό του χαλκού αυξήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1920, όταν εντοπίστηκε ο ρόλος του χαλκού στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Ο βασικός ρόλος του χαλκού στους ανθρώπους αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1956 σε μία μελέτη που αφορούσε υποσιτισμένα παιδιά με αναιμία ανθεκτική σε θεραπεία σιδήρου<sup>6</sup>. Περαιτέρω μελέτες επέτρεψαν έναν σαφή ορισμό των παθολογικών παρατηρήσεων που σχετίζονται με την ανεπάρκεια χαλκού κυρίως σε νεογννήτα. Ακόμα και εάν δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως όλοι οι μηχανισμοί ομοίωσης του χαλκού, έχει επιτευχθεί η κατανόηση της κινητικής του μεταβολισμού του χαλκού, περίπου 80 χρόνια μετά την ανακάλυψη του ρόλου του Cu στον ανθρώπινο μεταβολισμό. Η ημερήσια ανάγκη χαλκού ενός ενήλικα ανέρχεται σε 1 mg / ημέρα. Το νερό που προέρχεται από σωληνώσεις (στους οποίους γίνεται εκτεταμένη χρήση χαλκού) αποτελεί μία πολύ καλή πηγή χαλκού σε αντίθεση με τα μη-μολυσμένα γλυκά νερά που περιέχουν ελάχιστο ή καθόλου χαλκό. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) η επιτρεπτή τιμή χαλκού στο νερό για ανθρώπινη χρήση είναι 2 mg/L<sup>7</sup>. Οι κύριες διατροφικές πηγές χαλκού είναι η σοκολάτα, το ήπαρ ζωικής προέλευσης, όστρακα, πράσινα λαχανικά, αποξηραμένα φρούτα και οι ξηροί καρποί. Η βιοδιαθεσιμότητα του χαλκού είναι πολύ μεγαλύτερη στο κρέας από ό,τι στα λαχανικά. Η συγκέντρωση του χαλκού σε αυτά τα τρόφιμα κυμαίνεται μεταξύ 20 - 50 mg/kg, περίπου 500 φορές υψηλότερη από ό,τι στο ανθρώπινο γάλα. Η περιεκτικότητα χαλκού στο ανθρώπινο γάλα μειώνεται αισθητά (50%) μετά τον 4<sup>ο</sup> μήνα της γαλουχίας, και ένας παρατεταμένος θηλασμός μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια χαλκού<sup>8</sup>. Η συνιστώμενη διατροφική ποσότητα χαλκού σε παιδική ηλικία

είναι 80 μg/kg/day. Η βιοδιαθεσιμότητα του χαλκού εξαρτάται από 3 κύριους παράγοντες: την απορρόφηση από το γαστρεντερικό σωλήνα, τη μεταφορά στο αίμα και από την εξαγωγή του χαλκού από τα ηπατοκύτταρα από την κυκλοφορία του αίματος. Μία πληθώρα παραγόντων μπορεί να επηρεάσει τη βιοδιαθεσιμότητα: η γήρανση, το φύλο, καθώς και ορμονικοί παράγοντες<sup>910</sup>.

### A.1.3 Απορρόφηση και μεταφορά του χαλκού

Ο χαλκός απορροφάται στο στομάχι, στο δωδεκαδάκτυλο και στο λεπτό έντερο<sup>11</sup>. Από κλινικής άποψης, η απορρόφηση του χαλκού στον άνθρωπο συμβαίνει στον ειλέο. Η γαστρεντερική οδός δε λαμβάνει μόνο 1 mg χαλκού ανά ημέρα από τη διατροφή<sup>12</sup>, αλλά απελευθερώνονται και υψηλές ποσότητες (~4.5 mg/ημέρα) μέσω του σιέλου, χολής, γαστρικών εκκρίσεων και μέσω αποπτωτικά εντερικά κύτταρα που ρέουν από τον εντερικό βλεννογόνο. Το πρώτο βήμα στην απορρόφηση του χαλκού είναι η πρόσληψη του μετάλλου που υπάρχει στη διατροφή από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί με τους οποίους ο χαλκός μεταφέρεται διαμέσου των εντερικών κυττάρων δεν είναι ακόμη πολύ γνωστοί. Η χημική “δομή” του χαλκού που περιέχεται στα λαχανικά ή στα ζωικά τρόφιμα αποτελεί βασικό παράγοντα στην απορρόφηση του χαλκού. Ενώ τα άλατα χαλκού (ανθρακικό, οξικό, θειικό και χλωριούχο) απορροφούνται ικανοποιητικά, τα οξειδία του χαλκού έχουν πολύ μικρότερη ικανότητα να διασχίσουν το εντερικό φράγμα<sup>13</sup>. Η επεξεργασία των τροφίμων επηρεάζει και αυτή την απορρόφηση του χαλκού: τα άλατα που χρησιμοποιούνται για την συντήρηση των τροφίμων μπορούν να μεταβάλλουν την διαλυτότητα του χαλκού που συνδέεται με τις πρωτεΐνες και την βιοδιαθεσιμότητά του. Το pH του εντέρου είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απορρόφηση του χαλκού καθώς ένα όξινο περιβάλλον είναι απαραίτητο για την απελευθέρωση ιόντων χαλκού από τα σύμπλοκα που σχηματίζονται στα τρόφιμα και στα εκκρίματα των βλεννογόνων<sup>14</sup>. Η ύπαρξη χηλικών παραγόντων στην διατροφή, όπως το κιτρικό οξύ ή το γαλακτικό οξύ, ευνοούν την απορρόφηση του χαλκού. Πολλά δισθενή κατιόντα δρουν ανταγωνιστικά στην απορρόφηση του χαλκού στο έντερο. Η ικανότητα του ψευδαργύρου στο να αποτρέπει την απορρόφηση του χαλκού παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε ποντικούς και μετέπειτα επιβεβαιώθηκε στους ανθρώπους: 3 mg ψευδαργύρου όταν προστίθενται στη διατροφή είναι αρκετά ώστε να προκαλέσουν έλλειψη χαλκού η οποία οδηγεί σε σοβαρή αναιμία και λευκοπενία. Ο ψευδάργυρος παρεμβαίνει στο μεταβολισμό του χαλκού, ενεργώντας σε διαφορετικά σημεία: μετατοπίζει το χαλκό από το συγκεκριμένο μεταφορέα στο εντερικά κύτταρα και αυξάνει την περιεκτικότητα σε μεταλλοθειονίνη στο εντερικό επιθήλιο, που εμποδίζει τη διακίνηση του χαλκού και ευνοεί την απώλεια στα κόπρανα μέσω της απόπτωσης των εντερικών κυττάρων<sup>15</sup>. Οι μοριακές οδοί με τις οποίες τα ιόντα χαλκού εισέρχονται στα εντερικά κύτταρα καθώς και οι βιοχημικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη χαλκού στη μεμβράνη πλάσματος των εντερικών κυττάρων σε θηλαστικά δεν είναι γνωστοί.

#### A.1.4 Αντλίες Χαλκού

Η σημαντικότερη αντλία χαλκού από τον εντερικό αυλό (intestinally) στα κύτταρα του εντέρου είναι ο μεταφορέας κατιόντων ανθρώπου τύπου 1 (hCTR1), μία πρωτεΐνη 190 αμινοξέων. Θεωρείται πως έχει τρεις διαμεμβρανικές περιοχές που υπάρχουν στην πλασματική μεμβράνη ως ομοτριμερές, και θεωρείται μια απαραίτητη πρωτεΐνη για την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη καθώς και για την εντερική πρόσληψη χαλκού<sup>16</sup>. Βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη των εντερικών κυττάρων και δρα ως ένας συμβατικός μεταφορέας που παρέχει ένα μονοπάτι διαπέρασης για τα ιόντα χαλκού. Ο hCTR1 μπορεί να εσωτερικευθεί παρουσία αυξημένων επιπέδων χαλκού και θεωρείται μεταφορέας χαλκού υψηλής συγγένειας: η δράση του εξαρτάται από τον χρόνο, είναι κορεσμένος και διεγείρεται από εξωκυτταρικό όξινο pH και υψηλές συγκεντρώσεις καλίου<sup>15</sup>.

Πειραματικά αποτελέσματα σε κύτταρα Caco-2 έδειξαν πρόσφατα ότι η βασοπρωστατική πρόσληψη χαλκού υπερβαίνει κατά πολύ εκείνη των εντερικών κυττάρων. Στην ίδια μελέτη δίδονται αποδείξεις του hCTR1 βασοπρωστατικού εντοπισμού σε κύτταρα T84, ένα κοινό μοντέλο για εντερικά κρυπτοκύτταρα. Η βασοπρωστατική μεταφορά διαμεσολαβείται από τον hCTR1. Ο ρόλος του hCTR1 ως ο κύριος παράγοντας που οδηγεί στην απορρόφηση του εντερικού χαλκού στα θηλαστικά, έχει παρουσιαστεί σε ποντίκια CTR1 όπου εμφανίζονται σοβαρά ελαττώματα ανάπτυξης και βιωσιμότητας, συστηματική ανεπάρκεια χαλκού, υπερφόρτωση σιδήρου, καρδιακή υπερτροφία και σοβαρό έλλειμμα ανάπτυξης λόγω παρεμπόδισης της εντερικής απορρόφησης του χαλκού<sup>17</sup>.

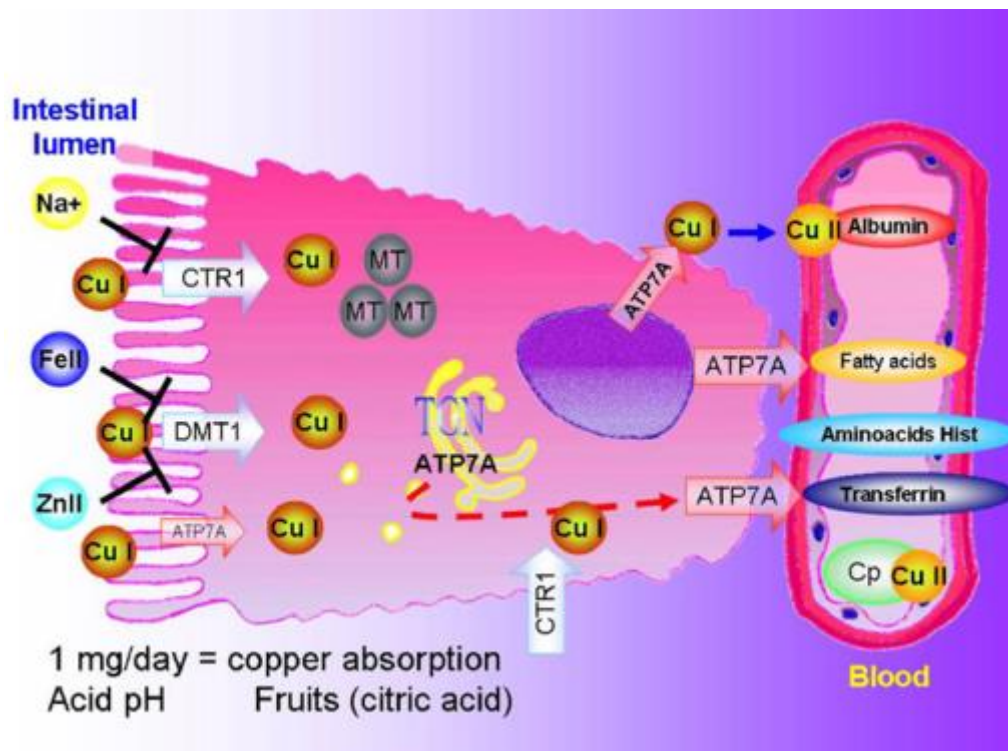
Η παρουσία μιας αυξημένης ενδοαυλικής μεταβαλλόμενης περιεκτικότητας σε νάτριο διεγείρει την CTR1-μεσολαβούμενη απορρόφηση χαλκού από εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, αυξάνοντας τη συγκέντρωση  $H^+$ . Η έκφραση του CTR1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού υποδηλώνει ότι ο χαλκός θα μπορούσε να μεταφερθεί από το πλάσμα στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω του CTR1<sup>17</sup>. Ένας ρόλος στη μεταφορά κορυφής  $Cu(I)$  στα εντερικά κύτταρα πιθανόν οφείλεται στον DMT1 (dication metal transporter 1), γνωστός και ως Nramp 2 ή DCT1. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα δείχνουν πως ο DMT1 είναι φυσιολογικός φορέας  $Cu(I)$  σε εντερικά κύτταρα και υποδεικνύει ότι η εντερική απορρόφηση των  $Cu(I)$  και  $Fe(II)$  είναι συνυφασμένη<sup>18</sup>.

Η χορήγηση χαλκού σε κυτταροκαλλιέργεια Caco-2 είναι ικανή να ρυθμίζει την έκφραση του DMT1 καθώς και της έκφρασης της σιδηροξεδάσης (HEPH) και του μεταφορέα σιδήρου ferritin-1 (Fpn1). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν τον σημαντικό ρόλο του χαλκού στη διαμόρφωση της πρόσληψης του σιδήρου από τα εντερικά κύτταρα. Η μειωμένη απορρόφηση χαλκού σε ποντικούς, εξαιτίας της εισαγωγής  $Fe(II)$  στη διατροφή, οδηγεί στην υπόθεση πως υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ του χαλκού και του σιδήρου στον ίδιο μεταφορέα. Οι μοριακές βάσεις για τα δεδομένα αυτά αποσαφηνίστηκαν πρόσφατα με την απόδειξη ότι ο χαλκός θα μπορούσε να ανταγωνιστεί τον σίδηρο για πρόσληψη μέσω του DMT1. Αυτός ο

ανταγωνισμός χαλκού-σιδήρου επαληθεύει την κατάσταση του χαλκού σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνια αναιμία και σε γυναίκες με υποσιδηραιμία κατά τη διάρκεια της κύησης, στις οποίες ο σίδηρος εισέρχεται ως θεραπευτικός παράγοντας σε ασυνήθιστα υψηλές ποσότητες. Η πρόσληψη χαλκού στον εντερικό αυλό μέσω του DMT1 έχει δείχθει ότι είναι επίσης ευαίσθητη στο pH. Ένας πιθανός ρόλος του ATP7A στη ρύθμιση της απορρόφησης χαλκού από τα εντερικά κύτταρα εγείρει διάφορες ερωτήσεις σχετικά με τη συμπεριφορά του στο εντερικό επιθήλιο<sup>19</sup>. Σε αρουραίους, η στέρωση σιδήρου οδηγεί σε ισχυρή επαγωγή του γονιδίου ATP7A στο δωδεκαδακτυλικό επιθήλιο, ακολουθούμενη από σημαντική υπερφόρτωση χαλκού στο ήπαρ και στο έντερο, γεγονός που υποδηλώνει αύξηση της μεταφοράς εντερικού χαλκού κατά τη διάρκεια της έλλειψης σιδήρου.

### A.1.5 Ο Χαλκός στο αίμα

Ταιόντατουχαλκού, κατάτηνείσοδοστοαιμοστατικάίμα, δεσμεύονταιαμέσωςαπό τους δύοκύριουςφορείςχαλκούκατά την πορεία τους από το έντερο προς το συκώτι: την αλβουμίνη, την πλέον άφθονη πρωτεΐνη πλάσματος και την **τρανσκουπρεΐνη (transcuprein)**<sup>20</sup>. Ο χαλκός μπορεί ακόμη και να συνδέεται με διαφορετικά αμινοξέα, πεπτίδια και λιπαρά οξέα, αλλά πολλές ενδείξεις υποδεικνύουν ότι αυτά τα σύμπλοκα δεν σχετίζονται με τις φυσιολογικές συνθήκες.



Σχήμα 1: Απορρόφηση χαλκού από εντερικά κύτταρα στον εντερικό αυλό.



Η αλβουμίνη ανθρώπινου ορού είναι μια πολύπλευρη πρωτεΐνη-φορέας, η οποία εκτός από λιπαρά οξέα, βιταμίνες, ορμόνες, ξενοβιοτικά μεταφέρει επίσης μεταλλικά ιόντα όπως Cu(II), Ca(II), Zn(II), Co(II) και Cd(II)<sup>21</sup>. Οι μεταβολικές αλλαγές της αλβουμίνης κατά την επαφή με τις κυτταρικές επιφάνειες δίνουν την προέλευση σε δύο υποπληθυσμούς που χαρακτηρίζονται από διαφορετική συγγένεια με τις κυτταρικές επιφάνειες. Η αλβουμίνη θεωρείται ο κυριότερος συνδέτης του ανταλλάξιμου χαλκού στο ανθρώπινο πλάσμα, συνδεόμενη περίπου με το 17% του χαλκού χάρη στη μεγάλη συγγένειά της με τον Cu(II) της αλληλουχίας Asp-Ala (Thr) - His στο αμινοτελικό άκρο. Ένα δεύτερο σημείο πρόσδεσης, ιδιαίτερα διατηρημένο κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, που περιέχει δύο / τρεις ιμιδαζολικές και μία / δύο καρβοξυλικές ομάδες συναρμοσμένες, δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά χαλκού (1% μη χαλκού πλάσματος χωρίς σερουλοπλασμίνη), αλλά και για άλλα δισθενή κατιόντα (Zn, Ni, Cd). Ο δεσμευμένος με αλβουμίνη Cu(II) ανάγεται ταχέως από ασκορβικό σε Cu(I)-αλβουμίνη, που επανοξειδώνεται από μοριακό οξυγόνο. Η δραστηριότητα οξειδοαναγωγής του δεσμευμένου με αλβουμίνη χαλκού ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες ως εξής:

- Λόγος Cu / αλβουμίνης <1: 1, ο χαλκός είναι ουσιαστικά οξειδοαναγωγικά ανενεργός όσο η κυστεΐνη-34 είναι σε ανηγμένη κατάσταση.
- η σύνδεση με λιπαρά οξέα διευκολύνει την οξείδωση κυστεΐνης και μετατρέπεται το σύμπλοκο χαλκού-αλβουμίνης από αντιοξειδωτικά σε προ-οξειδωτικά.<sup>22</sup>

Η συναρμογή Cu(II) προκαλεί αλλαγές διαμόρφωσης κοντά στη θέση δέσμευσης μετάλλων της ανθρώπινης αλβουμίνης. Η αλβουμίνη που υπάρχει στο ανθρώπινο πλάσμα μπορεί να δεσμεύσει έως και 40 μgCu(II) / mL, παρόλο που στην πραγματικότητα δεσμεύει μόνο 180ng Cu(II) / mL. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση της ύπαρξης άλλων συστατικών πλάσματος με συγγένεια για χαλκό υψηλότερη από την αλβουμίνη, όπως οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με την τρανσκουπρεΐνη ή κάποια συγκεκριμένα πεπτιδία. Η παρατήρηση ότι οι αναλβουμιναιμικοί αρουραίοι δεν παρουσιάζουν σχετικές αλλαγές στην κατανομή του διαιτητικού χαλκού στο ήπαρ υποστηρίζει αυτή την υπόθεση. Από την άλλη πλευρά, η παρουσία ακόρεστων θέσεων πρόσδεσης χαλκού στην αλβουμίνη μπορεί να προσφέρει κάποια προστασία από την αιφνίδια απελευθέρωση ιόντων χαλκού στο αίμα που προκαλούν οξεία ενδοαγγειακή αιμόλυση, όπως παρατηρήθηκε σε ασθενείς με νόσο <sup>23</sup>.

Ορισμένα αμινοξέα έχουν μικρό ρόλο στη μεταφορά χαλκού στο αίμα και ένα μικρό ποσοστό Cu στο ανθρώπινο πλάσμα βρίσκεται ως σύμπλοκο με ιστιδίνη ή ως τριμερές σύμπλοκο CuAlbHis. Μια μελέτη σχετικά με την κατανομή ιόντων χαλκού μεταξύ ανθρώπινης αλβουμίνης και τρανσφερρίνης, η οποία έχει δύο θέσεις δέσμευσης για το Cu(II), έδειξε ότι η τρανσφερρίνη δεσμεύει χαλκό πιο έντονα από την αλβουμίνη<sup>24</sup>. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μεταφοράς, σε σχέση με την αλβουμίνη στο ανθρώπινο αίμα, εμποδίζουν τον ανταγωνισμό της αλβουμίνης για τα δισθενή ιόντα χαλκού που δε δεσμεύονται από τη σερουπλασμίνη. Παρόλα αυτά, μπορούμε να υποθέσουμε ότι, απουσία αλβουμίνης, η τρανσφερρίνη θα μπορούσε να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά Cu(II) στο πλάσμα.

### A.1.6 Πρόσληψη χαλκού από τα ηπατοκύτταρα

Τα ιόντα Cu(II) εισέρχονται στα ερυθρά κύτταρα των θηλαστικών μέσω του μονοπατιού ανταλλαγής ανιόντων με την μορφή αρνητικά φορτισμένων συμπλοκών ενώσεων με χλωριούχα και ανθρακικά άλατα<sup>25</sup>. Τα ιόντα Cu(II) ανάγονται σε ιόντα Cu(I) στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, πιθανώς από μια σουλφυδρυλική ομάδα εντοπισμένη στην εξωτερική πλευρά. Η πρόσληψη χαλκού κατά μήκος της μεμβράνης των ηπατοκυττάρων πραγματοποιείται στον ημιτονοειδές πόλο, όπου φτάνει δεσμευμένος στην αλβουμίνη ως Cu(II)<sup>26</sup>. Ασχέτως του υποστρώματος στο οποίο πραγματοποιείται η πρόσληψη των ιόντων χαλκού, τα ηπατοκύτταρα πρέπει να αφαιρέσουν τα ιόντα χαλκού από υψηλής σταθερότητας σύμπλοκά του με την αλβουμίνη, ιστιδίνη και πρωτεϊνών παρόμοιες με την τρανσκουπρεΐνη. Η διαδικασία πρόσληψης χαλκού από τα ηπατοκύτταρα πιθανώς ξεκινάει με την δέσμευση του χαλκού ως τριμερές σύμπλοκο CuHisAlb ή ως σύμπλοκο CuHis<sub>2</sub>, με την αναγωγή του από ιόντα Cu(II) σε ιόντα Cu(I) από την οξειδάση NADH στη μεμβράνη του πλάσματος<sup>27</sup>. Έχει υπολογισθεί ότι για κάθε μόριο NADH που οξειδώνεται μεταφέρεται ένα ιόντα χαλκού. Η πρόσληψη χαλκού στα ηπατοκύτταρα διεγείρεται από τον αναγωγικό παράγοντα βιταμίνη C, που πιθανώς επιταχύνει την αναγωγή του χαλκού<sup>28</sup>.

Η οξειδάση NADH μειώνει τόσο το Cu(II) όσο και το Fe(III): αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί τα αυξημένα επίπεδα σιδήρου στα ηπατοκύτταρα μπορούν να σταματήσουν την πρόσληψη χαλκού, ίσως με τη μείωση της δραστηριότητας της μεταλλοαναγωγάσης στη μεμβράνη του πλάσματος. Η αναγωγή του χαλκού κατά τη διέλευσή του στον ημιτονοειδή αυλό μειώνει τη σταθερότητα των συμπλοκών, απελευθερώνοντας άτομα χαλκού και επιτρέποντας την πρόσληψή τους από ηπατοκύτταρα. Λίγα είναι γνωστά για τα μόρια και τους βιοχημικούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη χαλκού στη μεμβράνη πλάσματος των ηπατοκυττάρων στα θηλαστικά. Νέες γνώσεις σχετικά με το μεταβολισμό χαλκού θηλαστικών έχουν αποκτηθεί με την ταυτοποίηση της οικογένειας γονιδίων SLC31<sup>29</sup>.

Υπάρχουν τουλάχιστον δύο μέλη της οικογένειας γονιδίων SLC31, τα ανθρώπινα γονίδια μεταφορέων κατιόντων (hCTR1) και hCTR2. Ο κατιονικός μεταφορέας 1 (CTR1) είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη μεταφοράς χαλκού υψηλής συγγένειας, διατηρημένη από ζυμομύκητες στον άνθρωπο, η οποία μεσολαβεί στη φυσιολογική πρόσληψη του Cu(I) από το εξωκυττάριο περιβάλλον, μετά από αναγωγή του Cu(II) από μια μεταλλοαναγωγάση της κυτταρικής επιφάνειας<sup>30</sup>. Ο CTR1 δεσμεύει τέσσερα ιόντα Cu(I) ως πολυπυρηνικώνθειολικών συμπλόκων Cu(I)<sup>31</sup>. Ο hCTR1 είναι ένα συστατικό του μηχανισμού μεταφοράς χαλκού στη μεμβράνη των ηπατικών κυττάρων, ο οποίος μεταφέρει χαλκό διαμέσου της μεμβράνης πλάσματος με υψηλή συγγένεια με ένα χρονοεξαρτώμενο κορεσμένο και ενεργειακά ανεξάρτητο τρόπο<sup>15</sup>.

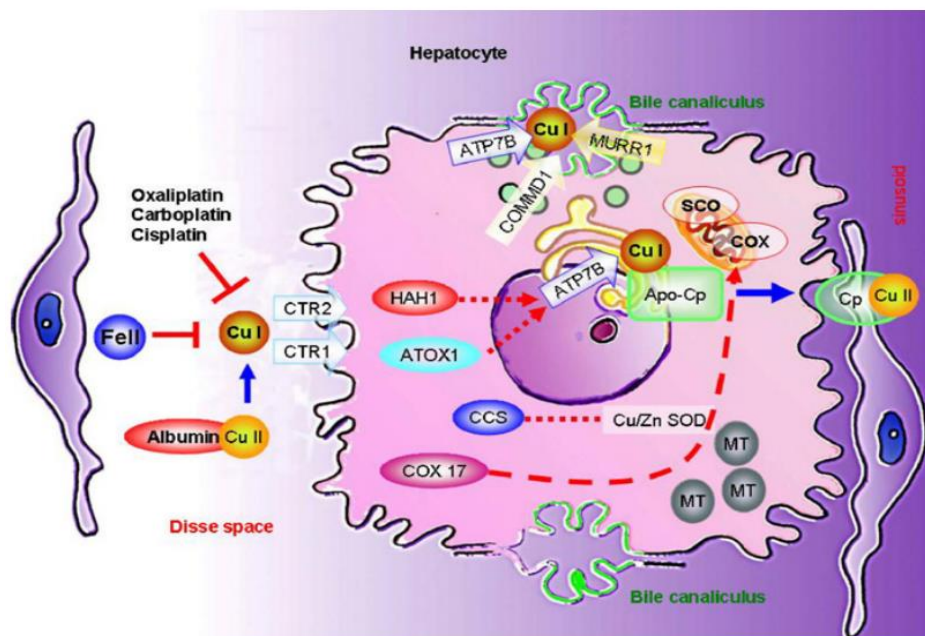
Δύο πλούσιες σε μεθειονίνη περιοχές του hCTR1 ρυθμίζουν την ενδοκυττάρωση που οφείλεται στο χαλκό. Η ανταπόκριση σε χαμηλές συγκεντρώσεις χαλκού απαιτεί τον τερματικό πυρήνα αμινοξέων μεθειονίνης M<sub>4</sub>M<sub>4</sub>M<sub>4</sub>M<sub>4</sub>, ενώ η διαμεμβρανική αλληλουχία M<sub>4</sub>X<sub>4</sub>X<sub>4</sub>M απαιτείται για την ενδοκυτταρική ανταπόκριση σε υψηλές συγκεντρώσεις<sup>32</sup>. Σε *in vitro* συνθήκες υπερβολικής συγκέντρωσης χαλκού

ο CTR1 μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου άμεσα μέσω ενδοκύτωσης και αποικοδομείται από τις κενοτοπικές πρωτεάσες<sup>33</sup>.

Ο CTR1 δεν είναι εξειδικευμένος μόνο προς τον χαλκό: μπορεί να διευκολύνει τη μεταφορά άλλων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των τριών αντικαρκινικών φαρμάκων με βάση το λευκόχρυσο, cisplatin, carboplatin και oxaliplatin<sup>34</sup>.

Ο ρόλος του hCTR2 παραμένει άγνωστος παρόλο που εκφράζεται σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς που έχουν μελετηθεί<sup>35</sup>. Στους σακχαρομύκητες ο CTR2 εντοπίζεται στη μεμβράνη όπου κινητοποιεί αποθήκες χαλκού προς το κυτταρόπλασμα. Μία μελέτη πάνω στον ανοσοεντοπισμό του CTR2 σε διαφορετικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές υποδεικνύει τον εντοπισμό του σε όψιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα, με πιθανό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του χαλκού, διεγείροντας την μεταφορά χαλκού στο κυτταρόπλασμα<sup>36</sup>.

Μελέτες σχετικές με νεφρικά κύτταρα δείχνουν ότι ο CTR2 εντοπίζεται στη μεμβράνη του πλάσματος, όπου προάγει την πρόσληψη χαλκού και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών επιπέδων χαλκού. Ο χαλκός που εισάγεται από την κυτταρική μεμβράνη μέσω του CTR1 δεσμεύεται γρήγορα σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες φορείς που μεταφέρουν ιόντα χαλκού σε συγκεκριμένες θέσεις εντός του κυττάρου. Ο μοριακός συνοδός (στον άνθρωπο) χαλκού HAH1 παίζει ουσιαστικό ρόλο στην μεταφορά του χαλκού στην εκκρινική οδό του κυττάρου και αλληλεπιδρά απευθείας με το ATP7B στο ήπαρ και με το ATP7A σε άλλα κύτταρα όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 2**<sup>37</sup>.



Σχήμα 2: Μεταφορά χαλκού σε ηπατοκύτταρα.

Ο Atox1 έχει αποδειχθεί ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στην ομοιόσταση του χαλκού, καθώς και στην παράδοση ιόντων χαλκού σε ATPάσες τύπου P που έχουν μετατοπιστεί στο δίκτυο δια-Γκόλτζι. Ο COX-17, ένας μιτοχονδριακός μοριακός

συνοδός χαλκού, είναι η μόνη μέχρι σήμερα γνωστή πρωτεΐνη που εμφανίζει σημαντική ομολογία πρωτογενούς αλληλουχίας με τις μεταλλοθειονίνες<sup>38</sup>. Είναι ένας βασικός δότης χαλκού στα μιτοχόνδρια και συνεργάζεται με τρεις άλλους μοριακούς συνοδούς χαλκού, Sco1, COX-11 και COX-2 για την παράδοση ιόντων χαλκού στην κυτοχρωμική οξειδάση<sup>39</sup>. Αυτοί οι μεταλλο-μοριακοί συνοδοί χρησιμοποιούν μία δεξαμενή χαλκού που εμπεριέχεται στην μιτοχονδριακή μήτρα<sup>40</sup>.

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα για τον ανθρώπινο SCO1 και SCO2 υποδηλώνουν ότι και οι δύο πρωτεΐνες θα μπορούσαν να δρουν όχι μόνο ως μοριακοί μεταφορείς χαλκού για τη νοξειδάση του κυτοχρώματος, αλλά μάλλον ως ανιχνευτές μιτοχονδριακών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων Έχει προταθεί ένα μοντέλο για τον ανθρώπινο SCO, στο οποίο ο COX-17 παρέχει χαλκό στον SCO2, ο οποίος το μεταφέρει απευθείας στο COX, ενώ η αντίδραση διευκολύνεται από τον SCO2 Οι SCO1 και SCO2 θα μπορούσαν επίσης να διαδραματίσουν επιπλέον ρόλους στην κυτταρική ομοίωση του χαλκού, πιθανώς ως συστατικά ενός μιτοχονδριακού μονοπατιού στο οποίο και οι δύο πρωτεΐνες θα μπορούσαν να δρουν ως αισθητήρες της ενδοκυτταρικής κατάστασης χαλκού, ίσως από τις οξειδοαναγωγικές θειόλες ή τις θέσεις δέσμησης μετάλλων.

Τα μιτοχόνδρια θα μπορούσαν επίσης να λειτουργήσουν ως αποθήκες χαλκού, αποθηκεύοντας ιόντα χαλκού μέσω της σερουλοπλασμίνης και της μεταλλοθειονίνης, και μεταφέροντας χαλκό στο δίκτυο δια-Γκόλτζι και στις εκκριτικές οδούς όταν συσσωρεύεται μεγάλη ποσότητα χαλκού μέσα στο κύτταρο<sup>41</sup>. Ο μοριακός συνοδός χαλκού CCS ενεργοποιεί το βασικό αντιοξειδωτικό ένζυμο SOD με άμεση εισαγωγή χαλκού και πιθανώς προστατεύει τα μεταλλικά ιόντα από τη δέσμηση σε ελεύθερους ενδοκυτταρικούς δεσμευτές χαλκού. Ο CCS1 είναι μοριακός συνοδός, απαραίτητος για την παροχή Cu(I) στην Cu/Zn-σουλπεροξειδική δισμουτάση 1 (SOD1) εντός των μιτοχονδρίων στον χώρο μεταξύ των μεμβρανών<sup>42</sup>.

Η SOD1 των θηλαστικών μπορεί να προσλάβει ιόντα χαλκού ακόμη και μέσω εναλλακτικού μονοπατιού ενεργοποίησης ανεξάρτητου από CCS, η οποία περιλαμβάνει την ανηγμένη μορφή γλουταθειονίνης ή GSH. Έχουν αναφερθεί αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο στα ηπατικά κύτταρα της μεταλλοθειονίνης (MT), μιας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης πλούσιας σε κυστεΐνη, εντοπισμένη στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, που συνδέονται ισχυρά με τον χαλκό καθώς και με άλλα μεταλλικά ιόντα. Οι μεταλλοθειονίνες δεσμεύοντας τα μεταλλικά ιόντα μέσω των πλούσιων σε κυστεΐνη άλφα και βήτα περιοχών τους, ενεργούν ως αντιοξειδωτικά, προστατεύουν τα ηπατοκύτταρα και άλλα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου του δωδεκαδακτυλικού και του νεφρικού επιθηλίου, από πιθανή περίσσεια χαλκού που μπορεί να είναι τοξική<sup>43</sup>. Στον αντίποδα κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, η προστασία των μεταλλοθειονίων μπορεί μετριαστεί ή και ένα εξαφανιστεί, ενώ παράλληλα οι μεθειονίνες απελευθερώνουν χαλκό ενισχύοντας τον σχηματισμό ROS που συνεισφέρουν στην δημιουργία κυτταρικής βλάβης.

### A.1.7 ΑΤΡάσες ATP7A & ATP7B

Δύο ΑΤΡάσες τύπου P, η ATP7A και ATP7B, είναι κομβικά μόρια για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του χαλκού στα θηλαστικά. Στο ήπαρ βλέπουμε πως έχουν διπλό ρόλο: όταν βρίσκονται στο δίκτυο δια-Γκόλτζι παρέχουν ιόντα χαλκού απαραίτητα στα ένζυμα που χρειάζονται χαλκό, ενώ σε συνθήκες υψηλών συγκεντρώσεων pH, η ATP7A και ATP7B εντοπίζουν αυτές τις υψηλές συγκεντρώσεις και μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη για να απομακρύνουν την περίσσεια του ενδοκυτταρικού χαλκού<sup>44</sup>. Στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, ο μεταφορέας χαλκού ATP7B βρίσκεται δίκτυο δια-Γκόλτζι όταν οι εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις χαλκού είναι χαμηλές (μικρότερες το 1μmol/L) και τις αναδιανέμει. Προσδιορίστηκε πρόσφατα ένας νέος ενδοκυτταρικός μεταφορέας του ATP7B: είναι η πρωτεΐνη τύπου C της νόσου Niemann-Pick (NPC1), μια πρωτεΐνη όψιμου ενδοσώματος που ρυθμίζει την κυκλοφορία των ενδοκυτταρικών κυστιδίων του ATP7B<sup>45</sup>.

Μια πρόσφατη μελέτη σχετικά με τον ανοσολογικό εντοπισμό ATP7B σε κύτταρα ηπατώματος (HepG2) αποδεικνύει πως ο τελευταίος προορισμός μεταφοράς της ATP7B είναι ένα παρακεντρικό κυψελιδώδες διαμέρισμα. Η ATP7B θα μπορούσε λοιπόν, να είναι υπεύθυνη για τη συσσώρευση χαλκού στα κυστίδια, τα οποία στη συνέχεια υφίστανται εξωκυττάρωση, απελευθερώνοντας περίσσεια χαλκού σε όλη τη πλασματική μεμβράνη. Ο τελικός προορισμός της ATP7B στα ηπατοκύτταρα κατά τη μεταφορά χαλκού βρίσκεται ακόμα υπό συζήτηση. Παρόλο που η μετατόπιση ATP7B διατηρείται μεταξύ μη ηπατικών κυτταρικών σειρών, δεν έχει εντοπιστεί κάποια αλληλεξαρτώμενη μετατόπιση με το MURR1 / COMMD1, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μετατόπιση του ATP7B θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ανεξάρτητα. Η ATP7B μεταφέρει χαλκό σε κύτταρα βαθμιδωτά: για να εισέλθουν σε αυτό το μονοπάτι μεταφοράς, τα ιόντα του χαλκού πρέπει να αναχθούν, καθώς η ATP7B μεταφέρει ιόντα Cu(I) ή σύμπλοκαιστίνης-Cu(I). Η αυξημένη έκφραση των γονιδίων ATP7A και ATP7B παρατηρήθηκε πρόσφατα σε ορισμένα δείγματα καρκίνου του ανθρώπου και μπορεί να σχετίζεται με ογκογένεση και αντοχή στη χημειοθεραπεία<sup>46</sup>. Σε κύτταρα νευροβλαστώματος, η έκφραση της ATP7A έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται από τον υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος β και επηρεάζει τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού χαλκού, αποκαλύπτοντας μια σύνδεση μεταξύ της αντικαρκινικής δράσης των ρετινοειδών και του μεταβολισμού του χαλκού<sup>47</sup>. Η σταθερότητα της ATP7B ρυθμίζεται εν μέρει από την COMMD1 (MURR1), πρωτεΐνη που απουσιάζει στα τεριέBedlington, ζωικά μοντέλα για την τοξικότητα του χαλκού. Η COMMD1 ασκεί το ρυθμιστικό της ρόλο στην ομοιόσταση του χαλκού, μέσω της αλληλεπίδρασης με τη νεοσυσταθείσα ATP7B και μειώνοντας τη σταθερότητά της. Η COMMD1 δεσμεύει επιλεκτικά τον Cu (II) και μπορεί να συνεργαστεί με την ATP7B για να διευκολύνει την απέκκριση χολικού χαλκού. Η γλουταρεδοξίνη (GRX1) έχει επίσης προταθεί ως βασικός παράγοντας για τη λειτουργία της ATP7A και ATP7B. καταλύει την αναγωγή των δισουλφιδικών γεφυρών και μπορεί να αντιστρέψει τη γλουταθειονυλίωση των υπολειμμάτων κυστεΐνης εντός των έξι μοτίβων δέσμευσης χαλκού MXCXXC, διευκολύνοντας τη σύνδεση χαλκού για μεταγενέστερη μεταφορά<sup>48</sup>. Η λειτουργία της ATP7B σε ιστούς διαφορετικούς από το συκώτι είναι

ασαφής. Ο ρόλος της ATP7A στη φυσιολογία του χαλκού έχει μελετηθεί καλά σε διαγονιδιακά ποντίκια πέρα από την έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Menkes. Η πρωτεΐνη υπερκεφράζεται στην καρδιά, τους λείους μυς του πνεύμονα, τα περιφερικά σωληνάρια του νεφρού, τα εντερικά κύτταρα, τα ηπατοκύτταρα, καθώς και στον ιππόκαμπο, την παρεγκεφαλίδα και το χοριοειδές πλέγμα του εγκεφάλου. Σε ποντίκια που εκφράζουν την ανθρώπινη ATP7A, η συγκέντρωση χαλκού μειώθηκε στους περισσότερους ιστούς, ιδιαίτερα στην καρδιά και στον εγκέφαλο, υποδηλώνοντας σχετικό ρόλο της ATP7A στην εκροή χαλκού από κύτταρα και ιστούς.<sup>49</sup>

### **A.1.8 Κατανομή χαλκού σε περιφερειακούς ιστούς**

Δυστυχώς οι γνώσεις που έχουμε σχετικά με τα μόρια που εμπλέκονται στην κατανομή χαλκού σε περιφερειακούς ιστούς είναι πολύ χαμηλές. Η σερουλοπλασμίνη θεωρείται εδώ και πολύ καιρό ως ο κύριος μεταφορέας χαλκού στους περιφερειακούς ιστούς, και ο ρόλος της στην μεταφορά του χαλκού έχει αναφερθεί επίσης πρόσφατα.<sup>50</sup>

Ο χαλκός που μεταφέρεται στο δίκτυο δια-Γκόλτζι μεταφέρεται στη συσκευή Golgi μέσω του ATP7B και στη συνέχεια ενσωματώνεται στη σερουλοπλασμίνη σε κυστίδια που διασχίζουν τη μεμβράνη πλάσματος και απελευθερώνουν στο πλάσμα το χαλκό που ήταν συνδεδεμένος στη σερουλοπλασμίνη. Η σύνθεση της σερουλοπλασμίνης απαιτεί Cu(II), και έτσι ο Cu(I) οξειδώνεται σε κάποιο στάδιο πριν την ενσωμάτωσή του στην πρωτεΐνη<sup>49</sup>. Τα κανάλια εντός του ηπατοκυτταρικού χλωριδίου εμπλέκονται στο μεταβολισμό του χαλκού, προωθώντας την ενσωμάτωση του χαλκού στη σερουλοπλασμίνη, πιθανώς βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα της ATP7B, αν και πολλοί ερευνητές θεωρούν ότι αυτή η πρωτεΐνη δεν έχει κάποιο σημαντικό ρόλο στη μεταφορά ή στο μεταβολισμό του χαλκού<sup>50</sup>

### **A.1.9 Κατανομή χαλκού στον εγκέφαλο**

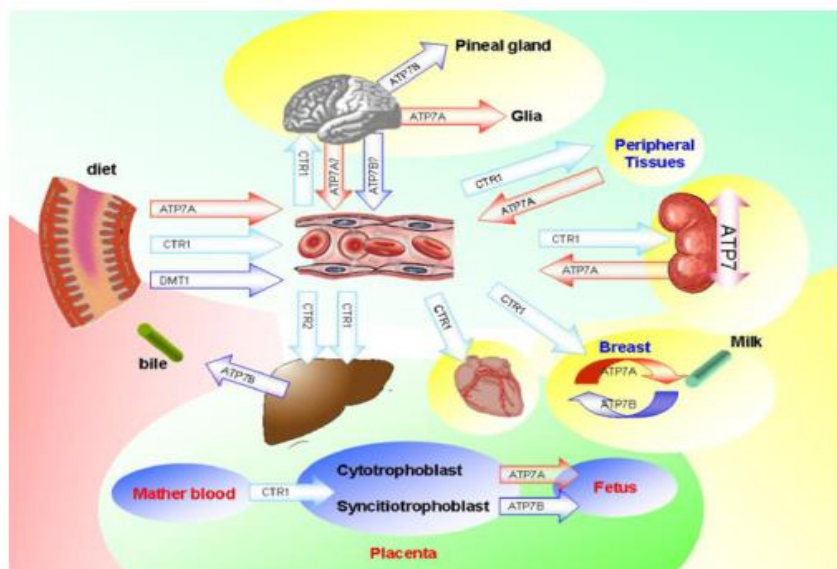
Ο μηχανισμός της μεταφοράς του χαλκού στον εγκέφαλο δεν είναι σαφής. Η έκφραση των μεταφορέων χαλκού φαίνεται να είναι υψηλότερη στα εγκεφαλικά φράγματα παρά στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Το παραπάνω γεγονός έχει ως αποτέλεσμα τη διαπέραση του αιματοεγκεφαλικού φράγματος κυρίως από ελεύθερα ιόντα χαλκού. Νέες λειτουργίες της σερουλοπλασμίνης έχουν προταθεί όσον αφορά το κεντρικό νευρικό σύστημα, όπου η πρωτεΐνη θα μπορούσε να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στις νευροπαθολογικές καταστάσεις διεγείροντας διάφορα νευροτοξικά μόρια, συμπεριλαμβανομένου του νιτρικού οξειδίου (NO) σε μικρογλοιακά κύτταρα.<sup>51</sup>

Η συσχέτιση της σερουλοπλασμίνης στο μεταβολισμό των κατεχολαμινών αποδεικνύεται από την παρατήρηση ότι η χαμηλότερη περιεκτικότητα σερουλοπλασμίνης στον ορό παρατηρείται στις πιο σοβαρές νευρολογικές μορφές

της νόσου Wilson. Ο CTR1 είναι ίσως ο πιο σημαντικός παράγοντας που μεσολαβεί στην πρόσληψη χαλκού στη συντριπτική πλειονότητα των περιφερικών ιστών, συμπεριλαμβανομένων του εγκεφάλου, των σωληνοειδών κυττάρων του νεφρικού φλοιού, του χοριοειδούς πλέγματος, της καρδιάς, των σπερματοζωαρίων, του επιθηλίου του αγωγού του μαστού και του αμφιβληστροειδούς.<sup>52</sup>

### **A.1.10 Χαλκός και πλακούντας**

Ο χαλκός έχει σημαντική επιρροή στη φυσιολογική αναπαραγωγή των γυναικών και την ανάπτυξη του εμβρύου.<sup>53</sup> Ο πλακούντας μπορεί να θεωρηθεί βασικό όργανο στην παροχή χαλκού στο έμβρυο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ως ένα από τα λίγα όργανα του ανθρώπινου σώματος που εκφράζεται τόσο η ATP7A όσο και η ATP7B, οι οποίες έχουν διαφορετικές λειτουργίες στη μεταφορά χαλκού. Στον ανθρώπινο πλακούντα, η ATP7A εντοπίζεται στον κυτταροτροφόβλαστο, στον κυτταροτροφοβλάστη και στα εμβρυϊκά ενδοθηλιακά κύτταρα του εμβρύου, ενώ η ανοσοεντοπισμός ATP7B περιορίζεται στον συγκυτταροτροφικό βλάστη<sup>54</sup>. Η ATP7A εμπλέκεται πιθανότατα στην παροχή χαλκού στα ένζυμα χαλκού του πλακούντα και στη μεταφορά των μεταλλικών ιόντων στην κυκλοφορία του εμβρύου. Η ATP7B διατηρεί την ομοιόσταση του χαλκού του πλακούντα μεταφέροντας την περίσσεια χαλκού στη πίσω στην κυκλοφορία αίματος της μητέρας<sup>55</sup>. Στους τροφοβλάστες του πλακούντα που βρίσκονται σε καλλιέργεια, οι δύο ορμόνες που είναι απαραίτητες κατά τη διάρκεια της κύησης, η ινσουλίνη και τα οιστρογόνα, μπορεί να επηρεάσουν τη μεταφορά χαλκού στον πλακούντα προκαλώντας μετατόπιση ATP7A στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό οδηγεί σε αυξημένη εκροή χαλκού από τους τροφοβλάστες, που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί από το αναπτυσσόμενο έμβρυο<sup>56</sup>. Αντίθετα, τα επίπεδα της ATP7B μειώθηκαν σε απόκριση στην ινσουλίνη, με αντίστοιχη μείωση της εκροής χαλκού κατά μήκος της μεμβράνης των τροφοβλαστών και χαμηλότερη επιστροφή του χαλκού στη κυκλοφορία αίματος της μητέρας. Το hCTR1 ασκεί επίσης ρόλο στην μεταφορά χαλκού στον ανθρώπινο πλακούντα: στα κύτταρα του πλακούντα, το hCTR1 εντοπίζεται εντός των κυτταροτροφοβλαστών και στο εμβρυϊκό ενδοθήλιο του εμβρύου και η ανοσο-έκφραση του τροποποιείται σημαντικά από ινσουλίνη, οιστρογόνα και προγεστερόνη<sup>57</sup>.



Σχήμα 3: Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μεταφορά χαλκού σε διάφορα όργανα.

### A.1.11 Χαλκός στους νεφρούς

Οι νεφροί έχουν μεγάλη σημασία στο μεταβολισμό του χαλκού και η περιεκτικότητά τους σε χαλκό ρυθμίζεται πολύ αποτελεσματικά, καθώς η ATP7A και η ATP7B είναι οι πιο σημαντικοί μεταφορείς χαλκού που συμβάλλουν στη ρύθμιση αυτή όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 3**. Συν-εκφράζονται σε επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς και απομακρυσμένων νεφρικών σωληναρίων, όπου η ATP7A συμβάλλει στην απομάκρυνση περίσσειας χαλκού και στην προστασία του νεφρικού παρεγχύματος από υπερβολικές συγκεντρώσεις χαλκού<sup>58</sup>. Η ATP7A και η ATP7B εκφράζονται επίσης στα σπειράματα, θυμίζοντάς μας το σημαντικό ρόλο που έχουν στη ρύθμιση των επιπέδων χαλκού στο διήθημα. Η ATP7B έχει επίσης ανοσοανιχνευθεί στο επιθηλιακό κύτταρο που καλύπτει τους βρόχους του Henle στο νεφρικό μυελό, όπου μπορεί να έχει ρόλο στην επαναπορρόφηση του χαλκού. Σε κύτταρα HEK 293, ένα μοντέλο ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων, το hCTR1 αποδείχθηκε ότι εκφράζεται στη μεμβράνη του πλάσματος, όπου παρέχει μια οδό διαπερατότητας για τον χαλκό που δρα ως συμβατικός μεταφορέας.<sup>59</sup>

### A.1.12 Χαλκός στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Ο χαλκός είναι απαραίτητος για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου, ο οποίος χρησιμεύει ως συμπράγοντας στη σουπεροξειδική δισμουτάση, στη νυδροξυλάση της ντοπαμίνης-βήτα, στην πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς, σε ρουλοπλασμίνη και άλλες μεταλλοπρωτεΐνες απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου. Η ATP7A και η ATP7B παίζουν κεντρικό ρόλο στην κατανομή του χαλκού στα διάφορα τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ATP7B, που εκφράζεται σε νευρώνες Purkinje στην παρεγκεφαλίδα, μεταφέρει ιόντα χαλκού στη σερούλοπλασμίνη, ενώ κατά την ανάπτυξη, η ATP7A μεταφέρεται από κύτταρα



Purkinje σε γλία Bergmann, τα κύτταρα που υποστηρίζουν νευρώνες στον εγκέφαλο των νεογνών<sup>60</sup>. Η ATP7B εκφράζεται επίσης και λειτουργικά ενεργή στην επίφυση. Πολλές έρευνες επικεντρώνονται στη διακίνηση του χαλκού στους εγκεφάλους ενηλίκων ανθρώπων, εξαιτίας του γεγονότος πως διαταραχές στην ομοίωση του χαλκού σε ασθενείς με Αλτσχάιμερ, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και νευροεκφυλισμό<sup>61</sup>. Δύο πρωτεΐνες που σχετίζονται με το νευροεκφυλισμό, η πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (APP) και η πρωτεΐνη Prion, είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν χαλκό και, ταυτόχρονα, είναι οι κύριοι ρυθμιστές της νευρωνικής ομοίωσης. Η συσχέτιση της μεταλλοθειονίνης με τις νευροφυσιολογικές και νευροδιαμορφωτικές λειτουργίες έχει επιβεβαιωθεί από τα πολύ υψηλά επίπεδα MT που βρίσκονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και από τον προσδιορισμό μιας ειδικής για τον εγκέφαλο ισομορφής, Mt-III<sup>62</sup>. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι μία δομή κλειδί στην διακίνηση του χαλκού από την γενική κυκλοφορία του αίματος προς τον εγκέφαλο. Στον ποντικό της ωχράς κηλίδας, ένα ζωικό μοντέλο της νόσου Menkes που χαρακτηρίζεται από ελαττωματική εντερική απορρόφηση χαλκού και από έλλειψη χαλκού στον εγκέφαλο, η χορήγηση χαλκού με ενδομυϊκές ενέσεις δεν μπορεί να βελτιώσει την κατάσταση του εγκεφάλου, καθώς ο χορηγούμενος χαλκός δεν μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η συσχέτιση του διαιθυλοδιθειοκαρβαμικού με τον εγχυμένο χαλκό διευκολύνει τη διέλευση των ιόντων χαλκού στο αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ανοίγει καινούρια πεδία έρευνας πάνω στους μεταφορείς χαλκού για τον εγκέφαλο με σκοπό την εύρεση θεραπείας για τα παιδιά που έχουν τη νόσο του Menkes<sup>63</sup>. Ο ανθρώπινος μεταφορέας χαλκού hCuTc, μέλος της οικογένειας CuT που σχετίζεται με την ομοίωση του χαλκού, απομονώθηκε από ανθρώπινους εμβρυϊκούς εγκεφάλους, και πιθανά παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην ενδοκυτταρική διακίνηση του χαλκού στους νευρώνες<sup>64</sup>.

