



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Σύνθεση Συμπλόκων Στοιχείων Μετάπτωσης με
Βιολογικής Σημασίας Μόρια. Μελέτη της
Αντικαρκινικής και Αντιδιαβητικής τους Δράσης.**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΓΑΛΑΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σύνθεση Συμπλόκων Στοιχείων Μετάπτωσης με Βιολογικής Σημασίας Μόρια. Μελέτη της Αντικαρκινικής και Αντιδιαβητικής τους Δράσης.

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΓΑΛΑΝΗ

A.M.: 263/102710

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΛΥΜΠΕΡΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΡΑΛΙΩΤΑ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΚΑΡΑΛΙΩΤΑ

ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΣΤΑΜΠΑΚΗ ΧΑΤΖΗΠΑΝΑΓΙΩΤΗ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΜΟΥΤΣΑΤΣΟΥ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΧΡΙΣΤΙΑΝΑ ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΥ

Καθηγήτρια

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΜΟΥΤΣΑΤΣΟΥ

Καθηγήτρια

ΣΠΥΡΟΣ ΠΕΡΛΕΠΕΣ

Καθηγητής

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΕΘΕΝΙΤΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΡΔΑΣ

Ερευνητής Α

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΨΥΧΑΡΗΣ

Ερευνητής Α

ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΡΑΠΤΟΠΟΥΛΟΥ

Ερευνητής Α

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 03/03/2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αφορά την μελέτη συμπλόκων ενώσεων του χαλκού, του ψευδαργύρου, του μολυβδαινίου και του βαναδίου με μόρια βιολογικής και φαρμακολογικής σημασίας. Συγκεκριμένα μελετάται η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση συμπλόκων ενώσεων του χαλκού, ψευδαργύρου, μολυβδαινίου και βαναδίου με τους υποκαταστάτες λεβοφλοξασίνη, 1.10-φαινανθρολίνη, 2.2'-διπυριδίνη, καρνιτίνη, μαλονικό οξύ και καφεϊκό οξύ. Οι υποκαταστάτες αυτοί είναι σημαντικοί διότι εμπλέκονται σε βιολογικές διεργασίες και έχουν φαρμακολογικές εφαρμογές. Τα προαναφερθέντα στοιχεία μετάπτωσης, είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο και τα φυτά, συμμετέχοντας σε πολλές βιολογικές δράσεις.

Οι κινολόνες είναι μια κατηγορία συνθετικών φαρμάκων, τα οποία είναι παράγωγα της 4-κινολόνης, και είναι γνωστά για την αντιβακτηριακή τους δράση κυρίως λόγω της παρεμπόδισης σχηματισμού του δεοξυριβονουκλεικού οξέος. Στο πλαίσιο αυτό αναφέρεται η σύνθεση, η μελέτη και ο χαρακτηρισμός με στοιχειακή ανάλυση και διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους (IR, UV-Vis, EPR, NMR, TGA) των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης. Παρασκευάστηκαν σύμπλοκες ενώσεις της τρίτης γενεάς φθοροκινολόνης, λεβοφλοξασίνης, παρουσία και μη υποκαταστατών δοτών ετεροκυκλικών ατόμων αζώτου όπως 2.2-διπυριδίνης και 1.10-φαινανθρολίνης. Σε ορισμένα από αυτά πραγματοποιήθηκε η επίλυση της δομής με περίθλαση ακτίνων Χ. Μελετήθηκε περαιτέρω ο τρόπος αλληλεπίδρασης των συμπλόκων αυτών με DNA καθώς και η δράση τους έναντι τριών διαφορετικών μικροοργανισμών, των *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* και *Staphylococcus Aureus*. Πραγματοποιήθηκε επίσης προσδιορισμός της κυτταροτοξικής τους δράσης έναντι της κυτταρικής σειράς, MCF-7. Περαιτέρω στα σύμπλοκα της λεβοφλοξασίνης με τον ψευδάργυρο πραγματοποιήθηκαν πειράματα μικροσκοπικής φθορισμομετρίας (confocal fluorescent).