### A.1.13 Χαλκός στον αμφιβληστροειδή

Οι δύο ATPάσες χαλκού έχουν εντοπιστεί στον ανθρώπινο αμφιβληστροειδή, σε επιθηλιακά κύτταρα ενώ η ATP7A ανιχνεύθηκε και στο νευροαισθητικό αμφιβληστροειδή. Τα παραπάνω μπορούν να δημιουργήσουν αμφιβολίες για την παθογένεση της εναπόθεσης χαλκού στον κερατοειδή χιτώνα ασθενών που πάσχουν από νόσο Wilson, οδηγώντας στον τυπικό δακτύλιο Kayser-Fleischer. Η αμφιβληστροειδοπάθεια στη νόσο του Wilson, που σχετίζεται γενικά με την ανώμαλη συστηματική εναπόθεση χαλκού, θα μπορούσε να προκύψει από την απώλεια των ATP7A και ATP7B από τον αμφιβληστροειδή, και στη επακόλουθη απορρύθμιση των επιπέδων χαλκού στα διάφορα τμήματα του αμφιβληστροειδούς<sup>65</sup>.

### A.1.14 Χαλκός ως προ-οξειδωτικό

Ο σχηματισμός δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) κατά την έκθεση ηπατικών κυττάρων σε μεγάλες ποσότητες χαλκού θεωρείται ο κύριος λόγος που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο <sup>66</sup>. Ο χαλκός είναι ένα μεταβατικό μέταλλο που χαρακτηρίζεται από το χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό μεταξύ του Cu(II) και Cu(I) 0.158 V σε νερό, στο οποίο οφείλεται η ικανότητά του να ανταλλάσσει ηλεκτρόνια με άλλες χημικές ενώσεις. Η βιολογική χρησιμότητα του χαλκού προέρχεται κυρίως από την ικανότητά του να εναλλάσσεται μεταξύ της οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής του. Τα αποτελέσματα των μετάλλων που χαρακτηρίζονται από μεταβλητές οξειδωτικές καταστάσεις (όπως ο χαλκός και ο σίδηρος), εξαρτώνται από την επικρατέστερη μορφή του μετάλλου ή οποία με την σειρά της εξαρτάται από το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και το περιβάλλον συναρμογής. Για το λόγο αυτό ο χαλκός χρησιμοποιείται από ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων (παραπάνω από 300 ένζυμα που συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης στους ανθρώπους) <sup>67</sup>.

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση του χαλκού είναι μία από τις κρίσιμες μεταβλητές που επηρεάζουν τις οδούς μεταφοράς ιόντων. Η πρόσληψη χαλκού και οι ενδοκυτταρικές οξειδωτικές επιδράσεις του οφείλονται κυρίως στα ιόντα δισθενούς χαλκού, ενώ η επίδραση στην μεμβρανική μεταφορά οφείλεται κυρίως στα ιόντα μονοσθενή χαλκού που πιθανότατα δημιουργείται στην επιφάνεια της μεμβράνης, όπου σουλφυδρυλικές ομάδες δρουν ως αναγωγικά μέσα. Τα ιόντα μονοσθενή χαλκού αναμένονται να βρίσκονται συχνότερα στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης και μέσα στο κύτταρο, όπου το οξειδοαναγωγικό δυναμικό είναι αισθητά χαμηλότερο από ότι στο αίμα <sup>68</sup>. Οι μελέτες σχετικά με τη συσσώρευση χαλκού στους ανθρώπους έχουν αναπτυχθεί ελάχιστα: Ο Cu(I) έχει μεγάλη συγγένεια για τις θειόλες (-SH), τις πιο σημαντικές ενώσεις συναρμογής του Cu(I) σε βιολογικά περιβάλλοντα. Οι κυτταρικοί και βιοχημικοί μηχανισμοί με τους οποίους η αποθήκευση χαλκού μπορεί να προκαλέσει κυτταρική βλάβη και κυτταρική νέκρωση ακόμα είναι υπό συζήτηση. Έχει γίνει η υπόθεση πως η περίσσεια χαλκού θα μπορούσε να προκαλέσει υπεροξειδικές κυτταρικές βλάβες με τη δημιουργία ROS και την επακόλουθη οξειδωτική βλάβη <sup>69</sup>.

Στην πραγματικότητα, το οξειδωτικό στρες συχνά αναφέρεται ως μια πιθανή αιτία βλάβης στα κύτταρα που είναι εκτεθειμένα σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού, ακόμα και εάν δεν υπάρχουν ποσοτικά δεδομένα που να υποστηρίζουν την άποψη αυτή. Σε κύτταρα του ήπατος που επωάζονται με υψηλές συγκεντρώσεις Cu(II), τα λυσοσώματα ταυτοποιήθηκαν ως η κύρια θέση του ενδογενούς κυτταροτοξικού σχηματισμού ROS, και σε μία άλλη μελέτη μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με λέιζερ, η προέλευση των ROS σε ηπατικά κύτταρα εντοπίστηκε σε μιτοχόνδρια, γεγονός που υποδηλώνει έναν σημαντικό ρόλο των μιτοχονδρίων στις περιπτώσεις απόπτωσης που οφείλονται στον χαλκό. Στην ίδια μελέτη η συνεπώαση ηπατικών κυττάρων επεξεργασμένα με χαλκό με το χηλικό παράγοντα σιδήρου δεφεροξαμίνη, παρεμπόδισε αισθητά την παραγωγή ROS και αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο ηπατικών κυττάρων. Η έκθεση σε χαλκό βρέθηκε ότι ενεργοποιεί την εξωκυτταρική κινάση (ERK) σε ηπατικά κύτταρα πέστροφας, διεγείροντας τη

φωσφορυλίωση της pERK· η ενεργοποίησή της, καθώς και του p38, ήταν υπεύθυνες για τον ενισχυμένο σχηματισμό ROS, για τον κυτταρικό θάνατο εξαιτίας απόπτωσης.

Η νέκρωση των ηπατικών κυττάρων που προκλήθηκε από τον Cu(II), επίσης έχει αποδοθεί στην υπεροξειδωση μεμβρανικών λιπιδίων, και στην αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου που παρατηρήθηκαν όταν τα ηπατικά κύτταρα επωάστηκαν σε υψηλά επίπεδα Cu(II)<sup>70</sup>. Σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί από την ασθένεια Wilson και σε Bedlington terriers, ένα ζωικό μοντέλο της ασθένειας Wilson, έχει παρατηρηθεί η οξειδωτική βλάβη σε μιτοχόνδρια ηπατικών κυττάρων. Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν προηγούμενες αναφορές, υποδεικνύουν τα μιτοχόνδρια ως κύριους στόχους των υπεροξειδωτικών βλαβών σχετιζόμενες με χαλκό στην ασθένεια Wilson. Η έντονη συμμετοχή των μιτοχονδρίων μπορεί να είναι η κύρια αιτία για την έλλειψη κυτταρικής ενέργειας και την αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ελεύθερου ασβεστίου, που αμφότερα οδηγούν στην απόπτωση και συνεπώς στον κυτταρικό θάνατο.

## A.2 Μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

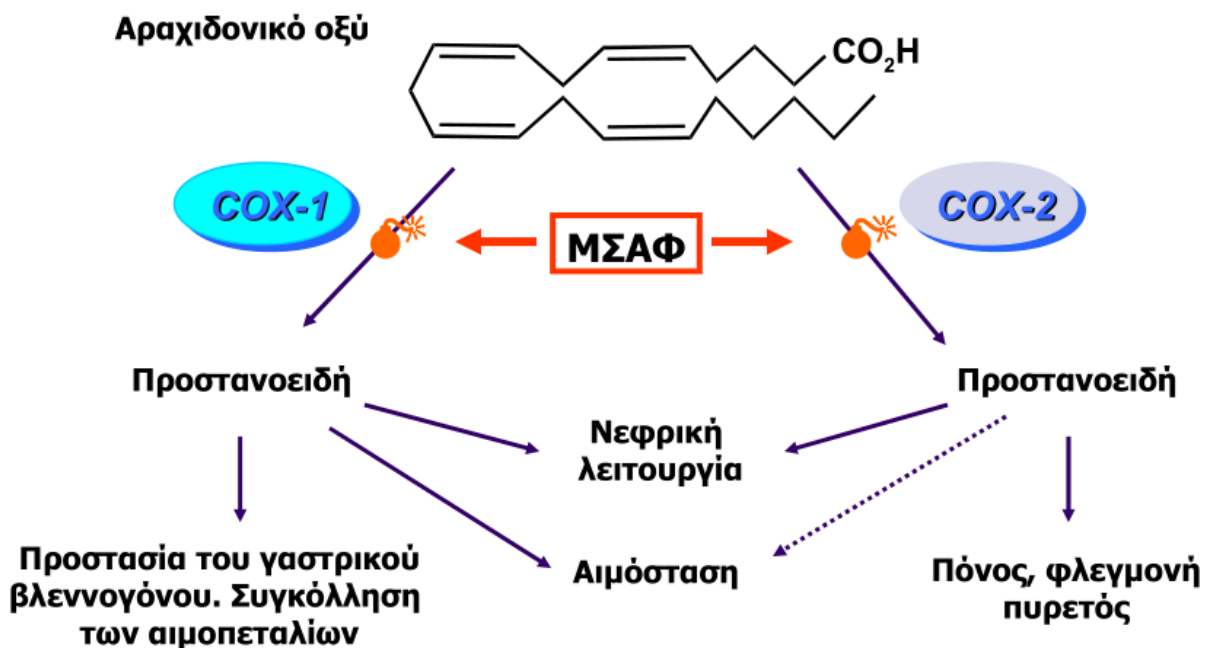
Τα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID-ΜΣΑΦ) είναι μια κατηγορία φαρμάκων τα οποία αν και απόχημικής απόψεως είναι ετερογενή, παρουσιάζουν παρόμοιες θεραπευτικές δράσεις αλλά και παρενέργειες. Τα ΜΣΑΦ είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα φάρμακα σε ολόκληρο τον κόσμο. Υπολογίζεται ότι στις ΗΠΑ περίπου 17.000.000 άτομα καθημερινά χρησιμοποιούν διάφορα ΜΣΑΦ. Η αντιπυρετική δράση του εκχυλίσματος του φλοιού της ιτιάς ήταν γνωστή από τον 18<sup>ο</sup> αιώνα και το δραστικό συστατικό του εκχυλίσματος, η σαλικίνη, απομονώθηκε το 1829 από τον Leroux. Το 1899 η Bayer κυκλοφόρησε το ακετυλοσαλικυλικό οξύ ως σκεύασμα με το όνομα «ασπιρίνη». Η ασπιρίνη είναι το αρχέτυπο της κατηγορίας των ΜΣΑΦ. Τη δεκαετία του 1950 κυκλοφόρησε η φαινυλβουταζόνη, το πρώτο μη σαλικυλικό ΜΣΑΦ και τη δεκαετία του 1960 η ηνδομεθακίνη η οποία αποτέλεσε την αρχή μιας προσπάθειας να συντεθούν ΜΣΑΦ με μεγαλύτερη αντιφλεγμονώδη δράση και μικρότερη τοξικότητα. Περίπου εκείνη την εποχή οι B. Samuelsson και S. Bergstrom περιέγραψαν την οδό της σύνθεσης των προσταγλανδινών και το 1971 ο J.R. Vane έδειξε ότι τα ΜΣΑΦ ασκούν τη θεραπευτική τους δράση αναστέλλοντας ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη σύνθεση των προσταγλανδινών, την κυκλοοξυγενάση (COX). Για τις ανακαλύψεις τους αυτές οι B. Samuelsson, S. Bergstrom και J.R. Vane τιμήθηκαν το 1982 με το βραβείο Nobel στη Φυσιολογία και την Ιατρική.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1990 παρουσιάστηκε μια νέα τάξη ΜΣΑΦ, οι αναστολείς της COX-2 ή κοξίμπες. Αρχικά θεωρήθηκε ότι η υποκατηγορία αυτή των ΜΣΑΦ θα ήταν απαλλαγμένη από τις μεϊζονες παρενέργειες των υπολοίπων ΜΣΑΦ ωστόσο με την πάροδο του χρόνου φάνηκε ότι και οι κοξίμπες είχαν σημαντική τοξικότητα και μάλιστα ορισμένες από αυτές αποσύρθηκαν από την φαρμακευτική αγορά το 2004.

### A.2.2 Μηχανισμός Δράσεως

Ο μηχανισμός δράσης των ΜΣΑΦ περιγράφηκε το 1971 από τον John Vane, ο οποίος πρώτος υπέθεσε ότι η δράση τους συνδέεται με την αναστολή της βιοσύνθεσης της προσταγλανδίνης (PG)<sup>71</sup>. Ο κύριος μηχανισμός δράσης των ΜΣΑΦ είναι η αναστολή της δράσης της κυκλοοξυγενάσης. Έχει βρεθεί ότι θεραπευτικές δόσεις ασπιρίνης και άλλων ΜΣΑΦ μειώνουν τη βιοσύνθεση προσταγλανδινών στον άνθρωπο και υπάρχει γενικά καλή συσχέτιση μεταξύ της αντιφλεγμονώδους δράσης<sup>72</sup> του κάθε ΜΣΑΦ και της ικανότητάς του να αναστέλλει τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών. Η COX ή συνθετάση της προσταγλανδίνης Η (PGHS) είναι ένα ένζυμο το οποίο συμμετέχει στη σύνθεση προσταγλανδινών και θρομβοξανών από

το αραχιδονικό οξύ. Επομένως τα ΜΣΑΦ δρουν τελικά, αναστέλλοντας τη σύνθεση των παραπάνω ουσιών.



Σχήμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση μηχανισμού δράσης ΜΣΑΦ

### A.2.3 Η σύνθεση προσταγλανδινών και θρομβοξανών

Οι προσταγλανδίνες (PG) και οι θρομβοξανές (TX) ανήκουν στην ομάδα των βιολογικά δραστικών νλιπιδίων που ονομάζονται εικοσανοειδή. Σχεδόν όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα στον άνθρωπο έχουν την ικανότητα να συνθέτουν προσταγλανδίνες και θρομβοξανές. Οι προσταγλανδίνες και οι θρομβοξανές είναι γνωστές και με την κοινή ονομασία προστανοειδή και οι μεν προσταγλανδίνες φέρουν δακτύλιο 5 ατόμων ενώ ο δακτύλιος του μορίου των θρομβοξανών έχει 6 άτομα.

Τα προστανοειδή συντίθενται μέσω της λεγόμενης οδού της COX. Η οδός αυτή ξεκινά από το αραχιδονικό οξύ, από το οποίο συντίθεται προσταγλανδίνη H (PGH) με τη δράση της κυκλοοξυγενάσης. Στη συνέχεια από την PGH, μετά από διάφορα ενζυματικά βήματα, συντίθενται διάφορες προσταγλανδίνες (D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>) και θρομβοξανές (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>). Εκτός από το αραχιδονικό οξύ, σαν βιοσυνθετικό υπόστρωμα μπορεί να χρησιμεύσει το διομογαμμαλινολενικό οξύ (DGLA) και το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA). Τα μόρια που προκύπτουν από το αραχιδονικό οξύ φέρουν το σημείο 2 (π.χ. προσταγλανδίνη E<sub>2</sub>) ενώ αυτά που προέρχονται από το DGLA φέρουν το σημείο 1 και από το EPA το σημείο 3. Η μεγάλη πλειοψηφία των φυσικών προσταγλανδινών προέρχονται ωστόσο από το αραχιδονικό οξύ.

## A.2.4 Βιολογική δράση των προστανοειδών

Τα προστανοειδή β εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής, ωστόσο αν και *in vitro* οι δράσεις τους είναι συγκεκριμένες, *in vivo* η κατάσταση δεν είναι τόσο σαφής. Οι παράγοντες που προκαλούν την ασάφεια είναι η ταυτόχρονη παραγωγή μορίων με αντίθετες *in vitro* δράσεις, η διαφορετική δράση του ίδιου μορίου ανάλογα με το κύτταρο-στόχο και η τροποποίηση της δράσεως υπό την επίδραση του μικροπεριβάλλοντος. Η TXA2 προάγει τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, ενώ η PGI2 που παράγεται στο τοίχωμα των αγγείων την αναστέλλει. Οι PGE2 και PGD2 προκαλούν διάταση και αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων της μικροκυκλοφορίας ενώ η TXA2 προκαλεί αγγειοσύσπαση. Η PGE2 προκαλεί υπεραλγησία και πυρετό ενώ οι PGD2, PGF2a και TXA2 προκαλούν βρογχόσπασμο.

Αξιοσημείωτη είναι η δράση των προσταγλανδινών στους νεφρούς όπου δρουν μέσω δύο μηχανισμών. Από τη μια πλευρά δρουν στα αγγεία, διατηρώντας τη νεφρική ροή αίματος και το ρυθμό σπειραματικής διήθησης μέσω ενίσχυσης της αγγειοσύσπασης που προκαλεί η αγγειοτασίνη II, αυξάνοντας την έκκριση ρενίνης και ανταγωνιζόμενα τυχόν συστηματική αγγειοσύσπαση. Από την άλλη πλευρά, οι προσταγλανδίνες δρουν και στα νεφρικά σωληνάκια, ανταγωνιζόμενες τη δράση της αντιδιουρητικής ορμόνης.

## A.2.5 Κυκλοξυγενάση

Μέχρι στιγμής η COX φαίνεται να υπάρχει σε δύο ισομορφές την COX-1 και την COX-2. Πρόσφατα έχει περιγραφεί και μια τρίτη ισομορφή η COX-3 η οποία όμως είναι πιθανώς παραλλαγή του γονιδίου COX-1 με μια επιπλέον πεπτιδική αλληλουχία. Οι δύο ισομορφές της COX κωδικοποιούνται σε διαφορετικά χρωμοσώματα αλλά οι δύο πρωτεΐνες έχουν σχεδόν το ίδιο μέγεθος (600 αμινοξέα) με μοριακό βάρος 68 kDa πριν τις τροποποιήσεις που ακολουθούν τη μετάφραση.

Παρά τις μοριακές τους ομοιότητες τα δύο ένζυμα διαφέρουν σημαντικά στο πώς εκφράζονται στους ιστούς. Η COX-1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς αλλά σε βαθμό που ποικίλλει από ιστό σε ιστό, ενώ η COX-2 είναι μη ανιχνεύσιμη στους περισσότερους ιστούς, σε φυσιολογικές συνθήκες. Η COX-2 εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα στον εγκέφαλο, τους νεφρούς και τα οστά ενώ η έκφρασή της στους υπόλοιπους ιστούς αυξάνεται σε συνθήκες φλεγμονής, υπό την επίδραση των κυτοκινών και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής όπως οι ιντερλευκίνες I και II, παράγοντες νέκρωσης των όγκων, και ολιγοπολυσακχαρίτης.

Αντίστροφα αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως οι ιντερλευκίνες 3, 4 και 10 καθώς και τα κορτικοειδή καταστέλλουν την έκφραση της COX-2. Είναι σημαντικό ότι η COX-1 εκφράζεται στο στομάχι, σε αντίθεση με την COX-2. Οι δύο ισομορφές της COX έχουν παρόμοια ενζυμική δραστηριότητα: δρουν στα ίδια υποστρώματα, παράγουν τα ίδια προϊόντα και καταλύουν την ίδια αντίδραση με όμοιο καταλυτικό μηχανισμό. Η κύρια δομική διαφορά τους είναι στο αμινοξύ 590 όπου η COX-1 φέρει

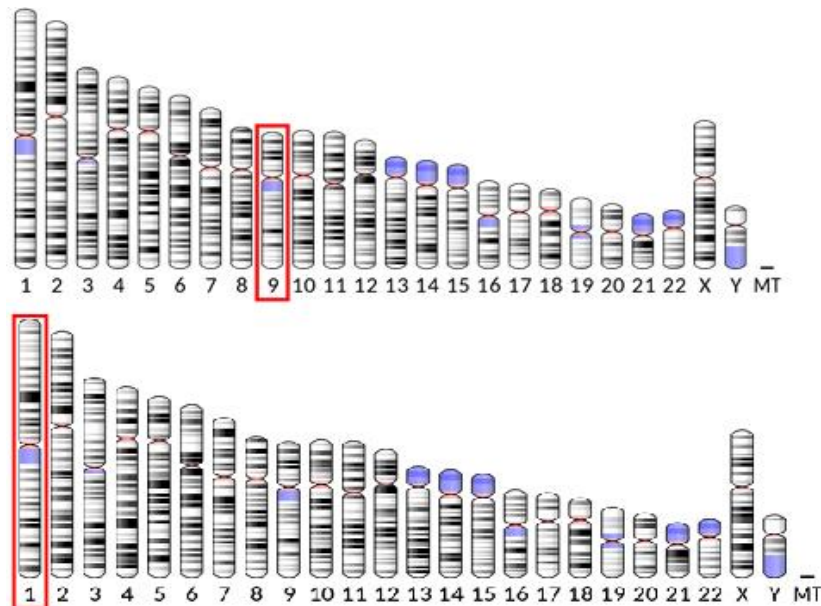
ισολευκίνη, ενώ η COX-2 φέρει βαλίνη με αποτέλεσμα η COX-2 να έχει μεγαλύτερο θύλακα σύνδεσης και επομένως μεγαλύτερο φάσμα υποστρωμάτων. Στη μοριακή αυτή διαφορά στηρίζεται και η εκλεκτικότητα των αναστολέων της COX-2 οι οποίοι λόγω του μεγαλύτερου όγκου τους μπορούν να φθάσουν στη θέση συνδέσεως του υποστρώματος της COX-2 αλλά όχι της COX-1 μια και αυτή είναι όπως αναφέρθηκε μικρότερη. Η αναστολή της δράσης της COX γίνεται με διάφορους μηχανισμούς:

- Μη-αντιστρεπτή αναστολή, όπως προκαλεί η ασπιρίνη ακετυλιώνοντας το ενεργόκέντρο του ενζύμου.

- Αντιστρεπτή, ανταγωνιστική αναστολή, όπως στην περίπτωση της ιβουπροφαίνης αλλά και των περισσότερων ΜΣΑΦ τα οποία δρουν ως ανταγωνιστικά υποστρώματα.

- Αντιστρεπτή, μη-ανταγωνιστική αναστολή η οποία προκαλείται από την παρακεταμόλη (ακεταμινοφαίνη) μέσω δέσμευσης ελευθέρων ριζών.

Τα περισσότερα από τα ΜΣΑΦ που υπήρχαν πριν από τους εκλεκτικούς αναστολείς της COX-2 δεν εμφανίζουν εκλεκτικότητα στην αναστολή των δύο μορφών της COX ή αναστέλλουν περισσότερο την COX-1 (π.χ. ινδομεθακίνη, ναπροξένη, ιβουπροφαίνη). Ωστόσο ορισμένα από αυτά εμφανίζουν καθ' υπερβολή αναστολή της COX-2 όπως η νιμεσουλίδη και η ετοδολάκη και σε μικρότερο βαθμό η μελοξικάμη και η δικλοφαινάκη. Οι εκλεκτικοί αναστολείς της COX-2 (ροφεκοξίμη και σελεκοξίμη σε θεραπευτικές δόσεις αναστέλλουν την COX-2 200 με 300 φορές ισχυρότερα από την COX-1.



Σχήμα 5: Θέση του γονιδίου της κυκλοξυγενάσης 1 και 2 αντίστοιχα, στο ανθρώπινο γονιδίωμα

## A.2.6 Ταξινόμηση και φαρμακοκινητική

Η ονομασία ΜΣΑΦ δεν περιορίζεται σε μία μόνο κατηγορία αλλά εμπεριέχει μια πληθώρα διαφορετικών κατηγοριών φαρμάκων που έχουν αρκετά διαφορετικές χημικές δομές μεταξύ τους. Κατά κύριο λόγο τα ΜΣΑΦ είναι οργανικά οξέα (συνήθως ασθενή) που έχουν την ιδιότητα να συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με τις πρωτεΐνες που εμπεριέχει το πλάσμα. Η ταξινόμησή τους γίνεται συνήθως με βάση τις κλινικές και φαρμακολογικές τους ιδιότητες<sup>75</sup>. Οι πιο πρόσφατες ταξινομήσεις σχετίζονται με την ιδιότητα των ΜΣΑΦ να αναστέλλουν την COX-1 ή/και την COX-2. Ο πλέον σύγχρονός τρόπος ταξινόμησης χρησιμοποιεί το δείκτη τοξικότητας, δηλαδή το λόγο της συγκέντρωσης του ΜΣΑΦ που απαιτείται για την αναστολή του 50% των ενζύμων COX-2/COX-1. Γενικά όσο μικρότερος είναι ο λόγος αυτός, τόσο ασφαλέστερο θεωρείται το εκάστοτε ΜΣΑΦ. Ο τρόπος ταξινόμησης με βάση την χημική δομή, αν και παλαιότερος παραμένει ακόμα ιδιαίτερα χρήσιμος καθώς ομαδοποιεί τα εκάστοτε φάρμακα με βάση τα φαρμακοκινητικά τους χαρακτηριστικά. Συνολικά θα μπορούσαμε να κατατάξουμε τα ΜΣΑΦ στις εξής κατηγορίες:

1. Παράγωγα του σαλικυλικού οξέος (ακετυλοσαλικυλικό οξύ, διφλουιζάλη, σουλφασαλαζίνη)
2. Παράγωγα του οξικού οξέος (ινδομεθακίνη, δικλοφενάκη, σουλινδάκη)
3. Παράγωγα του προπιονικού οξέος (φαινοπροφαίνη, ιβουπροφαίνη, κετοπροφαίνη, ναπροξένη, ναβουφετόνη)
4. Παράγωγα του ανθρανιλικού οξέος(μεφαιναμικό οξύ)
5. Οξικάμες (πιροξικάμη, μελοξικάμη)
6. Κοξίμπες (σελεκοξίμπη, ροφεκοξίμπη, βαλντεκοξίμπη)
7. Άλλα ΜΣΑΦ (νιφλουμικό οξύ, αζαπροζαόνη, διατυλφείνη, κετορολάκη)

Το τελευταίο διάστημα οι διάφορες έρευνες στοχεύουν κυρίως στην σύνθεση νέων φαρμάκων που θα έχουν όσο το δυνατόν μικρότερο λόγο COX-2/COX-1 με σκοπό να είναι πιο αποτελεσματικά και λιγότερο επικίνδυνα.

Η χορήγηση των ΜΣΑΦ γίνεται κατά κύριο λόγο από το στόμα και η απορρόφησή τους γίνεται εύκολα από το ανώτερο πεπτικό σύστημα. Τις περισσότερες φορές απορροφώνται και από τους βλεννογόνους αλλά υπάρχουν και διάφορα σκευάσματα για ενδομυϊκή ή ενδοφλέβια χρήση. Συνήθως η συγκέντρωση του εκάστοτε φαρμάκου είναι αποτελεσματική 30 λεπτά μετά τη χορήγηση από το στόμα ενώ η μέγιστη συγκέντρωση εμφανίζεται περίπου 2 ώρες μετά τη χορήγηση και ελαττώνεται ανάλογα με το χρόνο ημίσειας ζωής και τις ιδιότητες που έχει το εκάστοτε χορηγούμενο φάρμακο<sup>73</sup>. Τα ΜΣΑΦ έχουν την τάση να κατανέμονται σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος ενώ έχουν υψηλή συγγένεια με τις πρωτεΐνες του πλάσματος με άμεση απόρροια να συνδέονται με αυτές σε ποσοστό της τάξεως του 90-99%. Τα ΜΣΑΦ απεκκρίνονται από τον οργανισμό μέσω των νεφρών είτε σε ελεύθερες είτε σε συνδεδεμένες μορφές. Βέβαια αξίζει να σημειωθεί πως μικρές τους ποσότητες μπορούν να ανιχνευθούν στη χολή και μέσω αυτής περνούν στο έντερο όπου από εκεί αποβάλλονται με τα κόπρανα.



## A.2.7 Φαρμακολογία

Προς το παρόν στην Ελλάδα κυκλοφορούν πάνω από 20 διαφορετικά ΜΣΑΦ. Με βάση τη χημική τους δομή τα ΜΣΑΦ μπορούν να καταταχθούν σε κατηγορίες με διαφορετικά χαρακτηριστικά (πίνακας). Τα ΜΣΑΦ σαν ομάδα έχουν παρεμφερή φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Απορροφώνται γρήγορα και σε μεγάλο βαθμό από το στόμα και κατανέμονται σε μικρό βαθμό στους ιστούς εξαιτίας του μεγάλου ποσοστού δέσμευσής τους από τις πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνη). Έχουν ελάχιστο ηπατικό μεταβολισμό και αποβάλλονται από τους νεφρούς είτε με σπειραματική διήθηση ή με σωληναριακή έκκριση.

Πίνακας 1: Η φαρμακολογική βάση της θεραπευτικής – Εθνικό Συνταγολόγιο

---

<b>Παράγωγα σαλικυλικού οξέος</b> (Καρβοξυλικά οξέα) Ακετυλοσαλικυλικό οξύ, Διφλουνιζάλη
<b>Παράγωγα οξεικού οξέος</b> Ινδομεθακίνη, Ασμετασίνη, Ετοδολάκη, Δικλοφενάκη, Τολμετίνη, Σουλινδάκη
<b>Παράγωγα προπιονικού οξέος</b> Φαινοπροφαίνη, Φλουρβιπροφαίνη, Ιβου- προφαίνη, Κετοπροφαίνη, Ναπροξένη, Θειοπροφαινικό οξύ,
<b>Παράγωγα ανθρανιλικού οξέος</b> (Φαιναμάτες) Μεφαιναμικό οξύ, Τολφαιναμικό οξύ
<b>Παράγωγα ενολικού οξέος (Οξικάμες)</b> Πιροξικάμη, Μελοξικάμη, Τενοξικάμη, Φαινυλβουταζόνη
<b>Αλκανόνες</b> Ναβουμετόνη
<b>Εκλεκτικοί αναστολείς COX-2</b> Νιμεσουλίδη, Σελεκοξίμπη, Ροφεκοξίμπη
<b>Άλλα ΜΣΑΦ</b> Νιφλουμικό οξύ, Αζαπροπαζόνη, Διακετυλρεΐνη

---

Τα περισσότερα ΜΣΑΦ προκαλούν αντιστρεπτή αναστολή της COX, επομένως η διάρκεια δράσης τους καθορίζεται από τη φαρμακοκινητική τους. Εξαιρέση αποτελεί η ασπιρίνη η οποία προκαλεί μη-αντιστρεπτή αναστολή της COX, επομένως η διάρκεια δράσης της εξαρτάται από το ρυθμό σύνθεσης της COX. Τα ΜΣΑΦ χωρίζονται σε αυτά με βραχύ χρόνο ημιζωής (< 6 ώρες) και σε αυτά με μακρό χρόνο ημιζωής (> 10 ώρες). Ένα σημαντικό φαρμακοκινητικό πλεονέκτημα των ΜΣΑΦ, το οποίο οφείλεται στο ότι είναι οργανικά οξέα, είναι η ιδιότητά τους να συσσωρεύονται στις φλεγμονώδεις εστίες.

## A.2.8 Αναλγησία και αντιφλεγμονώδης δράση

Τα ΜΣΑΦ ασκούν την αντιφλεγμονώδη δράση τους, όπως προαναφέρθηκε, αναστέλλοντας την COX-2 στους ιστούς που εμφανίζουν τη φλεγμονή και παρεμποδίζουν το σχηματισμό των PGE 2 και PGI 2 . Οι αναλγητικές ιδιότητές τους φαίνεται όμως να οφείλονται σε ένα ευρύτερο πεδίο περιφερικών και κεντρικών δράσεων. Μερικές περιφερικές δράσεις τους που ακόμα ερευνώνται, είναι η αναστολή της λιποξυγενάσης και άλλοι μηχανισμοί άσχετοι με την αναστολή των προσταγλανδινών.

Οι κεντρικές δράσεις των ΜΣΑΦ δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένες, καθώς δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος και ο ρόλος των COX και των PG στους κεντρικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με τον πόνο<sup>74</sup>. Τέλος, η αντιπυρετική δράση των ΜΣΑΦ πιστεύεται ότι οφείλεται στην αναστολή των PGE 2 που σχετίζονται με την πρόκληση του πυρετού στον υποθάλαμο. Οι προσταγλανδίνες αυτές παράγονται από την COX-2 που εντοπίζεται τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του εγκεφάλου.

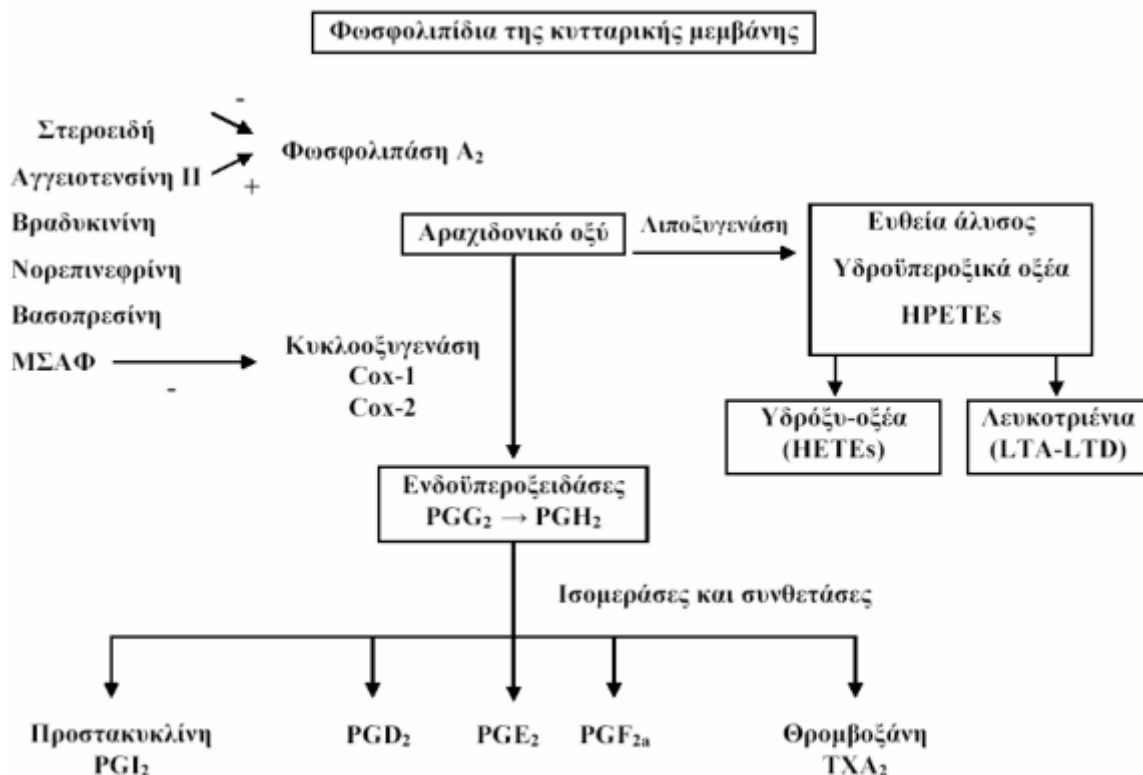
## A.2.9 Η αναλγητική δράση των ΜΣΑΦ-Γενικά

Τα ΜΣΑΦ θεωρούνται ως σχετικά ήπια αναλγητικά αλλά αυτό δεν είναι απόλυτο. Η αναλγητική δράση ενός φαρμάκου πρέπει να εκτιμάται με βάση όχι μόνο την ένταση αλλά και το είδος του πόνου. Τα ΜΣΑΦ σε ορισμένες περιπτώσεις (όπως π.χ. σε μετεγχειρητικό πόνο) μπορούν να έχουν αναλγητική δράση ανώτερη και των οπιοειδών. Τα ΜΣΑΦ φαίνεται ότι ασκούν ιδιαίτερη αναλγητική δράση σε περιπτώσεις στις οποίες ο πόνος συνδέεται με την ύπαρξη φλεγμονής. Ο πόνος στις περιπτώσεις αυτές οφείλεται πιθανώς σε τοπική διέγερση των ινών του πόνου και αυξημένη ευαισθησία στον πόνο (υπεραλγησία) η οποία εν μέρει προκύπτει από αυξημένη διεγερσιμότητα κεντρικών νευρώνων στο νωτιαίο μυελό.

Η αναλγητική δράση των ΜΣΑΦ είναι βασικά περιφερική και οφείλεται στην αναστολή της σύνθεσης των προσταγλανδινών στην εστία της φλεγμονής και του πόνου. Οι προσταγλανδίνες δεν προκαλούν πόνο άμεσα αλλά ευαισθητοποιούν τις απολήξεις των νευρικών ινών του πόνου στη δράση άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών (βραδυκινίνη, ισταμίνη, 5-υδροξυτρυπταμίνη) ενισχύοντας έτσι το βασικό μήνυμα του πόνου. Η ευαισθητοποίηση προκαλείται κυρίως από τις προσταγλανδίνες E και G. Ένας άλλος μηχανισμός αναλγητικής δράσης των ΜΣΑΦ είναι άμεση δράση στους νευρώνες (κεντρικούς και περιφερικούς) με μείωση της ικανότητας αντίληψης του πόνου.

Η αναλγητική δράση ενός συγκεκριμένου ΜΣΑΦ ποικίλει από άτομο σε άτομο. Έτσι, ενώ σε επίπεδο πληθυσμού η αναλγητική δράση όλων των ΜΣΑΦ είναι περίπου η ίδια, σε ατομικό επίπεδο υπάρχουν μεγάλες διαφορές. Στην κλινική πράξη αυτό σημαίνει ότι η έλλειψη αναλγητικής ανταπόκρισης σε ένα ΜΣΑΦ δεν προδικάζει το ίδιο για άλλα ΜΣΑΦ. Ορισμένοι ασθενείς ανταποκρίνονται καλύτερα σε ένα φάρμακο και δεν ανταποκρίνονται σε άλλο. Οι τυχόν διαφορές στην αποτελεσματικότητα μεταξύ διαφόρων ΜΣΑΦ φαίνεται ότι οφείλονται περισσότερο

στη χρησιμοποιούμενη δοσολογία παρά στις ιδιότητες του φαρμάκου. Μία μελέτη που συνέκρινε τη δικλοφενάκη, την ινδομεθακίνη και τη πιροξικάμη έδειξε ότι υπήρχαν μεγάλες διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα και το μεταβολισμό μεταξύ ασθενών και υποδεικνυε ότι αυτές ήταν η αιτία της διαφοράς στην αναλγητική δράση ενός συγκεκριμένου φαρμάκου μεταξύ των ασθενών. Για τους παραπάνω λόγους υποστηρίζεται ότι είναι απαραίτητη η ύπαρξη 10-15 διαφορετικών ΜΣΑΦ ώστε να υπάρχουν αρκετές εναλλακτικές λύσεις σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται.

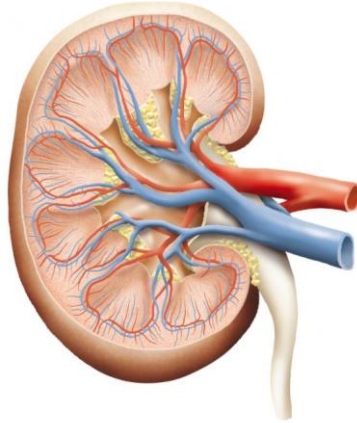


Σχήμα 6: Βιοσύνθεση των εικοσανοειδών από το αραχιδονικό οξύ.

### A.2.10 ΜΣΑΦ και νεφρική λειτουργία

Η κύρια λειτουργία των ΜΣΑΦ είναι η αναστολή της σύνθεσης προσταγλανδινών στους νεφρούς. Η αναστολή αυτή δεν επηρεάζει όμως την αιμοδυναμική κατάσταση του νεφρού αλλά ούτε και τη νεφρική λειτουργία σε φυσιολογικά άτομα. Όπως είναι αναμενόμενο όμως, σε άτομα με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία, ο ρόλος των αγγειοδιασταλτικών προσταγλανδινών είναι πολύτιμος. Η χορήγηση ΜΣΑΦ προκαλεί αγγειοσύσπαση στα προσαγωγά και απαγωγάρτηριάκια και ελαττώνει το ρυθμό σπειραματικής διήθησης<sup>75</sup>. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει σε ασθενείς με μειωμένο ενδαγγειακό όγκο λόγω λήψης διουρητικών, απώλειας υγρών, αιμορραγίας ή σήψης. Επομένως, εύκολα γίνεται αντιληπτό πως η οξεία νεφρική ανεπάρκεια λόγω αγγειοσύσπασης των αγγείων του νεφρού είναι η πιο συχνή μορφή

νεφροτοξικότητας των ΜΣΑΦ και είναι αναστρέψιμη μόνο εάν γίνει γρήγορα η αναγνώριση της αιτίας και διακοπεί η χορήγησή τους και αναπληρωθεί άμεσα ο ενδαγγειακός όγκος. Σε ηλικιωμένα άτομα η χρόνια χορήγηση ΜΣΑΦ μπορεί να προκαλέσει βλάβη του νεφρικού παρεγχύματος και χρόνια εξελικτική νεφρική ανεπάρκεια. Τα ΜΣΑΦ μπορεί να προκαλέσουν ήπια κατακράτηση Na στο 10-25% των ασθενών.



*Εικόνα 2: Τα ΜΣΑΦ μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στην λειτουργία των νεφρών*

Η δράση τους αυτή πιθανόν να οφείλεται σε απευθείας επίδραση στα νεφρικά σωληνάκια ή στα αγγεία του νεφρού. Η κατακράτηση νατρίου είναι σοβαρότερη όπως είναι αναμενόμενο, σε περιπτώσεις ασθενών με κάποιο οίδημα, καρδιακή ανεπάρκεια, κίρρωση του ήπατος ή νεφρωσικό σύνδρομο. Η χορήγηση ΜΣΑΦ σχετίζεται επίσης με την κατακράτηση ύδατος και την υπονατριαιμία από αραίωση. Οι επιδράσεις αυτές είναι ήπιες σε υγιή άτομα, αλλά μπορεί να είναι προβληματικές σε ασθενείς με κίνδυνο υπονατριαιμίας και οιδήματα. Οφείλονται σε αναστολή της σύνθεσης των προσταγλανδινών που ανταγωνίζονται τους μηχανισμούς συμπύκνωσης των ούρων.

### **A.2.11 Αγγειακός τόνος**

Ο τρόπος επίδρασης των ΜΣΑΦ στον τόνο των αγγείων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Η σύνθεση πολλών αγγειοδραστικών ουσιών, πολλές από τις οποίες προκαλούν αγγειοσύσπαση (π.χ. θρομβοξάνη  $A_2$ ) ενώ άλλες αγγειοδιαστολή, επηρεάζονται από την ανασταλτική επίδραση των ΜΣΑΦ στην COX. Βέβαια σε φυσιολογικά άτομα η διατήρηση ισορροπίας του αγγειακού τόνου δε φαίνεται να επηρεάζεται από τη χορήγηση ΜΣΑΦ <sup>76</sup>.

## A.2.12 ΜΣΑΦ και γαστρεντερικό σύστημα (ΓΕΣ)

Τα ΜΣΑΦ έχουν ιδιαίτερα τοξική επίδραση στο γαστρικό βλεννογόνο και για αυτό η χορήγησή τους είναι μειωμένη σε άτομα με ιστορικό γαστροδωδεκαδακτυλικού έλκους ή διαφόρων άλλων διαταραχών του πεπτικού συστήματος. Αιμορραγία από το ανώτερο πεπτικό αλλά και διάτρηση γαστροδωδεκαδακτυλικού έλκους είναι μερικές από τις επιπλοκές που έχουν παρατηρηθεί μετά από τη λήψη ΜΣΑΦ, με αξιοσημείωτο το γεγονός πως οι παραπάνω επιπλοκές δεν περιορίστηκαν μόνο σε άτομα με κάποιο επιβαρυσμένο ιστορικό αλλά και σε άτομα με ιστορικό ελεύθερο από προβλήματα στο πεπτικό σύστημα.

Η επικρατούσα άποψη είναι πως τα ΜΣΑΦ επιδρούν στο σύνολο των μηχανισμών που σχετίζονται με την γαστροπροστασία στον ανθρώπινο οργανισμό<sup>77</sup>. Στο σύνολο των μηχανισμών αυτών περιλαμβάνονται η επαρκής ροή αίματος στο γαστρικό βλεννογόνο, η αναγέννηση των επιθηλιακών κυττάρων, η παραγωγή βλέννης, η έκκριση διττανθρακικών, η επαρκής παρουσία προσταγλανδινών, ιντερλευκίνης-1, νευροπεπτιδίων καθώς και πολλοί άλλοι. Η τοπική επίδραση των ΜΣΑΦ στο γαστρικό βλεννογόνο είναι ένας ακόμη βλαπτικός παράγοντας που προστίθεται στους προηγούμενους μηχανισμούς. Αξίζει να σημειωθεί πως εφόσον τα ΜΣΑΦ είναι λιποδιαλυτά ασθενή οργανικά οξέα, εισέρχονται στα κύτταρα του βλεννογόνου στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, όπου ιονίζονται και παγιδεύονται σε ιονισμένη μορφή. Έπειτα μεταβάλλουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και επιτρέπουν την είσοδο ιόντων υδρογόνου τα οποία προκαλούν κυτταρικές βλάβες. Τα ΜΣΑΦ νέας γενιάς, τα οποία είναι αναστολείς της COX-2, εμφανίζουν πολύ λιγότερες τοξικές επιδράσεις στο γαστρεντερικό σύστημα, όπως είναι αναμενόμενο άλλωστε<sup>78</sup>. Η χρήση τους επομένως συνιστάται σε ασθενείς με προβλήματα από το ΓΕΣ. Εκτός όμως από την ένδειξη χορήγησης αναστολέων της COX-2, η χορήγηση γαστροπροστατευτικών σκευασμάτων στους ασθενείς αυτούς, είναι απαραίτητη για την πρόληψη και τη θεραπεία των επιπλοκών. Τέλος, δεν υπάρχει καμία ένδειξη μέχρι σήμερα, ότι η λοίμωξη με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού σχετίζεται με τη χορήγηση ΜΣΑΦ.

## A.2.13 Αντιπηκτική δράση των ΜΣΑΦ

Τα ΜΣΑΦ καταφέρνουν να επηρεάσουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων με μία πληθώρα μηχανισμών που περιλαμβάνουν την αναστολή του ενζυμικού συστήματος της COX-1. Αυτό συμβαίνει διότι τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων περιέχουν την COX-1. Οι προσταγλανδίνες και η θρομβοξάνη που παράγονται στα αιμοπετάλια διεγείρουν αλλά και συγχρόνως αναστέλλουν κάποιες λειτουργίες των αιμοπεταλίων<sup>79</sup>. Η σημαντικότερη όμως επίδραση των ΜΣΑΦ είναι η διαταραχή της αιμόστασης λόγω της ελάττωσης παραγωγής της θρομβοξάνης A<sub>2</sub>. Βέβαια για την πλειονότητα των ΜΣΑΦ, αυτή η αντιαιμοπεταλική δράση είναι τις περισσότερες φορές παροδική και εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την εκάστοτε συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα. Επομένως όταν η συγκέντρωση

του φαρμάκου ελαττωθεί κάτω από ένα κρίσιμο σημείο, ελαττώνεται αντίστοιχα και η αναστολή της COX-1 και αποκαθίσταται σταδιακά η λειτουργία των αιμοπεταλίων σε διάστημα μερικών ημερών. Από το σύνολο των ΜΣΑΦ, μόνο η ασπιρίνη χρησιμοποιείται για την αντιαιμοπεταλιακή της δράσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως η δράση της ασπιρίνης δεν είναι παροδική και υφίσταται σε όλη τη διάρκεια ζωής των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων, διότι δεν μπορούν να συνθέσουν νέα COX-1. Παρόλο που η αντιαιμοπεταλιακή δράση των ΜΣΑΦ και συγκεκριμένα της ασπιρίνης είναι ιδιαίτερα χρήσιμη και απαραίτητη σε ασθενείς επιρρεπείς σε θρομβώσεις, καθίσταται επικίνδυνη σε μια πληθώρα ασθενών και συγκεκριμένα σε αλκοολικούς, σε άτομα με αιμορραγική διάθεση, σε άτομα που είναι υπό θεραπεία με άλλα αντιπηκτικά και τέλος σε όσους πρόκειται να υποβληθούν σε μεγάλες επεμβάσεις και συγκεκριμένα σε επεμβάσεις με κεντρικούς νευρικούς αποκλεισμούς.

#### **A.2.14 Δράση στην ηπατική λειτουργία**

Στις περισσότερες περιπτώσεις η διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας έπεται από τη θεραπευτική λήψη ΜΣΑΦ είναι αρκετά σπάνια, αλλά στην περίπτωση που υπάρξει κάποια επιπλοκή είναι εύκολα αναστρέψιμη μετά τη διακοπή του φαρμάκου<sup>80</sup>. Συγκεκριμένα ΜΣΑΦ θεωρούνται ως πιο ηπατοτοξικά από άλλα, χωρίς όμως να υπάρχει κάποια ικανοποιητική εξήγηση για το φαινόμενο αυτό. Ωστόσο, παρόλο που οι πιθανές επιπλοκές είναι εύκολα αναστρέψιμες, η εξέταση της ηπατικής λειτουργίας σε ασθενείς που λαμβάνουν ΜΣΑΦ για μεγάλα χρονικά διαστήματα, θα πρέπει να είναι τακτική καθώς η υπερδοσολογία συγκεκριμένων ΜΣΑΦ, όπως της φαινακετίνης και της ακεταμινοφαίνης, μπορεί να οδηγήσουν σε οξεία ηπατική ανεπάρκεια.

#### **A.2.15 Δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ)**

Το σύνολο των ανεπιθύμητων επιδράσεων των ΜΣΑΦ στο ΚΝΣ, συμψηφίζονται στην κεφαλαλγία ζάλη, σύγχυση και διαταραχές στη λειτουργία της μνήμης. Οι παραπάνω ανεπιθύμητες επιδράσεις είναι συνήθως εντονότερες σε ηλικιωμένα άτομα, γεγονός που οδηγεί πολλές φορές στην ανάγκη διακοπής της θεραπείας. Έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία επίσης, περιπτώσεις που η μακροχρόνια χορήγηση ΜΣΑΦ συσχετίστηκε με την εμφάνιση κατάθλιψης και παράνοιας. Δυστυχώς όμως προς το παρόν οι ακριβείς μηχανισμοί εμφάνισης αυτών των σοβαρών ψυχικών διαταραχών δεν είναι εξακριβωμένοι αλλά ούτε και τεμκηριωμένοι.

Για τους προαναφερθέντες λόγους, εφίσταται η προσοχή στους ασθενείς οι οποίοι έχουν ιστορικό ψυχικών διαταραχών η κατάχρησης ουσιών όταν πρόκειται να τους χορηγηθεί μακροχρόνια κάποιο ΜΣΑΦ. Πρόσφατες μελέτες έχουν γίνει και πάνω στη νόσο Alzheimer γενικότερα άλλου τύπου άνοιες, και στον τρόπο επίδρασης των ΜΣΑΦ σε ασθενείς με τις παθήσεις αυτές. Μερικές επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν

καθυστέρηση εξέλιξης της άνοιας ή ελαττωμένη συχνότητα σε ασθενείς που λαμβάνουν ΜΣΑΦ για μεγάλα χρονικά διαστήματα <sup>81</sup>. Η επίδραση των ΜΣΑΦ σε αυτή την κατηγορία ασθενών πιθανολογείται πως οφείλεται στην αναστολή της COX-2 και στην καταστολή της μικρογλοιακής δραστηριότητας.

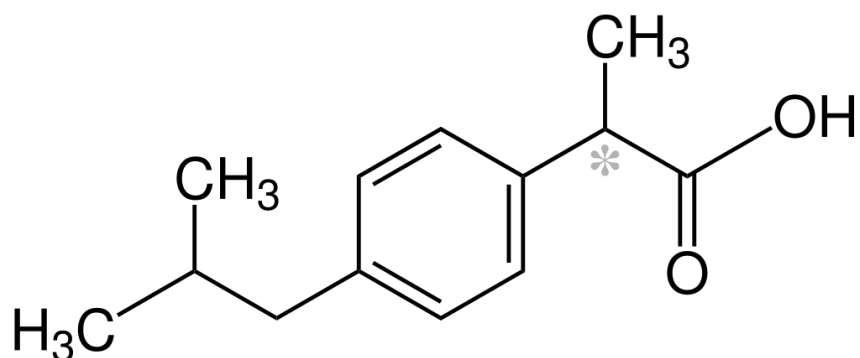
### **A.2.16 Αντικαρκινική δράση**

Η ελαττωμένη συχνότητα ορθοπρωτικού καρκίνου έχει συσχετιστεί με τη χρήση ΜΣΑΦ από διάφορες μελέτες <sup>82</sup>. Ακόμα όμως δεν έχει προσδιοριστεί η κατάλληλη δοσολογία και διάρκεια χορήγησης ΜΣΑΦ ούτε σε ότι αφορά την πρόληψη του καρκίνου αλλά φυσικά ούτε και στη θεραπεία του. Το ερευνητικό ενδιαφέρον στο τομέα αυτόν ξεκίνησε από το γεγονός πως οι ερευνητές γνώριζαν ήδη πως οι ΡGπου παράγονται από την COX-2, συμβάλουν στην αύξηση πολλών κακοηθών όγκων, καθώς επηρεάζουν τη μίτωση, την αναγέννηση και την απόπτωση στον κύκλο ζωής των καρκινικών κυττάρων. Παράλληλα ενισχύουν τις ανασοκατασταλτικές επιδράσεις των κυττάρων αυτών.

Οι συγκεντρώσεις προσταγλανδινών σε κακοήθεις όγκους του τραχήλου, του μαστού, του πνεύμονα και του εντέρου, είναι αυξημένες σε σύγκριση με τους αντίστοιχους υγιής ιστούς. Εφόσον ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου είναι μεγαλύτερος σε χρόνιες φλεγμονές και σε αυξημένα επίπεδα της COX-2, τότε ο κίνδυνος αυτός μειώνεται με τη χρήση αναστολέων της COX-2.

### **A.2.17 Ιβουπροφαίνη**

Η ιβουπροφαίνη (ibuprofen, Hibu) προήλθε από προπιονικό οξύ κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960. [56] Το όνομα προέρχεται από τις 3 λειτουργικές ομάδες: ισοβουτύλιο (ιβου),προπιονικό οξύ (προ) φαινύλιο (φαιν). Η ανακάλυψή της ήταν το αποτέλεσμα της έρευνας κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 και του 1960 για να βρεθεί μια ασφαλέστερη εναλλακτική λύση έναντι της ασπιρίνης. Ανακαλύφθηκε από μια ομάδα με επικεφαλής τον Stewart Adams και η αίτηση διπλώματος ευρεσιτεχνίας κατατέθηκε το 1961. Ο Adams δοκίμασε αρχικά το φάρμακο ως θεραπεία για τον πονοκέφαλό του από κατανάλωση αλκοόλ. Το φάρμακο κυκλοφόρησε ως θεραπεία για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1969 και στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1974. Αργότερα, το 1983 και το 1984, έγινε το πρώτο ΜΣΑΦ (εκτός από την ασπιρίνη) που ήταν διαθέσιμο χωρίς συνταγή (OTC) σε αυτές τις δύο χώρες. Πλέον είναι διαθέσιμο με μία πληθώρα εμπορικών ονομασιών όπως "Advil" ή "Motrin"<sup>83</sup>.



Σχήμα 7: Συντακτικός τύπος της ιβουπροφαίνης

Είναι μια οπτικώς δραστική ένωση με αμφότερα τα S και R-ισομερή, εκ των οποίων το S (δεξιόστροφο) ισομερές είναι το πιο βιολογικά ενεργό. Αυτό το ισομερές έχει επίσης απομονωθεί και χρησιμοποιηθεί ιατρικά. Η ιβουπροφαίνη παράγεται βιομηχανικά ως ρακεμικό μείγμα. Η ένωση, όπως και άλλα 2-αρυλοπροπιονικά παράγωγα(συμπεριλαμβανομένων κετοπροφένης, φλουρμπιπροφένης, ναπροξένης, κ.λπ.), περιέχει ένα στερεοκεντρικό στην θέση της προπιονικής χαρακτηριστικής ομάδας. Έτσι, εμφανίζονται δύο εναντιομερή ιβουπροφαίνης, με πιθανότητα διαφορετικών βιολογικών επιδράσεων και μεταβολισμού για κάθε εναντιομερές. Μια ισομεράση (α-μεθυλακυλο-CoA ρακεμάση) μετατρέπει τη (R)-ιβουπροφαίνη σε δραστικό (S)-εναντιομερές.



Εικόνα 3: Συσκευασία εμπορικά διαθέσιμης ιβουπροφαίνης

Η αντιφλεγμονώδης δράση της ιβουπροφαίνης οφείλεται στην αναστολή της COX-2. Πιθανές παρενέργειες της ιβουπροφαίνης είναι η νεφρική δυσλειτουργία, η γαστρεντερική αλλοίωση και η αιμορραγία<sup>84</sup>. Η στοχευμένη χορήγηση της ιβουπροφαίνης πιθανώς βοηθά στη μείωση των παρενεργειών. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως εκτός από την αντιμετώπιση της αρθρίτιδας και του πόνου, ο καρκίνος και νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως το Alzheimer, θα μπορούσαν ενδεχομένως να αντιμετωπιστούν με τη χρήση παρεμποδιστών της COX-2, όπως

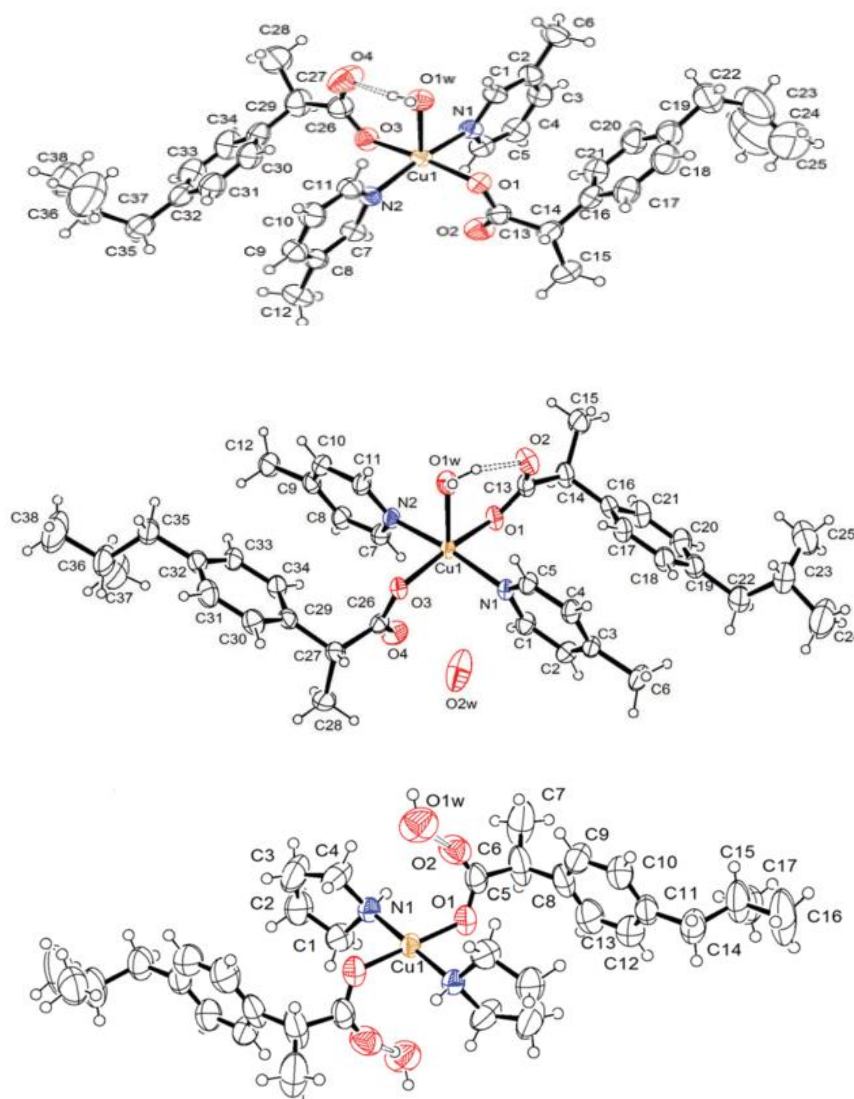


είναι η ιβουπροφαίνη. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η ιβουπροφαίνη θα μπορούσε να επηρεάσει τη μικροβιακή ανάπτυξη *in vitro* και, από την άλλη πλευρά άλλωστε, οι βακτηριακές λοιμώξεις προκαλούν συχνά πόνο και φλεγμονή<sup>85</sup>.

Παρόλο που η χρήση του ibuprofen είναι ιδιαίτερα εκτεταμένη, οι αναφορές συμπλόκων του Cu με το ibuprofen στην βιβλιογραφία είναι περιορισμένη. Τα σύμπλοκα που έχουν σχηματιστεί είναι μονοπυρηνικά με την ύπαρξη 2 ligands του εκάστοτε αζωτοδότη και την συναρμογή ligand νερού.

Πίνακας 2: Σύμπλοκα Cu με το ΜΣΑΦ ibuprofen στην βιβλιογραφία<sup>88</sup>

Σύμπλοκο	Δότης-N	Είδος Συμπλόκου
[Cu(ibuprofen) <sub>2</sub> (β-picoline) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)]	β-picoline	Μονοπυρηνικό
[Cu(ibuprofen) <sub>2</sub> (γ-picoline) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)]•H <sub>2</sub> O	γ-picoline	Μονοπυρηνικό
[Cu(ibuprofen) <sub>2</sub> (pyrrolidine) <sub>2</sub> ](H <sub>2</sub> O)	pyrrolidine	Μονοπυρηνικό



Σχήμα 8: Δομή των μονοπυρηνικών συμπλόκων κατά σειρά: [Cu(ibuprofen)<sub>2</sub>(β-picoline)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)], [Cu(ibuprofen)<sub>2</sub>(γ-picoline)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]•H<sub>2</sub>O και [Cu(ibuprofen)<sub>2</sub>(pyrrolidine)<sub>2</sub>](H<sub>2</sub>O).<sup>88</sup>

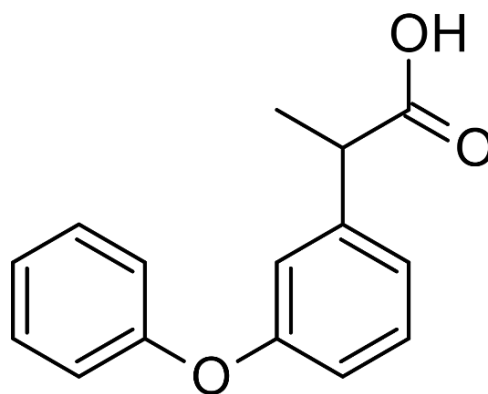
## A.2.18 Φαινοπροφαίνη

Η φαινοπροφαίνη (fenoprofen, Hfeno) είναι ένας μη-στεροειδής αντιφλεγμονώδης ένωση προπιονικού οξέος. Η αποτελεσματικότητά της είναι παρόμοια με άλλα ΜΣΑΦ, αν και μπορεί να έχει αυξημένη τοξικότητα στους νεφρούς. Επειδή η φαινοπροφαίνη εμφανίζει σημαντική αντισταμοπεταλιακή δράση μπορεί να έχει αξία στη μείωση της επίπτωσης παροδικών ισχαιμικών προσβολών. Το άλας ασβεστίου χρησιμοποιείται κλινικά για τη διαχείριση του ήπιου έως μέτριου πόνου και για την ανακούφιση φλεγμονωδών διαταραχών όπως η αρθρίτιδα. Η φαινοπροφαίνη απορροφάται εύκολα έπειτα από στοματική χορήγηση. Η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητά της, ωστόσο, μεταβάλλονται όταν χορηγείται με τροφή ή γάλα. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα επιτυγχάνονται εντός 1-2 ωρών μετά τη στοματική χορήγηση. Η αρχική αναλγητική απόκριση είναι εμφανής εντός 15-30 λεπτών μετά τη στοματική χορήγηση και διαρκεί 4-6 ώρες<sup>86</sup>. Παρόμοια με άλλα ΜΣΑΦ, η φαινοπροφαίνη παρεμποδίζει την κυκλοξυγενάση, το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή προσταγλανδινών.



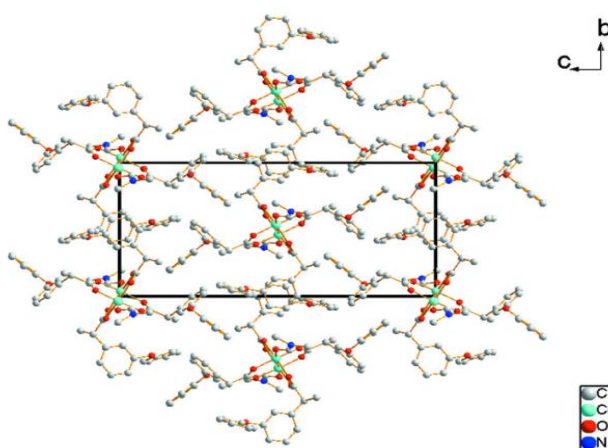
Εικόνα 4: Σύμπλοκο της COX-2 με ΜΣΑΦ που παρεμποδίζει την δράση της<sup>90</sup>

Η φαινοπροφαίνη είναι ένας αντιφλεγμονώδης παράγοντας που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της εκφυλιστικής νόσου των αρθρώσεων, της αλκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας και της ουρικής αρθρίτιδας. Η αποτελεσματικότητά της είναι συγκρίσιμη με άλλα ΜΣΑΦ. Όπως και άλλα μέλη αυτής της θεραπευτικής τάξης, η φαινοπροφαίνη αναστέλλει αντιστρεπτά τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Τα μειονεκτήματα της φαινοπροφαίνης σε σύγκριση με άλλους μη-στεροειδείς αντιφλεγμονώδεις παράγοντες περιλαμβάνουν μεγάλο διαχωρισμό μεταξύ της δόσης που απαιτείται για την αναλγησία και εκείνης που απαιτείται για την αντιφλεγμονώδη δράση και της νεφρικής τοξικότητας που σχετίζεται με τη χρήση της<sup>87</sup>.



Σχήμα 9: Συντακτικός τύπος της φαινοπροφαίνης

Η φαινοπροφαίνη ενδείκνυται για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της οστεοαρθρίτιδας, της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας, της ψωριασικής αρθρίτιδας, του πόνου και των οξέων προσβολών της ουρικής αρθρίτιδας ή της ασθένειας εναπόθεσης πυροφωσφορικού ασβεστίου. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανακούφιση της δυσμηνόρροιας και του πόνου που σχετίζεται με μη ρευματικές φλεγμονώδεις καταστάσεις ή αγγειακούς πονοκεφάλους και χρησιμοποιείται προληπτικά για τη θεραπεία αγγειακών πονοκεφάλων.



Σχήμα 10: Κρυσταλλική δομή του διπυρηνικού συμπλόκου  $[Cu_2(feno)_4(DMF)_2]$ <sup>92</sup>

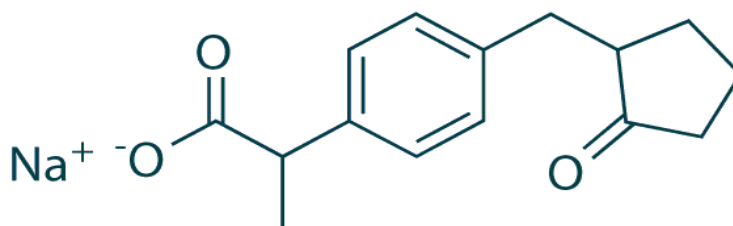
Στην βιβλιογραφία υπάρχει ένας μικρός αριθμός συμπλόκων του χαλκού με το fenoprofen. Στα σύμπλοκα αυτά ο χαλκός βρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα +2, και η παρουσία του χαλκού ενισχύει αισθητά την δράση του fenoprofen. Σχεδόν όλα τα σύμπλοκα που αναφέρονται στην βιβλιογραφία είναι διπυρηνικά, με την εξαίρεση ενός μοναδικού μονοπυρηνικού συμπλόκου όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.<sup>9188</sup>

Πίνακας 3: Γνωστά μονοπυρηνικά και διπυρηνικά σύμπλοκα Cu με το Fenoprofen<sup>93 94</sup>

Σύμπλοκο	Co-ligand	Είδος Συμπλόκου
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (pyrazine) <sub>2</sub> ]	Pyrazine	Διπυρηνικό
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (2,5-Me <sub>2</sub> pyraz) <sub>2</sub> ]	2,5-Me <sub>2</sub> pyrazine	Διπυρηνικό
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ]	DMF	Διπυρηνικό
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (caffeine) <sub>2</sub> ]	Caffeine	Διπυρηνικό
[Cu(feno) <sub>2</sub> (imidazole) <sub>2</sub> ]	Imidazole	Μονοπυρηνικό
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (4,4'-bipy) <sub>2</sub> ]	4,4'-bipy	Διπυρηνικό

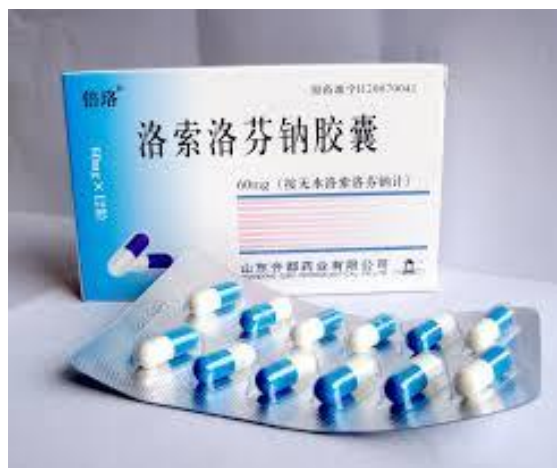
## A.2.19 Λοξοπροφαίνη

Η λοξοπροφαίνη (loxoprofen, Ηλοχο) αποτελεί ένα προ-φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των ΜΣΑΦ. Παρασκευάστηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία, με την υπόθεση πως θα προκαλεί λιγότερα ανεπιθύμητα συμβάντα που σχετίζονται με την χρήση των ΜΣΑΦ σε σύγκριση με τα ήδη υπάρχοντα ΜΣΑΦ. Στοματικά σκευάσματα υπάρχουν στην αγορά της Ιαπωνίας από το 1986, και η λοξοπροφαίνη αποτελεί νούμερο 1 συνταγογραφούμενο ΜΣΑΦ στην Ιαπωνία και το νούμερο 2 στην Κίνα. Η χρήση του στοχεύει κυρίως στην αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της οστεοαρθρίτιδας, του πόνου, φλεγμονών που προκύπτουν από κάποια χειρουργική επέμβαση, καθώς και του πυρετού που προκαλείται από οξεία φλεγμονή του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος<sup>89</sup>.



Εικόνα 5: Συντακτικός τύπος του άλατος νατρίου της Λοξοπροφαίνης

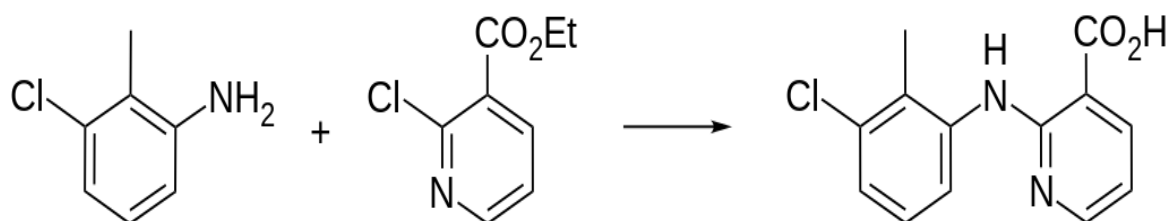
Όπως ήδη αναφέρθηκε, η λοξοπροφαίνη είναι ένα προ-φάρμακο, με την ενεργή της μορφή να είναι ο μεταβολίτης της, η *trans*-αλκοόλη. Η δράση του όπως και στα περισσότερα ΜΣΑΦ, γίνεται μέσω της αναστολής των ενζύμων COX-1 και COX-2, με σημαντική λεπτομέρεια, πως η λοξοπροφαίνη από μόνη της δεν προκαλεί αναστολή των υποδοχέων αλλά μόνο ο μεταβολίτης της. Στην αγορά συνήθως βρίσκεται σε μορφή άλατος του νατρίου<sup>89</sup>.



Εικόνα 6: Φάρμακο διαθέσιμο στην αγορά της Ιαπωνίας, του άλατος της λοξοπροφαίνης, σε μορφή κάψουλας

### A.2.20 Κλονιξίνη

Η κλονιξίνη (clonixin, Hclon) είναι ένα πυριδινομονοκαρβοξυλικό οξύ, και ουσιαστικά συνίσταται από το νικοτινικό οξύ, στο μόριο του οποίου έχει γίνει υποκατάσταση στη θέση 2 από μία (2-μεθυλ-3-χλωροφαινυλ)αμινομάδα. Χρησιμοποιείται (ως άλας της λυσίνης) για τη θεραπεία των κολικών των νεφρών, του μυϊκού πόνου και των ημικρανιών. Χαρακτηρίζεται ως ΜΣΑΦ, μη-ναρκωτικό αναλγητικό, αντιπυρετικό, αναστολέας συσσώρευσης αιμοπεταλίων και ως αγγειοδιασταλτικός παράγοντας. Επίσης δρα ως αναστολέας της προσταγλαδίνης – συνθετάσης ενδοπεροξειδίου αλλά και της λιποξυγενάσης.

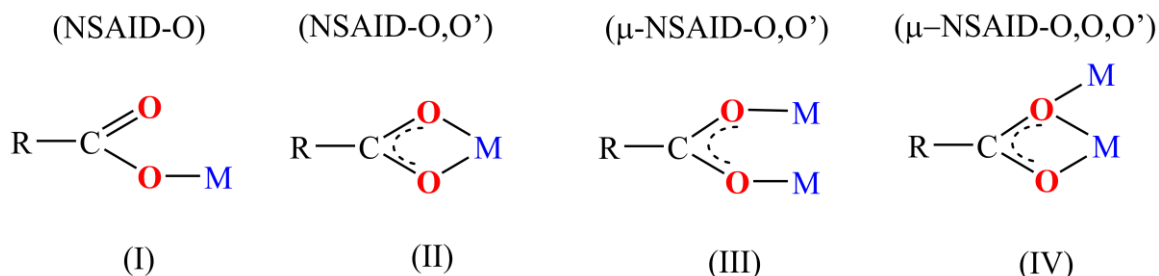


Σχήμα 11: Σύνθεση Κλονιξίνης (M. H. Sherlock, N. Sperber, BE 679271; eidem, U.S. Patent 3,337,570 (1966, 1967 both to Schering))

### A.2.21 Τρόπος σύνδεσης ΜΣΑΦ μέσω του καρβοξυλίου

Στο σύνολο των δομών συμπλόκων ενώσεων μετάλλων με ΜΣΑΦ που έχουν μελετηθεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, φαίνεται πως τα ΜΣΑΦ συνδέονται στο εκάστοτε μέταλλο με έναν από τους εξής 4 τρόπους που φαίνονται στο **Σχήμα 12**. Παρατηρείται ένας διαχωρισμός ανάμεσα στα μονοπυρηνικά σύμπλοκα και στα πολυπυρηνικά σύμπλοκα. Στα μονοπυρηνικά σύμπλοκα, η καρβοξυλομάδα συνδέεται στο μέταλλο είτε μονοδραστικά, χρησιμοποιώντας ένα από τα δύο

καρβοξυλικά οξυγόνα (Σχήμα 12(I)), είτε διδραστικά χηλικά μέσω και των δύο καρβοξυλικών οξυγόνων ( $\kappa\text{-O,O}'$ ) όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 12(II). Στην περίπτωση των πολυπυρηνικών συμπλόκων, η καρβοξυλική ομάδα συμμετέχει επίσης και ως γέφυρα μεταξύ των μετάλλων εξαιτίας των δύο οξυγόνων της καρβοξυλικής ομάδας με διδραστικό τρόπο ( $\mu_{1,3}\text{-O,O}'$ ) (Σχήμα (III)) ή με τριδραστικό τρόπο ( $\mu\text{-MΣΑΦ-O,O,O}'$ ) (Σχήμα (IV))<sup>90</sup>.

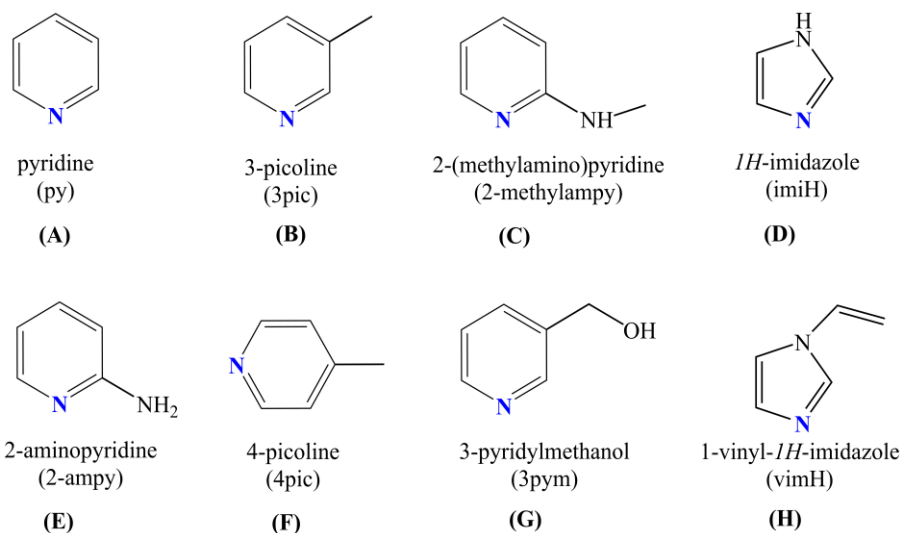


Σχήμα 12: Διαφορετικοί τρόποι σύνδεσης των ΜΣΑΦ κατά τη δημιουργία συμπλόκων ΜΣΑΦ-Μετάλλων.

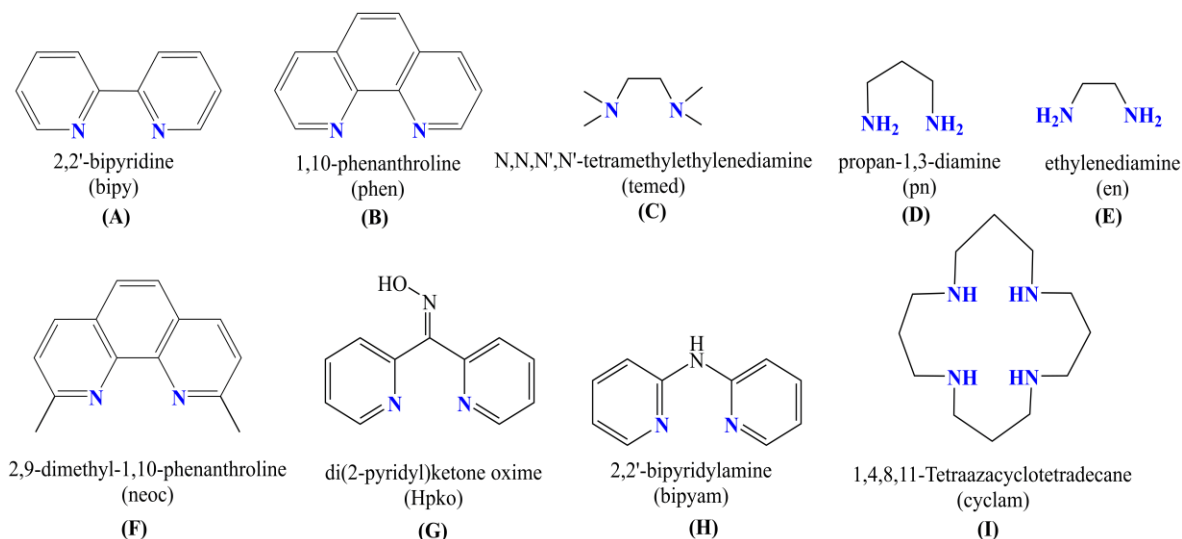
## A.2.21 Ο ρόλος των co-ligands

Η μελέτη όμως των προαναφερθέντων συμπλόκων μετάλλων-ΜΣΑΦ απαιτεί να λάβουμε υπόψιν και την φύση των co-ligands που χρησιμοποιούνται στα σύμπλοκα αυτά. Στην βιβλιογραφία εντοπίζουμε έναν διαχωρισμό των co-ligands σε τρεις βασικές κατηγορίες:

- Co-ligands δότες O, όπως το H<sub>2</sub>O, η MeOH, το DMSO, το DMF κ.α.
- Co-ligands δότες N, όπως η πυριδίνη (py), και τα διάφορα παράγωγά της όπως η 2-αμινοπυριδίνη, η 3-πικολίνη, το ιμιδαζόλιο.
- Co-ligands δότες 2 ατόμων N, όπως η 2,2'-διπυριδίνη, η 2,2'-διπυριδιλαμίνη, η 1,10-φαινανθρολίνη κ.α.



Σχήμα 13: Συντακτικοί τύποι και ονόματα διαφόρων co-ligands δοτών ενός ατόμου N



Σχήμα 14: Συντακτικοί τύποι και ονόματα διαφόρων *co-ligands* δοτών δύο ατόμων N.

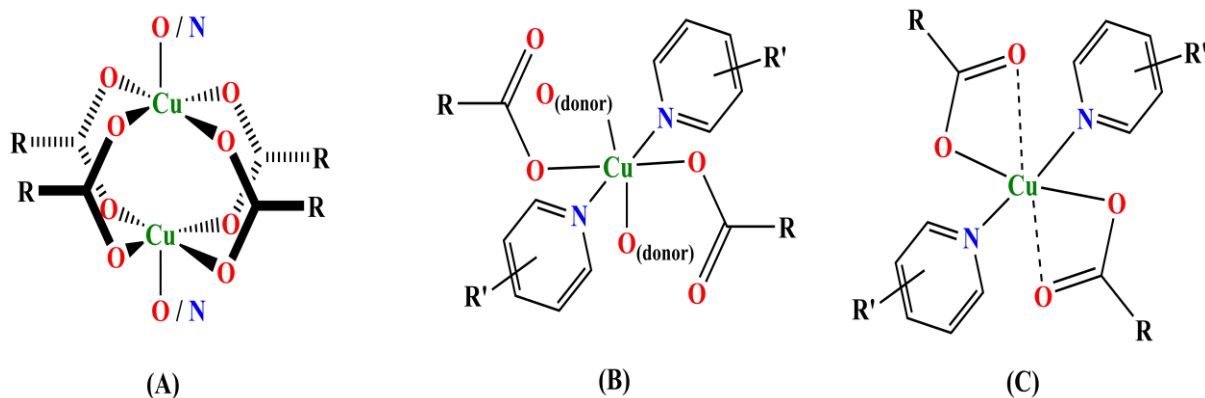
## A.4 Σύμπλοκα Cu(II)-ΜΣΑΦ

Τα σύμπλοκα του Cu(II) με καρβοξυλικά ΜΣΑΦ μπορούν να κατηγοροποιηθούν σε 3 κατηγορίες οι οποίες βασίζονται στην φύση των *co-ligands*, με βάση το εάν είναι δότες O, N ή δύο/περισσότερων ατόμων N, σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες αντίστοιχα.

### A.4.1 Σύμπλοκα Cu(II)-ΜΣΑΦ με *co-ligands* O-δότες

Στη συγκεκριμένη κατηγορία επικρατεί πάντα μία αναλογία 1:2 Cu(II):ΜΣΑΦ. Παράλληλα η παρουσία των δοτών οξυγόνου ως *co-ligands* οδηγούν κατά κύριο λόγο σε σχηματισμό πολυπυρηνικών συμπλόκων, με ελάχιστα από τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα να είναι μονοπυρηνικά.

Τα διπυρηνικά σύμπλοκα έχουν τη γενική μορφή  $[Cu_2(\mu\text{-ΜΣΑΦ-O,O}')_4(\delta\text{ότης-O})_2]$  στην οποία τα ΜΣΑΦ ligands δρουν ως διδραστικές γέφυρες σε διαμόρφωση *raddlewheel*. Στα σύμπλοκα αυτής της κατηγορίας, η γεωμετρία γύρω από το Cu είναι ελαφρώς παραμορφωμένη τετραγωνική πυραμίδα, στην οποία τα 4 άτομα οξυγόνου των ΜΣΑΦ σχηματίζουν τη βάση της πυραμίδας, ο δότης-O βρίσκεται στην κορυφή της πυραμίδας, ενώ το άλλο ιόν του χαλκού βρίσκεται στην 6<sup>η</sup> θέση του ψευδο-οκταέδρου (Σχήμα 15). Χαρακτηριστικό αυτών των συμπλόκων είναι η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων Cu η οποία συνήθως κυμαίνεται στο εύρος 2.585 – 2.660 Å, η οποία είναι τυπική για διπυρηνικά σύμπλοκα του χαλκού(II) που εμφανίζουν τη διαμόρφωση *raddlewheel*.<sup>95</sup>



Σχήμα 15: Οι 3 πιο συνηθισμένες διαμορφώσεις σε κρυσταλλικές δομές Cu(II)-MΣΑΦ που εμφανίζονται στη βιβλιογραφία<sup>95</sup>

Πίνακας 4: Δομικά χαρακτηριστικά για τα διπυρηνικά σύμπλοκα Cu(II)-MΣΑΦ που εμφανίζουν διαμόρφωση raddlewheel.

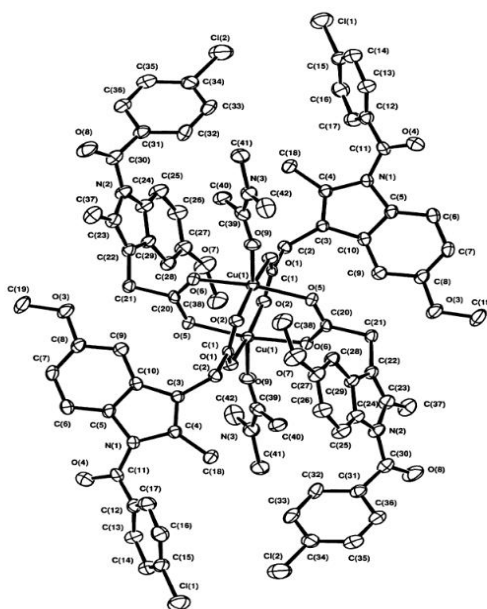
Σύμπλοκο	Ο-δότης	Απόσταση Cu...Cu (Å)	Δείκτης τριγωνικότητας (τ) <sup>a</sup>
[Cu <sub>2</sub> (Hdifl) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ]	DMF	2.660	0.00
[Cu <sub>2</sub> (fluf) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ]	DMF	2.618	0.00
[Cu <sub>2</sub> (indo) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ]	DMF	2.630	0.05
[Cu <sub>2</sub> (dicl) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ]	DMF	2.627	0.002
[Cu <sub>2</sub> (tolf) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ]	DMF	2.607	0.008
[Cu <sub>2</sub> (oxa) <sub>4</sub> (DMSO) <sub>2</sub> ]	DMSO	2.612	0.002
[Cu <sub>2</sub> (tolf) <sub>4</sub> (DMSO) <sub>2</sub> ]	DMSO	2.662	0.00
[Cu <sub>2</sub> (nap) <sub>4</sub> (DMSO) <sub>2</sub> ]	DMSO	2.629	0.095
[Cu <sub>2</sub> (mef) <sub>4</sub> (DMSO) <sub>2</sub> ]	DMSO	2.628	0.02
[Cu <sub>2</sub> (nif) <sub>4</sub> (DMSO) <sub>2</sub> ]	DMSO	2.627	0.010
[Cu <sub>2</sub> (indo) <sub>4</sub> (DMA) <sub>2</sub> ]	DMA	2.649	0.000
[Cu <sub>2</sub> (dicl) <sub>4</sub> (MeOH) <sub>2</sub> ]	MeOH	2.585	0.002
[Cu <sub>2</sub> (nif) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	H <sub>2</sub> O	2.644	0.000
[Cu <sub>2</sub> (indo) <sub>4</sub> (THF) <sub>2</sub> ]	THF	2.624	0.009
Σύμπλοκο	Ο-δότης	Απόσταση Cu...Cu (Å)	Δείκτης τριγωνικότητας (τ) <sup>a</sup>
[Cu <sub>2</sub> (indo) <sub>4</sub> (py) <sub>2</sub> ]	py	2.678	0.010
[Cu <sub>2</sub> (nap) <sub>4</sub> (3pic) <sub>2</sub> ]	3pic	2.690	0.125

<sup>a</sup>Ο δείκτης τριγωνικότητας (τ) υπολογίζεται από τη σχέση  $\tau = (\varphi_1 - \varphi_2)/60^\circ$ , όπου  $\varphi_1$  και  $\varphi_2$  είναι οι δύο μεγαλύτερες γωνίες στη σφαίρα συναρμογής του χαλκού(II).  $\tau = 0$  για κανονική τετραγωνική πυραμίδα, ενώ  $\tau = 1$  για τριγωνική διπυραμίδα<sup>91</sup>.

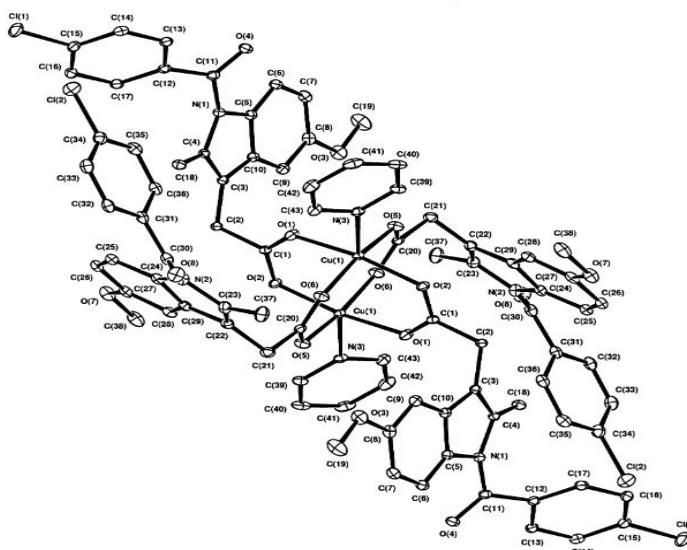
<sup>b</sup> Hdicl – Diclofenac, H<sub>2</sub>dilf – Diflunisal, Hfluf – Lufenamic acid, Hindo – Indometacin, Hmef – Mefenamic acid, Hnap – Naproxen, Hnif – Niflumic acid, Hoxa – oxaprozin, Htolf – Tolfenamic acid.



Βέβαια έχει επιτευχθεί, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, και η απομόνωση δύο μονοπυρηνικών συμπλόκων του χαλκού με ΜΣΑΦ και ligands δότες-Ο, με τη γενική τους δομή να συνοψίζεται στον τύπο  $[Cu(MΣΑΦ-O)_2(Δότης-O)_x]$  (όπου  $x = 2$  ή  $3$ ). Το σύμπλοκο με  $x=2$  είναι το  $[Cu(dicl-O)_2(H_2O)_2]$  όπου ο χαλκός είναι τετρασυναρμοσμένος με επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία<sup>95</sup>. Το σύμπλοκο στο οποίο  $x=3$  είναι το  $[Cu(par-O)_2(H_2O)_3]$ , στο οποίο το ιόν του χαλκού φέρει πέντε ligands και εμφανίζει γεωμετρία τετραγωνικής πυραμίδας<sup>92</sup>. Στα δύο αυτά σύμπλοκα τα ΜΣΑΦ συνδέονται μονοδραστικά στο ιόν του χαλκού.



Εικόνα 7: Διάγραμμα ORTEP της ένωσης  $[Cu_2(indo)_4(DMA)_2]$ <sup>98</sup>

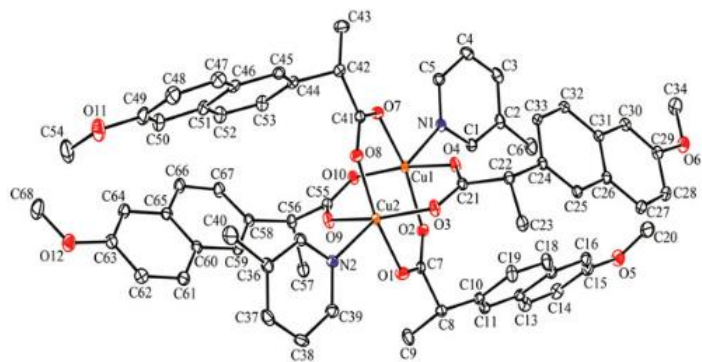


Εικόνα 8: Διάγραμμα ORTEP της ένωσης  $[Cu_2(indo)_4(py)_2]$ <sup>98</sup>

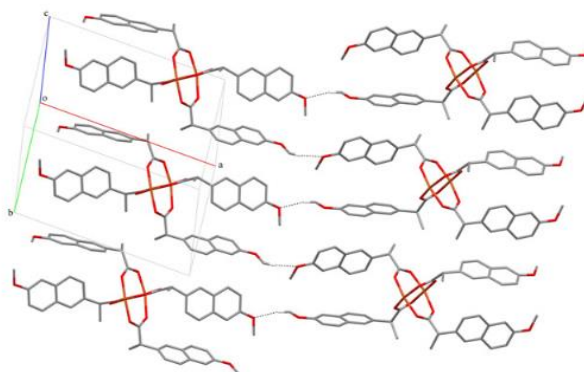
#### A.4.2 Σύμπλοκα Cu(II)-ΜΣΑΦ με co-ligands N-δότες

Στη συγκεκριμένη κατηγορία έχουν παρατηρηθεί τρία είδη συμπλόκων:

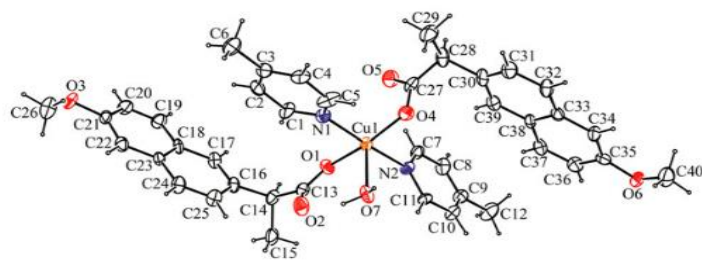
- Μονοπυρηνικά σύμπλοκα όπως τα  $[Cu(mef-O)_2(3pic)_2]$ ,  $[Cu(nar-O)_2(3pyr)_2]$ ,  $[Cu(nif-O)_2(3pyr)_2]$ ,  $[Cu(dicl-O)_2(py)_2]$  κ.α. Τα ΜΣΑΦ συναρμόζονται μονοδραστικά, με τα σύμπλοκα να έχουν το γενικό τύπο  $[Cu(NSAID-O)_2(N-donor)_2]$  και να εμφανίζουν παραμορφωμένη τετραεδρική γεωμετρία γύρω από το χαλκό (**Σχήμα 15**). Τα μη-συναρμωσμένα καρβοξυλικά άτομα οξυγόνου βρίσκονται σε απόσταση οριακή από το ιόν του χαλκού για να θεωρηθεί δεσμική, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται συναρμογή τύπου '4+2' και συνεπώς μια ψευδο-οκταεδρική γεωμετρία.
- Διπυρηνικά σύμπλοκα όπως το  $[Cu_2(\mu-nar)_4(3pic)_2]$ , με γενικό τύπο  $[Cu_2(\mu-NSAID-O,O')_4(\Delta\acute{o}της-N)_2]$ , τα οποία εμφανίζουν την κλασική διαμόρφωση raddlewheel. Σε αυτά τα σύμπλοκα η απόσταση μεταξύ των ατόμων Cu (2.678-2.690 Å) είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτές που εντοπίζουμε στα σύμπλοκα του τύπου  $[Cu_2(\mu-NSAID-O,O')_4(\delta\acute{o}της-O)_2]$ .
  - Σύμπλοκα με ταυτόχρονη παρουσία δοτών-N και δοτών-O: Οι δότες-O είναι συνήθως ένας ή δύο και προέρχονται από το διαλύτη (π.χ.  $H_2O, MeOH$ ). Στις περιπτώσεις αυτές, ο γενικός τύπος των συμπλόκων θα μπορούσε να περιγραφεί με τον παρακάτω τύπο  $[Cu(MΣΑΦ-O)_2(\Delta\acute{o}της-N)_2(\Delta\acute{o}της-O)_x]$  (με  $x=1$  ή 2). Τα ΜΣΑΦ συναρμόζονται μονοδοτικά στον Cu(II). Σε όσα σύμπλοκα  $x=2$  (π.χ.  $[Cu(tolf-O)_2(py)_2(MeOH)_2]$ ) το ιόν του χαλκού έχει αριθμό συναρμογής 6 και εμφανίζει παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία (**Σχήμα 15, 3<sup>η</sup> περίπτωση**). Στο σύμπλοκο  $[Cu(nar-O)_2(4pic)_2(H_2O)]$  όπου  $x=1$ <sup>93</sup>, ο Cu(II) φέρει αριθμό συναρμογής 5 και εμφανίζει γεωμετρία παραμορφωμένης τετραγωνικής πυραμίδας ( $\tau = 0.13$ ) ( $\tau$  είναι ο δείκτης τριγωνικότητας ( $\tau$ ) υπολογίζεται από τη σχέση  $\tau = (\varphi_1 - \varphi_2)/60^\circ$ , όπου  $\varphi_1$  και  $\varphi_2$  είναι οι δύο μεγαλύτερες γωνίες στη σφαίρα συναρμογής του χαλκού(II). Η τιμή  $\tau = 0$  αντιστοιχεί σε κανονική τετραγωνική πυραμίδα, ενώ  $\tau = 1$  σε τριγωνική διπυραμίδα<sup>91</sup>.



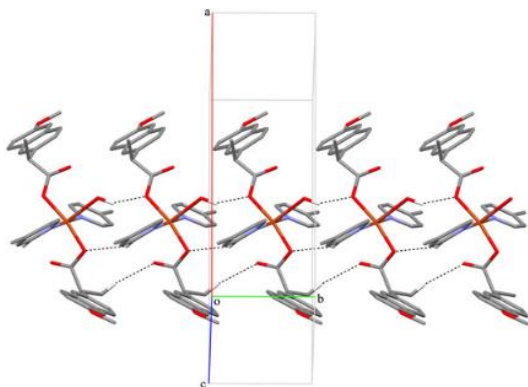
(A)



(B)



(C)

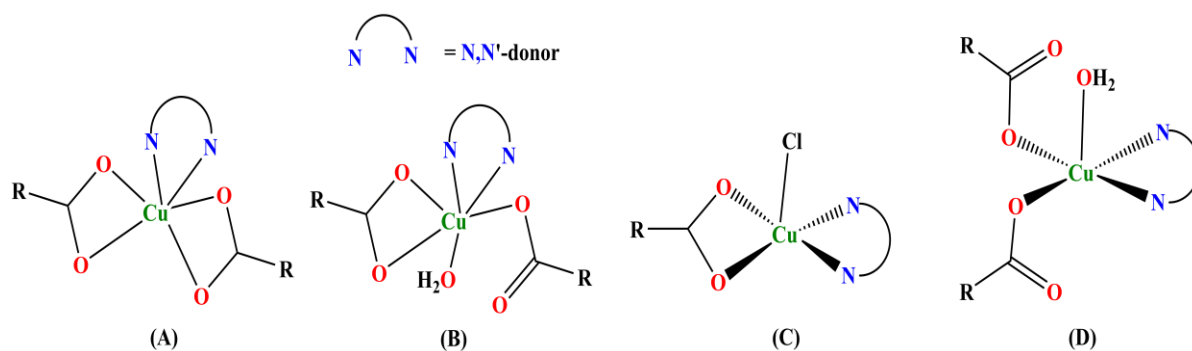


(D)

Εικόνα 9: Διαγράμματα ORTEPIII και κρυσταλλική απεικόνιση των ενώσεων  $[Cu_2(\mu\text{-nar})_4(3pic)_2]$  (A) + (B) και  $[Cu(\text{nar-O})_2(4pic)_2(H_2O)]$  (C) + (D).<sup>97</sup>

### A.4.3 Σύμπλοκα Cu(II)-ΜΣΑΦ με N,N'-δότες ως co-ligands

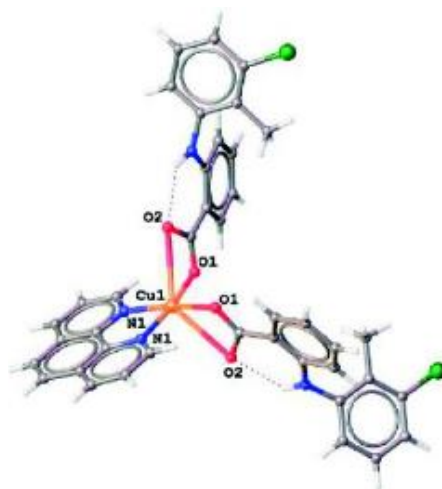
Στο ευρύτερο σύνολο των συμπλόκων Cu(II)-ΜΣΑΦ που φέρουν co-ligands N,N'-δότες (που συνδέονται διδοτικά και χηλικά), όλα τα σύμπλοκα που έχουν χαρακτηριστεί δομικά, είναι μονοπυρηνικά και στην πλειονότητα αυτών το ιόν Cu(II) έχει αριθμό συναρμογής έξι εμφανίζοντας παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία. Επίσης η πλειονότητα των συμπλόκων αυτών μπορούν να περιγραφούν με το γενικό τύπο  $[Cu(ΜΣΑΦ-O,O')_2(N,N'-Δότης)]$  έχοντας την καρβοξυλική ομάδα του ΜΣΑΦ να δρα διδοτικά και χηλικά (**Σχήμα16**).