Η καρνιτίνη, είναι ένα μόριο που εμπλέκεται σε βιολογικές οξειδώσεις. Επιπλέον είναι γνωστή για την αντικαρκινική και αντιδιαβητική της δράση όπως και τα μόρια μαλονικό και καφεϊκό οξύ. Στο πλαίσιο αυτό αναφέρεται η σύνθεση, η μελέτη και ο χαρακτηρισμός με στοιχειακή ανάλυση και διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους (IR, UV-Vis, NMR, TGA) συμπλόκων ενώσεων των προαναφερθέντων υποκαταστατών. Σε ορισμένα από αυτά πραγματοποιήθηκε επίλυση της κρυσταλλικής δομής με περίθλαση ακτίνων Χ. Περαιτέρω πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της αντικαρκινικής και εν μέρει της αντιδιαβητικής τους δράσης *in vitro* και *in vivo*. Στα σύμπλοκα της καρνιτίνης πραγματοποιήθηκαν επίσης πειράματα μικροσκοπικής φθορισμομετρίας (confocal fluorescent).

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Σύμπλοκες ενώσεις της λεβοφλοξασίνης, καρνιτίνης, του μαλονικού και του καφεϊκού οξέος με τα μεταλλικά ιόντα χαλκού, ψευδαργύρου, μολυβδαινίου και βαναδίου.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: λεβοφλοξασίνη, 1.10-φαινανθρολίνη, 2.2'-διπυριδίνη, αντιμικροβιακή δράση, αντικαρκινική δράση, καρνιτίνη, αντιδιαβητική δράση, μαλονικό οξύ, καφεϊκό οξύ, DNA, MIC, κυτταροτοξικότητα, φαινανθρολίνη, διπυριδίνη, μικροσκοπία φθορισμού.

ABSTRACT

The subject of the present doctoral thesis concerns the study of some transition metals with chelating agents that are of biological and pharmacological interest. Particularly, the reaction of copper, zinc, molybdenum and vanadium with the ligands levofloxacin, 1.10 phenanthroline, 2.2'-bipyridine, carnitine, malonic acid and caffeic acid is investigated. These ligands are very important because of their therapeutic applications. In addition the aforementioned transition metals are essential nutrients for humans and plants participating in many biological functions.

Quinolones are a class of synthetic drugs which are derivatives of the 4-quinolone, and are known for their antibacterial activity mainly due to the inhibition of formation of deoxyribonucleic acid. In this context is referred, the study and characterization by elemental analysis and various spectroscopic methods (IR, UV-Vis, EPR, NMR, TGA) of complexes of levofloxacin. Complexes of the third generation fluoroquinolone, levofloxacin, were prepared in the presence and absence of heterocyclic substituents donor nitrogen atoms such as 2.2'-bipyridine and 1.10-phenanthroline. In some of them analysis of their structure by X-ray diffraction, was followed. Furthermore it was studied the interaction of these complexes with DNA and the antibacterial activity against three different microorganisms, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*. In addition their cytotoxic activity was evaluated against MCF-7 cell line. Furthermore, experiments of confocal fluorescent were performed for the zinc complexes of levofloxacin.

Carnitine is a molecule involved in biological oxidations. Furthermore, it is known for its anticancer and antidiabetic activity like malonate and caffeic acid molecules. In this context, the synthesis, study and characterization by elemental analysis and various spectroscopic methods (IR, UV-Vis, NMR, TGA) of complexes of the above ligands is referred. In some of them crystal structure analysis was performed, by X-ray diffraction while determination of their anticancer and antidiabetic activity was performed. Furthermore, experiments of confocal fluorescent were performed for the complexes of carnitine.

SUBJECT AREA: Complexes of levofloxacin, carnitine, malonic acid and caffeic acid

KEYWORDS: levofloxacin, 1.10-phenanthroline, 2.2'-bipyridine, antimicrobial activity, anticancer activity, carnitine, antidiabetic activity, malonic acid, caffeic acid, DNA, MIC, cytotoxicity, phenanthroline, bipyridine, confocal fluorescent.