Σχήμα 16: Σφαίρα συναρμογής του Cu(II) στα σύμπλοκα (A)  $[Cu(ΜΣΑΦ-O,O')_2(N,N'-Δότης)]$  (B)  $[Cu(tol-O,O')(tol-O)(phen)(MeOH)]$ , (C)  $[Cu(fluf-O,O')(bipyam)Cl]$  και (D)  $[Cu(keto-O)_2(bipyam)(H_2O)]$

Μέχρι στιγμής έχουν δημοσιευθεί 12 δομές με παρόμοια διαμόρφωση των ligands γύρω από το ιόν Cu ( $[Cu(tol-O,O')_2(bipy/bipyam/phen)]$ ,  $[Cu(nap-O,O')_2(bipy/phen)]$  κ.λπ.). Η εξαίρεση στα σύμπλοκα Cu(II)-ΜΣΑΦ που έχουν αριθμό συναρμογής 6 είναι το σύμπλοκο  $[Cu(tol-O,O')(tol-O)(phen)(MeOH)]$  στο οποίο τα δύο ligands ΜΣΑΦ συνδέονται με διαφορετικούς τρόπους. Το ένα συνδέεται μονοδοτικά ενώ το δεύτερο διδραστικά χηλικά (**Σχήμα 16 (B)**).

Η σφαίρα συναρμογής ολοκληρώνεται με την παρουσία της μεθανόλης που δρα ως ligand. Επιπρόσθετα έχουν δημοσιευθεί και δύο σύμπλοκα που έχουν αριθμό συναρμογής 5 πέντε με γεωμετρία παραμορφωμένης τετραγωνικής πυραμίδας ( $[Cu(fluf-O,O')(bipyam)Cl]$  και  $[Cu(keto-O)_2(bipyam)(H_2O)]$ ). Στο πρώτο, το μοναδικό ΜΣΑΦ δρα διδραστικά χηλικά ενώ το δεύτερο έχει δύο ΜΣΑΦ που δρουν μονοδοτικά.



(A)



(B)

Σχήμα 17: Δομή των ενώσεων  $[Cu(tol-O,O')_2(phen)]$  (A),  $[Cu(nap)_2(bipy)]$  (B).

## **B. Πειραματικό Μέρος**

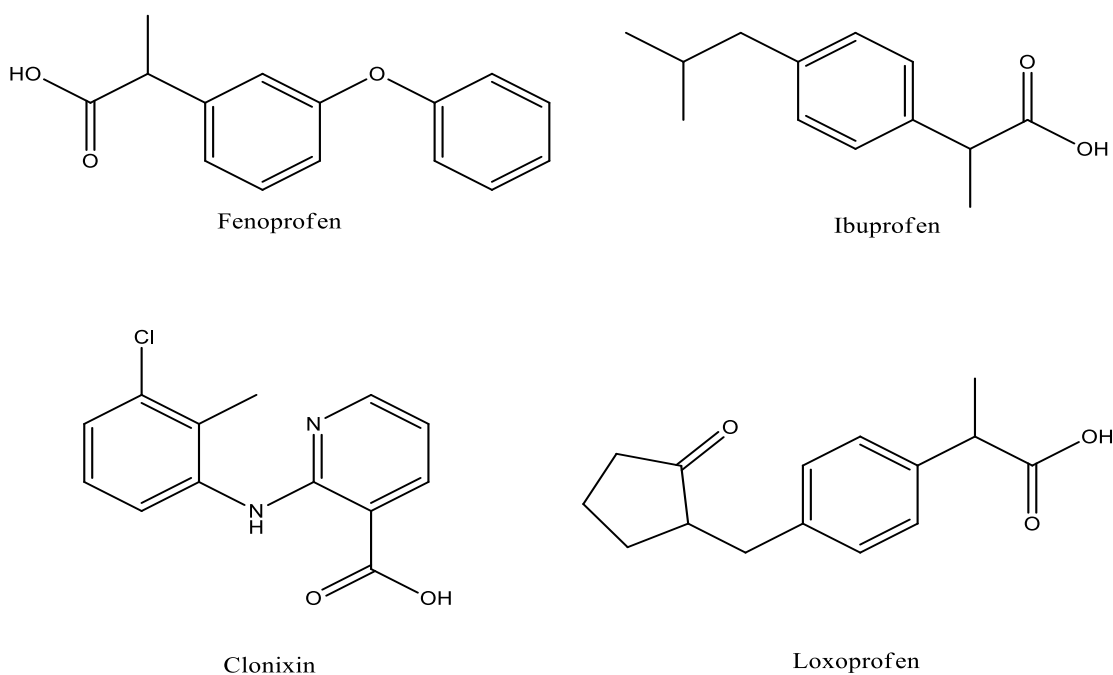
## Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής είναι η σύνθεση, η μελέτη της δομής και η εξέταση των βιολογικών ιδιοτήτων συμπλόκων ενώσεων του δισθενούς χαλκού και του ψευδαργύρου με τα ΜΣΑΦ φαινοπροφαίνη, ιβουπροφαίνη, λοξοπροφαίνη και κλονιξίνη παρουσία ή απουσία co-ligand δότη ενός ή δύο ατόμων Ν.

## B.1 Υλικά - Αντιδραστήρια- Όργανα Μέτρησης – Μελέτες αλληλεπίδρασης

### B.1.1 Ligands

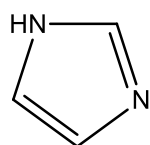
Τα ligands που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή είναι τα ΜΣΑΦ φαινοπροφαίνη (fenoprofen), ιβουπροφαίνη (ibuprofen), κλονιξίνη (clonixin) και λοξοπροφαίνη (loxoprofen) (**Εικόνα 10**). Ως ΜΣΑΦ έχουν την ιδιότητα να εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση, να μειώνουν τον πόνο, καθώς και τον πυρετό. Οι ιδιότητες αυτές επιτυγχάνονται, όπως προαναφέρθηκε, μέσω της αναστολής ενός ενζύμου που εμπλέκεται στη σύνθεση των προσταγλανδινών, την κυκλοοξυγενάση (COX). Η επιλογή των παραπάνω ligands έγινε με σκοπό τη βελτίωση των διαφόρων βιολογικών τους δράσεων.



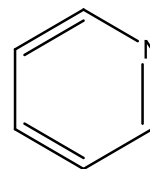
Εικόνα 10: Συντακτικοί τύποι των ligands που χρησιμοποιήθηκαν.

## B.1.2 Ετεροκυκλικές ενώσεις - Αζωτοδότες

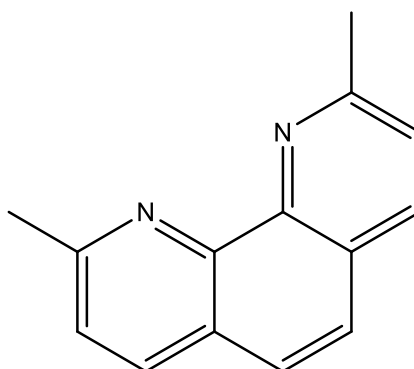
Επιπρόσθετα, τρεις διαφορετικές ετεροκυκλικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως co-ligands κατά τη σύνθεση των συμπλόκων. Η χρήση τους έγινε για τη σταθεροποίηση των συμπλόκων αλλά και για την βελτίωση των βιολογικών ιδιοτήτων λόγω πιθανής συνεργιστικής δράσης<sup>94</sup>. Δύο από τις ενώσεις αυτές είναι δότες ενός ατόμου N (N-δότες) και είναι η πυριδίνη (pyridine, py) και το ιμιδαζόλιο (imidazole, Himi), ενώ η τρίτη είναι δότης δύο ατόμων N (N,N'-δότης) και είναι η νεοκουπροΐνη ή 2,9-διμεθυλο-1,10-φαιναθρολίνη (neocuproine = neoc) (**Εικόνα 11**).



Imidazole



Pyridine



Neocuproine

Εικόνα 11: Συντακτικοί τύποι των co-ligands που χρησιμοποιήθηκαν

## B.1.3 Διαλύτες – Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα εξής:  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , sodium loxoprofen dihydrate ( $\text{Naloxo} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), calcium fenoprofen ( $\text{Ca}(\text{feno})_2$ ), ibuprofen (Hibu), clonixin (Hclon), KOH, πυκνό HCl (35% v/v), NaCl, trisodium citrate, calf-thymus (CT) DNA, BSA, HSA και αιθίδιο βρωμίδιο (EB) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma Aldrich και χρησιμοποιήθηκαν όπως παραλήφθηκαν. Οι διαλύτες μεθανόλη (MeOH), διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), αιθανόλη (EtOH) και διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Chemlab σε βαθμό καθαρότητας “χημικώς καθαρά” και χρησιμοποιήθηκαν όπως παραλήφθηκαν.

Το διάλυμα DNA που χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Συγκεκριμένα, έγινε διάλυση του calf-thymus DNA (CT DNA) σε ρυθμιστικό διάλυμα (150 mM NaCl και 15 mM κιτρικού νατρίου) του οποίου το pH = 7.0 (το οποίο ρυθμίστηκε με διάλυμα



0.1 M HCl) υπό συνεχή ανάδευση για 72 h και διατηρήθηκε στους 4°C. Για να μπορέσουμε να αποφανθούμε για την καθαρότητα του DNA από τυχόν πρωτεϊνικές προσμίξεις, έγινε η μέτρηση των εντάσεων απορρόφησης στα 260 και 280. Ο λόγος των 2 αυτών εντάσεων ( $A_{260}/A_{280}$ ) βρέθηκε ίσος με 1.85 – 1.90 και επιβεβαιώνει την καθαρότητα του DNA. Επιπρόσθετα η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε κατά την διάρκεια των μελετών επιλέχθηκε με βάση την απορρόφηση που εμφανίζει το DNA στα 260 nm, έπειτα από μία αραίωση 1:20 κ.ό. του αρχικού διαλύματος. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε ο τύπος του Lambert – Beer:

$$A = \varepsilon \times d \times c$$

όπου:

- A: η απορρόφηση
- $\varepsilon$ : η μοριακή απορρόφηση ( $\varepsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
- d: το πάχος της κυψελίδας (σε cm)
- c: η συγκέντρωση διαλυμένης ουσίας (M)

## B.1.4 Όργανα και πειραματικές διατάξεις

### B.1.4.1 Επίλυση κρυσταλλικών δομών

Η επίλυση των κρυσταλλικών δομών έγινε μέσω περίθλασης ακτίνων-X στο τμήμα Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης σε περιθλασίμετρο Bruker Kappa APEX II εξοπλισμένο με μονοχρωμάτορα τύπου TRIUMPH σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι μετρήσεις περίθλασης καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας ακτινοβολία από πηγή Mo. Οι διαστάσεις των μοναδιαίων κυψελίδων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 130 ανακλάσεις. Τα δεδομένα έντασης (intensity data) συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας τη λειτουργία σάρωσης  $\varphi$  και  $\omega$ . Για τη συλλογή και επεξεργασία των ανακλάσεων για κάθε κρύσταλλο, που οδήγησε στην επίλυση των δομών, οι ανακλάσεις ενσωματώθηκαν στο πακέτο λογισμικού Bruker SAINT<sup>95</sup> χρησιμοποιώντας narrow-frame αλγόριθμο. Τα δεδομένα διορθώθηκαν για απορρόφηση χρησιμοποιώντας την αριθμητική μέθοδο (SADABS) με βάση τις διαστάσεις των κρυστάλλων. Όλες οι δομές επιλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SUPERFLIP<sup>96</sup> και βελτιώθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων σε F2 σε full-matrix χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CRYSTALS 14.61\_build\_6236<sup>97</sup>. Όλα τα άτομα (εκτός των H) προσδιορίστηκαν ανισότροπα. Τα άτομα H βρέθηκαν στις αναμενόμενες θέσεις.

### B.1.4.2 Φάσματα υπερύθρου (IR)

Η λήψη των φασμάτων υπερύθρου πραγματοποιήθηκε σε φασματόμετρο Nicolet FT-IR 6700 στην περιοχή  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  υπό την μορφή δισκίων βρωμιούχου καλίου (KBr).

#### **B.1.4.3 Φάσματα UV-visible (UV-vis)**

Το σύνολο των φασμάτων UV-vis ελήφθη στο εύρος συγκεντρώσεων  $10^{-5}$ -  $5 \times 10^{-3}$  M (σε διάλυμα DMSO ή/και buffer) σε κυψελίδα πάχους 1 cm. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2001.

#### **B.1.4.4 Φάσματα φθορισμού**

Τα φάσματα φθορισμού λήφθηκαν στο φασματοφωτόμετρο Hitachi F-7000.

#### **B.1.4.5 Κυκλική βολταμετρία**

Το όργανο Autolab Electrochemical analyzer της Ecochemie χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη των συμπλόκων με την τεχνική της κυκλικής βολταμετρίας. Τα πειράματα της κυκλικής βολταμετρίας έγιναν σε ηλεκτρολυτική κυψέλη τριών ηλεκτροδίων των 30 mL. Το ηλεκτρόδιο εργασίας ήταν έλασμα λευκόχρυσου και το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο, σύρμα Pt. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl κορεσμένο με KCl. Τα κυκλικά βολταμμογραφήματα λήφθηκαν σε 0,4 mM διαλύματα DMSO/buffer (1:2) με ταχύτητα σάρωσης  $v = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  όπου το buffer ήταν ο φέροντας ηλεκτρολύτης. Η επιλογή του DMSO ως διαλύτη έγινε διότι όλα τα σύμπλοκα έχουν πολύ καλή διαλυτότητα σε αυτό. Η καθαρότητά του ελέγχθηκε με τη λήψη του κυκλικού βολταμμογραφήματος ενός διαλύματος που περιείχε μόνο το φέροντα ηλεκτρολύτη σε συγκέντρωση 0,1 M. Το οξυγόνο απομακρύνθηκε από τα διαλύματα με διοχέτευση καθαρού αερίου αζώτου. Η απαέρωση των διαλυμάτων ήταν απαραίτητη διότι το οξυγόνο μπορεί να δώσει ηλεκτροδιακές δράσεις που συνεπάγονται την αλλοίωση των μορφών των καμπυλών έντασης-τάσης. Όλες οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **B.1.4.6 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H NMR}$ )**

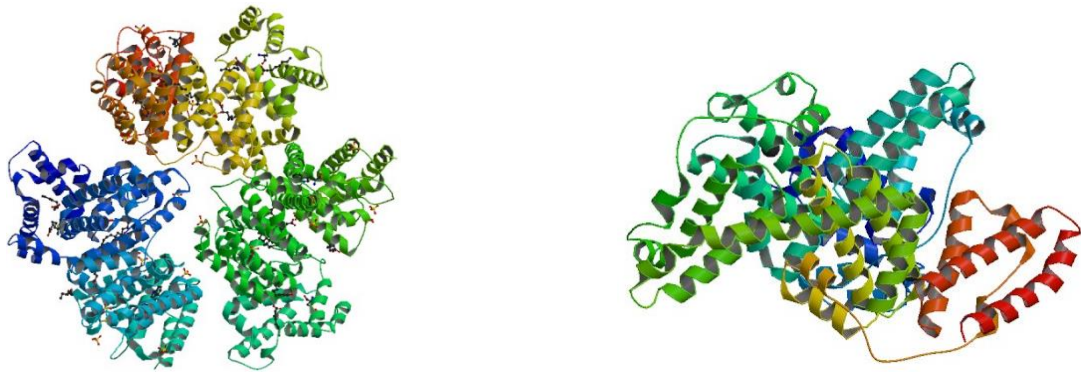
Η λήψη των φασμάτων έγινε σε διάλυμα DMSO- $d_6$  και το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Agilent 500/54 (500 MHz) στο Τμήμα Χημείας του ΑΠΘ.

## B.1.5 Μελέτες βιολογικής δράσης

### B.1.5.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης ενώσεων με αλβουμίνες ορού αίματος

Για τις μελέτες αλληλεπίδρασης των ενώσεων που συντέθηκαν με τις αλβουμίνες ορού αίματος, χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη αλβουμινών:

- i. Η αλβουμίνη ανθρώπινου ορού (Human serum albumin – HSA)
- ii. Η αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine serum albumin – BSA).



Εικόνα 12: Κρυσταλλικές δομές της αλβουμίνης ανθρώπινου και βόειου ορού

Οι μελέτες βασίζονται στην μείωση του φθορισμού της τρυπτοφάνης των αλβουμινών, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων ενώσεων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα της HSA ή της BSA (3  $\mu$ M) σε buffer (150 mM NaCl και 15 mM κιτρικού νατρίου) του οποίου το pH = 7.0. Η μελέτη της ελάττωσης της έντασης της εκπομπής φθορισμού της τρυπτοφάνης της HSA και BSA, στα 351 nm και 343 nm, αντίστοιχα, έγινε με την χρήση των συμπλόκων που συντέθηκαν με αυξανόμενη συγκέντρωσή τους. Η διέγερση έγινε σε μήκος κύματος 295 nm, ενώ τα φάσματα καταγράφηκαν στο εύρος 300–500 nm (η καταγραφή των φασμάτων εκπομπής των ελεύθερων συμπλόκων έγινε στα ίδια μήκη κύματος). Για την επίτευξη ορθότερων αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε διόρθωση των εκάστοτε φασμάτων μέσω αφαίρεσης των φασμάτων του εκάστοτε ελεύθερου συμπλόκου από το αρχικό φάσμα. Η επίδραση του φαινομένου εσωτερικού φίλτρου στις μετρήσεις αξιολογήθηκε με την παρακάτω εξίσωση:

$$I_{corr} = I_{meas} \times 10^{\varepsilon(\lambda_{exc})cd/2} \times 10^{\varepsilon(\lambda_{em})cd/2} \text{ (Εξίσωση 1)}$$

όπου:

- $I_{corr}$  = η διορθωμένη ένταση
- $I_{meas}$  = η μετρούμενη ένταση
- $c$  = η συγκέντρωση του αποσβέστη
- $d$  = το μήκος της κυβελίδας (1 cm)
- $\varepsilon(\lambda_{exc})$  και  $\varepsilon(\lambda_{em})$  = ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του αποσβέστη στο μήκος κύματος της διέγερσης και της εκπομπής, αντίστοιχα, όπως υπολογίστηκε από τα φάσματα UV-vis των συμπλόκων

Οι εξισώσεις των Stern–Volmer (Εξίσωση 2) και Scatchard (Εξίσωση 3) καθώς και τα αντίστοιχα διαγράμματα, χρησιμοποιήθηκαν ώστε να γίνει δυνατός ο υπολογισμός της σταθεράς Stern-Volmer  $K_{SV}$  (σε  $M^{-1}$ ), η σταθερά απόσβεσης  $k_q$  (σε  $M^{-1}s^{-1}$ ), η σταθερά πρόσδεσης στην αλβουμίνη  $K$  ( $M^{-1}$ ) καθώς και ο αριθμός θέσεων σύνδεσης ανά αλβουμίνη  $n$ .

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{Εξίσωση 2})$$

όπου:

- $I_0$  = ο αρχικός φθορισμός της αλβουμίνης
- $I$  = ο φθορισμός της αλβουμίνης μετά την προσθήκη της ένωσης
- $k_q$  = η σταθερά απόσβεσης των αλβουμινών
- $K_{SV}$  = η σταθερά Stern-Volmer
- $\tau_0$  = ο μέσος χρόνος ζωής φθορισμού των αλβουμινών
- $[Q]$  = η συγκέντρωση της ένωσης
- $K_{SV} = k_q \tau_0$

Γνωρίζοντας ότι  $\tau_0 = 10^{-8}$  s και αφού υπολογίσουμε τη σταθερά Stern–Volmer από την κλίση του διαγράμματος  $I_0/I$  προς  $[Q]$ , μπορούμε να υπολογίσουμε τη σταθερά απόσβεσης  $k_q$ .

Με βάση την εξίσωση Scatchard:

$$\frac{\Delta I/I_0}{[Q]} = nK - K \frac{\Delta I}{I_0} \quad (\text{Εξίσωση 2})$$

όπου  $K$  είναι η σταθερά σύνδεσης της αλβουμίνης με την ένωση, η οποία μπορεί να υπολογιστεί από την κλίση της ευθείας στο διάγραμμα  $(\Delta I/I_0)/[Q]$  προς  $\Delta I/I_0$  και  $n$  ο αριθμός των θέσεων σύνδεσης ανά αλβουμίνη που υπολογίζεται από την τεταγμένη επί την αρχή προς την κλίση στο ίδιο διάγραμμα.<sup>94</sup>

## B.1.5.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με DNA

### B.1.5.2.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA με φασματοσκοπία UV–vis

Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων που αναφέρονται στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή με CT DNA μελετήθηκε με φασματοσκοπία UV–vis ώστε να γίνει η διερεύνηση του πιθανού τρόπου σύνδεσης των ενώσεων στο CT DNA, καθώς και τον υπολογισμό της σταθεράς σύνδεσης  $K_b$ . Τα φάσματα UV του CT DNA καταγράφηκαν παρουσία καθενός συμπλόκου σε διάφορους λόγους  $r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$ . Η εξίσωση Wolfe–Shimer (Εξίσωση 4) χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν οι τιμές των σταθερών σύνδεσης  $K_b$  ( $M^{-1}$ ) και τα διαγράμματα  $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$  προς  $[\text{DNA}]$  από τα φάσματα των συμπλόκων που καταγράφηκαν παρουσία DNA για διάφορες τιμές  $r$ ,

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (\text{Εξίσωση 4})$$

όπου:

- [DNA]: η συγκέντρωση του CT DNA
- $\epsilon_A$ : ο λόγος της απορρόφησης προς τη συγκέντρωση της ένωσης σε κάθε μέτρηση
- $\epsilon_f$ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης για την ελεύθερη ένωση
- $\epsilon_b$ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της πλήρως δεσμευμένης ένωσης

Η σταθερά  $K_b$  (σε  $M^{-1}$ ) λαμβάνεται μελετώντας τις μεταβολές στην απορρόφηση των αντίστοιχων  $\lambda_{max}$  με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του CT DNA και αυτή δίνεται από τον λόγο της τεταγμένης επί την αρχή προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων στο διάγραμμα του λόγου  $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$  προς  $[DNA]$  σύμφωνα με την εξίσωση Wolfe-Shimer.

#### **B.1.5.2.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA με ιξωδομετρία**

Η μελέτη της ιξωδομετρίας έγινε με τη χρήση ενός περιστροφικού ιξωδόμετρου ALPHA L της Fungilab με 18 mL LCP spindle στα 100 rpm. Το ιξώδες του DNA ( $[DNA] = 0.1 \text{ mM}$ ) σε διάλυμα buffer (150 mM NaCl και 15 mM trisodium citrate σε pH 7.0) μετρήθηκε παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων των συμπλόκων. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου. Όλα τα δεδομένα που λήφθηκαν παρουσιάζονται ως διαγράμματα  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  προς  $r$ , όπου  $\eta$  είναι το ιξώδες του DNA παρουσία του συμπλόκου και  $\eta_0$  είναι το ιξώδες μόνο του DNA σε διάλυμα buffer.

#### **B.1.5.2.3 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA με κυκλική βολταμμετρία**

Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων με το DNA μελετήθηκε παρακολουθώντας τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο κυκλικό βολταμμογράφημα ενός διαλύματος του συμπλόκου σε 1:2 buffer/DNA συγκέντρωσης 0,40 mM ύστερα από προσθήκη DNA σε διάφορες τιμές  $r$ .

#### **B.1.5.2.4 Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης των συμπλόκων με το βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide – EB)**

Η μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης των συμπλόκων με το EB πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία φθορισμού εκπομπής με σκοπό να εξεταστεί αν μία ένωση μπορεί να αντικαταστήσει το EB στο σύμπλοκο DNA-EB. Το σύμπλοκο DNA-EB παρασκευάστηκε προσθέτοντας 20  $\mu\text{M}$  EB και 26  $\mu\text{M}$  CT DNA σε διάλυμα buffer. Η ικανότητα των συμπλόκων να παρεμβάλλονται στο DNA μελετήθηκε με την προσθήκη σταδιακά αυξανόμενης ποσότητας του διαλύματος του συμπλόκου σε διάλυμα DNA-EB. Η επίδραση της προσθήκης καθενός συμπλόκου στο διάλυμα DNA - EB λήφθηκε καταγράφοντας την αλλαγή στο φάσμα εκπομπής με μήκος κύματος διέγερσης στα 540 nm. Οι σταθερές Stern-Volmer ( $K_{sv}$ , σε  $M^{-1}$ )

υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη γραμμική εξίσωση Stern-Volmer (Εξίσωση 5) και από τη κλίση της γραφικής παράστασης  $I_0/I$  προς  $[Q]$ :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (\text{Εξίσωση 5})$$

όπου:

- $I_0$  και  $I$  : οι εντάσεις εκπομπής απουσία και παρουσία της υπό μελέτη ένωσης, αντίστοιχα
- $[Q]$ : η συγκέντρωση της ένωσης

Λαμβάνοντας ως χρόνο φθορισμού του συστήματος EB-DNA την τιμή  $\tau_0 = 23$  ns, η σταθερά απόσβεσης ( $k_q$ ,  $M^{-1}s^{-1}$ ) των συμπλόκων υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση (Εξίσωση 6):

$$K_{SV} = k_q \times \tau_0 \quad (\text{Εξίσωση 6})$$

## B.2 Σύνθεση των συμπλόκων ενώσεων

### B.2.1 Σύνθεση συμπλόκων χαλκού με το ΜΣΑΦ Loxoprofen

#### B.2.1.1 Σύνθεση του συμπλόκου $[Cu_2(loxo)_4(H_2O)_2]$ (I)

Μεθανολικό διάλυμα (8 mL) NaLoxoprofen (0.2 mmol, 54 mg) προστέθηκε σε υπό ανάδευση υδατικό διάλυμα (3 mL)  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (0.1 mmol, 17 mg). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 0.5 h. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε και το διήθημα συλλέχθηκε και αφέθηκε για κρυστάλλωση. Μετά το πέρας μερικών βδομάδων παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μπλε κρυσταλλικό προϊόν. Απόδοση 70 mg, 61%.

### B.2.2 Σύνθεση συμπλόκων με το ΜΣΑΦ fenoprofen

#### B.2.2.1 Σύνθεση του συμπλόκου $[Cu_2(feno)_4(DMF)_2]$ (II)

Διάλυμα  $Ca(feno)_2$  (0.15 mmol, 81 mg) σε DMF (2 mL) προστέθηκε σε υπό ανάδευση αιθανολικό διάλυμα (3 mL)  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,1 mmol, 17 mg). Το διάλυμα που προέκυψε, αφέθηκε υπό ανάδευση για 0.5 h. Το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 24 h. Έπειτα έγινε προσθήκη 2.5 mL  $H_2O$  και το διάλυμα αφέθηκε για κρυστάλλωση. Μετά το πέρας μερικών εβδομάδων, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός γαλαζοπράσινων κρυστάλλων. Απόδοση 41 mg, 29%.

#### B.2.2.2 Σύνθεση του συμπλόκου $[Zn(feno)_2(Himi)_2]$ (III)

Αιθανολικό διάλυμα (4 mL)  $Ca(feno)_2$  (0.2 mmol, 105 mg) προστέθηκε σε υπό ανάδευση αιθανολικό διάλυμα (2 mL) ιμιδαζολίου (0.4 mmol, 27 mg). Έπειτα από 5 min ανάδευσης, το διάλυμα που προέκυψε, προστέθηκε στο υπό ανάδευση αιθανολικό διάλυμα (2 ml)  $ZnCl_2$  (0.2 mmol, 27 mg). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 0.5 h. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε και το διήθημα συλλέχθηκε και αφέθηκε για κρυστάλλωση. Μετά το πέρας μερικών βδομάδων παρατηρήθηκε ο σχηματισμός άχρωμου κρυσταλλικού προϊόντος. Απόδοση 87 mg, 56%.

### B.2.3 Σύνθεση συμπλόκων χαλκού με το ΜΣΑΦ Ibuprofen

#### B.2.3.1 Σύνθεση της πρόδρομης ένωσης $[Cu(ibu)_2]$

Υδατικό διάλυμα (3 mL) KOH (1.2 mmol, 102 mg) προστέθηκε σε υπό ανάδευση υδατικό διάλυμα (8 mL) Hibu (1.2 mmol, 248 mg). Έπειτα από ανάδευση 5 min, το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε υδατικό διάλυμα (3 mL)  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (0.6 mmol, 102mg) και αναδεύτηκε για ακόμα 0.5 h. Έπειτα το διάλυμα διηθήθηκε (πλύσεις με  $MeOH/H_2O$ ) και το ίζημα συλλέχθηκε αφού αφέθηκε να στεγνώσει. Απόδοση 239 mg, 83%.

### B.2.3.2 Σύνθεση του συμπλόκου $[Cu(ibuprofen)_2(pyridine)_2(H_2O)]$ (IV)

Σε διάλυμα MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 v/v (16 mL) του συμπλόκου Cu(ibuprofen)<sub>2</sub> (0.1 mmol, 47 mg) υπό ανάδευση προστέθηκε περίσσεια πυριδίνης. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 0.5 h. Έπειτα το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία και μετά το πέρας μερικών εβδομάδων παρατηρήθηκαν σκούροι μπλε κρύσταλλοι κατάλληλοι για επίλυση της δομής με περίθλαση ακτίνων-Χ. Απόδοση 60.9 mg, 96%.

### B.2.3.3 Σύνθεση του συμπλόκου $[Cu(ibuprofen)_2(neocupron)(H_2O)]$ (VII)

Σε διάλυμα MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 v/v (16 mL) του συμπλόκου Cu(ibuprofen)<sub>2</sub> (0.1 mmol, 47mg) προστέθηκε υπό ανάδευση διάλυμα MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 v/v (16 mL) neocupron (0.1 mmol, 21 mg). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 0.5 h. Έπειτα το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία και μετά το πέρας μερικών εβδομάδων σχηματίστηκαν κρύσταλλοι κατάλληλοι για επίλυση της δομής με περίθλαση ακτίνων-Χ. Απόδοση 52 mg, 75%.

## B.2.4 Σύνθεση συμπλόκων χαλκού με το ligand clonixin

### B.2.4.1 Σύνθεση του συμπλόκου $[Cu(clonixin)_2(Himidazole)_2(EtOH)_2]$ (V)

Αιθανολικό διάλυμα (3 mL) ιμιδαζολίου (0.4 mmol, 27 mg) προστέθηκε σε υπό ανάδευση αιθανολικό διάλυμα (8 mL) HClon (0.4 mmol, 105 mg) καθώς και 400 μL KOH (1 M). Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 1 h. Μετά το πέρας της 1 h, το διάλυμα προστέθηκε στο υπό ανάδευση αιθανολικό διάλυμα (2 mL) CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.2 mmol, 34 mg). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 0.5 h. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε και το διήθημα συλλέχθηκε και αφέθηκε για κρυστάλλωση. Μετά το πέρας μερικών βδομάδων παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πράσινων κρυστάλλων που ήταν κατάλληλοι για επίλυση της δομής με περίθλαση ακτίνων-Χ. Απόδοση 82 mg, 55.5%.

### B.2.4.2 Σύνθεση του συμπλόκου $[Cu(clonixin)_2(neocupron)]$ (VI)

Αιθανολικό διάλυμα (3 mL) neocupron (0.2 mmol, 42 mg) προστέθηκε σε υπό ανάδευση αιθανολικό διάλυμα (8 mL) HClon (0.4 mmol, 105 mg), μαζί με 400 μL KOH (1 M) και το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 1 h. Μετά το πέρας της 1 h, το διάλυμα προστέθηκε στο υπό ανάδευση αιθανολικό διάλυμα (2 mL) CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.2 mmol, 34 mg). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 0.5 h. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε και το διήθημα συλλέχθηκε και αφέθηκε για κρυστάλλωση. Μετά το πέρας μερικών βδομάδων παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πράσινου κρυσταλλικού προϊόντος. Απόδοση 99 mg, 63%.



### B.3 Φυσικοχημικές τεχνικές μελέτης συμπλόκων

Η μέτρηση της αγωγιμότητας των συμπλόκων ενώσεων που συντέθηκαν σε διάλυμα σε DMSO έγινε με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη συμπεριφορά των συμπλόκων σε διάλυμα, σε συνδυασμό με την εκτίμηση των ηλεκτρονιακών φασμάτων. Στη βιβλιογραφία παρατηρούμε πως μια ένωση σε διάλυμα DMSO (1 mM) ορίζεται ως ηλεκτρολύτης 1:1 ή 1:2, όταν η μοριακή της αγωγιμότητα ( $\Lambda_{\mu}$ ) βρίσκεται σε εύρος τιμών 50 – 70  $\mu\text{S}/\text{cm}$  και 90 – 110  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , αντίστοιχα.

Πίνακας 4: Μοριακή αγωγιμότητα  $\Lambda_{\mu}$  ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) των συμπλόκων σε διάλυμα DMSO ( $10^{-3}\text{M}$ )

Ένωση	Μοριακή Αγωγιμότητα ( $\Lambda_{\mu}$ )
[Cu <sub>2</sub> (loxo) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (I)	10
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ] (II)	12
[Zn(feno) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> ] (III)	17
[Cu(ibu) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] (IV)	3
[Cu(clon) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> (EtOH) <sub>2</sub> ] (V)	16
[Cu(clon) <sub>2</sub> (neoc)] (VI)	18
[Cu(ibu) <sub>2</sub> (neoc)(H <sub>2</sub> O)] (VII)	15

Οι τιμές μοριακής αγωγιμότητας των συμπλόκων είναι ιδιαίτερα χαμηλές (στην περιοχή 3-18  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) και οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι ενώσεις **I-VII** δεν είναι ηλεκτρολύτες.

Πίνακας 5: Διαλυτότητες συμπλόκων I-VII σε διάφορους διαλύτες ( $\Delta$ : Διαλυτό,  $\text{M}\Delta$ : Μερικώς Διαλυτό)

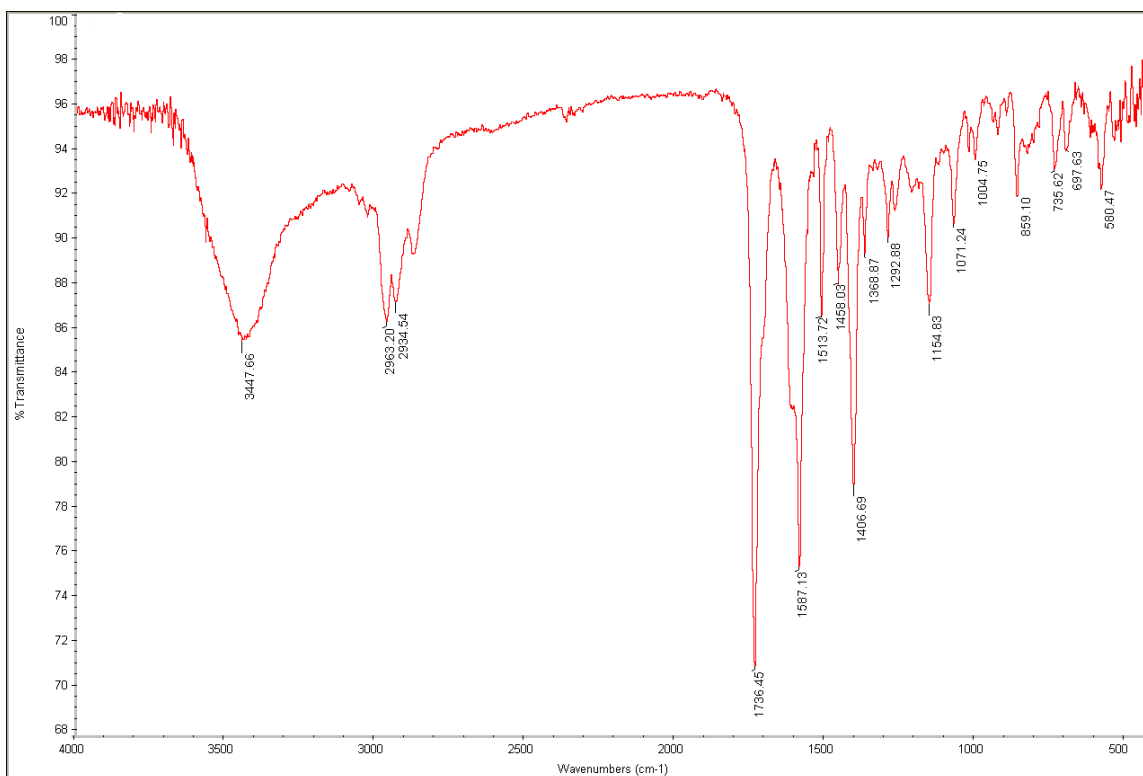
Ενώσεις	EtOH	CH <sub>3</sub> OH	DMSO	DMF	H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>
[Cu <sub>2</sub> (loxo) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (I)	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ] (II)	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$
[Zn(feno) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> ] (III)	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$
[Cu(ibu) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] (IV)	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$
[Cu(clon) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> (EtOH) <sub>2</sub> ] (V)	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$
[Cu(clon) <sub>2</sub> (neoc)] (VI)	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$
[Cu(ibu) <sub>2</sub> (neoc)(H <sub>2</sub> O)] (VII)	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$	$\text{M}\Delta$

## B.4 Φασματοσκοπική μελέτη των συμπλόκων I – VI

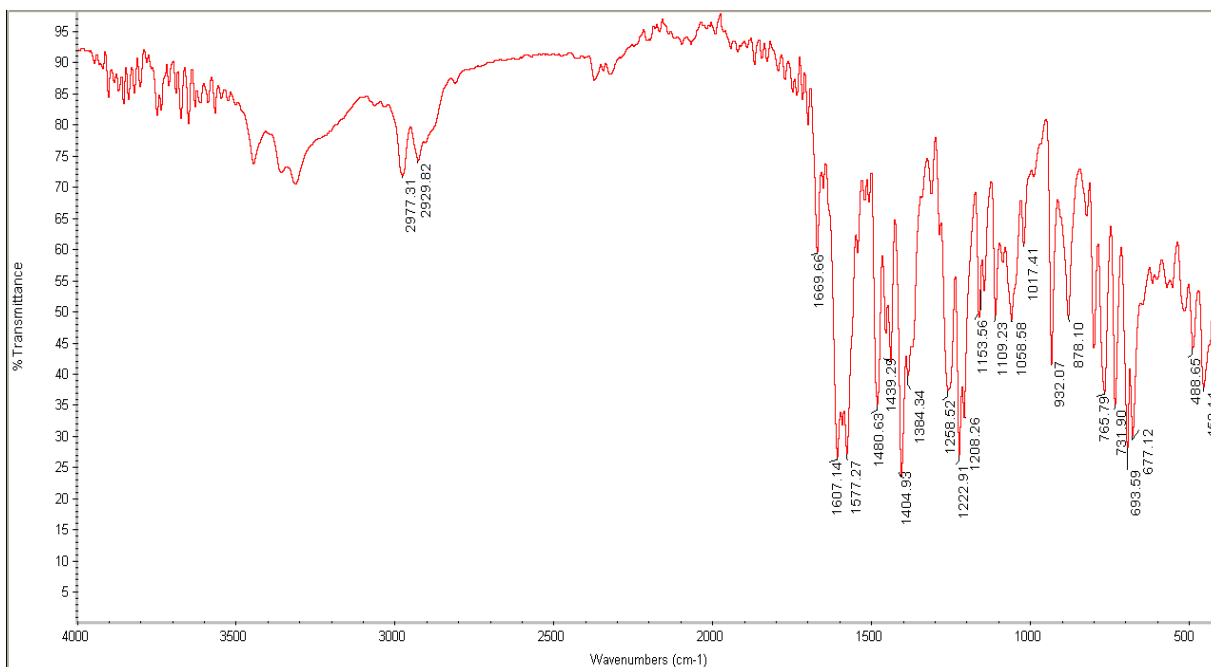
### B.4.1 Μελέτη των συμπλόκων με φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR)

Η χρήση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου είναι μία μελέτη ρουτίνας για ένα εργαστήριο, και επιτρέπει το γρήγορο και εύκολο έλεγχο για την ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων ή/και ατόμων σε μία ένωση. Με τον όρο υπέρυθρη φασματοσκοπία συνήθως περιγράφεται το εύρος μήκους κύματος ανάμεσα στα 200  $\mu\text{m}$  και στα 750 nm. Μέσω των κλασσικών σχέσεων που συσχετίζουν την ακτινοβολία και την ύλη, μπορεί να γίνει ο υπολογισμός της ενέργειας της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Συνήθως χρησιμοποιείται η έννοια το κυματάριθμου ( $\text{cm}^{-1}$ ), και συγκεκριμένα οι περιοχές 14000 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  (εγγύς υπέρυθρο), 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$  (μέσο υπέρυθρο) και < 400  $\text{cm}^{-1}$  (άπω υπέρυθρο). Η φασματοσκοπία υπέρυθρου καθίσταται ιδιαίτερα ελκυστική, εξαιτίας της μικρής ποσότητας δείγματος που απαιτεί, του μικρού κόστους και της δυνατότητας να επαναχρησιμοποιηθεί το υπό εξέταση δείγμα. Η φασματοσκοπία υπέρυθρου απεικονίζει φάσματα ενώσεων που εμφανίζουν διπολική ροπή. Η αλληλεπίδραση του υπέρυθρου φωτός με την εκάστοτε ένωση, προκαλεί μεταβολές στη διπολική ροπή του μορίου δημιουργώντας δονήσεις στο μόριο. Μέσω των δονήσεων αυτών, που αποτυπώνονται σε ένα φάσμα υπέρυθρου, είναι δυνατή η ταυτοποίηση χαρακτηριστικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριο<sup>96</sup>. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, η φασματοσκοπία IR χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί ο τρόπος συναρμογής των ligands στο εκάστοτε μέταλλο. Για το λόγο αυτό, οι κορυφές που εξετάστηκαν κυρίως είναι αυτές που οφείλονται στην ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση τάσης της καρβοξυλικής ομάδας των ligands, καθώς από την διαφορά  $\Delta\nu(\text{CO}_2) = \nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2) - \nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2)$  μπορούμε να εξαγάγουμε συμπεράσματα για τον τρόπο συναρμογής των ligand. Στα ελεύθερα ligand (**Παράρτημα – Φάσματα IR**), παρατηρούμε κορυφές:

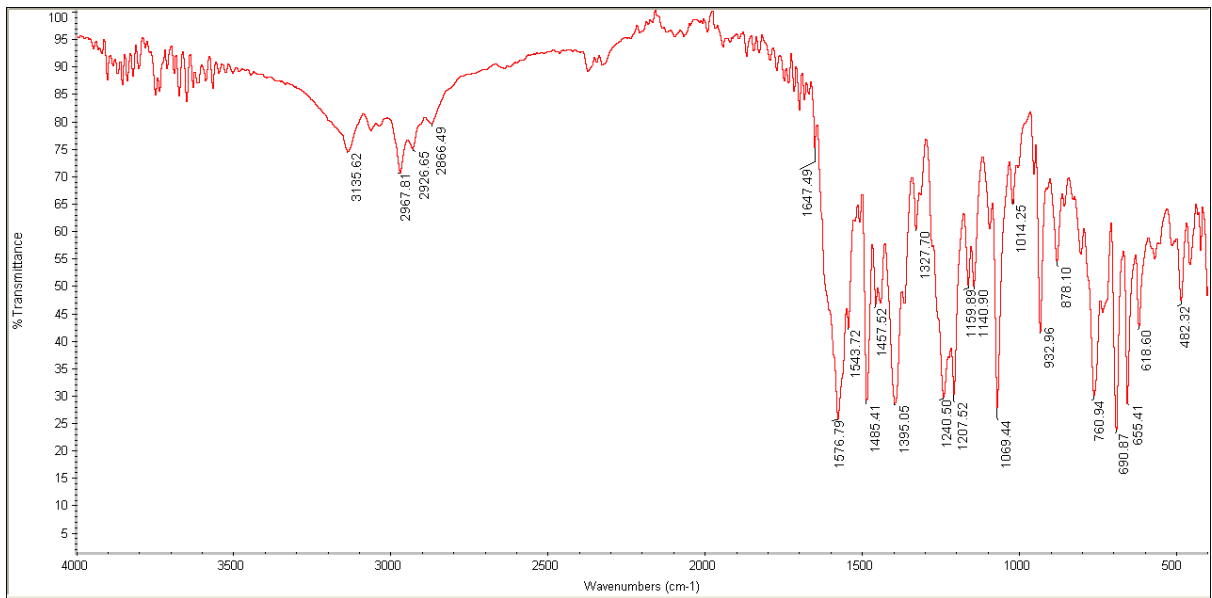
- |                           |   |  |
|---------------------------|---|--|
| • Na(loxo):               | $\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2) = 1552 \text{ cm}^{-1}$ , | $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2) = 1410 \text{ cm}^{-1}$ , |
|                           | $\Delta\nu(\text{CO}_2) = 142 \text{ cm}^{-1}$            |  |
| • Ca(feno) <sub>2</sub> : | $\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2) = 1557 \text{ cm}^{-1}$ , | $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2) = 1419 \text{ cm}^{-1}$ , |
|                           | $\Delta\nu(\text{CO}_2) = 138 \text{ cm}^{-1}$            |  |
| • Hibu:                   | $\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2) = 1539 \text{ cm}^{-1}$ , | $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2) = 1380 \text{ cm}^{-1}$ , |
|                           | $\Delta\nu(\text{CO}_2) = 128 \text{ cm}^{-1}$            |  |
| • Hclo:                   | $\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2) = 1580 \text{ cm}^{-1}$ , | $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2) = 1435 \text{ cm}^{-1}$ , |
|                           | $\Delta\nu(\text{CO}_2) = 145 \text{ cm}^{-1}$            |  |



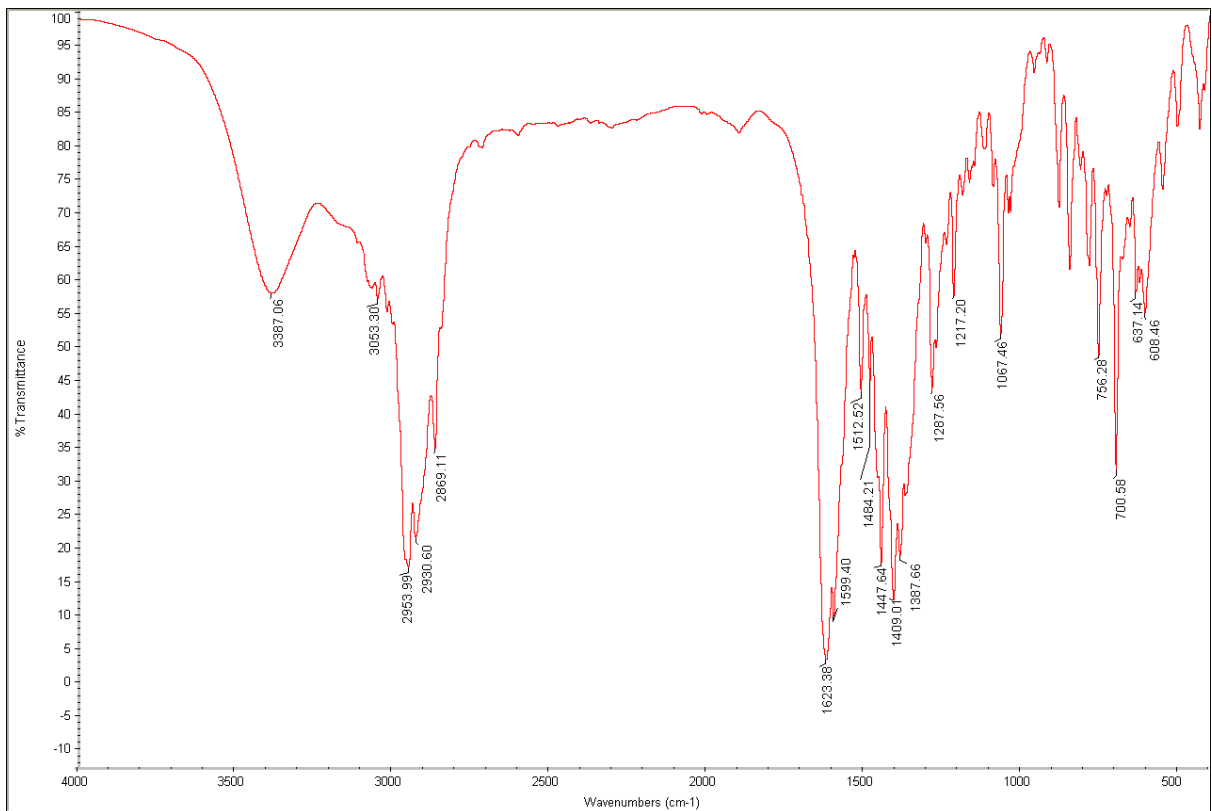
Εικόνα 13: Φάσμα υπεράουρου του συμπλόκου  $[Cu_2(oxo)_4(H_2O)_2]$  (I)



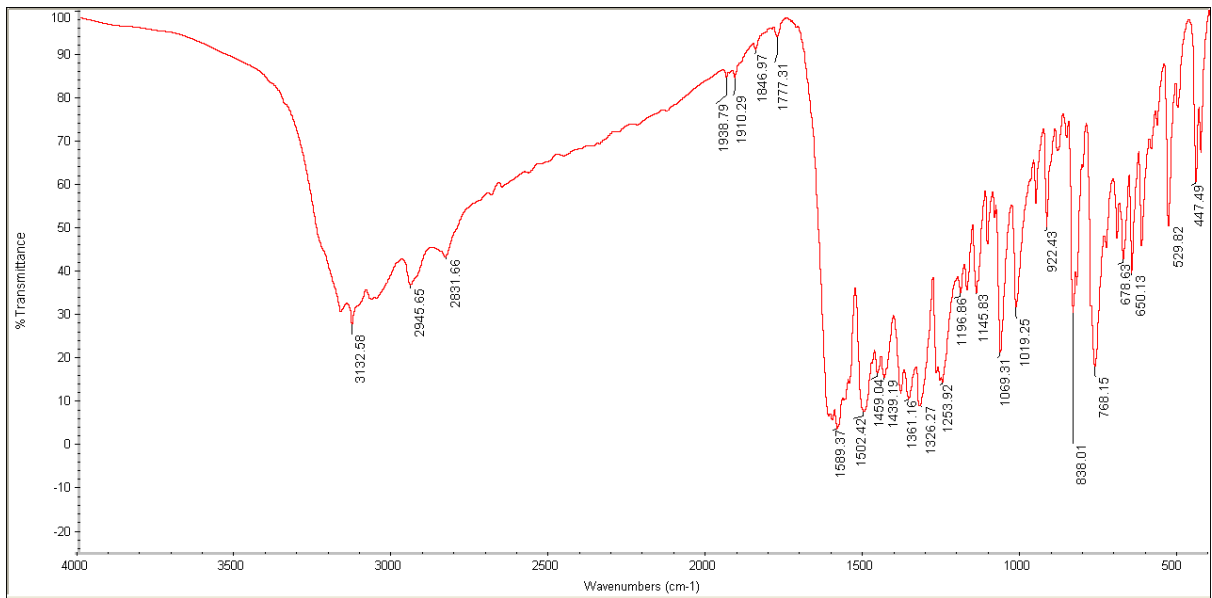
Εικόνα 14: Φάσμα υπεράουρου του συμπλόκου  $[Cu_2(feno)_4(DMF)_2]$  (II)



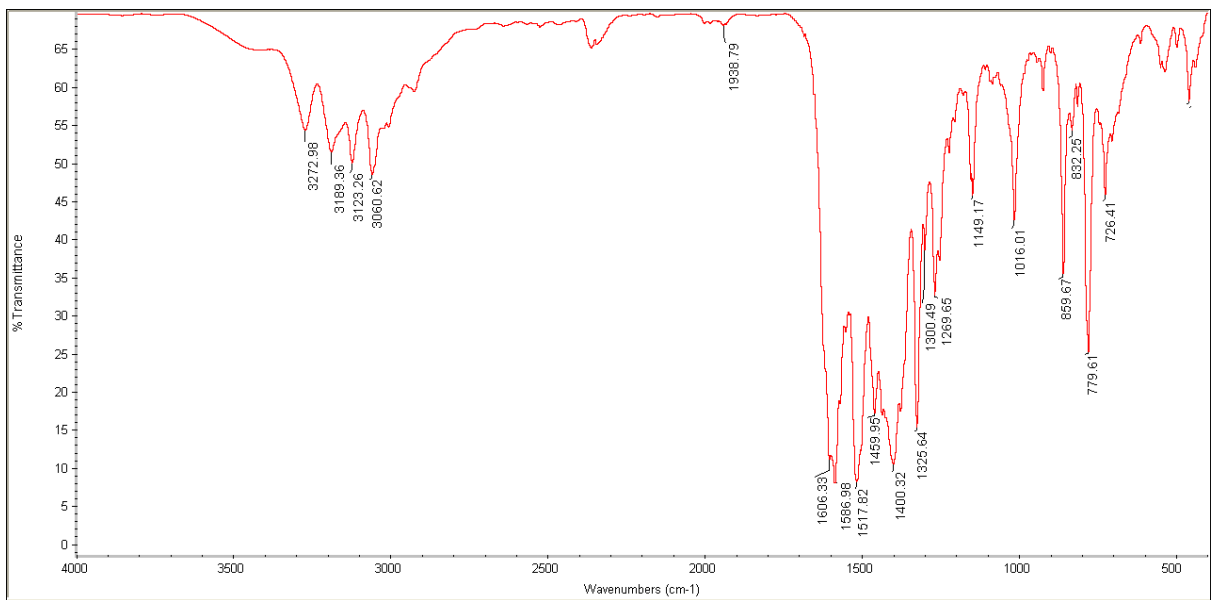
Εικόνα 15: Φάσμα υπέρυθρου του συμπλόκου  $[Zn(feno)_2(Himi)_2]$  (III)



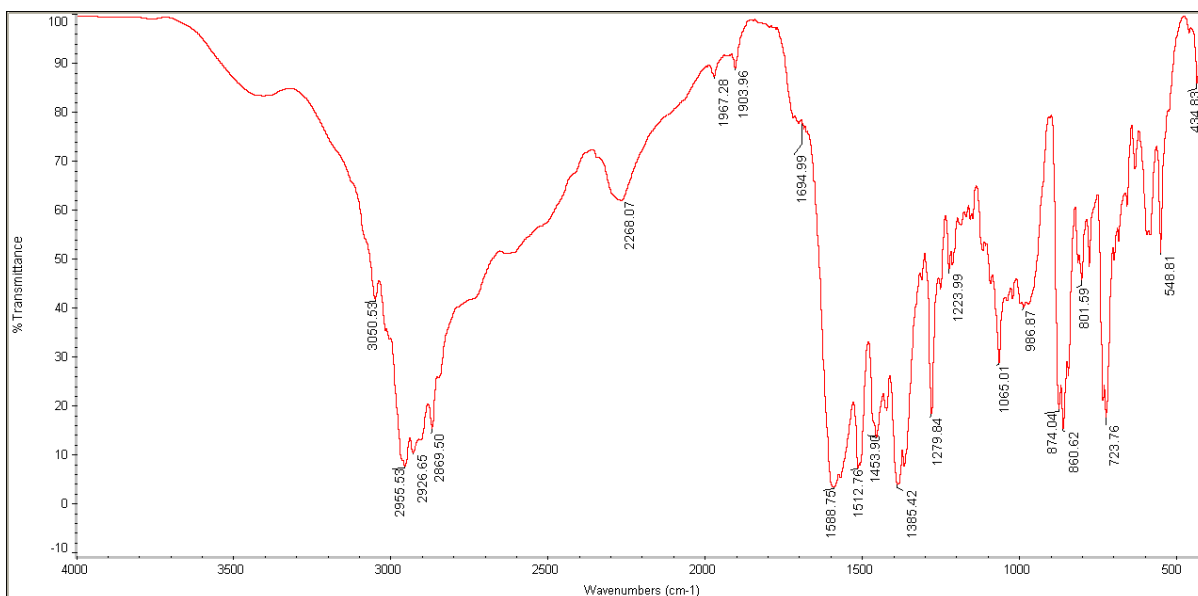
Εικόνα 16: Φάσμα υπέρυθρου του συμπλόκου  $[Cu(ibu)_2(py)_2(H_2O)]$  (IV)



Εικόνα 17: Φάσμα υπερέθρου του συμπλόκου  $[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{Himi})_2(\text{EtOH})_2]$  (V)



Εικόνα 18: Φάσμα υπερέθρου του συμπλόκου  $[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{ncoc})]$  (VI)



Εικόνα 19: Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου  $[\text{Cu}(\text{ibu})_2(\text{neoc})(\text{H}_2\text{O})]$  (VII)

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικές δονήσεις (σε  $\text{cm}^{-1}$ ) στα φάσματα IR των συμπλόκων I–VII και οι τιμές των παραμέτρων  $\Delta\nu(\text{CO}_2)$ , όπου  $[\Delta\nu(\text{CO}_2) = \nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2) - \nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2)]$

Ένωση	$\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2)$	$\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2)$	$\Delta\nu(\text{CO}_2)$	$\rho(\text{C-H})_{\alpha\zeta\omega\tau\omicron\delta\omicron\tau\epsilon\varsigma}$
$[\text{Cu}_2(\text{loxo})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (I)	1587	1407	180	-
$[\text{Cu}_2(\text{feno})_4(\text{DMF})_2]$ (II)	1577	1405	173	-
$[\text{Zn}(\text{feno})_2(\text{Himi})_2]$ (III)	1577	1395	182	761
$[\text{Cu}(\text{ibu})_2(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})]$ (IV)	1600	1387	213	701
$[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{Himi})_2(\text{EtOH})_2]$ (V)	1584	1361	223	768
$[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{neoc})]$ (VI)	1587	1400	187	726
$[\text{Cu}(\text{ibu})_2(\text{neoc})(\text{H}_2\text{O})]$ (VII)	1589	1385	204	724

Από τα παραπάνω φάσματα καθώς και από τον Πίνακα 6, οδηγούμαστε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Οι χαρακτηριστικές κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών  $(\text{C}=\text{O})_{\text{carboxylic}}$  και  $\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{carboxylic}}$  του καρβοξυλίου των ligands έχουν αντικατασταθεί από δύο νέες κορυφές που αποδίδονται στην αντισυμμετρική δόνηση τάσης  $\nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2)$  και τη συμμετρική δόνηση τάσης  $\nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2)$  της συναρμοσμένης καρβοξυλικής ομάδας.
- Στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος και συγκεκριμένα στην περιοχή  $700\text{--}770\text{ cm}^{-1}$ , παρατηρούμε την εμφάνιση κορυφών μέτριας έντασης που αποδίδονται στις εκτός του επιπέδου παραμορφώσεις των δεσμών C-H των αρωματικών,  $\rho(\text{C-H})$ , των δοτών αζώτου και συγκεκριμένα του imidazole, neocuproine και pyridine.

Επιπρόσθετα, ο υπολογισμός της διαφοράς  $\Delta\nu(\text{CO}_2)$  (όπου  $\Delta\nu(\text{CO}_2) = \nu_{\text{asym}}(\text{CO}_2) - \nu_{\text{sym}}(\text{CO}_2)$ ), η οποία αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο που έχουμε στη

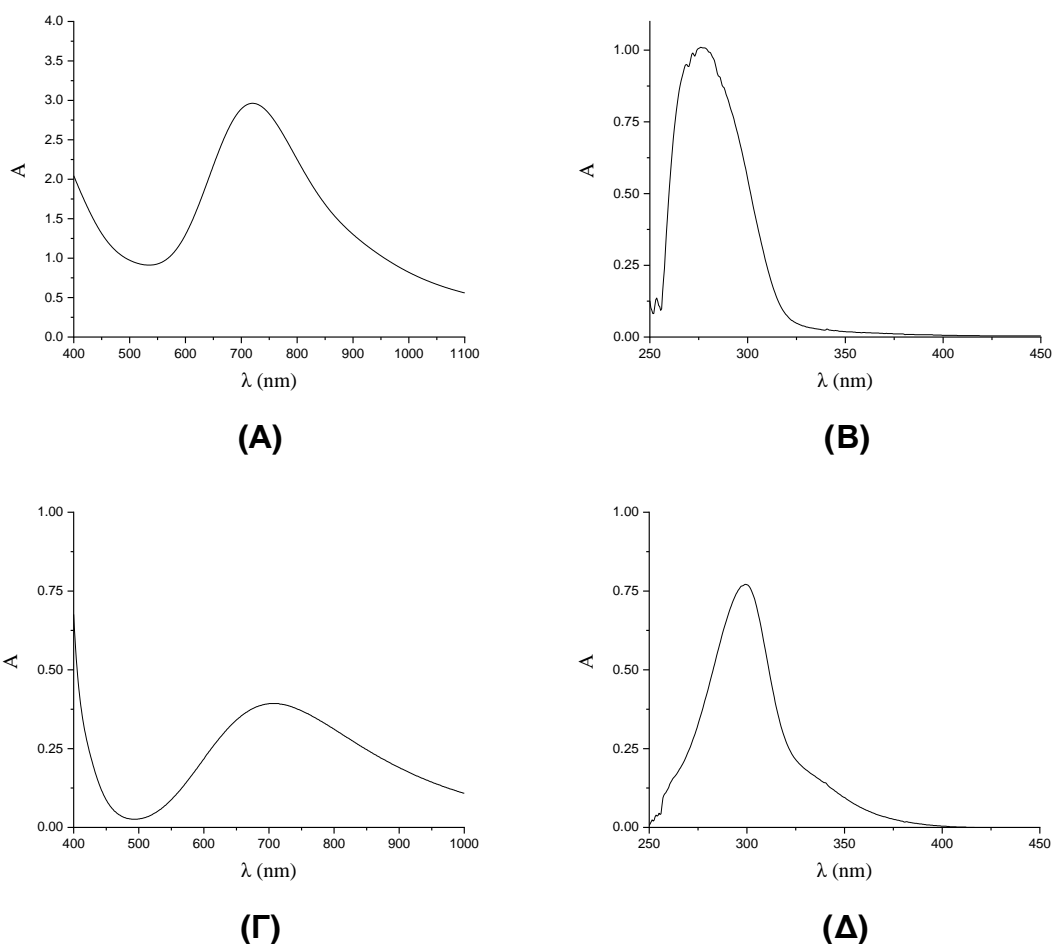
διάθεσή μας όταν εξετάζουμε τον τρόπο με τον οποίον συναρμόζεται το ligand μέσω της καρβοξυλικής ομάδας, μας επέτρεψε να αποσαφηνίσουμε τον τρόπο συναρμογής. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται προς την ορθότητά τους και από τις κρυσταλλικές δομές που απομονώθηκαν και επιλύθηκαν. Έτσι για τις ενώσεις **I** και **II**, βλέπουμε πως η διαφορά  $\Delta\nu(\text{CO}_2)$  ισούται με  $180\text{ cm}^{-1}$  και  $173\text{ cm}^{-1}$ , αντίστοιχα, επομένως τα ligands loxorprofen και fenoprofen συνδέονται διδραστικά ως γέφυρα μεταξύ των ατόμων χαλκού, γεγονός που για την ένωση **II** επιβεβαιώνεται και από την κρυσταλλική δομή. Στις ενώσεις **III** και **VI** φαίνεται πως τα ligandσυνδέονται διδραστικά χηλικά με τα αντίστοιχα μεταλλικά κέντρα. Αντίθετα στις περιπτώσεις των ενώσεων **IV**, **V** και **VII** η τιμή της διαφοράς  $\Delta\nu(\text{CO}_2)$  (**Πίνακας 6**) οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα ligands fenoprofen, ibuprofen και clonixin συνδέονται μονοδραστικά, αφού οι τιμές  $\Delta\nu(\text{CO}_2)$  που υπολογίστηκαν είναι χαρακτηριστικές για μονοδραστική συναρμογή. Τέλος στις περιπτώσεις των ενώσεων **IV**, **V** και **VII** ο τρόπος συναρμογής επιβεβαιώνεται και από την επίλυση των κρυσταλλικών δομών που ακολουθεί στη συνέχεια.

## B.4.2 Μελέτη συμπλόκων με φασματοσκοπία UV-vis

Η φασματοσκοπία υπεριώδους (UltraViolet, UV) - ορατού (Visible, Vis) είναι μεταξύ 200–1100 nm. Η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στις περιοχές αυτές είναι αποτέλεσμα των ενεργειακών μεταβολών στην ηλεκτρονική δομή των μορίων. Συγκεκριμένα, τα φάσματα απορρόφησης που προκαλούνται σε αυτό το είδος της φασματοσκοπίας οφείλονται στην ανύψωση ή την πτώση ηλεκτρονίων από την μια τροχιά σε μια άλλη. Στη φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού, η απορροφούμενη ενέργεια αντιστοιχεί στην ποσότητα που απαιτείται για τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου από ένα τροχιακό σε κάποιο άλλο.

Η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού ( $\lambda = 200\text{-}1100\text{ nm}$ ), χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να διερευνηθεί η δομή των ενώσεων και σε διάλυμα. Το χρώμα των ενώσεων επηρεάζεται άμεσα από την απορρόφηση ή την ανάκλαση. Αξίζει να σημειωθεί πως πέρα από τις ενεργειακές καταστάσεις των διαφόρων ligands, υπάρχουν και αυτές που οφείλονται στα τροχιακά του μετάλλου. Συγκεκριμένα:

- i. Διεγέρσεις ανάμεσα στα τροχιακά των ligands και του μετάλλου. Ονομάζονται ταινίες μεταφοράς φορτίου, επειδή στη διεγερμένη κατάσταση ένα ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε ένα τροχιακό που εντοπίζεται σε άλλο τμήμα του μορίου από εκείνο στο οποίο ανήκε στη βασική κατάσταση. Μπορούν να ταξινομηθούν σε ταινίες μεταφοράς από το μέταλλο στο ligand (MLCT) ή από το ligand στο μέταλλο (LMCT).
- ii. Διεγέρσεις ανάμεσα στα τροχιακά του ίδιου το μετάλλου. Οι διεγέρσεις αυτές είναι πιο γνωστές με το συμβολισμό d-d διεγέρσεις. Οφείλονται στην επίδραση του πεδίου του ligand στα τροχιακά του μετάλλου και εμφανίζονται σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (μικρότερη ενέργεια).
- iii. Σε μικρότερα μήκη κύματος (μεγαλύτερη ενέργεια) βρίσκουμε τις διεγέρσεις μεταξύ των διαφόρων ενεργειακών σταθμών των ligands (Intra-Ligands, IL).



Εικόνα 20: Ενδεικτικά φάσματα UV-vis του συμπλόκου  $[\text{Cu}_2(\text{feno})_4(\text{DMF})_2]$  (II) (A)  $5 \times 10^{-3} \text{M}$  + (B)  $10^{-5} \text{M}$  και  $[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{Himi})_2(\text{EtOH})_2]$  (V) (Γ)  $5 \times 10^{-3} \text{M}$  + (Δ)  $10^{-5} \text{M}$  αντίστοιχα.

Πίνακας 7: Μήκη κύματος μεγίστων ταινιών φασμάτων απορρόφησης UV-Vis, συμπλόκων (I-VI) σε διάλυμα DMSO (Οι τιμές μοριακής απόσβεσης  $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) δίνονται στις παρενθέσεις κάτω από τα μήκη κύματος).

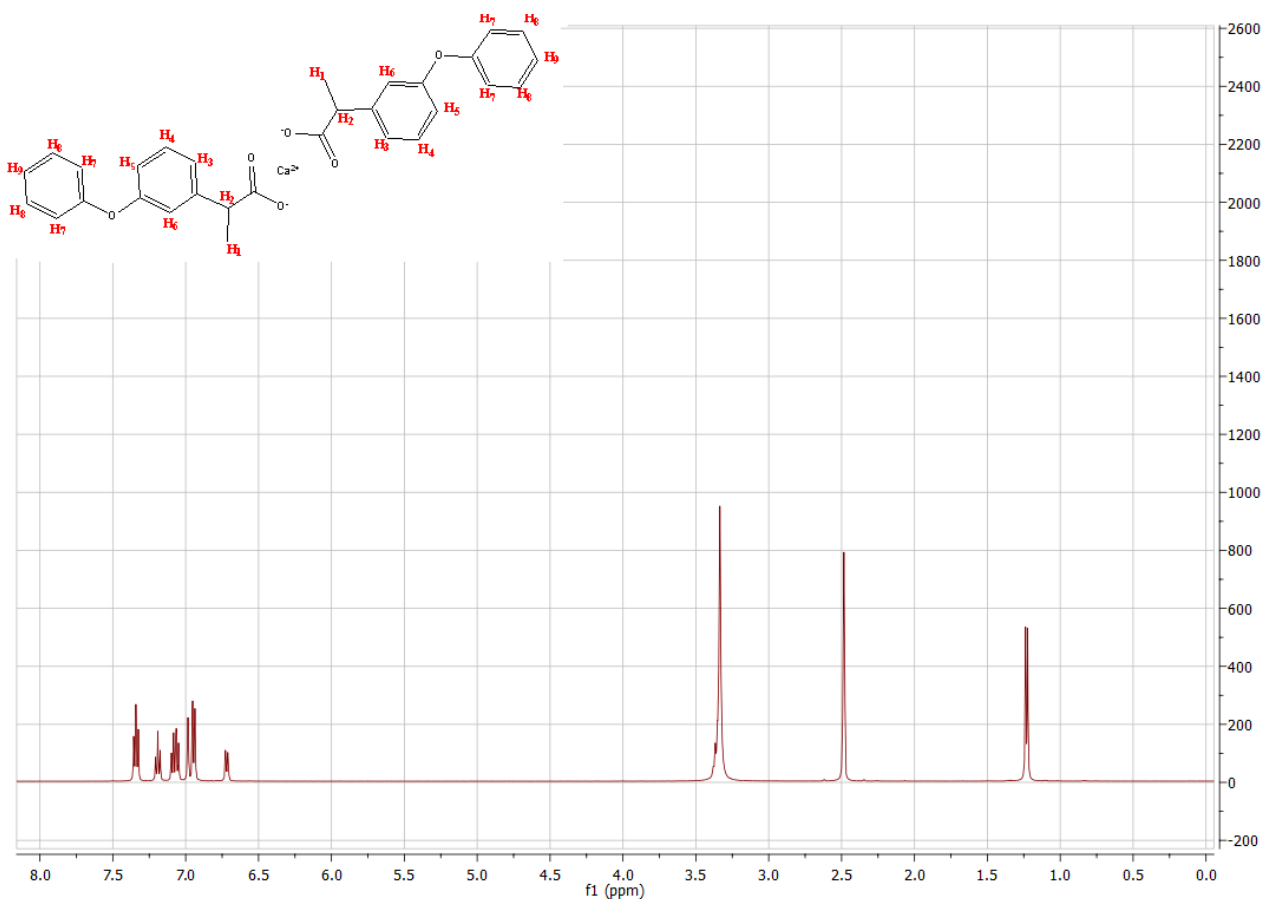
Ένωση	Ταινία I DMSO	Ταινία II DMSO	Ταινία III DMSO	Ταινία IV DMSO
$[\text{Cu}_2(\text{loxo})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (I)	715 (470)	295 (6120)	273 (9410)	265 (9950)
$[\text{Cu}_2(\text{feno})_4(\text{DMF})_2]$ (II)	720 (590)	-	280 (9940)	-
$[\text{Zn}(\text{feno})_2(\text{Himi})_2]$ (III)	-	-	279 (1590)	272 (17900)
$[\text{Cu}(\text{ibu})_2(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})]$ (IV)	715 (175)	299 (17700)	-	-
$[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{Himi})_2(\text{EtOH})_2]$ (V)	700 (80)	299 (17100)	-	-
$[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{neoc})]$ (VI)	650 (60)	296 (16300)	278 (16700)	-



Στα σύμπλοκα του χαλκού εμφανίζεται η ταινία I στην περιοχή 650 – 720 nm που μπορεί να αποδοθεί σε d-d μεταπτώσεις. Για όλα τα σύμπλοκα, εμφανίζονται μία έως τρεις ταινίες στην περιοχή 265-299 nm που οφείλονται κυρίως σε μεταπτώσεις Intra-Ligand.

### B.4.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H}$ NMR) - $[\text{Zn}(\text{feno})_2(\text{Himi})_2]$ (III)

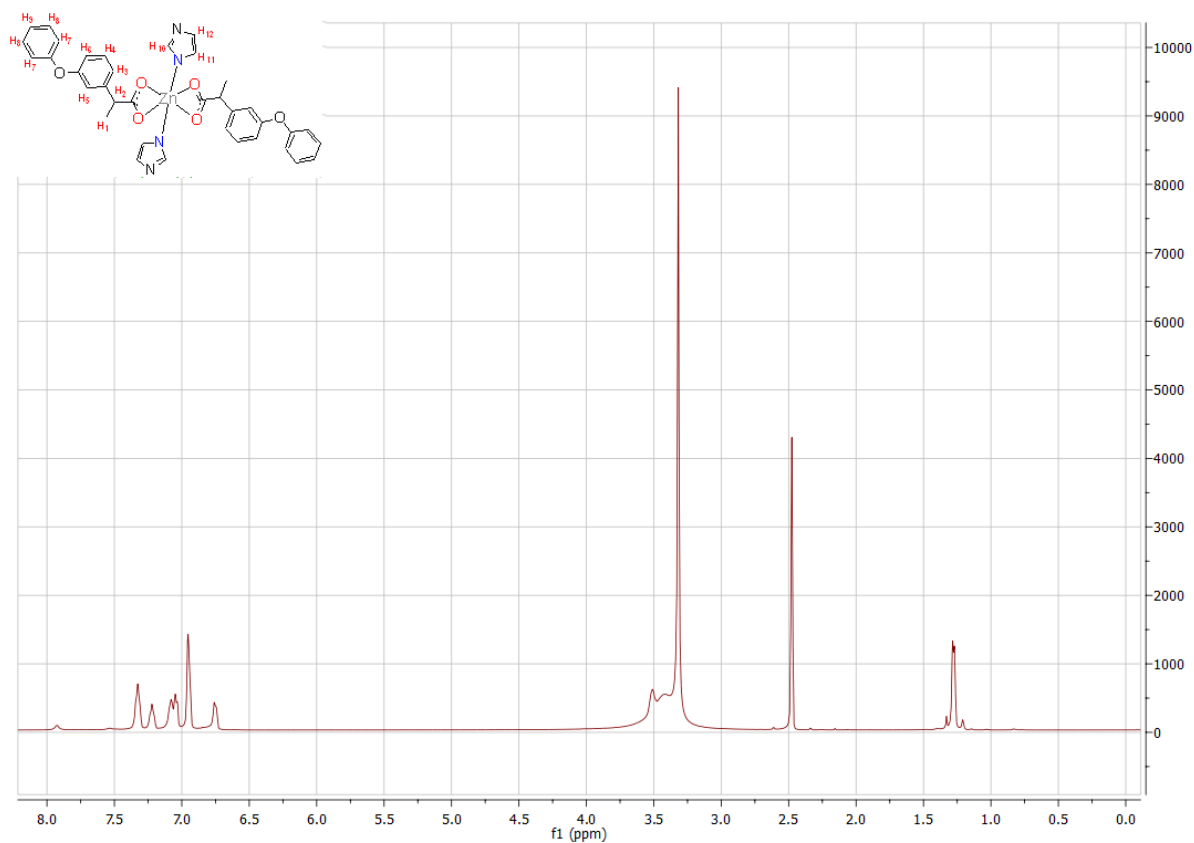
Στην περίπτωση του συμπλόκου  $[\text{Zn}(\text{feno})_2(\text{Himi})_2]$  (III), είναι εφικτή η χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού για την ταυτοποίηση της ένωσης. Η φασματοσκοπία  $^1\text{H}$ -NMR χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την περαιτέρω ταυτοποίηση της δομής του συμπλόκου, τη μελέτη συναρμογής των ligands καθώς και την παρακολούθηση της συμπεριφοράς του συμπλόκου σε διάλυμα. Η λήψη του φάσματος έγινε σε διάλυμα  $\text{DMSO}-d_6$ . Οι αναλογίες από την ολοκλήρωση των κορυφών επιβεβαιώνουν την ύπαρξη και την αναλογία των ligands στην ένωση καθώς εμφανίζονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές των ligands στο φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της ένωσης. Δεν παρατηρήθηκε καμία κορυφή που να αποδίδεται σε πιθανή διάσπαση του συμπλόκου, επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ένωση παραμένει σταθερή στο διάλυμα.



Εικόνα 21: Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR του ligand  $\text{Ca}(\text{feno})_2$

Πίνακας 8: Απόδοση υδρογόνων για το  $\text{Ca(feno)}_2$  και  $[\text{Zn(feno)}_2(\text{Himi})_2]$

Ligand	$\text{Ca(feno)}_2$ (ppm)	$[\text{Zn(feno)}_2(\text{Himi})_2]$ (ppm)
<b>Hfeno</b>		
H <sub>1</sub>	1.25	1.27
H <sub>2</sub>	3.37	3.51
H <sub>3</sub>	7.07	6.96
H <sub>4</sub>	7.20	6.96
H <sub>5</sub>	6.72	6.75
H <sub>6</sub>	6.97	6.96
H <sub>7</sub>	6.95	
H <sub>8</sub>	7.35	7.33
H <sub>9</sub>	7.07	7.22
<b>Himi</b>		
H <sub>10</sub>	-	6.90
H <sub>11</sub>	-	6.90
H <sub>12</sub>	-	7.93



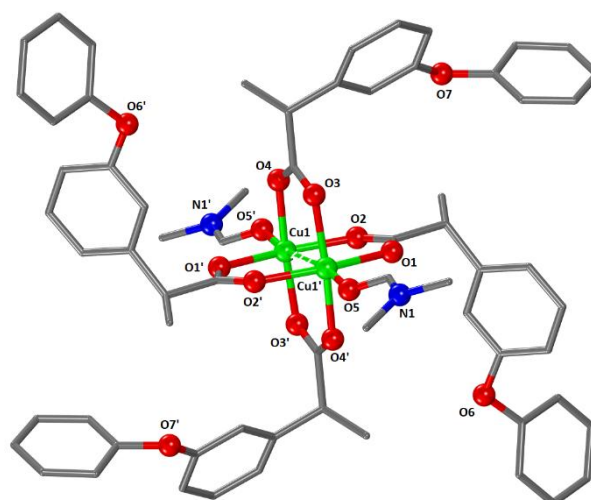
Εικόνα 22: Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης  $[\text{Zn(feno)}_2(\text{Himi})_2]$  (III)

## B.5 Χαρακτηρισμός της δομής συμπλόκων

Από το σύνολο των επτά συμπλόκων που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή, τέσσερα απομονώθηκαν σε κρυσταλλική μορφή η οποία επέτρεψε την επίλυσή τους. Οι δομές αυτές καθώς και τα κρυσταλλογραφικά τους δεδομένα παρουσιάζονται στη συνέχεια.

### B.5.1 Κρυσταλλική δομή της ένωσης $[\text{Cu}_2(\text{feno})_4(\text{DMF})_2]$ (II)

Η δομή δείχνει ότι πρόκειται για ένα διπυρηνικό σύμπλοκο του Cu(II) με αριθμό συναρμογής πέντε. Η μοριακή δομή του συμπλόκου II παρουσιάζεται στην **Εικόνα 23**, ενώ στους **Πίνακες 9 και 10**, παρουσιάζονται επιλεγμένες γωνίες δεσμών καθώς και αποστάσεις.



Εικόνα 23: Μοριακή δομή ένωσης  $[\text{Cu}_2(\text{feno})_4(\text{DMF})_2]$  (II).

Πίνακας 9: Αποστάσεις σημαντικότερων δεσμών για το σύμπλοκο  $[\text{Cu}_2(\text{feno})_4(\text{DMF})_2]$  (II)

Δεσμός	Απόσταση (Å)
Cu1—O2 <sup>i</sup>	1.9764 (15)
Cu1—O4 <sup>i</sup>	1.9704 (15)
Cu1...Cu1 <sup>i</sup>	2.6084 (6)
Cu1—O1	1.9517 (15)
Cu1—O3	1.9698 (15)
Cu1—O5	2.1915 (16)

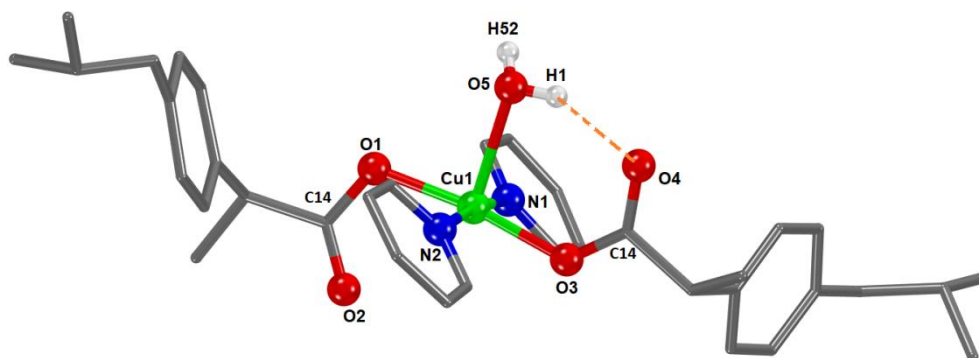
Πίνακας 10: Επιλεγμένες γωνίες δεσμών για το σύμπλοκο  $[\text{Cu}_2(\text{feno})_4(\text{DMF})_2]$  (II)

Δεσμός	Γωνία (°)
$\text{O2}^i\text{—Cu1—O4}^i$	89.89 (6)
$\text{O2}^i\text{—Cu1—Cu1}^i$	82.26 (5)
$\text{O4}^i\text{—Cu1—Cu1}^i$	84.90 (5)
$\text{O2}^i\text{—Cu1—O1}$	169.87 (6)
$\text{O4}^i\text{—Cu1—O1}$	89.96 (6)
$\text{O2}^i\text{—Cu1—O3}$	88.96 (6)
$\text{O4}^i\text{—Cu1—O3}$	169.71 (6)
$\text{O1—Cu1—O3}$	89.38 (7)
$\text{O2}^i\text{—Cu1—O5}$	89.11 (6)
$\text{O4}^i\text{—Cu1—O5}$	91.84 (6)
$\text{O1—Cu1—O5}$	101.02 (6)
$\text{O3—Cu1—O5}$	98.37 (6)

Τα ligands fenoρροfen συναρμόζονται διδραστικά μέσω των καρβοξυλικών οξυγόνων στα δύο άτομα του χαλκού(II), γεγονός που επιβεβαιώνεται από τις όμοιες αποστάσεις των δεσμών Cu-O όπως φαίνεται στον **Πίνακα 11**. Τα τέσσερα ligands fenoρροfen σχηματίζουν γέφυρες μεταξύ των δύο χαλκών προσδίδοντας τη δομή του raddlewheel που είναι συνηθισμένη διευθέτηση για σύμπλοκες ενώσεις του τύπου  $[\text{Cu}_2(\text{RCOO})_4(\text{O-δότης})_2]$ . Τέλος την σφαίρα συναρμογής ολοκληρώνουν τα ligands DMF που συνδέονται με ένα άτομο Cu το καθένα, μέσω του καρβονυλικού τους οξυγόνου. Η γεωμετρία που παρατηρείται γύρω από το χαλκό αναλογεί σε τετραγωνική πυραμίδα ( $\tau = 0,003$ ).

### B.5.2 Κρυσταλλική δομή της ένωσης $[\text{Cu}(\text{ibu})_2(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})]$ (IV)

Το σύμπλοκο **IV** είναι ένα μονοπυρηνικό σύμπλοκο με το χαλκό να έχει αριθμό συναρμογής πέντε.



Εικόνα 24: Μοριακή δομή ένωσης  $[\text{Cu}(\text{ibu})_2(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})]$  (IV)

Πίνακας 11: Αποστάσεις σημαντικότερων δεσμών για το σύμπλοκο  $[Cu(ibuprofen)_2(py)_2(H_2O)] (IV)$

Δεσμός	Απόσταση (Å)
Cu1—N1	2.057 (2)
Cu1—N2	2.045 (2)
Cu1—O1	1.9460 (19)
Cu1—O3	1.930 (2)
Cu1—O5	2.319 (2)
O1—C1	1.311 (4)
O2—C1	1.220 (4)
O3—C14	1.234 (4)
O4—C14	1.216 (4)

Πίνακας 12: Γωνίες δεσμών για το σύμπλοκο  $[Cu(ibuprofen)_2(py)_2(H_2O)] (IV)$

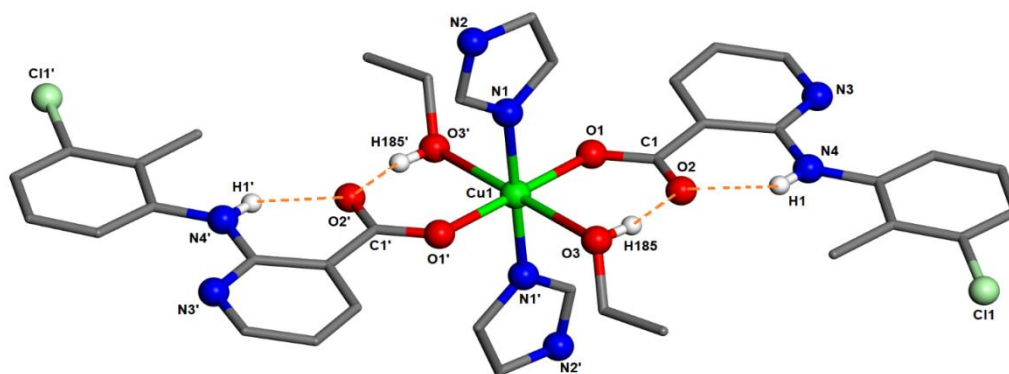
Δεσμός	Γωνία (°)
N1—Cu1—N2	172.71 (10)
N1—Cu1—O1	91.54 (9)
N2—Cu1—O1	90.95 (9)
N1—Cu1—O3	87.96 (9)
N2—Cu1—O3	88.62 (9)
O1—Cu1—O3	171.90 (10)
N1—Cu1—O5	96.53 (9)
N2—Cu1—O5	90.32 (9)
O1—Cu1—O5	89.86 (8)
O3—Cu1—O5	98.22 (9)

Η γεωμετρία του χαλκού είναι παραμορφωμένη τετραεδρική πυραμίδα. Τα ligands της ιβουπροφαίνης είναι αποπρωτονιωμένα και συναρμόζονται μονοδραστικά, γεγονός που επιβεβαιώνεται από το διαφορετικό μήκος δεσμού των δεσμών C14-O1 και C14-O2 όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 11**. Τη σφαίρα συναρμογής συμπληρώνουν δύο ligands πυριδίνης που συναρμόζονται μέσω του ατόμου αζώτου που περιέχουν, καθώς και με ένα ligand νερού, που εντοπίζεται στην κορυφή της τετραεδρικής πυραμίδας. Στο σύμπλοκο παρατηρούμε τον σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου (**Εικόνα 24**), πορτοκαλί διακεκομμένη γραμμή) μεταξύ του υδρογόνου του μορίου νερού (H1) με το μη-συναρμοσμένο οξυγόνο O4 της ιβουπροφαίνης.

Ο υπολογισμός του δείκτη τριγωνικότητας μας οδήγησε στην τιμή  $\tau = 0.014$ , γεγονός που επιβεβαιώνει την γεωμετρία τετραεδρικής πυραμίδας (τιμές πλησιέστερα στο 0 αντιστοιχούν σε πλησιέστερες γεωμετρίες προς την τετραεδρική πυραμίδα).

### B.5.3 Κρυσταλλική δομή της ένωσης $[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{Himi})_2(\text{EtOH})_2]$ (V)

Το σύμπλοκο **V** είναι ένα μονοπυρηνικό σύμπλοκο του Cu(II) που έχει αριθμό συναρμογής 6 και παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία (**Εικόνα 25**). Το μόριο είναι κεντροσυμμετρικό με το χαλκό να βρίσκεται στο κέντρο συμμετρίας. Τα δύο ligands clonixin είναι αποπρωτονιωμένα και συναρμόζονται μονοδραστικά στο άτομο του χαλκού μέσω ενός καρβοξυλικού οξυγόνου, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα διαφορετικά μήκη των δεσμών C1-O1 και C1-O2 (**Πίνακας 13**). Τη σφαίρα συναρμογής συμπληρώνουν τα δύο ligands ιμιδαζολίου που συναρμόζονται με το άτομο χαλκού μέσω του ατόμου αζώτου N1 και τα δύο ligands αιθανόλης που συναρμόζονται μέσω του O3 (**Εικόνα 25**). Τέλος παρατηρούμε το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (**Εικόνα 25**, πορτοκαλί διακεκομμένες γραμμές) μεταξύ των ατόμων υδρογόνου H1 και H185 με το μη-συναρμοσμένο καρβοξυλικό O2 του clonixin.



Εικόνα 25: Μοριακή δομή του συμπλόκου  $[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{Himi})_2(\text{EtOH})_2]$  (V)

Πίνακας 13: Αποστάσεις σημαντικότερων δεσμών για το σύμπλοκο  $[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{Himi})_2(\text{EtOH})_2]$  (V)

Δεσμός	Απόσταση (Å)
Cu1—N1	2.003 (2)
Cu1—O1	1.959 (2)
Cu1—O3	2.708 (3)
O1—C1	1.267 (3)
O2—C1	1.240 (3)

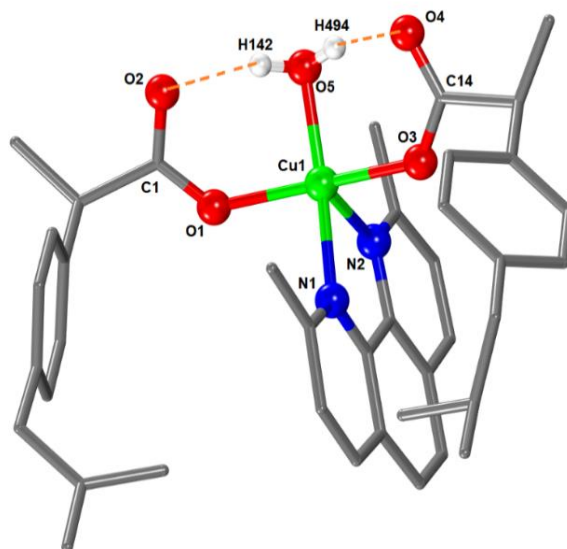
Πίνακας 14: Γωνίες δεσμών για το σύμπλοκο  $[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{Himi})_2(\text{EtOH})_2]$  (V)

Δεσμός	Γωνία (°)
$\text{O3}^i\text{—Cu1—N1}^i$	94.43 (9)
$\text{O3}^i\text{—Cu1—O1}^i$	96.14 (9)
$\text{N1}^i\text{—Cu1—O1}^i$	90.15 (9)
$\text{O3}^i\text{—Cu1—O1}$	83.86 (9)
$\text{N1}^i\text{—Cu1—O1}$	89.85 (9)
$\text{O1}^i\text{—Cu1—O1}$	179.994
$\text{O3}^i\text{—Cu1—O3}$	179.996
$\text{N1}^i\text{—Cu1—O3}$	85.57 (8)
$\text{O1}^i\text{—Cu1—O3}$	83.86 (9)
$\text{O1—Cu1—O3}$	96.14 (9)
$\text{O3}^i\text{—Cu1—N1}$	85.57 (9)
$\text{N1}^i\text{—Cu1—N1}$	179.994
$\text{O1}^i\text{—Cu1—N1}$	89.85 (8)
$\text{O1—Cu1—N1}$	90.15 (8)
$\text{O3—Cu1—N1}$	94.43 (9)



### B.5.4 Κρυσταλλική δομή της ένωσης $[\text{Cu}(\text{ibu})_2(\text{neoc})(\text{H}_2\text{O})]$ (VII)

Το σύμπλοκο **VII** είναι μονοπυρηνικό σύμπλοκο του χαλκού με αριθμό συναρμογής πέντε (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Μοριακή δομή του συμπλόκου  $[\text{Cu}(\text{ibu})_2(\text{neoc})(\text{H}_2\text{O})]$  (VII)

Πίνακας 15: Αποστάσεις σημαντικότερων δεσμών για το σύμπλοκο  $[\text{Cu}(\text{ibu})_2(\text{neoc})(\text{H}_2\text{O})]$  (VII)

Δεσμός	Απόσταση (Å)
Cu1—O1	1.949 (3)
Cu1—O3	1.979 (3)
Cu1—O5	1.968 (3)
Cu1—N1	2.018 (3)
Cu1—N2	2.255 (3)
O1—C1	1.251 (5)
O2—C1	1.230 (6)
O3—C14	1.260 (4)
O4—C14	1.221 (5)

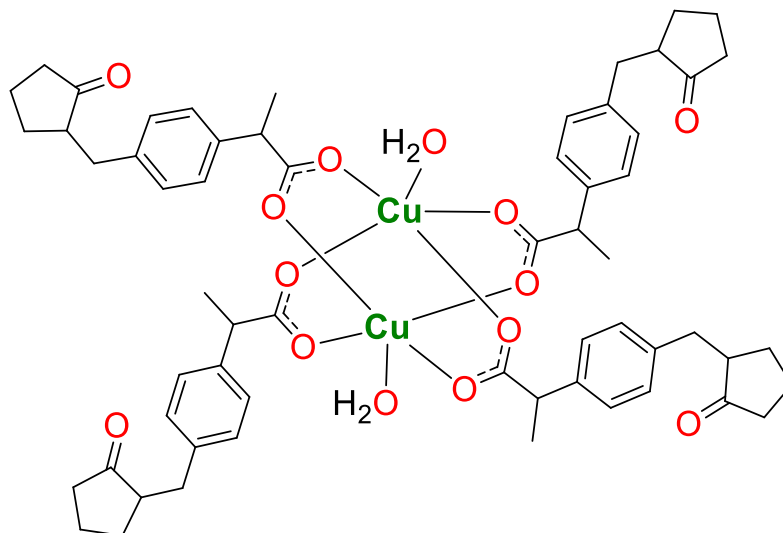
Πίνακας 16: Γωνίες δεσμών για το σύμπλοκο [Cu(ibu)<sub>2</sub>(neoc)(H<sub>2</sub>O)] (VII)

Δεσμός	Γωνία (°)
O1—Cu1—O3	163.75 (14)
O1—Cu1—O5	90.86 (13)
O3—Cu1—O5	91.81 (12)
O1—Cu1—N1	87.45 (12)
O3—Cu1—N1	87.62 (11)
O5—Cu1—N1	171.80 (12)
O1—Cu1—N2	98.21 (12)
O3—Cu1—N2	95.93 (11)
O5—Cu1—N2	109.92 (12)
N1—Cu1—N2	78.26 (11)
Cu1—O1—C1	126.5 (3)
Cu1—O3—C14	128.0 (3)
Cu1—N1—C27	122.9 (3)
Cu1—N1—C37	117.2 (2)

Τα ligands ιβουπροφαίνης είναι συναρμοσμένα μονοδραστικά μέσω ενός από τα καρβοξυλικά οξυγόνα τους, O1 και O3 (Πίνακας 15). Τη σφαίρα συναρμογής συμπληρώνουν το ligand της neocurpaine που συναρμόζεται διδραστικά χηλικά μέσω των 2 αζώτων και ένα ligand νερού που συναρμόζεται με το O5. Τα μήκη δεσμού δεν έχουν τη διαφορά που θα είχαν για ένα τυπικό μονοδραστικό ligand, διότι σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου (O2...H142 και O4...H494) ανάμεσα στο μη-συναρμοσμένα καρβοξυλικά οξυγόνα O2 και O4 και τα H του νερού H142 και H494, αντίστοιχα. Ο δείκτης τριγωνικότητας έχει τιμή  $\tau = 0.134$ , γεγονός που επιβεβαιώνει την τετραεδρικής πυραμιδική γεωμετρία γύρω από το χαλκό.

### B.5.5 Προτεινόμενη δομή της ένωσης $[\text{Cu}_2(\text{loxo})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (I)

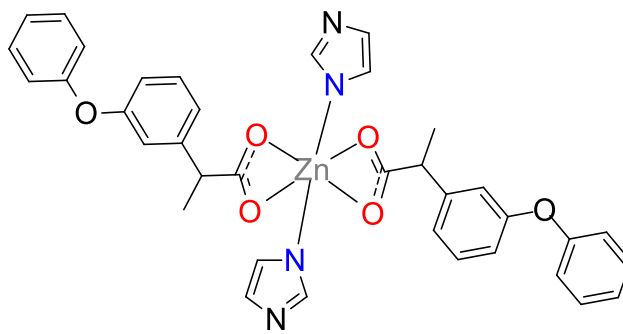
Σύμφωνα με τα φάσματα IR και με τις τιμές στον Πίνακα 6, καθώς και με παρεμφερή σύμπλοκα στην βιβλιογραφία (Πίνακας 4), προτείνεται η παρακάτω διπυρηνική δομή για το σύμπλοκο (I), όπου τα ligands loxo συναρμόζονται χηλικά και διδραστικά ως γέφυρες μεταξύ των δύο μεταλλικών κέντρων.



Εικόνα 27: Προτεινόμενη δομή ένωσης  $[\text{Cu}_2(\text{loxo})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (I)

### B.5.6 Προτεινόμενη δομή της ένωσης $[Zn(feno)_2(Himi)_2]$ (III)

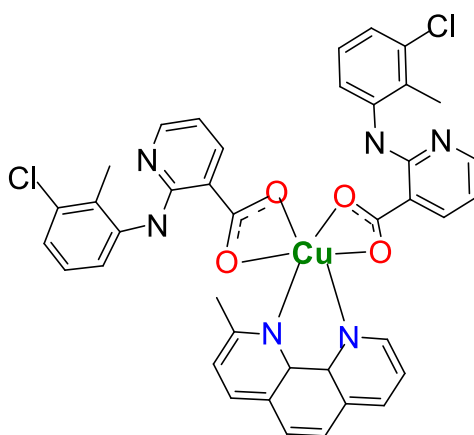
Σύμφωνα με τα φάσματα IR και με τις τιμές στον **Πίνακα 6**, καθώς και με παρεμφερή σύμπλοκα στην βιβλιογραφία, προτείνεται η παρακάτω διπυρηνική δομή για το σύμπλοκο **(VI)**, όπου τα clop συναρμόζονται διδρατικά χηλικά. Η σφαίρα συναρμογής συμπληρώνει ένα ligand neocurroine που συναρμόζεται και αυτό διδραστικά χηλικά μέσω των δύο αζώτων του. Η σφαίρα συναρμογής είναι  $CuN_2O_4$  και η γεωμετρία γύρω από το χαλκό μπορεί να θεωρηθεί παραμορφωμένη οκταεδρική.



Εικόνα 28: Προτεινόμενη δομή ένωσης  $[Zn(feno)_2(Himi)_2]$  (III)

### B.5.7 Προτεινόμενη δομή της ένωσης $[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{neoc})]$ (VI)

Σύμφωνα με τα φάσματα IR και με τις τιμές στον Πίνακα 6, καθώς και με παρεμφερεί σύμπλοκα στην βιβλιογραφία, προτείνεται η παρακάτω διπυρηνική δομή για το σύμπλοκο (VI), όπου το ligand clon, συναρμόζεται διδρατικά χηλικά, ενώ την σφαίρα συναρμογής ολοκληρώνει το μόριο του neocurroine που συναρμόζεται και αυτό διδοντικά χηλικά μέσω των δύο αζώτων του. Παρατηρούμε μια οκταεδρική γεωμετρία γύρω από το χαλκό.