Στην οικογένεια μου,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο 2008-2013, στο Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στον Τομέα της Ανόργανης Χημείας και Τεχνολογίας. Η ανάθεση του θέματος έγινε από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Αλεξάνδρα Λυμπεροπούλου Καραλίωτα την οποία και ευχαριστώ για την επίβλεψη, την συνεχή καθοδήγηση και την βοήθεια στην συγγραφή της παρούσης διατριβής.

Τα υπόλοιπα δύο μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Αναπλ. Καθηγήτρια κ. Δέσποινα Σταμπάκη-Χατζηπαναγιώτη και Καθηγήτρια κ. Αγγελική Μουτσάτσου, οι οποίες με βοήθησαν σημαντικά και με μεγάλη προθυμία όποτε τους το ζήτησα.

Τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής, που διέθεσαν τον πολύτιμο χρόνο τους για την εξέταση της διατριβής μου.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την φίλη και μεταδιδάκτορα Ελένη Ευθυμιάδου, για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγησή και αμέριστη συμπαράστασή της καθ'όλη την διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Όλους τους Καθηγητές και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Τομέα μου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Βασίλη Τσιτσία με τον οποίο και συνεργαστήκαμε άφογα υπό την επίβλεψη της κ. Καραλίωτα.

Ευχαριστίες επίσης οφείλω στους κρυσταλλογράφους κ. Α. Τερζή, κ. Κ. Ραπτοπούλου, κ. Β. Ψυχάρη για την ανάλυση των κρυσταλλικών δομών. Την Καθηγήτρια κ. Α. Μουτσάτσου από το τμήμα Χημικών Μηχανικών του Πολυτεχνείου για την λήψη ορισμένων φασμάτων TGA. Τους Γ. Μήτρικα και Γ. Σανάκη για την λήψη των φασμάτων EPR. Ευχαριστώ επίσης τους συναδέλφους: Ελένη Ευθυμιάδου, τον Δημήτρη Στέλλα, την Σέβη Καραλίωτα και τον Θεοδόση Θεοδοσίου για την συνεργασία μας στα πειράματα αντικαρκινικής και αντιδιαβητικής δράσης.

Τον αγαπημένο μου σύζυγο Βασίλη για την ατελείωτη υπομονή και συμπαράστασή του έως τώρα, τους γονείς μου Γιώργο και Μαρία και τον αδερφό μου Χρήστο, στους οποίους οφείλω τα πάντα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	29
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	30
1.1 Κατάταξη κινολονών	30
1.2 Μηχανισμός δράσης κινολονών	32
1.3 Μηχανισμοί ανάπτυξης αντίστασης	35
1.4 Λεβοφλοξασίνη.....	36
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΘΟΡΟΚΙΝΟΛΟΝΩΝ ΜΕ DNA.....	39
2.1 Εισαγωγή-DNA.....	39
2.2 Παρεμβολή	39
2.3 Δέσμευση στις αύλακες	41
2.4 Αλληλεπίδραση μετάλλων με το DNA.....	42
2.5 Μορφές του DNA A, B και Z	44
2.6 Μετουσίωση του DNA.....	46
2.7 Απόπτωση-Κυτταρικός Θάνατος	48
2.8 Προκαρυωτικοί και ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί.....	50
2.9 Ανάπτυξη των βακτηρίων	51
2.10 Καμπύλη ανάπτυξης.....	52
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ.....	55
3.1 Εισαγωγή.....	55
3.2 Η δράση του χαλκού στα βιολογικά συστήματα.....	55
3.3 Θεραπευτική δράση των συμπλόκων του χαλκού έναντι του έλκους και των πληγών.....	56
3.4 Αντιεπιληπτική δράση των συμπλόκων του χαλκού	56