Εικόνα 29: Προτεινόμενη δομή ένωσης  $[\text{Cu}(\text{clon})_2(\text{neoc})]$  (VI)

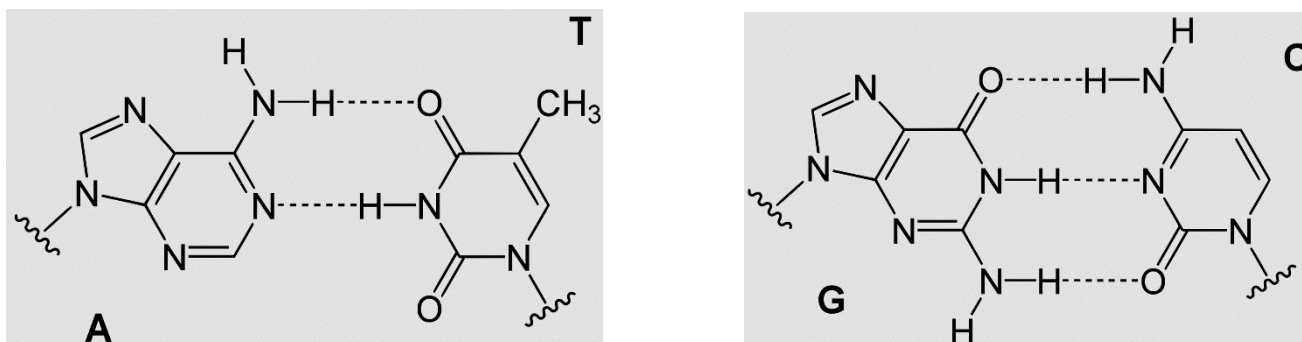
## B.6 Αλληλεπίδραση συμπλόκων με το DNA

### B.6.1 Γενικές πληροφορίες

#### B.6.1.1 Επίδραση των μεταλλικών ιόντων στη δομή και λειτουργία των νουκλεϊνικών οξέων

Τα νουκλεϊνικά οξέα παρουσιάζουν δύο ομάδες ικανές για σύνδεση με μέταλλα. Τα σάκχαρα και τις ετεροκυκλικές βάσεις. Η σταθερότητα των συμπλόκων μετάλλου-νουκλεϊνικού οξέος ποικίλλει ανάλογα με την επίδραση διαφόρων δομικών παραγόντων, όπως η εξουδετέρωση των αρνητικών φορτίων, η προκύπτουσα μεταβολή στη διαμόρφωση κι ο συναγωνισμός μεταξύ μετάλλου και δεσμών υδρογόνου. Έχουν διατυπωθεί πολλές αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με τη σπουδαιότητα των διαφόρων τύπων αλληλεπίδρασης των ιόντων του μετάλλου με την έλικα του DNA. Βασικά, πιστεύεται ότι υπάρχουν τέσσερις τύποι αλληλεπίδρασης:

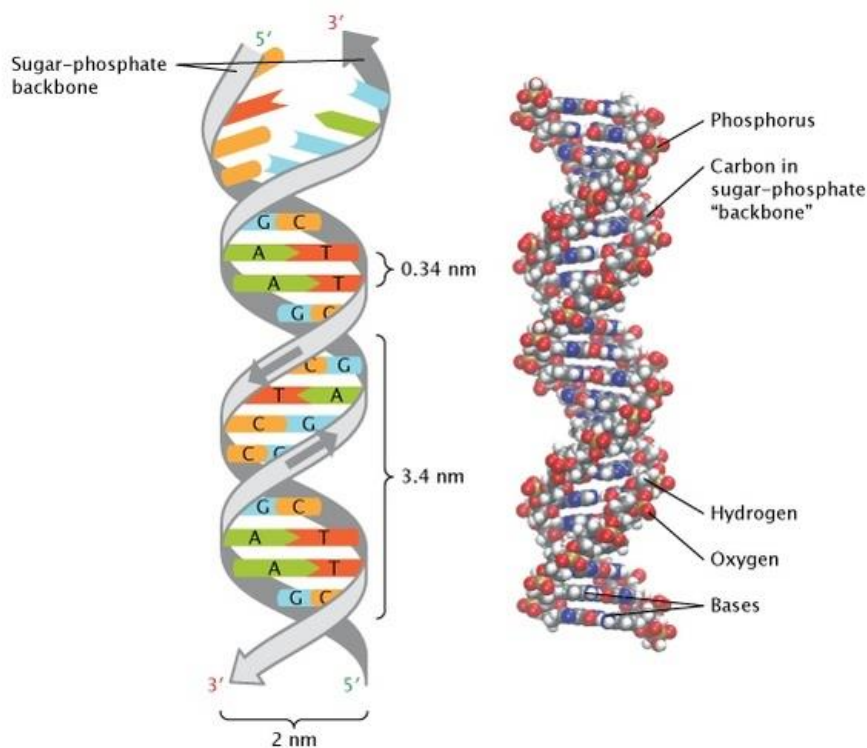
- άμεση σύνδεση του μεταλλοϊόντος με μία φωσφορική ομάδα ή περισσότερες.
- απεριόριστη μετακίνηση εφυδατωμένων συμπλόκων του μετάλλου κατά μήκος του συνόλου των φωσφορικών ομάδων
- αλληλεπιδράσεις του μεταλλικού ιόντος με βασικές θέσεις των ετεροκυκλικών βάσεων
- αλληλεπιδράσεις μέσω του χώρου



Εικόνα 30: Το ζεύγος αδενίνης - θυμίνης με 3 δεσμούς υδρογόνου, και το ζεύγος γουανίνης - κυτοσίνης με 3 δεσμούς υδρογόνου

### B.6.1.2 Σταθεροποίηση - Αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA

Η διάλυση του διπλού κλώνου DNA σε απεσταγμένο νερό οδηγεί σε άνοιγμα της διπλής έλικας προς δύο απλούς κλώνους κατά τυχαίο τρόπο συσπειρωμένους. Η αποελίκωση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι η επιφάνεια του μορίου του DNA κατακλύζεται από τ' αρνητικά φορτία των φωσφορικών ομάδων οι οποίες απωθούνται μεταξύ τους, καθιστώντας έτσι τη διατεταγμένη δομή ασταθή. Η παρουσία ηλεκτρολύτη σε συγκέντρωση τουλάχιστον  $2 \times 10^{-3}$  M σταθεροποιεί το μόριο του πολυνουκλεοτιδίου, διότι τα φορτία των φωσφορικών ομάδων εξουδετερώνονται από τ' αντισταθμιστικά ιόντα. Τα δισθενή ιόντα είναι βεβαίως αποτελεσματικότερα από τα μονοσθενή. Βρέθηκε ότι η θερμοκρασία μετουσίωσης, ( $T_m$  = melting temperature) του DNA - δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία τα μισά μόρια έχουν ανοίξει τελείως προς απλές έλικες ή όλα τα μόρια έχουν αποελιχθεί κατά το ήμισυ - αυξάνεται γραμμικά με το λογάριθμο της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Η σταθεροποίηση της διπλής έλικας του DNA δεν είναι γενικό φαινόμενο όλων των μεταλλικών ιόντων.



Εικόνα 31: Δομή διπλής έλικας του DNA<sup>101</sup>.

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική στις μελέτες μετουσίωσης του DNA είναι η φασματοφωτομετρία απορροφήσεως UV-vis. Συγκεκριμένα, μελετάται η μεταβολή της απορροφήσεως του διαλύματος μετάλλου-DNA σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, σε μήκος κύματος 258-260 nm. Η απορρόφηση σ' αυτό το μήκος κύματος οφείλεται στις βάσεις του πολυνουκλεοτιδίου κι αντιστοιχεί σε n-π\* και π-π\* μεταπτώσεις. Οι n-π\* οφείλονται σε μη-δεσμικά ζεύγη ηλεκτρονίων των ατόμων

οξυγόνου κι αζώτου, ενώ το μεγαλύτερο μέρος της κορυφής στα 260 nm αποτελούν οι π-π\* μεταπτώσεις. Η αύξηση της απορρόφησης του διαλύματος με την αύξηση της θερμοκρασίας οφείλεται στο φαινόμενο της υπερχρωμικότητας, κατά το οποίο η απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας από ένα κανονικά διατεταγμένο μόριο είναι μικρότερη του αθροίσματος των τιμών απορροφήσεως των συστατικών του. Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας διαλύματος DNA, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων καταστρέφονται με αποτέλεσμα να χαλάει και η κανονική δομή της διπλής έλικας, οπότε χάνεται η υποχρωμικότητα κι αυξάνεται η απορρόφηση. Κατά την ψύξη του διαλύματος σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων του ίδιου κλώνου - οι ονομαζόμενες θηλιές ή φουρκέτες - κι έτσι μειώνεται η τιμή της απορροφήσεως.

Εάν το μέταλλο του διαλύματος έχει την ικανότητα να σχηματίζει σταυροδεσμούς με το DNA κρατώντας τους δύο κλώνους του σε μικρή απόσταση, τότε κατά την ψύξη συμβαίνει επανασχηματισμός του δίκλωνου DNA και η απορρόφηση φθάνει τ' αρχικά επίπεδα. Εάν όμως το μέταλλο δεν έχει την ιδιότητα αυτή, τότε οι δύο κλώνοι παραμένουν τυχαία διατεταγμένοι και συνεστραμμένοι, δεν μπορούν να ξανασυνδεθούν και η απορρόφηση μειώνεται μόνον λίγο με την ελάττωση της θερμοκρασίας χωρίς φυσικά να φθάνει την αρχική της τιμή.

"Σκληρά" μέταλλα (όπως το  $Mg^{+}$  και  $Ca^{+}$ ), τα οποία έχουν μικρή τάση σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών, σταθεροποιούν τη διπλή έλικα ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του μετάλλου. Τότε απαιτείται μεγαλύτερη ενέργεια για την αποελικύωση του DNA κι έτσι αυξάνεται η τιμή του  $T_m$ . Εφόσον καθένα ιόν μετάλλου που είναι συνδεδεμένο με το DNA εξουδετερώνει ένα μέρος από το αρνητικό φορτίο αυτού, επιπρόσθετη σύνδεση γίνεται σταδιακά ασθενέστερη, δηλαδή η σύνδεση γίνεται ανταγωνιστική. Όταν η ποσότητα των μεταλλοϊόντων που έχει προστεθεί στο διάλυμα είναι ικανή για την πλήρη εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου των φωσφορικών ομάδων, τότε περαιτέρω προσθήκη μετάλλου οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας.

Μεταλλικά ιόντα τα οποία συνδέονται με τις βάσεις του DNA, αφενός μεν εξουδετερώνουν την ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ των φωσφορικών ομάδων, αφετέρου δε προκαλούν την καταστροφή των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ζευγών των βάσεων και των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται εξαιτίας του στοιβάγματος των βάσεων. Τότε αποσταθεροποιείται η διπλή έλικα και μειώνεται η θερμοκρασία τήξεως, διότι η ενέργεια που απαιτείται για το άνοιγμα του DNA ελαττώνεται. Υπάρχουν περιπτώσεις, όπως αυτή του Ag, όπου η σύνδεση του μετάλλου με τις βάσεις οδηγεί σε μία σταθερότερη δίκλωνη έλικα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι και σ' αυτήν την περίπτωση δε σταθεροποιείται η αρχική έλικα του DNA αλλά παράγεται μία εντελώς διαφορετική έλικα. Τα περισσότερα μεταλλοϊόντα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σταθεροποιούν τη δομή της διπλής έλικας, ενώ την αποσταθεροποιούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, καθώς αρχικά αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες και στη συνέχεια συνδέονται και με τις βάσεις <sup>99</sup>.



## B.6.2 Μελέτες αλληλεπίδρασης συμπλόκων με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV-vis)

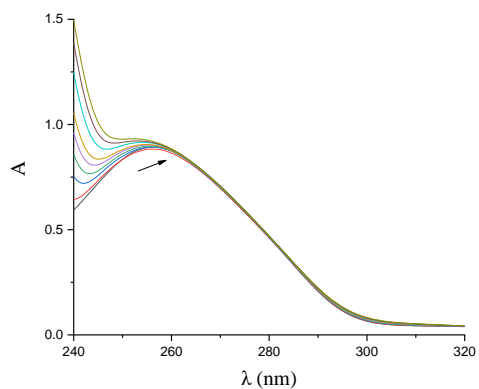
Η φασματοσκοπία UV-vis παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA καθώς και με την ισχύ της σύνδεσής τους με αυτό, μέσω του υπολογισμού της σταθεράς σύνδεσης,  $K_b$ . Η μελέτη της αλληλεπίδρασης μιας ένωσης με το DNA, με φασματοσκοπία UV-vis, περιλαμβάνει δύο στάδια.

Στο 1<sup>ο</sup> στάδιο, μελετάται η μεταβολή του φάσματος UV διαλύματος CT DNA, το οποίο είναι συνήθως Β-μορφής, στην περιοχή 200-400 nm με την προσθήκη σε αυξανόμενες ποσότητες της υπό μελέτη ένωσης. Εξετάζεται αν και με ποιο τρόπο η ένωση μπορεί να αλληλεπιδράσει με το DNA. Συγκεκριμένα, μελετάται η μεταβολή της απορρόφησης της ταινίας με  $\lambda_{max} = 258$  nm καθώς και οι πιθανές μετατοπίσεις του  $\lambda_{max}$  της ίδιας ταινίας. Οποιαδήποτε μεταβολή της απορρόφησης στο  $\lambda_{max}$  αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης. Ειδικότερα, η αύξηση της απορρόφησης (λόγω έκθεσης των πουρινών και πυριμιδινών του DNA), δηλαδή η υπερχρωμία, αποτελεί ένδειξη καταστροφής δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων, άρα και της δευτεροταγούς δομής του DNA, ενώ αντίθετα, η περίπτωση υποχρωμίας, αποτελεί ένδειξη παρεμβολής. Η μετατόπιση της θέσης του  $\lambda_{max}$  προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, βαθυχρωμία ή ερυθρή μετατόπιση (red-shift), ή προς μικρότερα μήκη κύματος, υψιχρωμία ή κυανή μετατόπιση (blue-shift), δείχνει σταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA ή αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA, μετά την αλληλεπίδραση με την ένωση.

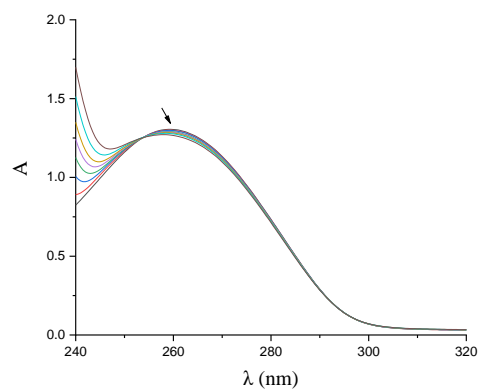
Στο 2<sup>ο</sup> στάδιο, τιτλοδοτείται διάλυμα της ένωσης με προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων του CT DNA και καταγράφονται τα φάσματα καθώς και οι μεταβολές των απορροφήσεων και της τιμής του  $\lambda_{max}$  που παρατηρούνται. Οι μεταβολές που παρατηρούνται μπορούν να οδηγήσουν σε αξιόπιστα συμπεράσματα σχετικά με το είδος της αλληλεπίδρασης. Μετατόπιση της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε συνδυασμό με μείωση της απορρόφησης (υποχρωμία) υποδηλώνει παρεμβολή της ένωσης στο CT DNA και σταθεροποίηση. Η υπερχρωμία υποδηλώνει ότι η ένωση συναρμόζεται πιθανότατα στην εξωτερική επιφάνεια του DNA, στην κύρια ή τη δευτερεύουσα αύλακα.

Κατά την αλληλεπίδραση των συμπλόκων με το DNA με παρεμβολή παρατηρείται στα φάσματα UV εμφάνιση βαθυχρωμίας, red-shift, η οποία οφείλεται στη μείωση της ενέργειας μετάπτωσης  $\pi \rightarrow \pi$  κατά τη σύζευξη του  $\pi$ -αρωματικού συστήματος του υποκαταστάτη με το  $\pi$ -αρωματικό σύστημα των βάσεων του DNA. Όταν το τροχιακό  $\pi$  σύζευξης συμπληρώνεται μερικώς με ηλεκτρόνια, περιορίζονται σημαντικά οι πιθανότητες μεταπτώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση υποχρωμίας.

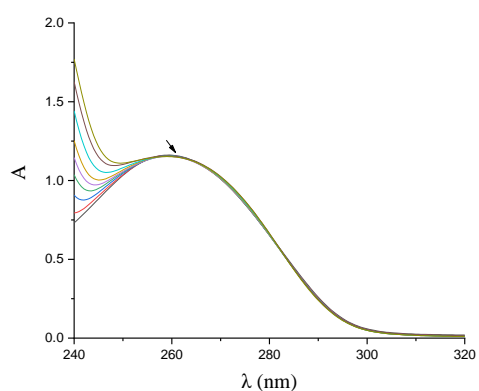
Αρχικά λάβαμε τα φάσματα UV για σταθερή συγκέντρωση CT-DNA με προσθήκη συνεχώς αυξανόμενων ποσοτήτων των συμπλόκων **I–VI**, σε διαφορετικούς λόγους  $r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$ . Παρακάτω εμφανίζονται τα φάσματα του DNA παρουσία των προαναφερθέντων συμπλόκων (**Εικόνα 32**).



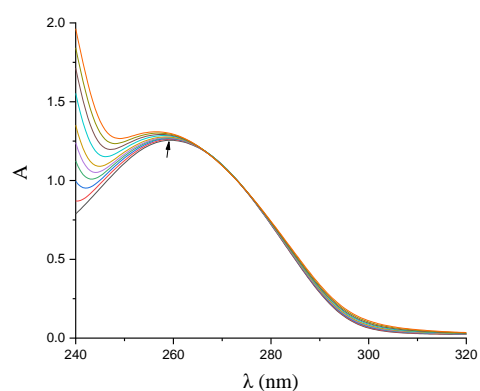
**(I)**



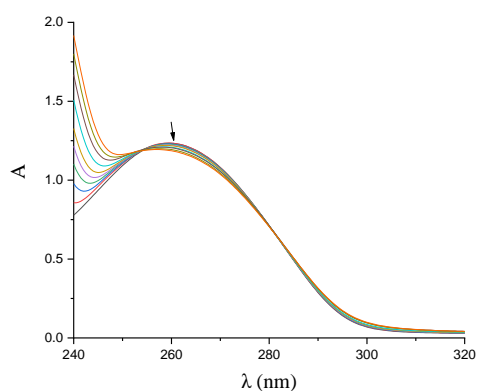
**(II)**



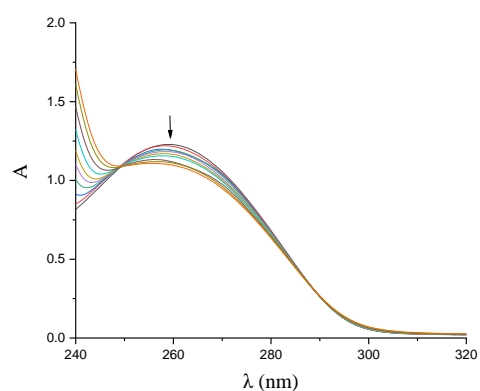
**(III)**



**(IV)**



**(V)**

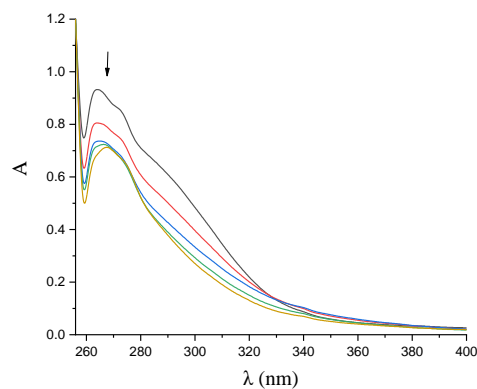


**(VI)**

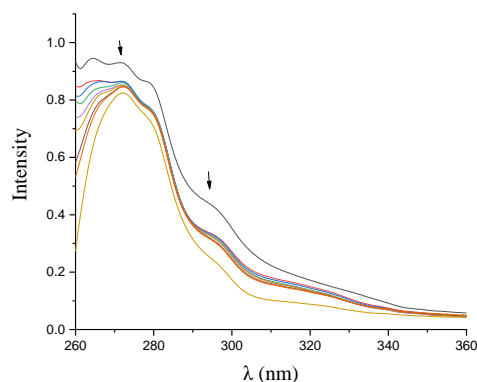
Εικόνα 32: Φάσματα UV-Vis του CT-DNA παρουσία διαλύματος του (I)  $[Cu_2(loxo)_4(H_2O)_2]$ , (II)  $[Cu_2(feno)_4(DMF)_2]$ , (III)  $[Zn(feno)_2(Himi)_2]$ , (IV)  $[Cu(ibu)_2(py)_2(H_2O)]$ , (V)  $[Cu(clon)_2(Himi)_2]$ , (VI)  $[Cu(clon)_2(neoc)]$ .

Στο σύνολο των φασμάτων, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 33**, παρατηρείται μετατόπιση της χαρακτηριστικής ταινίας του DNA, από τα 258 nm προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, γεγονός που υποδηλώνει αύξηση της σταθεροποίησης της δομής του DNA. Στα σύμπλοκα I και IV παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης στις ταινίες κοντά στα 258 nm, έχουμε δηλαδή φαινόμενο υπερχρωμίας, που αποτελεί ένδειξη εξωτερικής αλληλεπίδρασης των ενώσεων με την διπλή έλικα του DNA. Αντίθετα στα σύμπλοκα II, III, V και VI βλέπουμε πως υπάρχει μείωση της αντίστοιχης απορρόφησης, δηλαδή φαινόμενο υποχρωμίας, που αποτελεί ένδειξη παρεμβολής στην διπλή έλικα του DNA. Σημαντικό είναι όμως να αναφερθεί πως επειδή τα ποσοστά των παρατηρούμενων ποσοστών υπερχρωμίας και υποχρωμίας είναι σχετικά μικρά, δεν είναι εφικτή η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με τον τρόπο αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το CT-DNA.

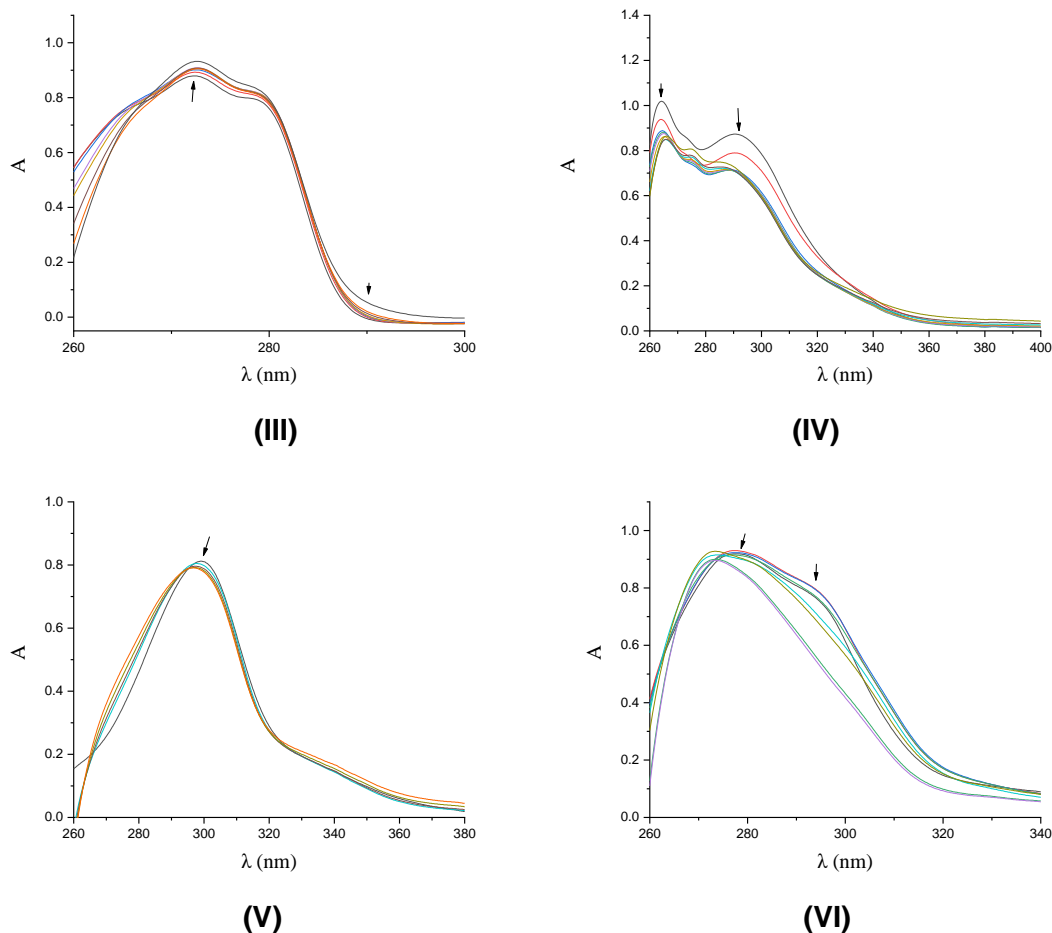
Στη συνέχεια λήφθηκαν τα φάσματα UV-vis προσθήκης αυξανόμενης ποσότητας διαλύματος DNA, γνωστής συγκέντρωσης, σε διάλυμα των συμπλόκων. Τα φάσματα καταγράφηκαν καθώς και οι μεταβολές των απορροφήσεων, συμπεριλαμβανομένης και της τιμής  $\lambda_{\max}$ . Οι παρατηρούμενες μεταβολές οδηγούν σε πιο αξιόπιστα συμπεράσματα σχετικά με το είδος της αλληλεπίδρασης. Μετατόπιση προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε συνδυασμό με υποχρωμία υποδηλώνει παρεμβολή της ένωσης στο DNA και σταθεροποίηση, ενώ η υπερχρωμία υποδηλώνει πως η ένωση συναρμόζεται πιθανότατα στην εξωτερική επιφάνεια του DNA ή/και μέσω δέσμησης στη μικρή ή μεγάλη αύλακά του.



(I)



(II)



Εικόνα 33: Φάσμα UV-Vis DMSO των συμπλόκων (I)  $[Cu_2(lox)_4(H_2O)_2]$ , (II)  $[Cu_2(feno)_4(DMF)_2]$ , (III)  $[Zn(feno)_2(Himi)_2]$ , (IV)  $[Cu(ibu)_2(py)_2(H_2O)]$ , (V)  $[Cu(clon)_2(Himi)_2(EtOH)_2]$ , (VI)  $[Cu(clon)_2(neoc)]$  παρουσία CT-DNA σε συνεχώς αυξανόμενες συγκεντρώσεις.

Παρατηρούμε πως σε όλα τα σύμπλοκα υπάρχει μετατόπιση των ταινιών σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (red-shift), και μείωση της απορρόφησης (υποχρωμία) (εξάριση το σύμπλοκο III που στην μια κορυφή του παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης, δηλαδή υπερχρωμία). Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν μια πρώτη ένδειξη αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA μέσω παρεμβολής.

Οι τιμές σύνδεσης των συμπλόκων με το CT DNA ( $K_b$ ) υπολογίστηκαν σύμφωνα με την εξίσωση Wolfe-Shimer (Εξίσωση 4) και τα αντίστοιχα διαγράμματα. Παρατηρούμε πως τα σύμπλοκα του fenoρροfen, εμφανίζουν σταθερά  $K_b$  δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από το ελεύθερο ligand, δηλαδή ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το DNA. Τα σύμπλοκα των loxorροfen και ibuprofen έχουν σταθερά  $K_b$  μεγαλύτερη από τα ελεύθερα ligands με το σύμπλοκο (IV) να έχει μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη. Ομοίως, τα σύμπλοκα του clonixίνη εμφανίζουν σταθερά  $K_b$  μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από το ελεύθερο ligand. Τέλος, τη μεγαλύτερη σταθερά  $K_b$  έχει το σύμπλοκο II ( $K_b = 1.83(\pm 0.08) \times 10^6 M^{-1}$ ).

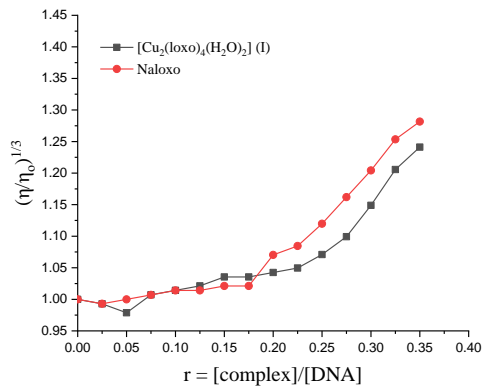
Πίνακας 17: Πίνακας σταθερών σύνδεσης ( $K_b$ ) των συμπλόκων με το DNA. Δίνονται τα μέγιστα των ταινιών  $\lambda_{max}(nm)$  και τα ποσοστά υποχρωμίας/υπερχρωμίας ( $\Delta A/A_0$ , %).

Ένωση	$\lambda(nm)$ ( $\Delta A/A_0$ (%)) <sup>α</sup>	$K_b(M^{-1})$
Ca(feno) <sub>2</sub>	272 (+5%) <sup>α</sup> , 279 (+7%)	3.29(±5.47) x10 <sup>4</sup>
Hibu	266 (+28%), 281 (+27%), 304 (-24%)	3.57(±0.16) x10 <sup>4</sup>
Hclon	284 (12%)	4.75(±5.65)x10 <sup>4</sup>
Naloxo	267 (-15%), 274(sh) <sup>β</sup> (-11%)	2.42(±1.15)x10 <sup>5</sup>
[Cu <sub>2</sub> (loxο) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (I)	264 (-27%), 272 (sh) (-21%)	7.54(±0.91)x10 <sup>5</sup>
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ] (II)	280 (-16%), 297 (-46%)	1.83(±0.08)x10 <sup>6</sup>
[Zn(feno) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> ] (III)	272 (-6%), 279 (-5%)	1.61(±0.09)x10 <sup>6</sup>
[Cu(ibu) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] (IV)	264 (-18%), 293 (sh) (-19%)	9.10(±0.77)x10 <sup>5</sup>
[Cu(clon) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> ] (V)	278 (-6%), 296 (-34%)	4.72(±4.06)x10 <sup>5</sup>
[Cu(clon) <sub>2</sub> (neoc)] (VI)	299 (-4%)	8.38(±2.41)x10 <sup>5</sup>

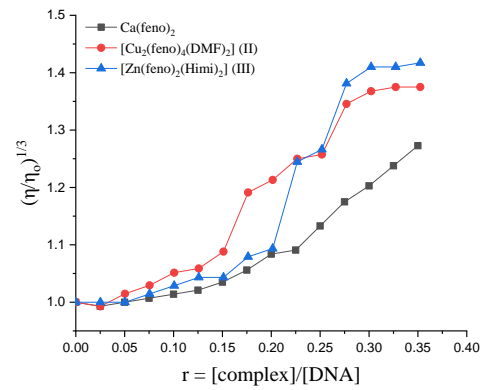
α το “+” υποδηλώνει υπερχρωμία, το “-” υποδηλώνει υποχρωμία, β “sh” = shoulder

### B.6.3 Μελέτες αλληλεπίδρασης συμπλόκων με ιξωδομετρία

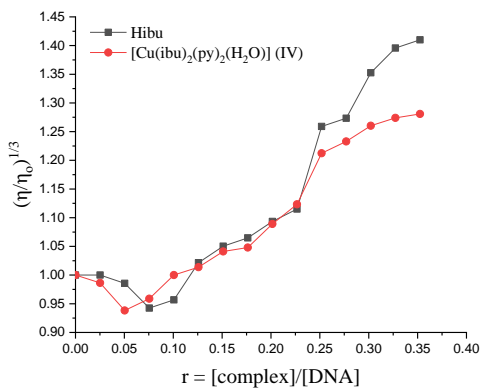
Η ιξωδομετρία αποτελεί μια ακόμη μέθοδο με την οποία εξετάζουμε την αλληλεπίδραση των συμπλόκων με το DNA. Στην μέθοδο αυτή γίνεται η μέτρηση του ιξώδους διαλύματος του DNA, το οποίο είναι ευαίσθητο στις αλλαγές του μήκους της αλυσίδας του DNA, και για αυτό η ιξωδομετρία αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο εξακρίβωσης του τρόπου σύνδεσης ενός συμπλόκου στο DNA. Αν η ένωση συνδέεται εξωτερικά με το DNA, είτε ηλεκτροστατικά είτε στην αύλακα, παρατηρείται μικρή κάμψη της έλικας του DNA, μειώνοντας ελάχιστα το μήκος της. Έτσι, το ιξώδες μειώνεται ή παραμένει αμετάβλητο. Εάν το σύμπλοκο δημιουργεί ρήξη στην έλικα του DNA, προκύπτουν θραύσματα μικρότερου μήκους και το ιξώδες ελαττώνεται σημαντικά. Τέλος, στην περίπτωση της κλασικής παρεμβολής, παρατηρείται αύξηση του μήκους της έλικας του DNA, καθώς τα ζεύγη βάσεων του DNA διαχωρίζονται για να φιλοξενήσουν την εισερχόμενη ένωση και κατά συνέπεια αυξάνεται το ιξώδες. Στην **Εικόνα 34** εμφανίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων του ιξώδους κατά την πραγματοποίηση μετρήσεων σε διάλυμα CT-DNA συνοδευόμενη από προσθήκη συνεχώς αυξανόμενων ποσοτήτων των συμπλόκων.



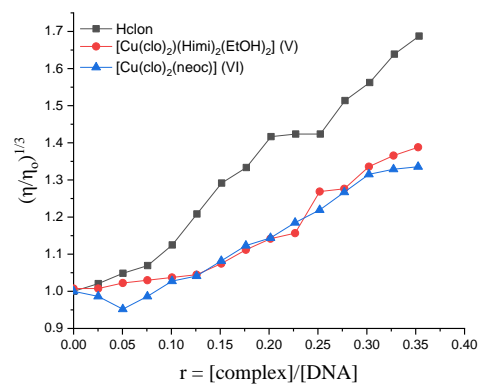
(A)



(B)



(C)



(D)

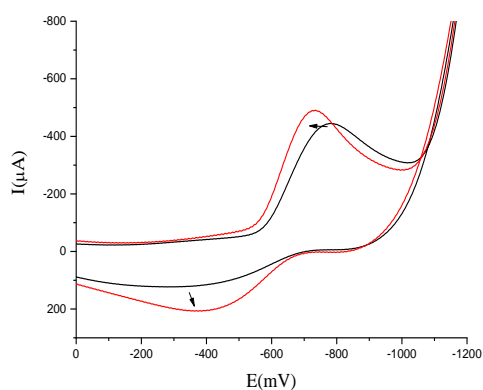
Εικόνα 34: Διάγραμμα του ιξώδους  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  σε συνάρτηση με το  $r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$  παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων των συμπλόκων. Η ομαδοποίηση έχει γίνει με βάση το ligand που περιέχουν τα εκάστοτε σύμπλοκα (A) - Loxoprofen, (B) – Fenoprofen, (C) – Ibuprofen, (D) – Clonixin

Για όλα τα σύμπλοκα παρατηρούμε ότι το ιξώδες αυξάνεται, έτσι οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η παρεμβολή είναι ο πιο πιθανός τρόπος αλληλεπίδρασης των συμπλόκων ενώσεων με το CT DNA.

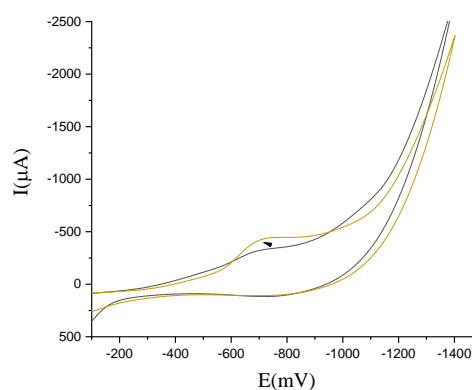
## B.6.5 Μελέτες κυκλικής βολταμμετρίας

Η εξέταση του τρόπου αλληλεπίδρασης ενός συμπλόκου με το DNA, πολλές φορές πραγματοποιείται και με διάφορες ηλεκτροχημικές τεχνικές. Αυτό γίνεται επειδή για τα σύμπλοκα με την αλληλεπίδρασή τους με την διπλή έλικα το DNA, μπορούν να ληφθούν χρήσιμες πληροφορίες τόσο για την οξειδωμένη όσο και για την ανηγμένη μορφή του μετάλλου που περιέχεται στο σύμπλοκο. Όταν υπάρχει αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο μέσω παρεμβολής τότε το ηλεκτροχημικό δυναμικό εμφανίζει μετατόπιση προς θετικές τιμές. Αντίθετα, παρατηρείται μετατόπιση προς αρνητικές τιμές όταν υπάρχει ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA. Συσχέτιση μπορεί να γίνει με το μέγεθος αυτής της μεταβολής, δηλαδή μεγάλη μετατόπιση αναλογεί σε ισχυρή αλληλεπίδραση ένωσης με την διπλή έλικα του DNA.

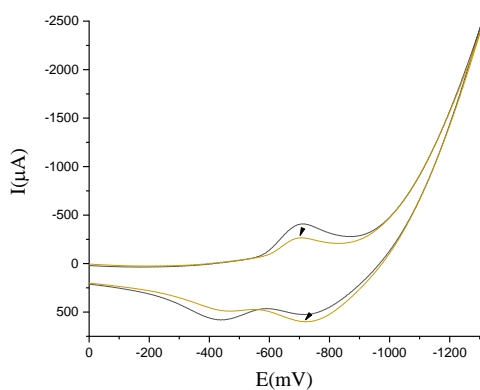
Παρατηρούμε πως από τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν, θετική μετατόπιση και συνεπώς αλληλεπίδραση με το DNA μέσω παρεμβολής εμφανίζουν και τα 5 σύμπλοκα που μελετήθηκαν. Εξάιρεση αποτελεί το σύμπλοκο  $[Cu_2(ioxo)_4(H_2O)_2]$  I που εμφανίζει και αρνητική πέρα από τη θετική μετατόπιση, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως συνδέεται στο DNA με παρεμβολή και ίσως με ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση.



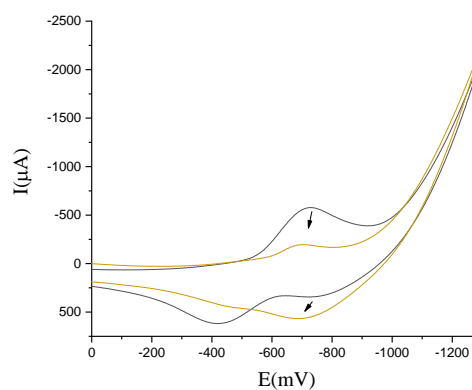
(A)



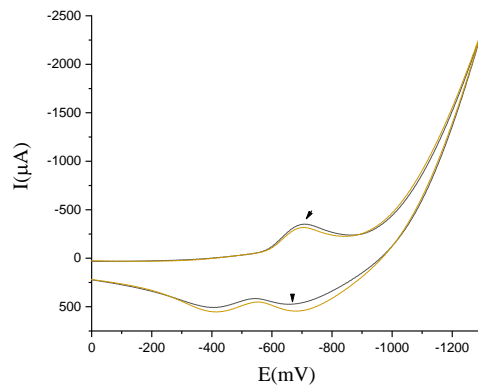
(B)



(C)



(D)



(E)

Εικόνα 35: Κυκλικά βολταμμογραφήματα 0,4 mM σε διάλυμα 1/2 dmsο/buffer των συμπλόκων (A)  $[Cu_2(loxo)_4(H_2O)_2]$  I, (B)  $[Cu_2(feno)_4(DMF)_2]$  II, (C)  $[Cu(clon)_2(neoc)]$  VI, (D)  $[Cu(ibu)_2(py)_2(H_2O)]$  IV, (E)  $[Cu(clon)_2(Himi)_2(EtOH)_2]$  V.

Πίνακας 18: Καθοδικά ( $E_{pc}$ ) και ανοδικά ( $E_{pa}$ ) δυναμικά (σε mV) για το οξειδοαναγωγικό ζεύγος των συμπλόκων I σε διάλυμα DMSO/buffer παρουσίας ή απουσίας DNA και οι μεταβολές τους.

Ένωση	$E_{pc(f)}^a$	$E_{pc(b)}^b$	$\Delta E_{pc}^c$	$E_{pa(f)}^a$	$E_{pa(b)}^b$	$\Delta E_{pa}^c$
$[Cu_2(loxo)_4(H_2O)_2]$ I (A)	-782	-726	+56	-391	-411	-20
$[Cu_2(feno)_4(DMF)_2]$ II (B)	-750	-699	+51	-	-	-
$[Cu(clon)_2(neoc)]$ VI (C)	-716	-694	+22	-745	-716	+29
$[Cu(ibu)_2(py)_2(H_2O)]$ IV (D)	-728	-689	+39	-738	-689	+49
$[Cu(clon)_2(Himi)_2(EtOH)_2]$ V (E)	-714	-696	+18	-665	-686	-21

Σημείωση: a  $E_{pc/a}$  σε DMSO/buffer απουσία CT DNA ( $E_{pc(a(f))}$ ), b  $E_{pc/a}$  σε DMSO/buffer παρουσία CT DNA ( $E_{pc(a(b))}$ ), c  $\Delta E_{pc/a} = E_{pc(a(b))} - E_{pc(a(f))}$



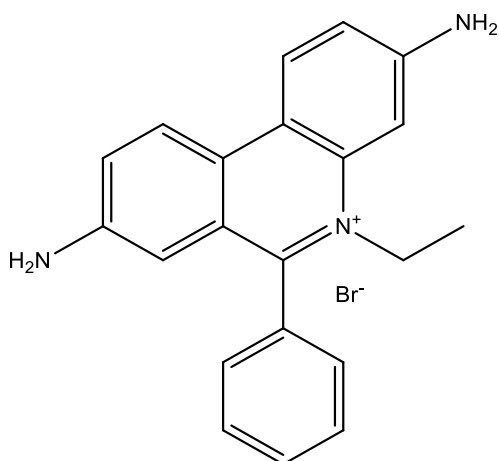
#### B.6.4 Μελέτη ανταγωνιστικής δράσης μεταξύ των συμπλόκων και του αιθιδίου βρωμιδίου (EB)

Αρκετές φορές, πραγματοποιούνται μελέτες ανταγωνιστικής δράσης της εξεταζόμενης ένωσης με μία ένωση αναφοράς η οποία έχει γνωστό τρόπο σύνδεσης με το DNA, ώστε να διαπιστωθεί ο τρόπος σύνδεσης της προς εξέταση ένωσης. Βασική προϋπόθεση βέβαια στο συγκεκριμένο είδος μελέτης, είναι η εξεταζόμενη ένωση και η ένωση αναφοράς, να εμφανίζουν παρόμοιες σταθερές σύνδεσης με το DNA. Η πιο διαδεδομένη ένωση αναφοράς σε τέτοιου είδους μελέτες στις περιπτώσεις σύνδεσης στο DNA μέσω παρεμβολής, είναι το αιθίδιο βρωμίδιο (φθορισμομετρικός αισθητήρας).

Το αιθίδιο βρωμίδιο (EB: ethidium bromide) **(Εικόνα 36)** είναι μία φθορίζουσα ένωση, και συγκεκριμένα μια φαινανθριδίνη που συνδέεται με τα νουκλειικά οξέα προς σχηματισμό ευδιάλυτων συμπλόκων. Συνδέεται στην διπλή έλικα του DNA μέσω παρεμβολής του επιπέδου δακτυλίου της φαινανθρίνης μεταξύ δύο γειτονικών βάσεων της διπλής έλικας του DNA.

Οι φασματοσκοπικές αλλαγές του EB στη συναρμογή του με το DNA χρησιμοποιούνται συχνά για να εξεταστεί η αλληλεπίδραση του DNA με άλλες ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, μελετώνται οι αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στα φάσματα φθορισμού του συμπλόκου του EB με το DNA κατά την προσθήκη της ένωσης σε αυξανόμενες ποσότητες. Θα πρέπει επίσης να τονισθεί ότι η ένωση δεν πρέπει να εμφανίζει ταινία εκπομπής στην περιοχή του φάσματος φθορισμού του συμπλόκου EB-DNA, έτσι ώστε να μην υπάρχει επικάλυψη δυο διαφορετικών φαινομένων, η οποία επηρεάζει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Όταν διάλυμα EB διεγερθεί με ακτινοβολία μήκους κύματος  $\lambda_{\max} = 540 \text{ nm}$ , εμφανίζει σχετικά ασθενή φθορισμό εκπομπής στα  $\lambda_{\max} = 600 \text{ nm}$ . Κατά την προσθήκη διαλύματος DNA στο διάλυμα EB, εμφανίζεται σημαντικά αυξημένος φθορισμός εκπομπής με  $\lambda_{\max} = 592 \text{ nm}$  που οφείλεται στη συναρμογή του EB μέσω παρεμβολής μέσω δύο γειτονικών βάσεων της διπλής έλικας του DNA. Η ένταση της ταινίας εκπομπής στα  $592 \text{ nm}$  που αποδίδεται στο σύμπλοκο EB-DNA ελαττώνεται κατά την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων της υπό μελέτη ένωσης που συνδέεται με το DNA το ίδιο ή πιο ισχυρά από ό,τι το EB. Αυτή η ελάττωση του φθορισμού αποκαλύπτει τον ανταγωνισμό μεταξύ της ένωσης και του EB κατά τη σύνδεσή τους με το DNA.

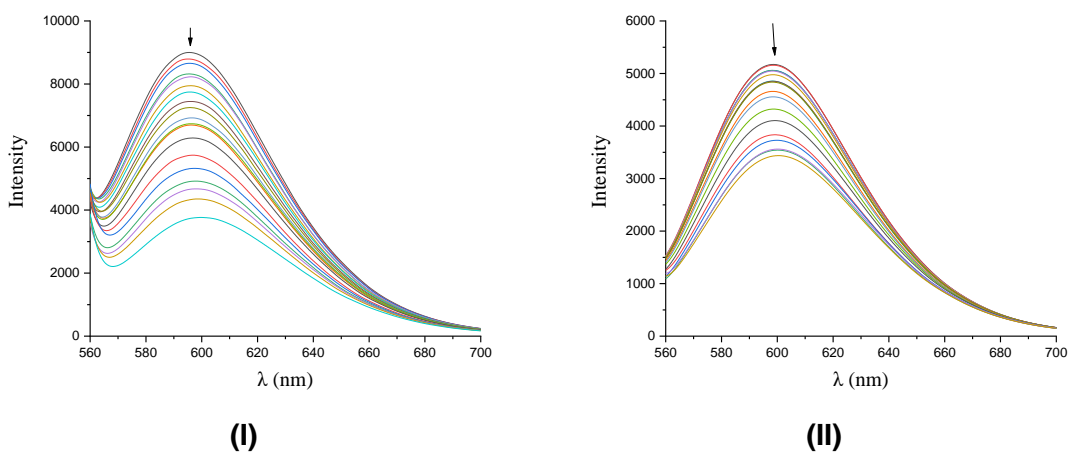


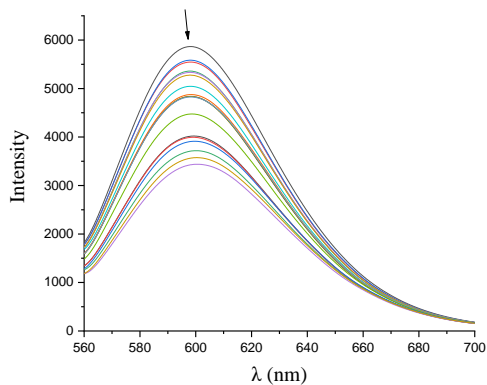
Εικόνα 36: Συντακτικός τύπος της ένωσης αναφοράς αιθίδιο βρωμίδιο (EB)

Εφόσον κατά την προσθήκη μιας ένωσης εμφανίζεται σημαντική ελάττωση του φθορισμού, θεωρείται ότι η ένωση αυτή έχει την ικανότητα να αντικαταστήσει το EB στο σύμπλοκό του με το DNA και πιθανώς ανταγωνίζεται με αυτό για την ίδια θέση σύνδεσης στο DNA. Μικρή ή αμελητέα ελάττωση φθορισμού υποδηλώνει μη ικανότητα αντικατάστασης του EB και έχει παρατηρηθεί κυρίως για ενώσεις που δε συμπεριφέρονται ως παρεμβολείς.<sup>100</sup>

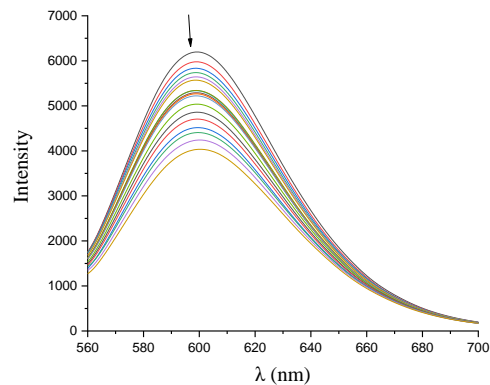
Το σύμπλοκο του EB-DNA παρασκευάστηκε με την ανάμιξη των διαλυμάτων EB (40  $\mu\text{M}$ ) και CT-DNA (40  $\mu\text{M}$ ) σε ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (150 mM) και κιτρικού νατρίου (15 mM) σε ουδέτερο pH (pH = 7.0).

Έπειτα ακολούθησε η προσθήκη με συνεχώς αυξανόμενες ποσότητες, των διαλυμάτων των συμπλόκων **I-VI**. Η προσθήκη των συμπλόκων οδήγησε σε έντονη μείωση του φθορισμού στα 592 nm όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 37**.

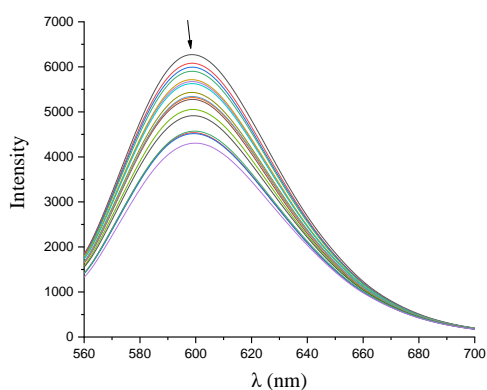




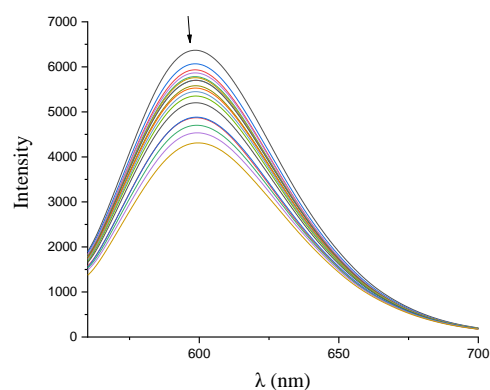
(III)



(IV)



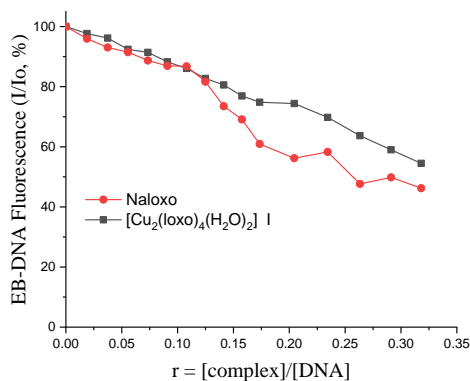
(V)



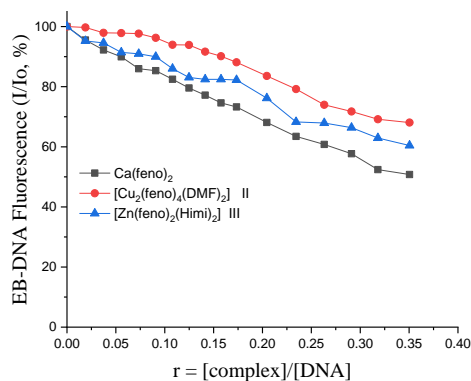
(VI)

Εικόνα 37: Φάσματα εκπομπής φθορισμού ( $\lambda_{\text{διέγ.}}=540\text{nm}$ ) του DNA-EB κατά την προσθήκη των συμπλόκων I–VI.

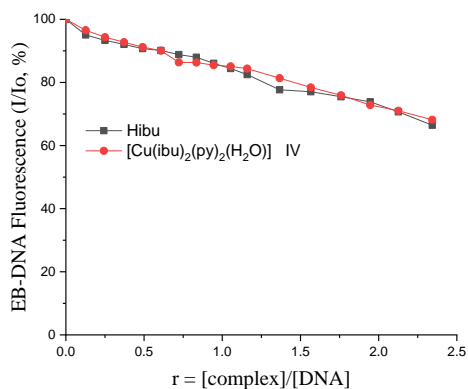
Συμπεραίνουμε πως τα σύμπλοκα I–VI ελαττώνουν έντονα το φθορισμό που εμφανίζει το EB-DNA. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν έχουν την ικανότητα να αντικαθιστούν το EB στο σύμπλοκο EB-DNA που σχηματίζεται. Εφόσον εμφανίζουν την ιδιότητα αυτή, τα σύμπλοκα συνδέονται κατά πάσα πιθανότητα μέσω παρεμβολής με την διπλή έλικα του DNA.



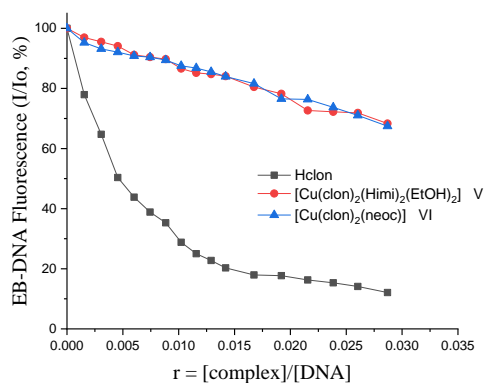
(A)



(B)



(C)

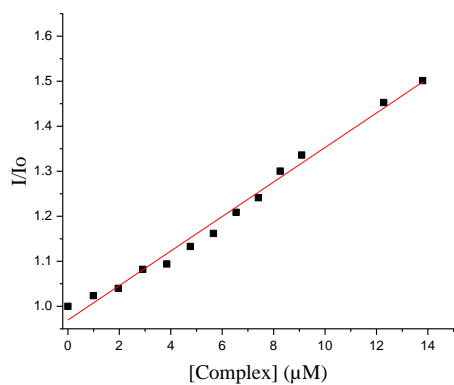


(D)

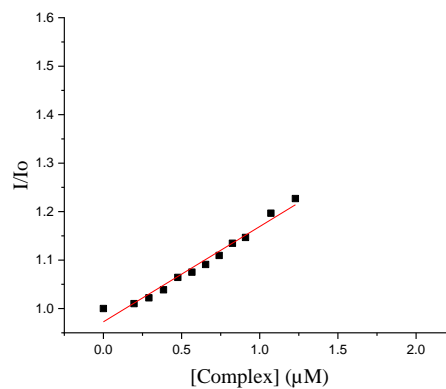
Εικόνα 38: Διάγραμμα ποσοστού έντασης φθορισμού ( $I/I_0$  %) σε  $\lambda = 592$  nm σε συνάρτηση με το λόγο  $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$ . Η ομαδοποίηση έχει γίνει με βάση το ΜΣΑΦ (A) - *Loxoprofen*, (B) - *Fenoprofen*, (C) - *Ibuprofen*, (D) - *Clonixin*

Από τα διαγράμματα που εμφανίζονται στην **Εικόνα 37** και **Εικόνα 38**, βλέπουμε πως με την προσθήκη συνεχώς αυξανόμενης ποσότητας των ενώσεων σε διάλυμα EB-DNA παρατηρείται μείωση του φθορισμού, άλλοτε σε μεγάλο ποσοστό, όπως στην περίπτωση των συμπλόκων **I**, **II**, **III** και άλλοτε σε μικρό ποσοστό, όπως στις περιπτώσεις των συμπλόκων **IV**, **V**, **VI**. Το σύμπλοκο **I** φαίνεται να εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό απόσβεσης φθορισμού.

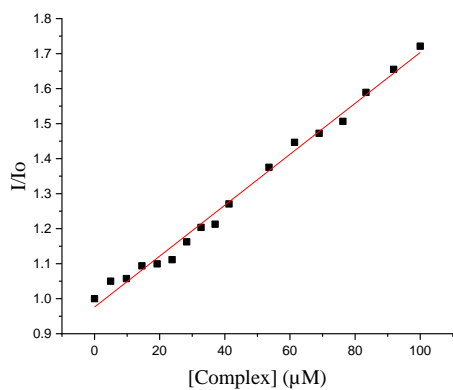
Ο υπολογισμός της σταθεράς Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) είναι απαραίτητος για την εκτίμηση της ικανότητας μείωσης του φθορισμού που προκαλείται από την καθεμία ένωση και δίνεται από την εξίσωση 5. Η σταθερά  $K_{SV}$  υπολογίζεται από την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων στα διαγράμματα  $I_0/I$  σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ένωσης. Το μέγεθος της  $K_{SV}$  σχετίζεται με την ικανότητα σύνδεσης της ένωσης στο CT-DNA. Οι τιμές της  $K_{SV}$  υπολογίστηκαν από τα αντίστοιχα διαγράμματα Stern-Volmer. Στην **Εικόνα 39** παρουσιάζονται τα διαγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της  $K_{SV}$  για το κάθε σύμπλοκο, ενώ στην **Πίνακα 19** εμφανίζονται οι τιμές των σταθερών  $K_{SV}$ .



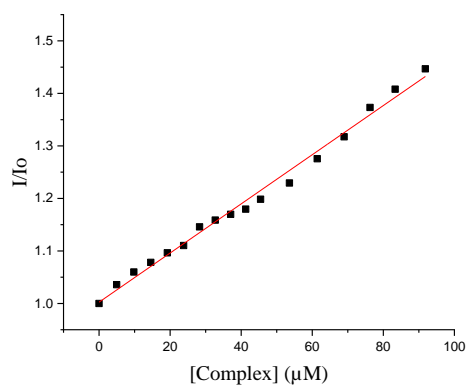
**(I)**



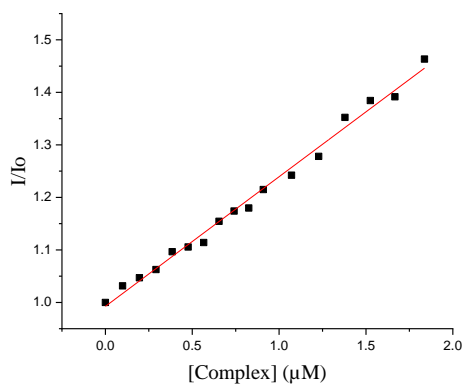
**(II)**



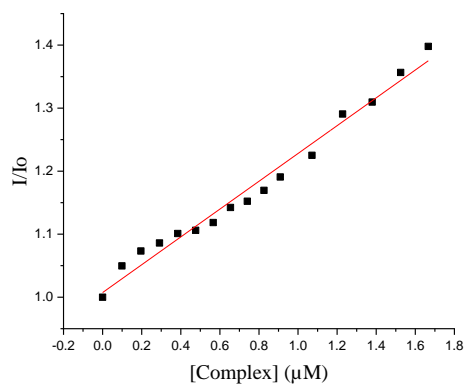
**(III)**



**(IV)**



**(V)**



**(VI)**

Εικόνα 39: Διαγράμματα Stern-Volmer της ελάττωσης φθορισμού EB-DNA για τα σύμπλοκα I-VI.

Πίνακας 19: Τιμές σταθεράς  $K_{sv}$  των ligands καθώς και των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν.

Ένωση	$\Delta I/I_0\%$	$K_{sv}(M^{-1})$	$k_q(M^{-1}s^{-1})$
Ca(feno) <sub>2</sub>	39.20	$4.74(\pm 0.15) \times 10^4$	$2.06(\pm 0.07) \times 10^{12}$
Hibu	24.53	$1.97(\pm 0.10) \times 10^5$	$8.55(\pm 0.45) \times 10^{12}$
Hclon	83.71	$3.86(\pm 0.09) \times 10^6$	$1.68(\pm 0.04) \times 10^{14}$
Naloxo	53.8	$7.66(\pm 0.24) \times 10^4$	$3.33(\pm 0.10) \times 10^{12}$
[Cu <sub>2</sub> (loxo) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (I)	36.3	$3.83(\pm 0.13) \times 10^4$	$1.67(\pm 0.05) \times 10^{12}$
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ] (II)	26.03	$1.97(\pm 0.10) \times 10^5$	$8.55(\pm 0.45) \times 10^{12}$
[Zn(feno) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> ] (III)	32.08	$7.27(\pm 0.18) \times 10^3$	$3.16(\pm 0.08) \times 10^{11}$
[Cu(ibu) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] (IV)	24.09	$4.68(\pm 0.12) \times 10^3$	$2.03(\pm 0.05) \times 10^{11}$
[Cu(clon) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> (EtOH) <sub>2</sub> ] (V)	27.34	$2.47(\pm 0.06) \times 10^5$	$1.07(\pm 0.03) \times 10^{13}$
[Cu(clon) <sub>2</sub> (neoc)] (VI)	23.64	$2.21(\pm 0.08) \times 10^5$	$9.60(\pm 0.36) \times 10^{12}$

Παρατηρώντας τον Πίνακα 19, γίνεται αντιληπτό πως όλες οι ενώσεις έχουν ικανότητα αντικατάστασης του EB και συνδέονται ισχυρά με το DNA μέσω παρεμβολής, γεγονός που υποδηλώνουν και οι τιμές της  $K_{sv}$ . Το σύμπλοκο V εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή  $K_{sv}$  ανάμεσα στα σύμπλοκα που συντέθηκαν.

## B.6.6 Συμπεράσματα

Με βάση τα φάσματα UV διαλύματος CT-DNA παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπλόκων καθώς και στα φάσματα των διαλυμάτων των συμπλόκων με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων διαλύματος CT-DNA, τα σύμπλοκα χωρίζονται σε 2 ομάδες ως προς τον τρόπο αλληλεπίδρασης τους με το CT-DNA. Τα σύμπλοκα **I** και **IV**, εμφανίζουν υπερχρωμία, ένδειξη εξωτερικής αλληλεπίδρασης με την διπλή έλικα του DNA ή/και δέσμευσης στην μικρή ή μεγάλη αύλακα του DNA. Στα υπόλοιπα σύμπλοκα (**II**, **III**, **V**, **VI**), παρατηρούμε το φαινόμενο της υποχρωμίας σε συνδυασμό με μετατόπιση προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα της αλληλεπίδρασής τους με την διπλή έλικα του DNA μέσω παρεμβολής.

Από τις μετρήσεις του ιξώδους διαλύματος CT-DNA παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων των συμπλόκων, επιβεβαιώνεται ότι όλα τα σύμπλοκα αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής, εξαιτίας της αύξησης του ιξώδους. Επίσης, από τις μελέτες κυκλικής βολταμμετρίας βλέπουμε πως όλα τα σύμπλοκα συνδέονται με το DNA μέσω παρεμβολής ενώ το σύμπλοκο **I** φαίνεται να συνδέεται μέσω παρεμβολής και πιθανόν μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης.

Η μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης με το EB έδειξε πως τα σύμπλοκα έχουν την ικανότητα να αντικαθιστούν το EB από το σύμπλοκο EB-DNA, αφού υπήρξε απόσβεση του φθορισμού του EB-DNA. Το σύμπλοκο **V** εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή  $K_{sv}$  ανάμεσα στα σύμπλοκα που συντέθηκαν.

## B.7 Μελέτες αλληλεπίδρασης συμπλόκων με τις αλβουμίνες ορού αίματος (HSA – BSA)

Στο ανθρώπινο πλάσμα, η αλβουμίνη ορού αποτελεί την πρωτεΐνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία. Είναι επίσης και μία από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες στο κυκλοφορικό σύστημα του οργανισμού, καθώς παίζει ζωτικό ρόλο στην ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης, προαπαιτούμενο της διατήρησης φυσιολογικού όγκου αίματος και φυσιολογικής περιεκτικότητας σε νερό στο μεσοκυττάριο υγρό αλλά και στους ιστούς. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων που έχουν τα διάφορα ligands καθώς και των συμπλόκων που χρησιμοποιήθηκαν με τις αλβουμίνες είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς η αλληλεπίδραση αυτή πιθανά οδηγεί σε αλλαγές στην βιολογική δράση και στις βιολογικές ιδιότητες των αλβουμινών.

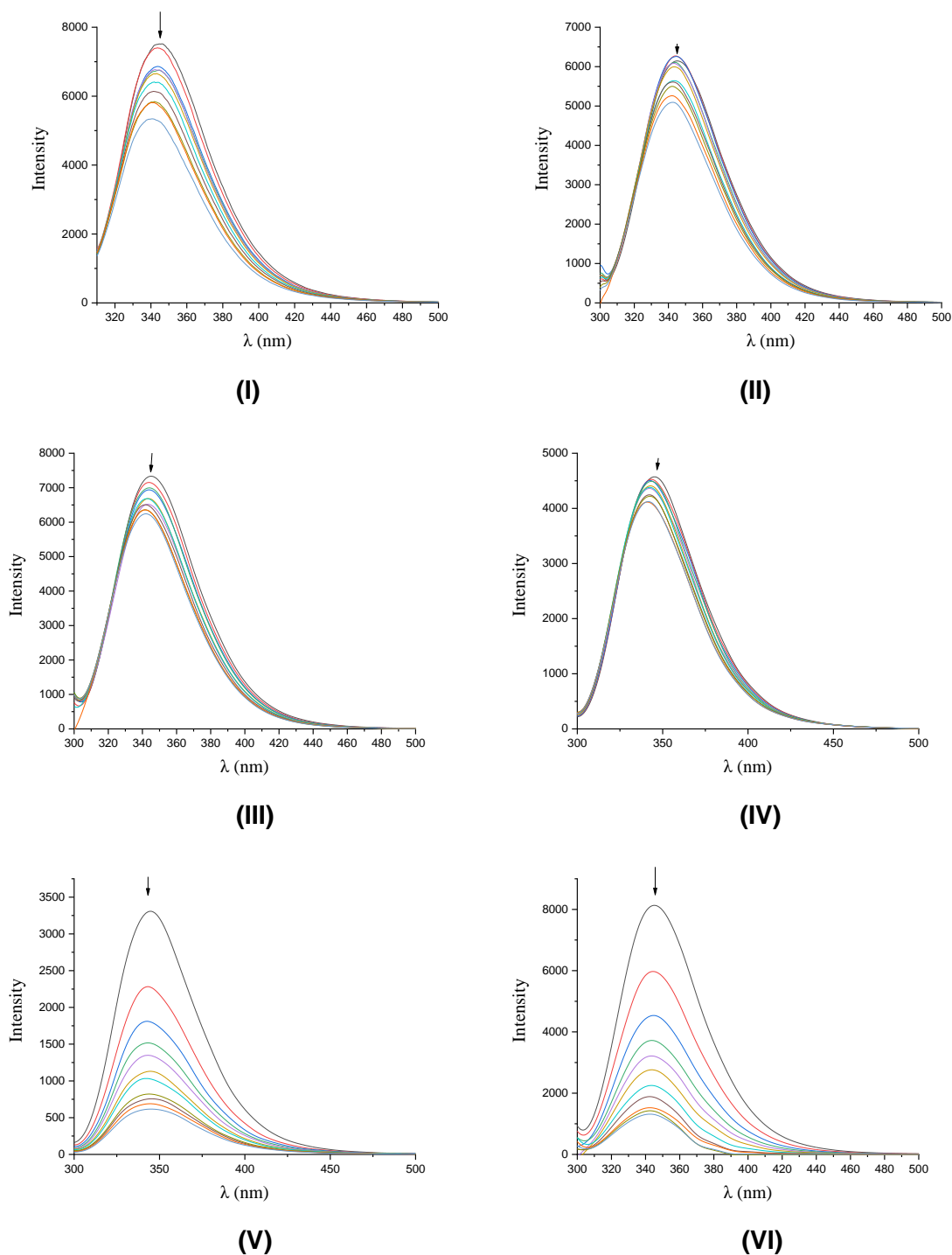
Η πιθανή αυτή αλληλεπίδραση μελετήθηκε σε δύο είδη αλβουμίνης, τη βοειδή αλβουμίνη του ορού (BSA, bovine serum albumin) και την ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού (HSA, human serum albumin). Η BSA έχει μελετηθεί εκτενώς εξαιτίας της δομικής της ομολογίας με την HSA. Το μόριο της BSA περιέχει δύο τρυπτοφάνες στις θέσεις 134 και 212 στις δομικές μονάδες IB και IIA, αντίστοιχα. Η HSA αποτελείται από 585 αμινοξέα και μια τρυπτοφάνη στη θέση 214 στη δομική μονάδα IIA. Οι αλβουμίνες αυτές μπορούν να δεσμεύσουν αντιστρεπτά ένα μεγάλο αριθμό ενδογενών και εξωγενών ενώσεων.

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των αλβουμινών με τα σύμπλοκα και τα ligands έγινε με πειράματα μελέτης της ελάττωσης της έντασης εκπομπής φθορισμού, χρησιμοποιώντας BSA (3  $\mu$ M) και HSA (3  $\mu$ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα (κιτρικό νάτριο 15 mM και χλωριούχο νάτριο 150 mM σε pH=7.0). Τα διαλύματα HSA και BSA παρουσιάζουν έντονη εκπομπή φθορισμού στα  $\lambda_{em,max} = 352$  nm και 342 nm, αντίστοιχα, λόγω της παρουσίας των τρυπτοφανών, όταν διεγείρονται στα 295 nm. Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού λήφθηκαν στην περιοχή 300-500 nm, και οι υπολογισμοί για τις ενώσεις έγιναν με κατάλληλη διόρθωση των φασμάτων τους, αφαιρώντας τα φάσματα εκπομπής των ενώσεων από τα φάσματα της αλβουμίνης. Οι πιθανές αλλαγές στα φάσματα του φθορισμού των BSA και HSA οφείλονται στην αλλαγή της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης, στην ένωση των υπομονάδων, στη σύνδεση των υποστρωμάτων ή ακόμα και στη μετουσίωση. Συγκεκριμένα, όταν κατά την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων μιας ένωσης στα διαλύματα αυτά, παρατηρείται ελάττωση της έντασης φθορισμού της BSA και της HSA, αυτό αποτελεί ένδειξη της αλληλεπίδρασης της ένωσης με την αλβουμίνη<sup>101</sup>.

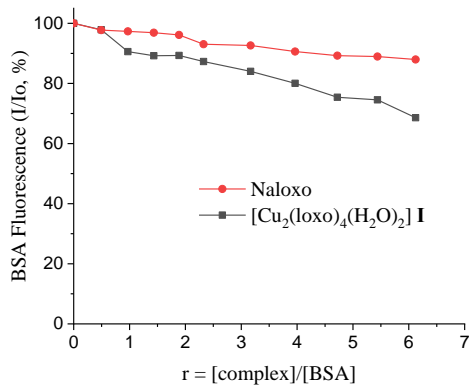


## B.7.1 Μελέτες αλληλεπίδρασης με BSA

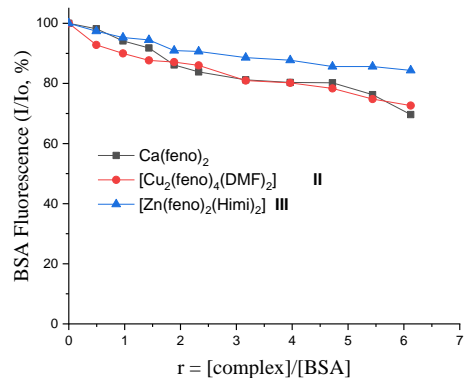
Παρακάτω εμφανίζονται τα φάσματα φθορισμού εκπομπής της BSA των συμπλόκων I – VI. Παρατηρείται (**Εικόνα 40**) έντονη μείωση του φθορισμού στα  $\lambda_{\max} = 342$  nm, καθώς προσθέτουμε συνεχώς αυξανόμενες ποσότητες του συμπλόκου. Η μείωση αυτή, υποδεικνύει πως υπάρχει αλληλεπίδραση των συμπλόκων με την αλβουμίνη.



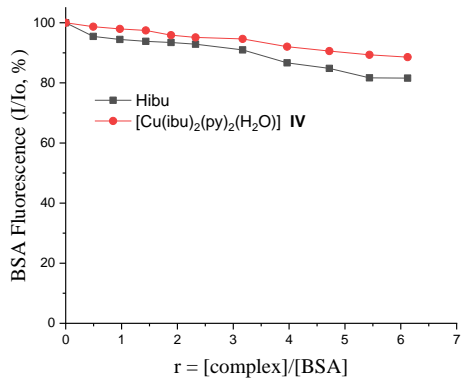
Εικόνα 40: Φάσμα φθορισμού εκπομπής της BSA ( $\lambda_{\text{exc}} = 295$  nm) παρουσία των συμπλόκων I – VI.



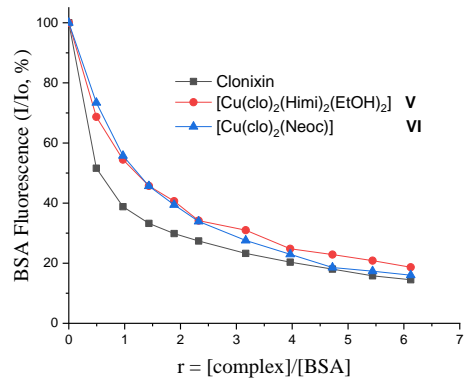
(A)



(B)



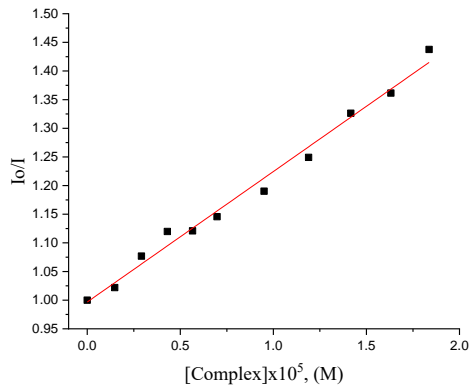
(C)



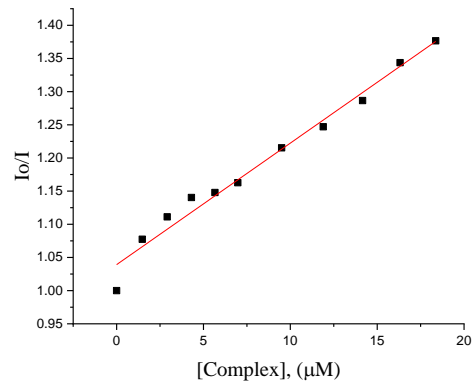
(D)

Εικόνα 41: Μεταβολή του ποσοστού φθορισμού εκπομπής της BSA ( $I/I_0$ , %) στα  $\lambda = 342$  nm σε συνάρτηση με το λόγο  $r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{BSA}]$ . Η ομαδοποίηση έχει γίνει με βάση το ΜΣΑΦ (A) - Loxorprofen, (B) – Fenoprofen, (C) – Ibuprofen, (D) - Clonixin

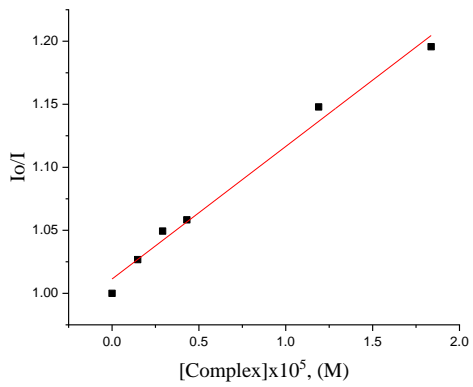
Παρατηρούμε πως όλα τα σύμπλοκα εμφανίζουν ελάττωση του φθορισμού εκπομπής κατά την προσθήκη τους στη BSA, με τα σύμπλοκα V και VI να ξεχωρίζουν, με την πιο έντονη ελάττωση (Εικόνα 40 και Εικόνα 41). Πιθανή αιτία της ελάττωσης αυτής να είναι η αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της BSA, υποδηλώνοντας έτσι σύνδεση μεταξύ της BSA και των συμπλόκων.



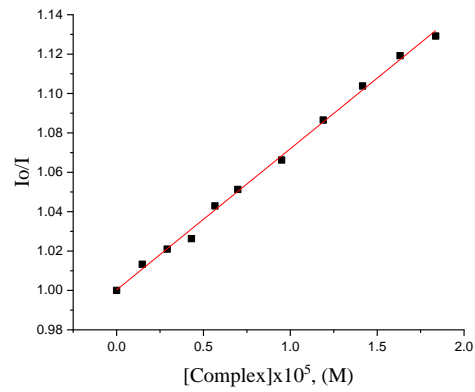
**(I)**



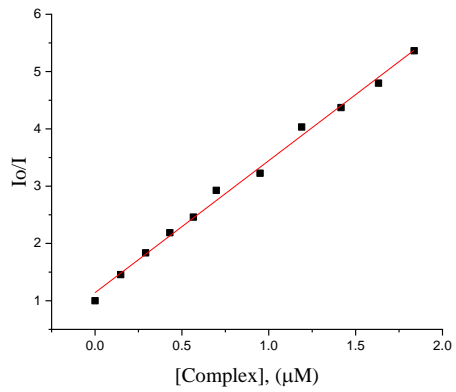
**(II)**



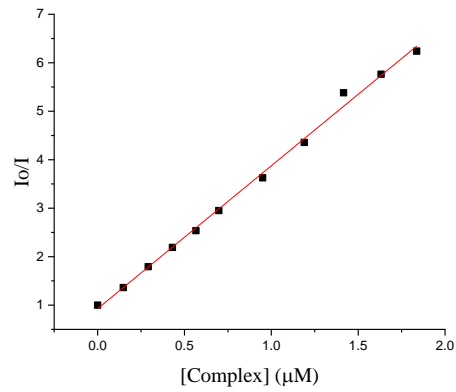
**(III)**



**(IV)**

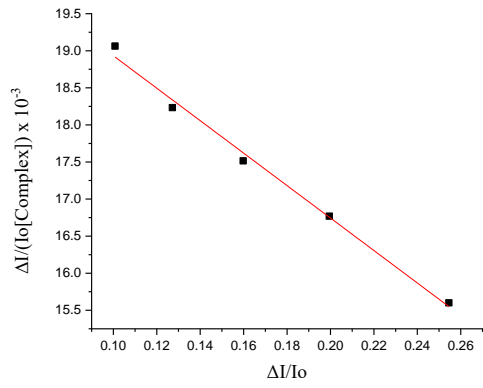


**(V)**

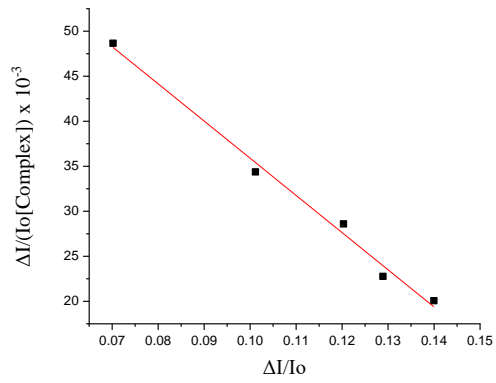


**(VI)**

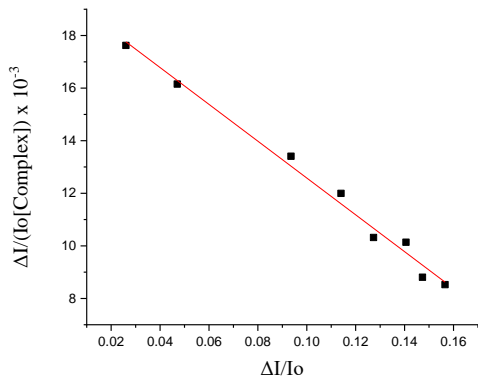
Εικόνα 42: Διαγράμματα Stern-Volmer των συμπλόκων I-VI.



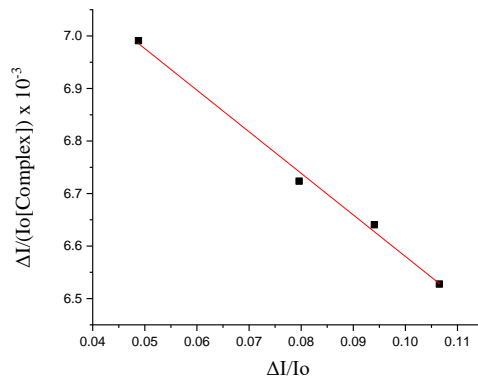
(I)



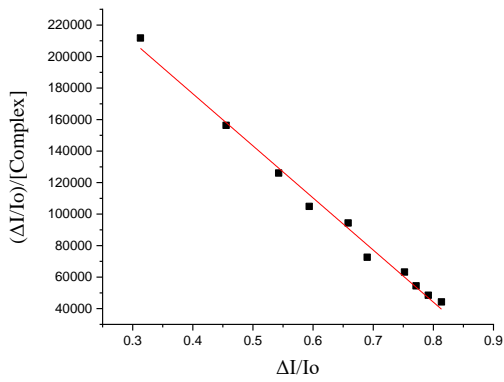
(II)



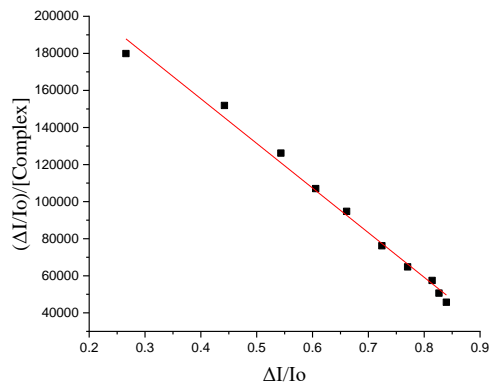
(III)



(IV)



(V)



(VI)

Εικόνα 43: Διαγράμματα Scatchard των συμπλόκων I – VI.

Πίνακας 20: Σύνολο σταθερών και παραμέτρων αλληλεπίδρασης συμπλόκων με την BSA

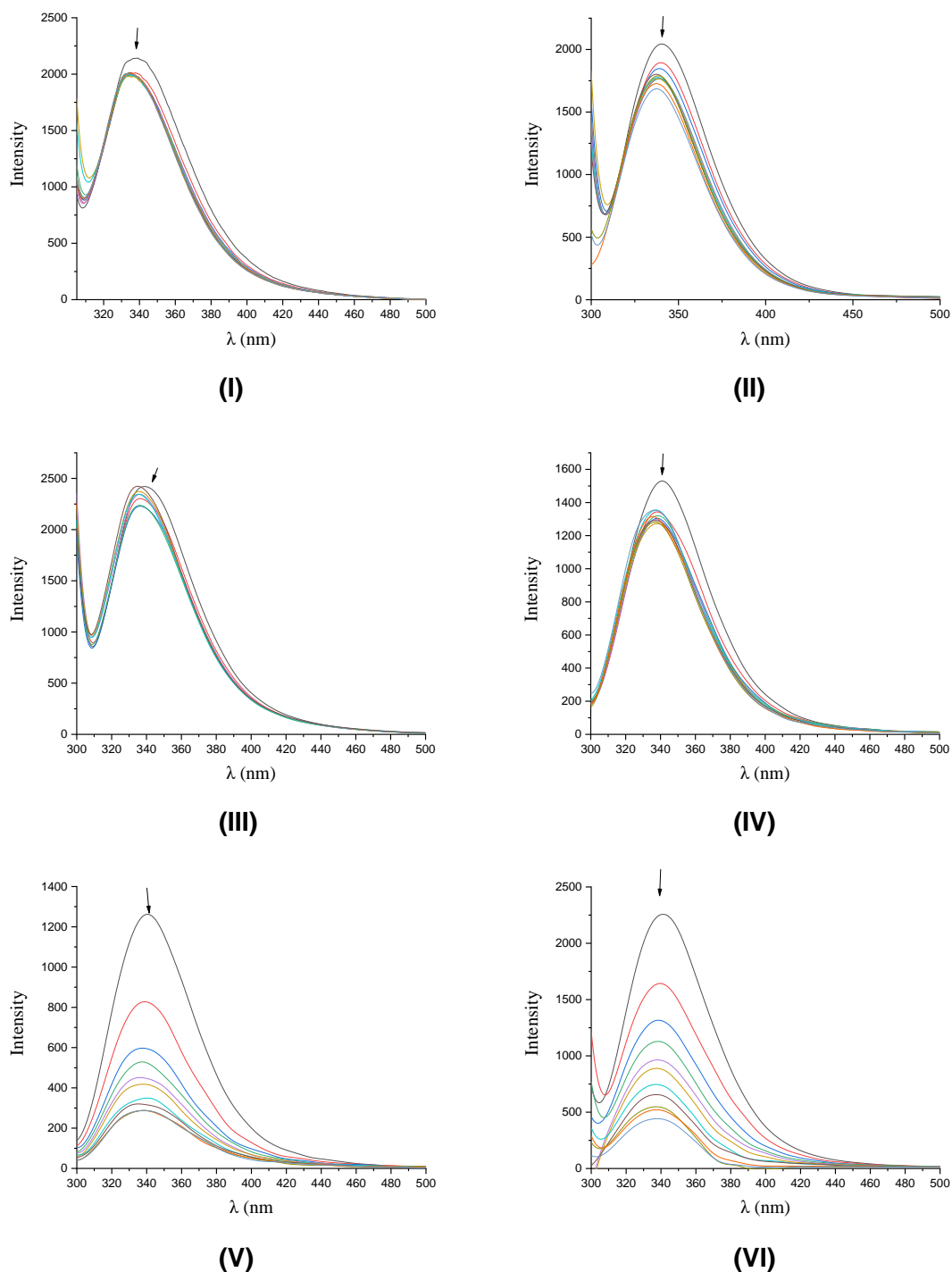
Ένωση	$K_{sv}(M^{-1})$	$k_q(M^{-1}s^{-1})$	$K(M^{-1})$	n
Ca(feno) <sub>2</sub>	$2.73(\pm 0.14) \times 10^4$	$2.73(\pm 0.14) \times 10^{12}$	$1.03(\pm 0.08) \times 10^5$	0.38
Hibu	$1.16(\pm 0.05) \times 10^4$	$1.16(\pm 0.05) \times 10^{12}$	$3.66(\pm 0.03) \times 10^4$	0.45
Hclon	$2.95(\pm 0.11) \times 10^5$	$2.95(\pm 0.11) \times 10^{13}$	$8.19(\pm 0.44) \times 10^5$	0.87
Naloxo	$7.96(\pm 0.33) \times 10^3$	$7.96(\pm 0.33) \times 10^{11}$	$9.18(\pm 0.45) \times 10^4$	0.19
[Cu <sub>2</sub> (Ioxo) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (I)	$2.28(\pm 0.08) \times 10^4$	$2.28(\pm 0.08) \times 10^{12}$	$2.19(\pm 0.10) \times 10^4$	0.96
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ] (II)	$1.83(\pm 0.09) \times 10^4$	$1.83(\pm 0.09) \times 10^{12}$	$4.13(\pm 0.22) \times 10^5$	0.19
[Zn(feno) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> ] (III)	$1.05(\pm 0.06) \times 10^4$	$1.05(\pm 0.06) \times 10^{12}$	$7.00(\pm 0.30) \times 10^4$	0.28
[Cu(ibu) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] (IV)	$7.17(\pm 0.13) \times 10^3$	$7.17(\pm 0.13) \times 10^{11}$	$7.92(\pm 0.38) \times 10^3$	0.93
[Cu(clon) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> (EtOH) <sub>2</sub> ] (V)	$2.95(\pm 0.06) \times 10^5$	$2.95(\pm 0.06) \times 10^{13}$	$2.41(\pm 0.08) \times 10^5$	1.05
[Cu(clon) <sub>2</sub> (neoc)] (VI)	$2.30(\pm 0.05) \times 10^5$	$2.30(\pm 0.05) \times 10^{13}$	$3.31(\pm 0.01) \times 10^5$	0.93

Η σταθερά απόσβεσης ( $k_q$ ) αφορά την αλληλεπίδραση των ενώσεων με τη BSA και υπολογίστηκε (Πίνακας 20) από τα διαγράμματα Stern-Volmer (Εικόνα 40) μέσω της εξίσωσης Stern-Volmer. Η τιμή  $k_q$  που υπολογίστηκε είναι σημαντικά υψηλότερη από  $10^{10} M^{-1}s^{-1}$  υποδηλώνοντας την ύπαρξη στατικού μηχανισμού απόσβεσης. Το σύνολο των συμπλόκων **I – VI** εμφανίζουν υψηλή ικανότητα απόσβεσης, με το σύμπλοκο **VI** να εμφανίζει την μεγαλύτερη σταθερά απόσβεσης.

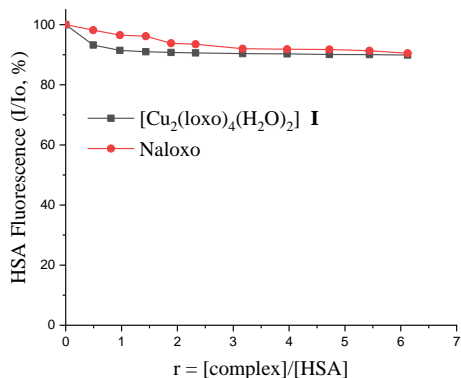
Αντίθετα το σύνολο των σταθερών σύνδεσης ( $K$ ) για τα σύμπλοκα **I–VI** υπολογίστηκαν από τα διαγράμματα Scatchard (Εικόνα 41), χρησιμοποιώντας την αντίστοιχη εξίσωση. Όλα τα σύμπλοκα εμφανίζουν υψηλές τιμές σταθεράς σύνδεσης, γεγονός που υποδηλώνει την σύνδεση των ενώσεων στις αλβουμίνες, επιτυγχάνοντας έτσι την μεταφορά τους σε πληθώρα βιολογικών στόχων. Την μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης για την BSA φαίνεται να εμφανίζει το σύμπλοκο **III**.

## B.7.2 Μελέτες αλληλεπίδρασης με HSA

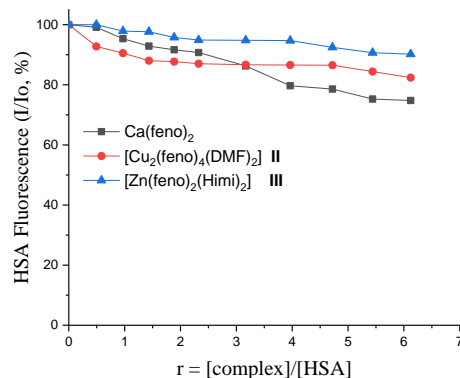
Στη συνέχεια θα δούμε τα φάσματα φθορισμού εκπομπής HSA των συμπλόκων I – VI. Όπως και στην περίπτωση της BSA, παρατηρούμε μείωση της έντασης φθορισμού, αυτή τη φορά στο  $\lambda_{\max} = 352$  nm, με την προσθήκη συνεχώς αυξανόμενων ποσοτήτων των ενώσεων, γεγονός που αναμένεται εξαιτίας της δομικής ομοιότητας μεταξύ της HSA και BSA. Η μείωση αυτή υποδεικνύει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση των ενώσεων με την αλβουμίνη.



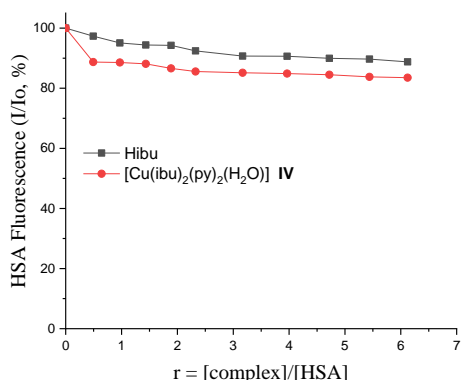
Εικόνα 44: Φάσμα φθορισμού εκπομπής της HSA ( $\lambda_{\text{διεγ}} = 295$  nm) παρουσία των συμπλόκων I – VI.



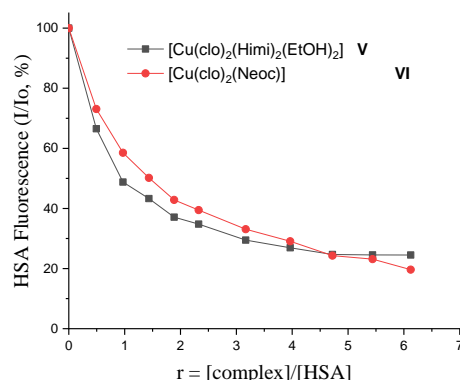
(A)



(B)



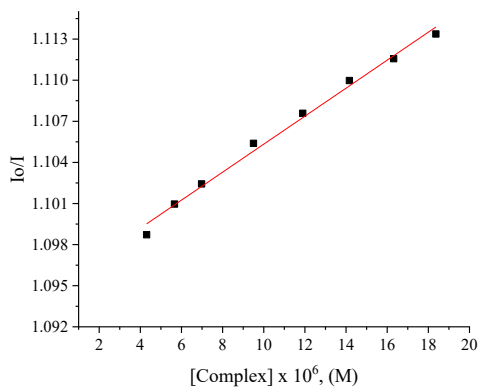
(C)



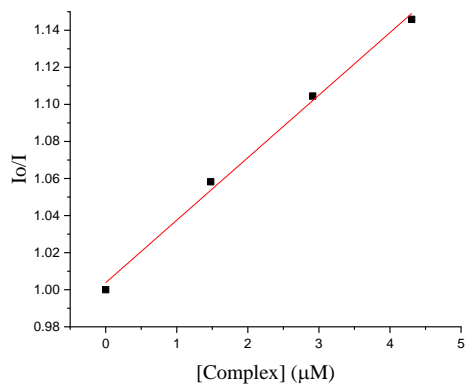
(D)

Εικόνα 45: Μεταβολή του ποσοστού φθορισμού εκπομπής της HSA (I/I<sub>0</sub>, %) στα λ=352 nm σε συνάρτηση με το λόγο  $r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{HSA}]$ . Η ομαδοποίηση έχει γίνει με βάση το ΜΣΑΦ (A) - Loxorofen, (B) – Fenorofen, (C) – Ibuprofen, (D) - Clonixin

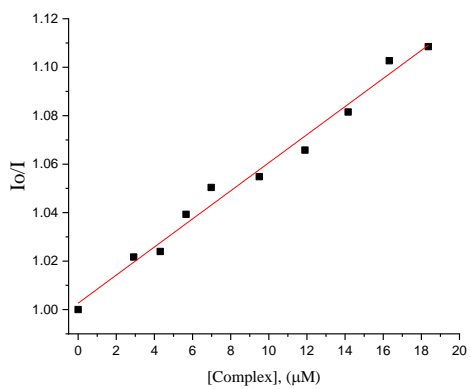
Όλα τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν φαίνεται να ελαττώνουν τον φθορισμό εκπομπής κατά την προσθήκη τους σε διάλυμα της HSA. Πιθανή αιτία της ελάττωσης αυτής μπορεί να είναι η αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της HSA η οποία οφείλεται στη σύνδεση των ενώσεων στην HSA. Στις περιπτώσεις των συμπλόκων που περιέχουν ligands τα οποία από μόνα τους δεν προκαλούν μείωση του φθορισμού εκπομπής σε μεγάλο ποσοστό, όπως το Loxorofen και το Ibuprofen (**Εικόνα 45**), βλέπουμε πως δεν υπάρχει μεγάλη μείωση και στα αντίστοιχα σύμπλοκα που τα περιέχουν.



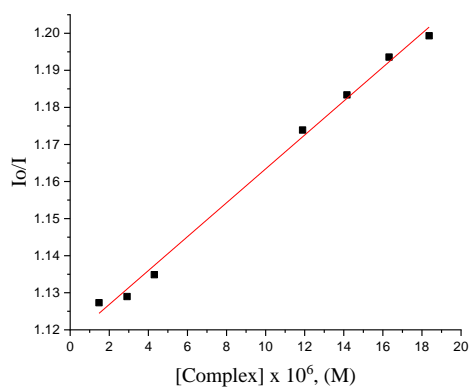
(I)



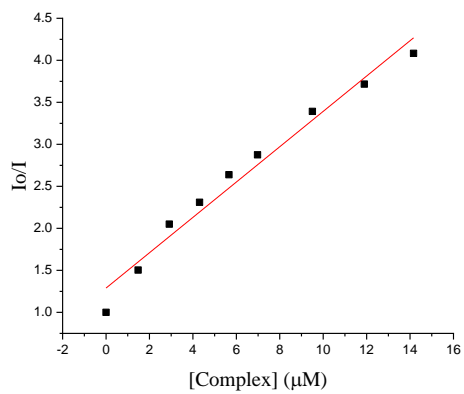
(II)



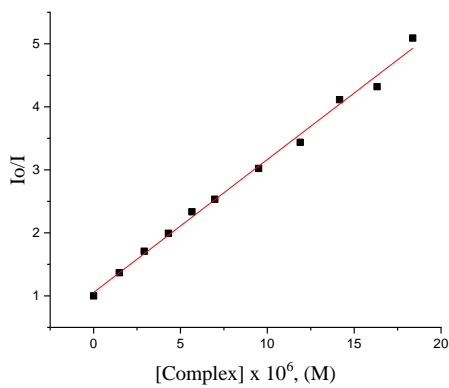
(III)



(IV)



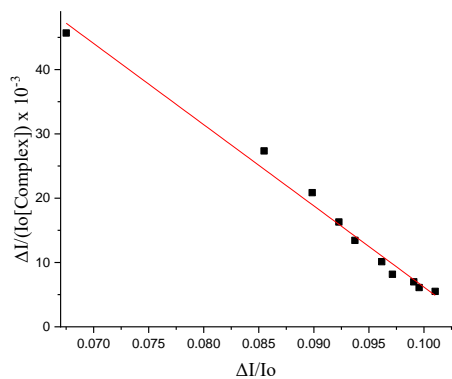
(V)



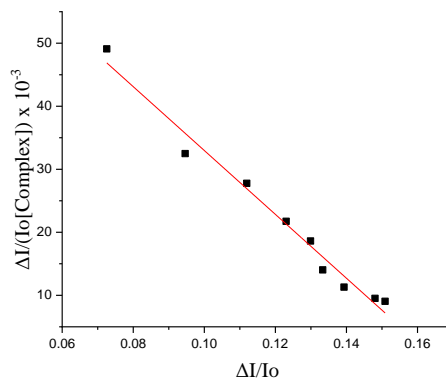
(VI)

Εικόνα 46: Διαγράμματα Stern-Volmer των συμπλόκων I – VI.

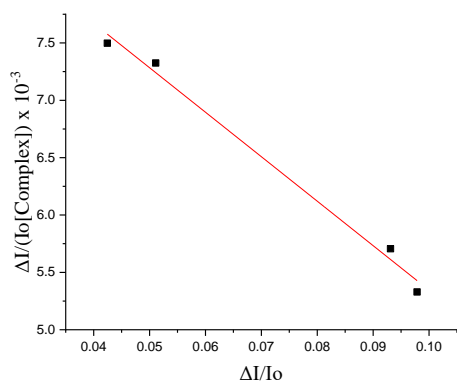




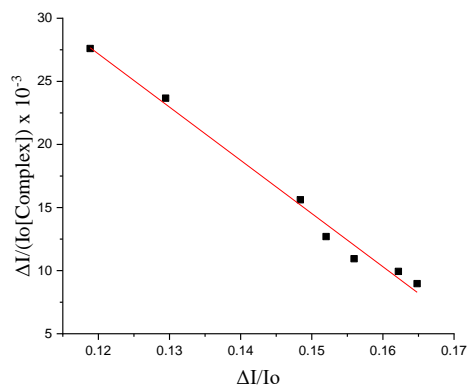
**(I)**



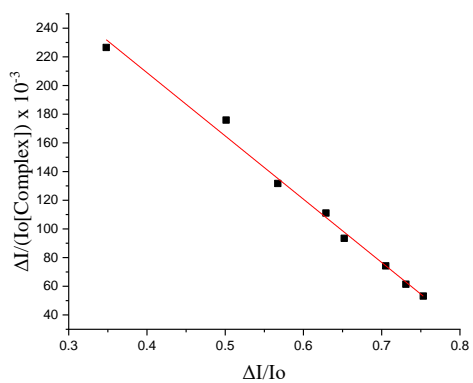
**(II)**



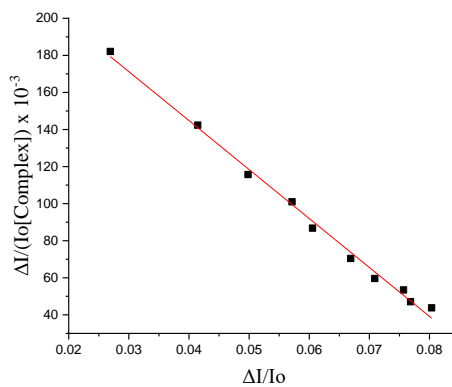
**(III)**



**(IV)**



**(V)**



**(VI)**

Εικόνα 47: Διαγράμματα Scatchard των συμπλόκων I-VI

Πίνακας 21: Σύνολο σταθερών και παραμέτρων αλληλεπίδρασης συμπλόκων με την HSA

Ένωση	$K_{sv}(M^{-1})$	$k_q(M^{-1}s^{-1})$	$K(M^{-1})$	n
Ca(feno) <sub>2</sub>	$2.01(\pm 0.07) \times 10^4$	$2.01(\pm 0.07) \times 10^{12}$	$1.50(\pm 0.05) \times 10^5$	0.18
Hibu	$1.11(\pm 0.04) \times 10^4$	$1.11(\pm 0.04) \times 10^{12}$	$1.42(\pm 0.06) \times 10^5$	0.15
Naloxo	$9.11(\pm 0.50) \times 10^3$	$9.11(\pm 0.50) \times 10^{11}$	$9.89(\pm 0.57) \times 10^4$	0.15
[Cu <sub>2</sub> (loxo) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (I)	$1.02(\pm 0.04) \times 10^3$	$1.02(\pm 0.04) \times 10^{11}$	$1.26(\pm 0.05) \times 10^6$	0.10
[Cu <sub>2</sub> (feno) <sub>4</sub> (DMF) <sub>2</sub> ] (II)	$3.37(\pm 0.16) \times 10^4$	$3.37(\pm 0.16) \times 10^{12}$	$5.07(\pm 0.28) \times 10^5$	0.17
[Zn(feno) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> ] (III)	$5.79(\pm 0.26) \times 10^3$	$5.79(\pm 0.26) \times 10^{11}$	$3.88(\pm 0.26) \times 10^4$	0.24
[Cu(ibu) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] (IV)	$4.57(\pm 0.14) \times 10^3$	$4.57(\pm 0.14) \times 10^{11}$	$4.22(\pm 0.20) \times 10^5$	0.18
[Cu(clon) <sub>2</sub> (Himi) <sub>2</sub> (EtOH) <sub>2</sub> ] (V)	$2.11(\pm 0.05) \times 10^5$	$2.11(\pm 0.05) \times 10^{13}$	$2.64(\pm 0.07) \times 10^5$	0.95
[Cu(clon) <sub>2</sub> (neoc)] (VI)	$2.10(\pm 0.13) \times 10^5$	$2.10(\pm 0.13) \times 10^{13}$	$4.41(\pm 0.16) \times 10^5$	0.87

Η σταθερά απόσβεσης ( $k_q$ ), όπως και στην περίπτωση της BSA, αφορά την αλληλεπίδραση των συμπλόκων με την αλβουμίνη και υπολογίστηκε από τα διαγράμματα Stern–Volmer μέσω της αντίστοιχης εξίσωσης. Η τιμή της σταθεράς απόσβεσης που υπολογίστηκε, είναι από μια έως τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από  $10^{10} M^{-1}s^{-1}$ , βοηθώντας μας να καταλήξουμε ότι υπάρχει στατικός μηχανισμός απόσβεσης. Το σύμπλοκο **V** και **VI** εμφανίζουν τις μεγαλύτερες τιμές  $k_q$  (Πίνακας 21).