3.5 Προστασία και αποκατάσταση από την ακτινοβολία των συμπλόκων του χαλκού	57
3.6 Καρδιακές παθήσεις και σύμπλοκα του χαλκού	58
3.7 Αντικαρκινική δράση των συμπλόκων του χαλκού	58
3.8 Αντιβακτηριακή-Αντιμικροβιακή δράση των συμπλόκων του χαλκού	59
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ.....	60
4.1 Ο ψευδάργυρος-Εισαγωγή.....	60
4.2 Ο ψευδάργυρος στα βιολογικά συστήματα.....	61
4.3 Ψευδάργυρος και διαβήτης.....	62
4.4 Ψευδάργυρος και κινολόνες	63
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	65
5.1 Αντιδραστήρια-Πρώτες ύλες.....	65
5.2 Μικροσυσκευές.....	65
5.3 Πειραματικές μέθοδοι χαρακτηρισμού δομής.....	65
5.4 Καλλιέργειες Κυττάρων.....	66
5.5 Διερεύνηση της επιβίωσης των κυττάρων	68
5.6 Μελέτη της αντιδιαβητικής δράσης της καρνιτίνης και των συμπλόκων της in vivo.....	70
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΗΣ ΛΕΒΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗΣ ΜΕ ΧΑΛΚΟ-ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ-ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ DNA ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	71
6.1 Σύνθεση απλών και μικτών συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με χαλκό.....	71
6.2 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με χαλκό	72
6.2.1 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	72

6.2.2	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων με ηλεκτρονική φασματοσκοπία (UV-Vis)	74
6.2.3	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων με φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού EPR.....	75
6.2.4	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων με θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)	78
6.2.5	Προσδιορισμός της δομής των συμπλόκων του χαλκού με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ	79
6.2.5.1	Περιγραφή της δομής του συμπλόκου 1	79
6.2.5.2	Περιγραφή της δομής του συμπλόκου 2	83
6.3	Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των συμπλόκων του χαλκού με την λεβοφλοξασίνη	88
6.4	Μελέτη της αλληλεπίδρασης με DNA	90
6.4.1	Μελέτη της αλληλεπίδρασης του DNA μέσω μελέτης κινιτικής και προσδιορισμού της σταθεράς σταθερότητας των συμπλόκων του χαλκού	91
6.4.2	Μελέτη της μεταβολής του σημείου τήξεως (Tm)	92
6.4.3	Μελέτη της σταθερότητας των συμπλόκων του χαλκού με λεβοφλοξασίνη εκτός οργανισμού	93
6.4.4	Αντικαρκινική δράση των συμπλόκων του χαλκού με λεβοφλοξασίνη	94
6.4.4.1	Κυτταροτοξική αξιολόγηση.....	94
6.5	Συμπεράσματα	97
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΥΟ ΜΙΚΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΛΕΒΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗΣ ΜΕ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟ ΜΕ ΕΤΕΡΟΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ ΔΙΠΥΡΙΔΙΝΗ ΚΑΙ ΦΑΙΝΑΝΘΡΟΛΙΝΗ- ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ-ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ DNA ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	98

7.1	Σύνθεση συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδαργυρο.....	98
7.2	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο.....	99
7.2.1	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων με φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR)	99
7.2.2	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο με ηλεκτρονική φασματοσκοπία (UV-Vis)	101
7.2.3	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο με θερμοσταθμική ανάλυση (TGA).....	102
7.2.4	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	103
7.3	Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη.....	108
7.4	Μελέτη της αλληλεπίδρασης των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με τον υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη με DNA.....	109
7.4.1	Μελέτη της αλληλεπίδρασης του DNA μέσω μελέτης της κινητικής και προσδιορισμού της σταθεράς σταθερότητας των συμπλόκων του ψευδαργύρου	110
7.4.2	Μελέτη μεταβολής του σημείου τήξεως.....	112
7.4.3	Μελέτη της σταθερότητας των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη εκτός οργανισμού	113
7.4.4	Αντικαρκινική δράση των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη.....	114