Αντίθετα, η σταθερά σύνδεσης ( $K$ ) για τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν, υπολογίστηκε από τα διαγράμματα Scatchard και με τη χρήση της αντίστοιχης εξίσωσης. Όλες οι τιμές των σταθερών σύνδεσης για τα σύμπλοκα **I–VI** είναι υψηλές, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα πως οι ενώσεις μας συνδέονται στις αλβουμίνες και έτσι μπορούν να μεταφερθούν σε πληθώρα βιολογικών στόχων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση μεγαλύτερη τιμή όσον αφορά την σταθερά σύνδεσης ( $K$ ) φαίνεται να εμφανίζει το σύμπλοκο **II** (Πίνακας 21).

## B.8 Συμπεράσματα

Στην συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία, έγινε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός έξι συμπλόκων ενώσεων του χαλκού με τα ligands fenoprofen, loxoprofen, ibuprofen και clonixipin και ενός συμπλόκου του ψευδαργύρου με το fenoprofen. Δύο από τα σύμπλοκα αυτά ήταν διπυρηνικά (I και II) ενώ τα υπόλοιπα μονοπυρηνικά. Για την σύνθεσή τους χρησιμοποιήθηκαν και τα co-ligands neocuproine, imidazole και pyridine. Ο χαρακτηρισμός των δομών των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη φασματοσκοπία IR, και κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Στην πλειονότητα των συμπλόκων, τα ligand ΜΣΑΦ συναρμόζονται μονοδραστικά, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα φάσματα υπεριώθρου καθώς και από τις λυμένες δομές. Εξαίρεση αποτελούν τα διπυρηνικά σύμπλοκα, όπου το ligands loxoprofen και fenoprofen, συναρμόζονται διδραστικά σχηματίζοντας γέφυρες μεταξύ των ατόμων χαλκού.

Η διαλυτότητα των ενώσεων στους περισσότερους διαλύτες είναι πλήρης ή γίνεται σε μέτριο βαθμό. Μελέτες υπεριώδους-ορατού μας έδειξαν τις κλασσικές και αναμενόμενες d-d και intra-ligand μεταπτώσεις. Όπως αναφέρθηκε ο μονοδραστικός ή διδραστικός τρόπος συναρμογής επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία IR.

Η αλληλεπίδραση των ενώσεων με το CT-DNA πραγματοποιήθηκε μέσω μιας σειράς μελετών με την χρήση φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού, ιξωδομετρίας, κυκλικής βολταμμετρίας καθώς και μελέτης αντικατάστασης του EB. Η εμφάνιση υπερχρωμίας ή υποχρωμίας στα φάσματα υπεριώδους ορατού είναι χαρακτηριστικό φαινόμενο της αλληλεπίδρασης ενώσεων με το DNA, ενώ οι τιμές της σταθεράς σύνδεσης  $K_b$  που υπολογίστηκαν αποδεικνύουν την ιδιαίτερα σταθερή σύνδεση των ενώσεων. Οι μελέτες του ιξώδους και συγκεκριμένα η αύξηση του ιξώδους μας δείχνει ότι οι ενώσεις συνδέονται μέσω παρεμβολής με το DNA. Οι μελέτες κυκλικής βολταμμετρίας επιβεβαιώνουν τα παραπάνω συμπεράσματα και συγκεκριμένα την σύνδεση των συμπλόκων μέσω παρεμβολής με το DNA. Στις μελέτες αντικατάστασης του EB, σημειώθηκε σημαντική μείωση του φθορισμού, γεγονός που αποδίδεται στην ικανότητα που εμφανίζουν τα σύμπλοκα να παίρνουν τη θέση του EB στο σύμπλοκο EB-DNA, αποτελώντας μία έμμεση απόδειξη της αλληλεπίδρασης μέσω παρεμβολής των ενώσεων που συντέθηκαν.

Τέλος μέσω των μελετών αλληλεπίδρασης με αλβουμίνες (BSA και HSA) υπολογίστηκε η σταθερά σύνδεσης  $K$  για το κάθε σύμπλοκο. Παρατηρήθηκε επίσης πως τα σύμπλοκα συνδέονται αρκετά ισχυρά με τις αλβουμίνες, ώστε να μπορούν να μεταφερθούν στους επιθυμητούς βιολογικούς στόχους και να έχουν την δυνατότητα να αποδεσμευθούν.

## Βιβλιογραφία

- (1) McHenry, C. The New Encyclopedia Britannica. *Encyclopedia Britannica*; 1974; p 612.
- (2) Peña, M. M. O.; Lee, J.; Thiele, D. J. A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution. *J. Nutr.* **1999**, *129* (7), 1251–1260. <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1251>.
- (3) Madsen, E.; Gitlin, J. D. Copper and Iron Disorders of the Brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **2007**, No. 30, 317–337. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094232>.
- (4) Lane, T. F.; Iruela-Arispe, M. L.; Johnson, R. S.; Sage, E. H. Angiogenesis and SPARC. *Trends Cell Biol.* **1994**, *125* (4), 929–943. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(94\)90215-1](https://doi.org/10.1016/0962-8924(94)90215-1).
- (5) Kodama, H.; Fujisawa, C. Copper Metabolism and Inherited Copper Transport Disorders: Molecular Mechanisms, Screening, and Treatment. *Metallomics*. 2009, pp 112–120. <https://doi.org/10.1039/b816011m>.
- (6) Sturgeon, P.; Brubaker, C. Copper Deficiency in Infants: A Syndrome Characterized by Hypocupremia, Iron Deficiency Anemia, And. *AMA. J. Dis. Child.* **1956**, *92* (3), 254–265. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1956.02060030248002>.
- (7) World Health Organization. *Guidelines for Drinking-Water Quality [Electronic Resource]: Incorporating First Addendum. Vol. 1, Recommendations. – 3rd Ed.*; 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02199.x>.
- (8) Özden, T. A.; Gökçay, G.; Cantez, M. S.; Durmaz, Ö.; Issever, H.; Ömer, B.; Saner, G. Copper, Zinc and Iron Levels in Infants and Their Mothers during the First Year of Life: A Prospective Study. *BMC Pediatr.* **2015**, *15* (157), 72–84. <https://doi.org/10.1186/s12887-015-0474-9>.
- (9) Madsen, E.; Gitlin, J. D. Copper Deficiency. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2007, pp 187–192. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32801421bb>.
- (10) Johnson, P. E.; Milne, D. B.; Lykken, G. I. Effects of Age and Sex on Copper Absorption, Biological Half-Life, and Status in Humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1992**, *56* (5), 917–925. <https://doi.org/10.1093/ajcn/56.5.917>.
- (11) Linder, M. C.; Hazegh-Azam, M. Copper Biochemistry and Molecular Biology. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1996, pp 797S-811S.
- (12) Turnlund, J. R.; Keyes, W. R.; Anderson, H. L.; Acord, L. L. Copper Absorption and Retention in Young Men at Three Levels of Dietary Copper by Use of the Stable Isotope <sup>65</sup>Cu. *Am. J. Clin. Nutr.* **1989**, *49* (5), 870–878. <https://doi.org/10.1093/ajcn/49.5.870>.
- (13) Ledoux, D. R.; Pott, E. B.; Henry, P. R.; Ammerman, C. B.; Merritt, A. M.; Madison, J. B. Estimation of the Relative Bioavailability of Inorganic Copper Sources for Sheep. *Nutr. Res.* **1995**, *15* (12), 1803–1813. [https://doi.org/10.1016/0271-5317\(95\)02049-7](https://doi.org/10.1016/0271-5317(95)02049-7).
- (14) Gollan, J. L. Studies on the Nature of Complexes Formed by Copper with Human Alimentary Secretions and Their Influence on Copper Absorption in the Rat. *Clin. Sci. Mol. Med.* **1975**. <https://doi.org/10.1042/cs0490237>.
- (15) Lee, J.; Peña, M. M. O.; Nose, Y.; Thiele, D. J. Biochemical Characterization of the Human Copper Transporter Ctr1. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (6), 4380–4387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104728200>.
- (16) Nose, Y.; Kim, B. E.; Thiele, D. J. Ctr1 Drives Intestinal Copper Absorption and Is Essential for Growth, Iron Metabolism, and Neonatal Cardiac Function. *Cell Metab.* **2006**, *4* (3), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.08.009>.
- (17) Kuo, Y.-M.; Gybina, A. A.; Pyatskowitz, J. W.; Gitschier, J.; Prohaska, J. R. Copper Transport Protein (Ctr1) Levels in Mice Are Tissue Specific and Dependent on Copper Status. *J. Nutr.* **2006**, *136* (1), 21–26. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.21>.

- (18) Han, O.; Wessling-Resnick, M. Copper Repletion Enhances Apical Iron Uptake and Transepithelial Iron Transport by Caco-2 Cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **2002**, 527–533. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00414.2001>.
- (19) Nyasae, L.; Bustos, R.; Braiterman, L.; Eipper, B.; Hubbard, A. Dynamics of Endogenous ATP7A (Menkes Protein) in Intestinal Epithelial Cells: Copper-Dependent Redistribution between Two Intracellular Sites. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **2007**, 292 (4), 1181–1194. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00472.2006>.
- (20) Linder, M. C.; Wooten, L.; Cerveza, P.; Cotton, S.; Shulze, R.; Lomeli, N. Copper Transport. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, 965–671.
- (21) BRESLOW, E. COMPARISON OF CUPRIC ION-BINDING SITES IN MYOGLOBIN DERIVATIVES AND. *J. Biol. Chem.* **1964**, No. 239, 3252.
- (22) Gryzunov, Y. A.; Arroyo, A.; Vigne, J. L.; Zhao, Q.; Tyurin, V. A.; Hubel, C. A.; Gandley, R. E.; Vladimirov, Y. A.; Taylor, R. N.; Kagan, V. E. Binding of Fatty Acids Facilitates Oxidation of Cysteine-34 and Converts Copper-Albumin Complexes from Antioxidants to Prooxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 413 (1), 53–66. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00091-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00091-2).
- (23) Wilson's Disease. (Major Problems in Internal Medicine, Volume 23): By I. H. Scheinberg and I. Sternlieb. 171 Pp. WB Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1984. *Gastroenterology* **1984**, 87 (6), 1403. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:001650858490221X>.
- (24) Løvstad, R. A. A Kinetic Study on the Distribution of Cu(II)-Ions between Albumin and Transferrin. *BioMetals* **2004**, 17 (2), 111–113. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000018362.37471.0b>.
- (25) Octavio Alda, J.; Garay, R. Chloride (or Bicarbonate)-Dependent Copper Uptake through the Anion Exchanger in Human Red Blood Cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **1990**, 259 (4 28-4), 570–576. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.259.4.c570>.
- (26) Bogdanova, A. Y.; Virkki, L. V.; Gusev, G. P.; Nikinmaa, M. Copper Effects on Ion Transport across Lamprey Erythrocyte Membrane: Cl<sup>-</sup>/OH<sup>-</sup> Exchange Induced by Cuprous Ions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, 159 (3), 204–213. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8736>.
- (27) van den Berg, G. J.; McArdle, H. J. A Plasma Membrane NADH Oxidase Is Involved in Copper Uptake by Plasma Membrane Vesicles Isolated from Rat Liver. *BBA - Biomembr.* **1994**, 1195 (2), 276–280. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90267-4).
- (28) Bingham, M. J.; McArdle, H. J. A Comparison of Copper Uptake by Liver Plasma Membrane Vesicles and Uptake by Isolated Cultured Rat Hepatocytes. *Hepatology* **1994**, 20 (4), 1024–1031. <https://doi.org/10.1002/hep.1840200435>.
- (29) Petris, M. J. The SLC31 (Ctr) Copper Transporter Family. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. Springer February 24, 2004, pp 752–755. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1092-1>.
- (30) Rees, E. M.; Thiele, D. J. Identification of a Vacuole-Associated Metalloreductase and Its Role in Ctr2-Mediated Intracellular Copper Mobilization. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (30), 21629–21638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703397200>.
- (31) Xiao, Z.; Loughlin, F.; George, G. N.; Howlett, G. J.; Wedd, A. G. C-Terminal Domain of the Membrane Copper Transporter Ctr1 from *Saccharomyces Cerevisiae* Binds Four Cu(I) Ions as a Cuprous-Thiolate Polynuclear Cluster: Sub-Femtomolar Cu(I) Affinity of Three Proteins Involved in Copper Trafficking. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (10), 3081–3090. <https://doi.org/10.1021/ja0390350>.
- (32) Guo, Y.; Smith, K.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Petris, M. J. Identification of Methionine-Rich Clusters That Regulate Copper-Stimulated Endocytosis of the Human Ctr1 Copper Transporter. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (17), 17428–17433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401493200>.
- (33) Liu, J.; Sitaram, A.; Burd, C. G. Regulation of Copper-Dependent Endocytosis and Vacuolar Degradation of the Yeast Copper Transporter, Ctr1p, by the Rsp5 Ubiquitin Ligase. *Traffic* **2007**, 8 (10), 1375–1384. <https://doi.org/10.1111/j.1600->

- 0854.2007.00616.x.
- (34) Sinani, D.; Adle, D. J.; Kim, H.; Lee, J. Distinct Mechanisms for Ctr1-Mediated Copper and Cisplatin Transport. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (37), 26775–26785. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703973200>.
  - (35) Zhou, B.; Gitschier, J. HCTR1: A Human Gene for Copper Uptake Identified by Complementation in Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94* (14), 7481–7486. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7481>.
  - (36) Van Den Berghe, P. V. E.; Folmer, D. E.; Malingré, H. E. M.; Van Beurden, E.; Klomp, A. E. M.; Van De Sluis, B.; Merks, M.; Berger, R.; Klomp, L. W. J. Human Copper Transporter 2 Is Localized in Late Endosomes and Lysosomes and Facilitates Cellular Copper Uptake. *Biochem. J.* **2007**, *407* (1), 49–59. <https://doi.org/10.1042/BJ20070705>.
  - (37) Banci, L.; Bertini, I.; Cantini, F.; Chasapis, C. T.; Hadjiladis, N.; Rosato, A. A NMR Study of the Interaction of a Three-Domain Construct of ATP7A with Copper(I) and Copper(I)-HAH1: The Interplay of Domains. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (46), 38259–38263. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506219200>.
  - (38) Sturtz Field, L.; Luk, E.; Culotta, V. C. Copper Chaperones: Personal Escorts for Metal Ions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. Springer October 2002, pp 373–379. <https://doi.org/10.1023/A:1021202119942>.
  - (39) Horng, Y. C.; Cobine, P. A.; Maxfield, A. B.; Carr, H. S.; Winge, D. R. Specific Copper Transfer from the Cox17 Metallochaperone to Both Sco1 and Cox11 in the Assembly of Yeast Cytochrome c Oxidase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (34), 35334–35340. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404747200>.
  - (40) Cobine, P. A.; Pierrel, F.; Winge, D. R. Copper Trafficking to the Mitochondrion and Assembly of Copper Metalloenzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. July 2006, pp 759–772. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.03.002>.
  - (41) Mehta, R.; Templeton, D. M.; O'Brien, P. J. Mitochondrial Involvement in Genetically Determined Transition Metal Toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *163* (1–2), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.05.011>.
  - (42) Schmidt, P. J.; Kunst, C.; Culotta, V. C. Copper Activation of Superoxide Dismutase 1 (SOD1) in Vivo: Role for Protein-Protein Interactions with the Copper Chaperone for SOD1. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (43), 33771–33776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006254200>.
  - (43) Shishido, N.; Nakamura, M.; Nakayama, K.; Takazawa, A.; Ohyama, T. Cu-Metallothioneins (Cu(I)8-MTs) in LEC Rat Livers 13 Weeks after Birth Still Act as Antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *387* (2), 216–222. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2233>.
  - (44) La Fontaine, S.; Mercer, J. F. B. Trafficking of the Copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in Copper Homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. July 15, 2007, pp 149–167. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.04.021>.
  - (45) Yanagimoto, C.; Harada, M.; Kumemura, H.; Koga, H.; Kawaguchi, T.; Terada, K.; Hanada, S.; Taniguchi, E.; Koizumi, Y.; Koyota, S.; Ninomiya, H.; Ueno, T.; Sugiyama, T.; Sata, M. Niemann-Pick C1 Protein Transports Copper to the Secretory Compartment from Late Endosomes Where ATP7B Resides. *Exp. Cell Res.* **2009**, *315* (2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.10.022>.
  - (46) Gao, Z. J.; Yuan, W. D.; Yuan, J. Q.; Yuan, K.; Wang, Y. Downregulation of Hif-2 $\alpha$  Reverse the Chemotherapy Resistance of Lung Adenocarcinoma A549 Cells to Cisplatin. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 1104–1111. <https://doi.org/10.12659/MSM.906107>.
  - (47) Bohlken, A.; Cheung, B. B.; Bell, J. L.; Koach, J.; Smith, S.; Sekyere, E.; Thomas, W.; Norris, M.; Haber, M.; Lovejoy, D. B.; Richardson, D. R.; Marshall, G. M. ATP7A Is a Novel Target of Retinoic Acid Receptor B2 in Neuroblastoma Cells. *Br. J. Cancer* **2009**, *100* (1), 96–105. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604833>.
  - (48) Lim, C. M.; Cater, M. A.; Mercer, J. F. B.; La Fontaine, S. Copper-Dependent Interaction of Glutaredoxin with the N Termini of the Copper-ATPases (ATP7A and

- ATP7B) Defective in Menkes and Wilson Diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *348* (2), 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.067>.
- (49) Bellingham, S. A.; Lahiri, D. K.; Maloney, B.; La Fontaine, S.; Multhaup, G.; Camakaris, J. Copper Depletion Down-Regulates Expression of the Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Precursor Protein Gene. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (19), 20378–20386. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400805200>.
- (50) Meyer, L. A.; Durley, A. P.; Prohaska, J. R.; Harris, Z. L. Copper Transport and Metabolism Are Normal in Aceruloplasminemic Mice. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (39), 36857–36861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105361200>.
- (51) Lee, K. H.; Yun, S. J.; Nam, K. N.; Gho, Y. S.; Lee, E. H. Activation of Microglial Cells by Ceruloplasmin. *Brain Res.* **2007**, *1171* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.07.053>.
- (52) Han, H.; Archibeque, S. L.; Engle, T. E. Characterization and Identification of Hepatic mRNA Related to Copper Metabolism and Homeostasis in Cattle. *Biol. Trace Elem. Res.* **2009**, *129* (1–3), 130–136. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8293-6>.
- (53) Wen, S.; Ai, W.; Alim, Z.; Boehm, U. Embryonic Gonadotropin-Releasing Hormone Signaling Is Necessary for Maturation of the Male Reproductive Axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (37), 16372–16377. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000423107>.
- (54) Hardman, B.; Manuelpillai, U.; Wallace, E. M.; van de Waasenburg, S.; Cater, M.; Mercer, J. F. B.; Ackland, M. L. Expression and Localization of Menkes and Wilson Copper Transporting ATPases in Human Placenta. *Placenta* **2004**, *25* (6), 512–517. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2003.11.013>.
- (55) Llanos, R. M.; Michalczyk, A. A.; Freestone, D. J.; Currie, S.; Linder, M. C.; Ackland, M. L.; Mercer, J. F. B. Copper Transport during Lactation in Transgenic Mice Expressing the Human ATP7A Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *372* (4), 613–617. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.123>.
- (56) Richardson, D. R.; Suryo Rahmanto, Y. Differential Regulation of the Menkes and Wilson Disease Copper Transporters by Hormones: An Integrated Model of Metal Transport in the Placenta. *The Biochemical journal*. Portland Press March 1, 2007, p 402. <https://doi.org/10.1042/BJ20061844>.
- (57) Hardman, B.; Manuelpillai, U.; Wallace, E. M.; Monty, J. F.; Kramer, D. R.; Kuo, Y. M.; Mercer, J. F. B.; Ackland, M. L. Expression, Localisation and Hormone Regulation of the Human Copper Transporter HCTR1 in Placenta and Choriocarcinoma Jeg-3 Cells. *Placenta* **2006**, *27* (9–10), 968–977. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.10.011>.
- (58) Linz, R.; Barnes, N. L.; Zimnicka, A. M.; Kaplan, J. H.; Eipper, B.; Lutsenko, S. Intracellular Targeting of Copper-Transporting ATPase ATP7A in a Normal and *Atp7b*-/- Kidney. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **2008**, *294* (1), F53-61. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00314.2007>.
- (59) Moore, S. D. P.; Cox, D. W. Expression in Mouse Kidney of Membrane Copper Transporters *Atp7a* and *Atp7b*. *Nephron* **2002**, *92* (3), 629–634. <https://doi.org/10.1159/000064075>.
- (60) Barnes, N.; Tsivkovskii, R.; Tsivkovskaia, N.; Lutsenko, S. The Copper-Transporting ATPases, Menkes and Wilson Disease Proteins, Have Distinct Roles in Adult and Developing Cerebellum. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (10), 9640–9645. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413840200>.
- (61) L Rossi 1, R Squitti, L Calabrese, G Rotilio, P. M. R. Alteration of Peripheral Markers of Copper Homeostasis in Alzheimer's Disease Patients: Implications in Aetiology and Therapy - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17657362/> (accessed Jun 9, 2020).
- (62) West, A. K.; Hidalgo, J.; Eddins, D.; Levin, E. D.; Aschner, M. Metallothionein in the Central Nervous System: Roles in Protection, Regeneration and Cognition. *NeuroToxicology*. Elsevier 2008, pp 489–503. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.12.006>.
- (63) Kodama, H.; Fujisawa, C. Copper Metabolism and Inherited Copper Transport

- Disorders: Molecular Mechanisms, Screening, and Treatment. *Metallomics*. The Royal Society of Chemistry January 1, 2009, pp 42–52. <https://doi.org/10.1039/b816011m>.
- (64) Li, J.; Ji, C.; Chen, J.; Yang, Z.; Wang, Y.; Fei, X.; Zheng, M.; Gu, X.; Wen, G.; Xie, Y.; Mao, Y. Identification and Characterization of a Novel Cut Family CDNA That Encodes Human Copper Transporter Protein CutC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *337* (1), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.029>.
- (65) Crisponi, G.; Nurchi, V. M.; Fanni, D.; Gerosa, C.; Nemolato, S.; Faa, G. Copper-Related Diseases: From Chemistry to Molecular Pathology. *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier April 1, 2010, pp 876–889. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.018>.
- (66) Manzl, C.; Enrich, J.; Ebner, H.; Dallinger, R.; Krumschnabel, G. Copper-Induced Formation of Reactive Oxygen Species Causes Cell Death and Disruption of Calcium Homeostasis in Trout Hepatocytes. *Toxicology* **2004**, *1* (196), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.11.001>.
- (67) R.R. Crichton. *Biological Inorganic Chemistry. An Introduction*; Elsevier: Amsterdam, 2008.
- (68) Osterberg, R. Therapeutic Uses of Copper-Chelating Agents. *Ciba Found. Symp.* **1980**, 283–299.
- (69) Farinati, F.; Cardin, R.; D’Inca, R.; Naccarato, R.; Sturniolo, G. C. Zinc Treatment Prevents Lipid Peroxidation and Increases Glutathione Availability in Wilson’s Disease. *J. Lab. Clin. Med.* **2003**, *141* (6), 372–377. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(03\)00027-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(03)00027-1).
- (70) Pourahmad, J.; O’Brien, P. J. Contrasting Role of Na<sup>+</sup> Ions in Modulating Cu<sup>2+</sup> or Cd<sup>2+</sup> Induced Hepatocyte Toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *126* (2), 159–169. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00162-9).
- (71) Vane, J. R. The Mode of Action of Aspirin-like Drugs. *Agents and Actions*. Birkhäuser-Verlag June 1978, pp 430–431. <https://doi.org/10.1007/BF01968671>.
- (72) Banti, C. N.; Hadjidakou, S. K. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Metal Complexes and Their Effect at the Cellular Level. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, *2016* (19), 3048–3071. <https://doi.org/10.1002/ejic.201501480>.
- (73) Tramér, D. M. R.; Williams, J. E.; Carroll, D.; Wiffen, P. J.; Moore, R. A.; McQuay, H. J. Comparing Analgesic Efficacy of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs given by Different Routes in Acute and Chronic Pain: A Qualitative Systematic Review. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **1998**, *42* (1), 71–79. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1998.tb05083.x>.
- (74) Brune, K. Spinal Cord Effects of Antipyretic Analgesics. *Drugs* **1994**, *47* (5), 21–27. <https://doi.org/10.2165/00003495-199400475-00005>.
- (75) Brater, D. C.; Harris, C.; Redfern, J. S.; Gertz, B. J. Renal Effects of COX-2-Selective Inhibitors. *American Journal of Nephrology*. *Am J Nephrol* 2001, pp 1–15. <https://doi.org/10.1159/000046212>.
- (76) Weir, M. R.; Sperling, R. S.; Reicin, A.; Gertz, B. J. Selective COX-2 Inhibition and Cardiovascular Effects: A Review of the Rofecoxib Development Program. *Am. Heart J.* **2003**, *146* (4), 591–604. [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(03\)00398-3](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(03)00398-3).
- (77) Mahmud, T.; Scott, D. L.; Bjarnason, I. A Unifying Hypothesis for the Mechanism of NSAID Related Gastrointestinal Toxicity. *Annals of the Rheumatic Diseases*. BMJ Publishing Group 1996, pp 211–213. <https://doi.org/10.1136/ard.55.4.211>.
- (78) D. Layton, E. Heeley, K. Hughes, S. A. W. S. Comparison of the incidence rates of selected gastrointestinal events reported for patients prescribed rofecoxib and meloxicam in general practice in England using prescription-event monitoring data | *Rheumatology* | Oxford Academic <https://academic.oup.com/rheumatology/article/42/5/622/1784499> (accessed Jun 9, 2020).
- (79) Schafer, A. I. Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs on Platelet Function and Systemic Hemostasis. *Journal of Clinical Pharmacology*. Blackwell Publishing Inc. 1995, pp 209–219. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1995.tb04050.x>.



- (80) Manoukian, A. V.; Carson, J. L. Nonsteroidal Anti Inflammatory Drug-Induced Hepatic Disorders. Incidence and Prevention. *Drug Safety*. Springer International Publishing 1996, pp 64–71. <https://doi.org/10.2165/00002018-199615010-00005>.
- (81) Mackenzie, I. R. A.; Munoz, D. G. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use and Alzheimer-Type Pathology in Aging. *Neurology* **1998**, *50* (4), 986–990. <https://doi.org/10.1212/WNL.50.4.986>.
- (82) Smalley, W. E.; DuBois, R. N. Colorectal Cancer and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *39* (C), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60067-8](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60067-8).
- (83) Adams, S. S. The Propionic Acids: A Personal Perspective. *J. Clin. Pharmacol.* **1992**, *32* (4), 317–323. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1992.tb03842.x>.
- (84) Kolhe, P.; Misra, E.; Kannan, R. M.; Kannan, S.; Lieh-Lai, M. Drug Complexation, in Vitro Release and Cellular Entry of Dendrimers and Hyperbranched Polymers. *Int. J. Pharm.* **2003**, *259* (1–2), 143–160. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00225-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00225-4).
- (85) F. Zayed, M.; H. Hassan, M. Synthesis and Biological Evaluation Studies of Novel Quinazolinone Derivatives as Antibacterial and Anti-Inflammatory Agents. *Saudi Pharm. J.* **2014**, *22* (2), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.03.004>.
- (86) Brogden, R. N.; Finder, R. M.; Speight, T. M.; Avery, G. S. Fenoprofen: A Review of Its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Rheumatic Diseases. *Drugs* **1977**, *13* (4), 241–265. <https://doi.org/10.2165/00003495-197713040-00001>.
- (87) Tuset, M.; Martín-Conde, M. . T.; M.<sup>a</sup> Miró, J.; Del Cacho, E.; Alberdi, A.; Codina, C.; Ribas, J. Características de Los Fármacos Antivirales. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* **2003**, *21* (8), 433–458. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(03\)72981-4](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(03)72981-4).
- (88) Agotegaray, M. A.; Dennehy, M.; Boeris, M. A.; Grela, M. A.; Burrow, R. A.; Quinzani, O. V. Therapeutic Properties, SOD and Catecholase Mimetic Activities of Novel Ternary Copper(II) Complexes of the Anti-Inflammatory Drug Fenoprofen with Imidazole and Caffeine. *Polyhedron* **2012**, *34* (1), 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2011.12.005>.
- (89) Greig, S. L.; Garnock-Jones, K. P. Loxoprofen: A Review in Pain and Inflammation. *Clin. Drug Investig.* **2016**, *36* (9), 771–781. <https://doi.org/10.1007/s40261-016-0440-9>.
- (90) Psomas, G. Copper(II) and Zinc(II) Coordination Compounds of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Structural Features and Antioxidant Activity. *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier B.V. June 1, 2020, p 213259. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213259>.
- (91) Addison, A. W.; Rao, T. N.; Reedijk, J.; Van Rijn, J.; Verschoor, G. C. Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Copper(II) Compounds Containing Nitrogen-Sulphur Donor Ligands; the Crystal and Molecular Structure of Aqua[1,7-Bis(N-Methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-Dithiaheptane]Copper(II) Perchlorate. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **1984**, No. 7, 1349–1356. <https://doi.org/10.1039/DT9840001349>.
- (92) Wang, Y. T.; Tang, G. M.; Wan, W. Z.; Wu, Y.; Tian, T. C.; Wang, J. H.; He, C.; Long, X. F.; Wang, J. J.; Ng, S. W. New Homochiral Ferroelectric Supramolecular Networks of Complexes Constructed by Chiral S-Naproxen Ligand. *CrystEngComm* **2012**, *14* (10), 3802–3812. <https://doi.org/10.1039/c2ce25138h>.
- (93) Caglar, S.; Adiguzel, E.; Sariboga, B.; Temel, E.; Buyukgungor, O. Mono and Dinuclear Copper(II) Naproxenato Complexes Containing 3-Picoline and 4-Picoline: Synthesis, Structure, Properties, Catechol Oxidase, and Antimicrobial Activities. *J. Coord. Chem.* **2014**, *67* (4), 670–683. <https://doi.org/10.1080/00958972.2014.891198>.
- (94) Efthimiadou, E. K.; Sanakis, Y.; Katsaros, N.; Karaliota, A.; Psomas, G. Transition Metal Complexes with the Quinolone Antibacterial Agent Pipemidic Acid: Synthesis, Characterization and Biological Activity. *Polyhedron* **2007**, *26* (5), 1148–1158. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2006.10.017>.
- (95) W.I. Madison, Bruker Inc., Apex2, Version 2 User Manual M86-E01078, 2006.
- (96) Palatinus, L.; Chapuis, G. SUPERFLIP - A Computer Program for the Solution of Crystal Structures by Charge Flipping in Arbitrary Dimensions. *J. Appl. Crystallogr.*

- 2007**, 40 (4), 786–790. <https://doi.org/10.1107/S0021889807029238>.
- (97) Betteridge, P. W.; Carruthers, J. R.; Cooper, R. I.; Prout, K.; Watkin, D. J. CRYSTALS Version 12: Software for Guided Crystal Structure Analysis . *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, 36 (6), 1487–1487. <https://doi.org/10.1107/s0021889803021800>.
- (98) McDonald, R. S. Review: Infrared Spectrometry. *Anal. Chem.* **1986**, 58 (9), 1906–1925. <https://doi.org/10.1021/ac00122a003>.
- (99) Hamilton, R. J. *Tarascon Pocket Pharmacopoeia : 2015 Deluxe Lab-Coat Edition*; 2015.
- (100) Κεσίσογλου Δημήτρης, Ψ. Γ. *No Title*; Εκδόσεις ΖΗΤΗ, 2011.
- (101) Perontsis, S.; Geromichalos, G. D.; Pekou, A.; Hatzidimitriou, A. G.; Pantazaki, A.; Fylaktakidou, K. C.; Psomas, G. Structure and Biological Evaluation of Pyridine-2-Carboxamide Copper(II) Complex Resulting from N'-(4-Nitrophenylsulfonyloxy)2-Pyridine-Carboxamidoxime. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, 208, 111085. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111085>.

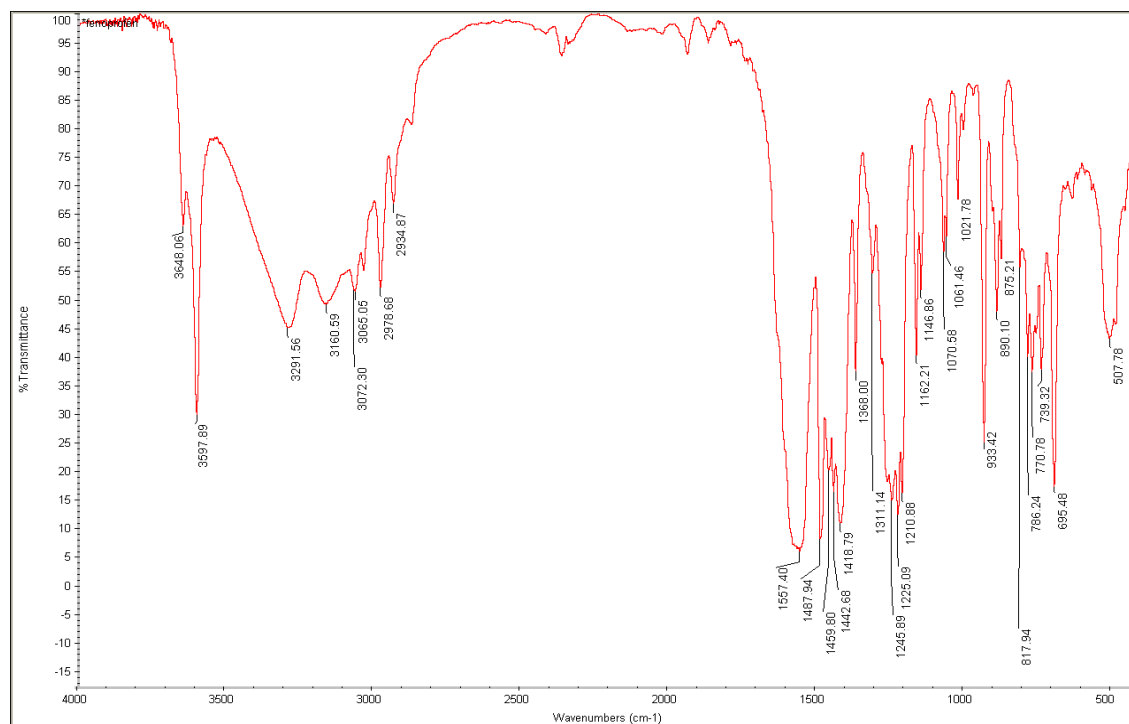
# Παράρτημα

## Συντομογραφίες

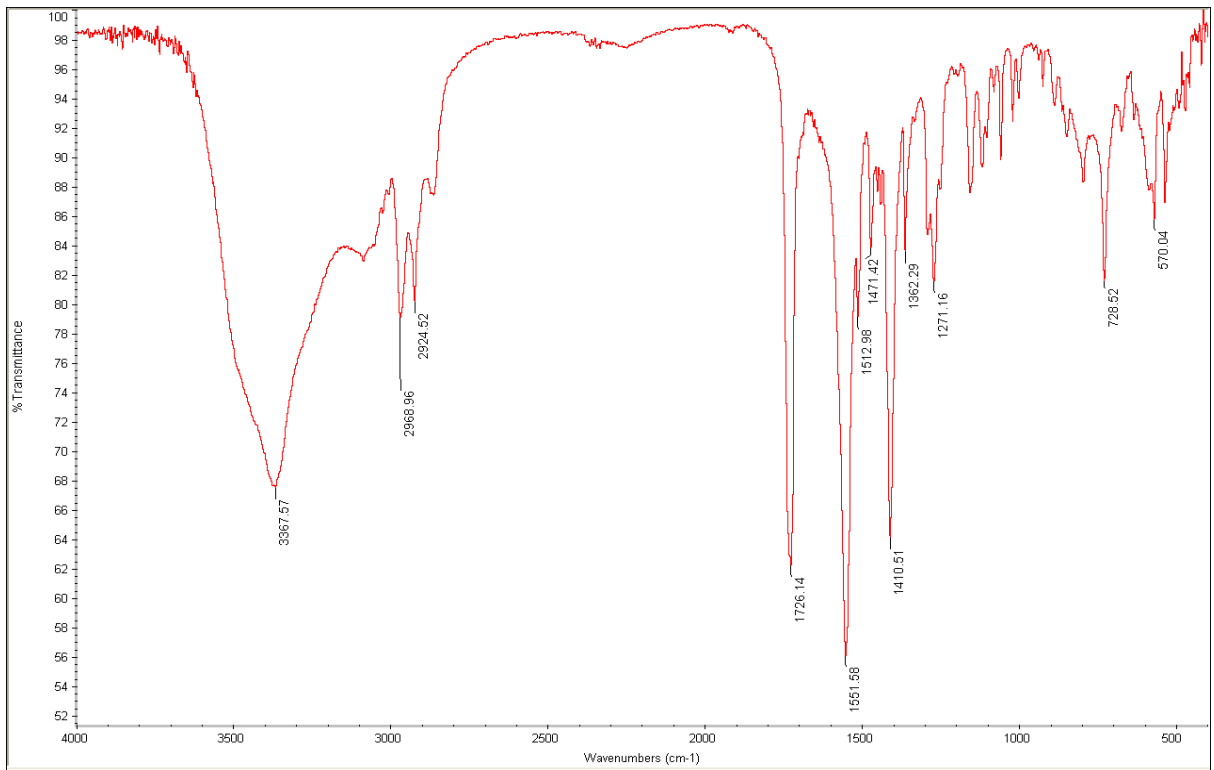
Πίνακας 22: Πίνακας συντομογραφιών

Συντομογραφία	Ολόκληρη ονομασία
Hloxo	Loxoprofen
Hfeno	Fenoprofen
Hclo	Clonixin
Hibu	Ibuprofen
indo	Indometacin
nap	Naproxen
tolf	Tolfenamic acid
fluf	Lufenamic acid
dicl	Diclofenac
nif	Niflumic acid
Hdulf	Diflunisal
DMSO	Dimethyl sulfoxide
MeOH	Methanol
EtOH	Ethanol
DMA	Dimethylacetamide
THF	Tetrahydrofuran
pic	Picoline
py	Pyridine
neoc	Neocupreine
DMF	Dimethylformamide

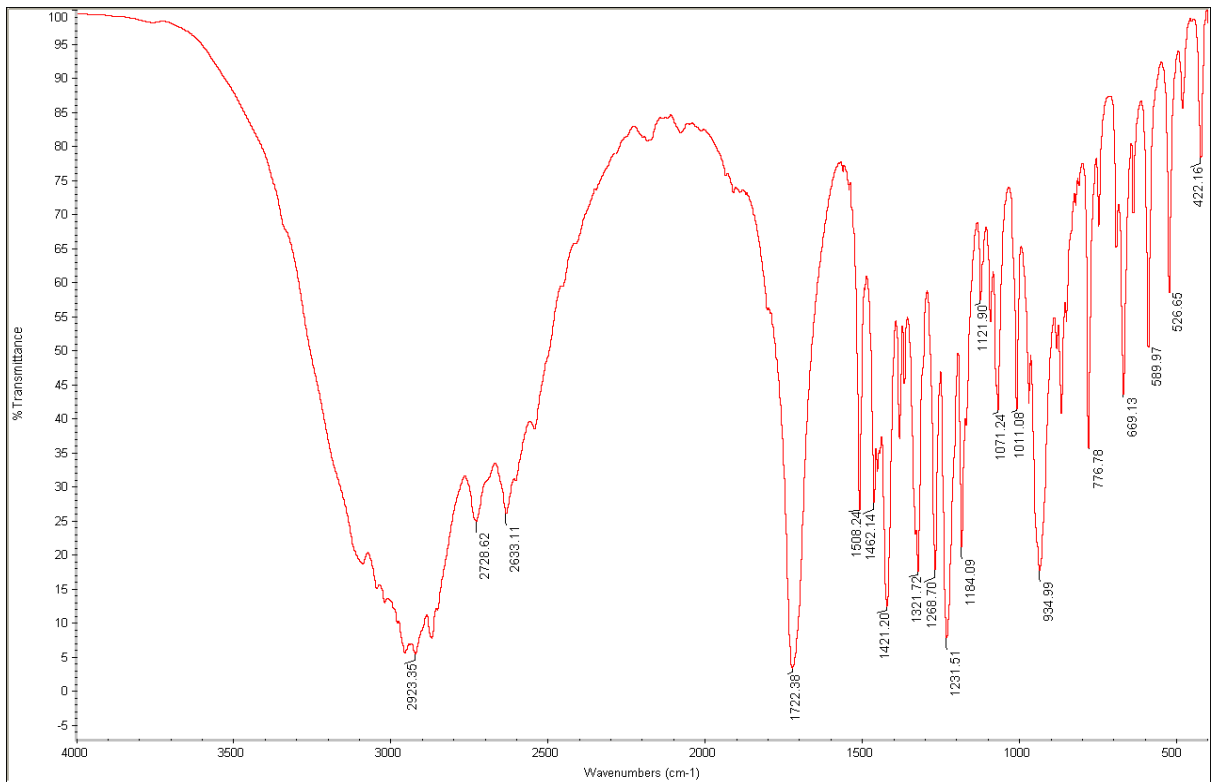
## Φάσματα IR – Ligands



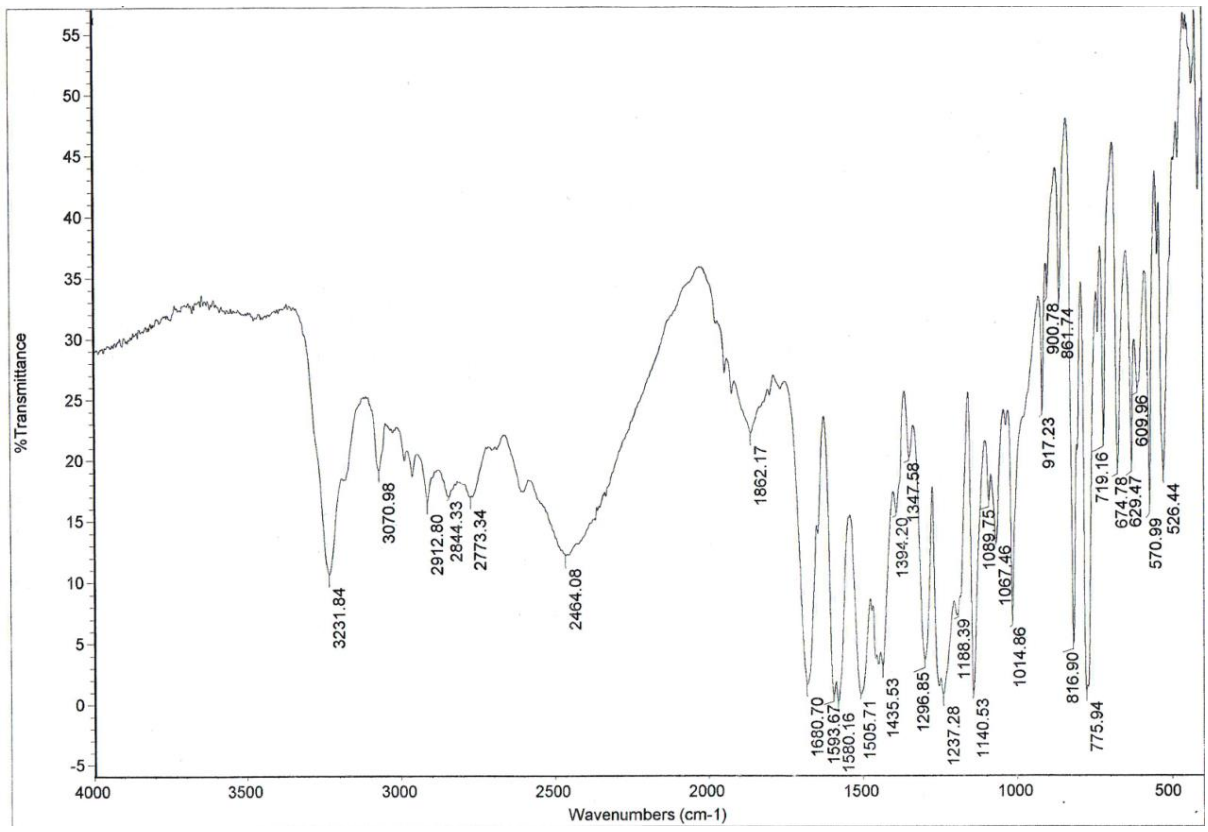
Εικόνα 48: Φάσμα IR του Ca(feno)<sub>2</sub>



Εικόνα 49: Φάσμα IR του Naloxo



Εικόνα 50: Φάσμα IR του Hibu



Εικόνα 51: Φάσμα IR του HClO

## Κρυσταλλογραφικά δεδομένα

Πίνακας 23: Κρυσταλλογραφικά δεδομένα ένωσης  $[\text{Cu}_2(\text{feno})_4(\text{DMF})_2]$  (II)

<b>Crystal data</b>	
Chemical formula	$\text{C}_{66}\text{H}_{66}\text{Cu}_2\text{N}_2\text{O}_{14}$
$M_r$	1238.35
Crystal system, space group	Triclinic, $P-1$
Temperature (K)	295
$a, b, c$ (Å)	10.7817 (6), 11.0680 (7), 14.699 (1)
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	83.148 (3), 71.133 (3), 66.967 (3)
$V$ (Å <sup>3</sup> )	1527.44 (17)
$Z$	1
Radiation type	Mo $K\alpha$
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.76
Crystal size (mm)	0.22 × 0.21 × 0.16
<b>Data collection</b>	
Diffractometer	Bruker Kappa Apex2
Absorption correction	Numerical Analytical Absorption (De Meulenaer & Tompa, 1965)
$T_{\min}, T_{\max}$	0.85, 0.89
No. of measured, independent	27439, 5869, 4188
and observed [ $I > 2.0\sigma(I)$ ] reflections	
$R_{\text{int}}$	0.015
$(\sin \theta/\lambda)_{\text{max}}$ (Å <sup>-1</sup> )	0.615
<b>Refinement</b>	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.032, 0.064, 1.00
No. of reflections	4188
No. of parameters	379
H-atom treatment	H-atom parameters constrained
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å <sup>-3</sup> )	0.47, -0.25

Πίνακας 24: Κρυσταλλογραφικά δεδομένα ένωσης [Cu(ibu)<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)] (IV)

<b>Crystal data</b>	
Chemical formula	C <sub>36</sub> H <sub>46</sub> CuN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<i>M<sub>r</sub></i>	650.32
Crystal system, space group	Triclinic, <i>P</i> -1
Temperature (K)	295
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	8.7794 (4), 11.6142 (6), 18.2906 (10)
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	83.614 (3), 76.680 (3), 77.267 (3)
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	1766.62 (16)
<i>Z</i>	2
Radiation type	Mo <i>K</i> $\alpha$
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.66
Crystal size (mm)	0.28 × 0.27 × 0.18
<b>Data collection</b>	
Diffractometer	Bruker Kappa Apex2
Absorption correction	Numerical Analytical Absorption (De Meulenaer & Tompa, 1965)
<i>T<sub>min</sub></i> , <i>T<sub>max</sub></i>	0.84, 0.89
No. of measured, independent and observed [ <i>I</i> > 2.0 $\sigma$ ( <i>I</i> )] reflections	39310, 6749, 4954
<i>R<sub>int</sub></i>	0.061
( $\sin \theta/\lambda$ ) <sub>max</sub> (Å <sup>-1</sup> )	0.616
<b>Refinement</b>	
<i>R</i> [ <i>F</i> <sup>2</sup> > 2 $\sigma$ ( <i>F</i> <sup>2</sup> )], <i>wR</i> ( <i>F</i> <sup>2</sup> ), <i>S</i>	0.047, 0.075, 1.00
No. of reflections	4954
No. of parameters	397
No. of restraints	9
H-atom treatment	H-atom parameters constrained
$\Delta\rho_{\max}$ , $\Delta\rho_{\min}$ (e Å <sup>-3</sup> )	0.45, -0.43

Πίνακας 25: Κρυσταλλογραφικά δεδομένα ένωσης  $[Cu(clon)_2(Himi)_2(EtOH)_2]$  (V)

<b>Crystal data</b>	
Chemical formula	$C_{36}H_{40}Cl_2CuN_8O_6$
$M_r$	815.21
Crystal system, space group	Triclinic, <i>P</i> -1
Temperature (K)	295
$a, b, c$ (Å)	7.686 (4), 11.390 (8), 11.776 (9)
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	76.17 (4), 88.92 (3), 71.90 (3)
$V$ (Å <sup>3</sup> )	949.8 (11)
$Z$	1
Radiation type	Mo $K\alpha$
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.77
Crystal size (mm)	0.25 × 0.25 × 0.21
<b>Data collection</b>	
Diffractometer	Bruker Kappa Apex2
Absorption correction	Numerical Analytical Absorption (De Meulenaer & Tompa, 1965)
$T_{min}, T_{max}$	0.82, 0.85
No. of measured, independent and observed [ $I > 2.0\sigma(I)$ ] reflections	16901, 3615, 3088
$R_{int}$	0.027
$(\sin \theta/\lambda)_{max}$ (Å <sup>-1</sup> )	0.615
<b>Refinement</b>	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.037, 0.071, 1.00
No. of reflections	3088
No. of parameters	241
H-atom treatment	H-atom parameters constrained
$\Delta\rho_{max}, \Delta\rho_{min}$ (e Å <sup>-3</sup> )	0.39, -0.30



Πίνακας 26: Κρυσταλλογραφικά δεδομένα ένωσης [Cu(ibu)<sub>2</sub>(neoc)(H<sub>2</sub>O)] (VII)

<b>Crystal data</b>	
Chemical formula	C <sub>40</sub> H <sub>46</sub> CuN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
$M_r$	698.36
Crystal system, space group	Triclinic, <i>P</i> -1
Temperature (K)	295
$a, b, c$ (Å)	10.3365 (6), 12.8412 (6), 15.3978 (8)
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	113.075 (3), 90.900 (3), 93.3745 (19)
$V$ (Å <sup>3</sup> )	1875.35 (17)
$Z$	2
Radiation type	Mo $K\alpha$
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.63
Crystal size (mm)	0.25 × 0.22 × 0.12
<b>Data collection</b>	
Diffractometer	Bruker Kappa Apex2
Absorption correction	Numerical Analytical Absorption (De Meulenaer & Tompa, 1965)
$T_{\min}, T_{\max}$	0.87, 0.93
No. of measured, independent and observed [ $I > 2.0\sigma(I)$ ] reflections	44979, 7385, 5242
$R_{\text{int}}$	0.042
$(\sin \theta/\lambda)_{\text{max}}$ (Å <sup>-1</sup> )	0.618
<b>Refinement</b>	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.058, 0.139, 1.00
No. of reflections	5242
No. of parameters	428
No. of restraints	16
H-atom treatment	H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å <sup>-3</sup> )	0.47, -0.48