7.4.5	Μελέτη της μικροσκοπίας φθορισμού των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη.....	116
7.5	Προσδιορισμός της δομής του συμπλόκου που απομονώθηκε μετά από ανακρυστάλλωση και των δυο συμπλόκων του ψευδαργύρου με τους ετερουποκαταστάτες φαινανθρολίνη και διπυριδίνη.....	118
7.6	Συμπεράσματα	119
8.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΚΑΡΝΙΤΙΝΗ.....	120
8.1	Εισαγωγή.....	120
8.2	Πηγές L-καρνιτίνης	121
8.3	Η βιοχημεία της L-καρνιτίνης	122
8.4	L-καρνιτίνη και μεταλλικά ιόντα.....	127
9.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ΜΟΛΥΒΔΑΙΝΙΟ.....	132
9.1	Βιολογική δράση του μολυβδαινίου	132
9.2	Σύμπλοκα του μολυβδαινίου	135
10.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 ΒΑΝΑΔΙΟ.....	139
10.1	Ο ρόλος του βαναδίου στα βιολογικά συστήματα	139
10.2	Τοξικότητα του βαναδίου	144
11.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΚΑΡΝΙΤΙΝΗΣ-ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	145
11.1	Σύνθεση συμπλόκων ενώσεων της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο και βαναδιο	145
11.1.1	Σύνθεση του συμπλόκου $[Mo_2O_4(OH)_2(O_2)(Me_3N-CH_2-CH(OH)-CH_2-COO-)](1)$	146
11.1.2	Σύνθεση του ένωσης $[V_{10}O_{28}](Me_3N-CH_2-CH(OH)-CH_2-COOH)_2(Na)_4(H_2O)_{16}$	146
11.2	Αποτελέσματα-συζήτηση.....	146

11.2.1 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων της καρνιτίνης μέσω θερμοσταθμικής ανάλυσης TGA	149
11.2.2 Χαρακτηρισμός του άλατος της καρνιτίνης με βανάδιο με ηλεκτρονική φασματοσκοπία (UV-Vis)	152
11.2.3 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο και του άλατος της καρνιτίνης με βανάδιο με φασματοσκοπία (NMR)	153
11.3 Προσδιορισμός της δομής του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης με κρυσταλλογραφία ακτίνων X $[V_{10}O_{28}](Me_3N-CH_2-CH-(OH)-CH_2-COOH)_2(Na)_4(H_2O)_{16}$	156
11.4 Αντικαρκινική δράση του περόξο συμπλόκου του μολυβδαινίου με την καρνιτίνη και του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης	163
11.5 Μελέτη της αντιδιαβητικής δράσης της καρνιτίνης.....	166
11.6 Συμπεράσματα	169
12. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12 ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ ΜΑΛΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	170
12.1 Μαλονικό οξύ-Εισαγωγή.....	170
12.2 Μαλονικό οξύ,σύνπλοκα με μεταλλικά ιόντα και βιολογική δράση τους	171
13. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΑΛΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ H_2O_2	175
13.1 Σύνθεση.....	175
13.1.1 Σύνθεση του περόξο συμπλόκου $(gu)_4[Mo_4O_{12}(O_2)_2]$	175
13.1.2 Σύνθεση του περόξο συμπλόκου με μαλονικό οξύ που προέκυψε με γουανιδίνη.....	175
13.2 Αποτελέσματα και συζήτηση	176
13.2.1 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων με φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR)	179

13.2.2 Χαρακτηρισμός της συμπλόκου ένωσης 2 που προέκυψε από την επίδραση μαλονικού παρουσία υπεροξειδίου με ηλεκτρονική φασματοσκοπία (UV-Vis)	181
13.2.3 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	181
13.3 Συμπεράσματα	184
14. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΚΑΦΕΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟ.....	185
14.1 Εισαγωγή.....	185
14.2 Βιολογική δράση του καφεϊκού οξέος	186
14.3 Αντιδιαβητική δράση του καφεϊκού οξέος	187
15. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΚΑΦΕΙΚΟ ΟΞΥ	189
15.1 Σύνθεση συμπλόκου του ψευδαργύρου με καφεϊκό οξύ.....	189
15.2 Αποτελέσματα και συζήτηση	190
15.2.1 Χαρακτηρισμός της συμπλόκου ένωσης με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	196
15.2.2 Χαρακτηρισμός της συμπλόκου ένωσης μέσω πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	191
15.2.3 Χαρακτηρισμός της συμπλόκου ένωσης με θερμοσταθμική ανάλυση (TGA).....	193
15.3 Συμπεράσματα	195

4.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	196
5.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	197
6.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	198
7.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	201
8.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	202

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Ο σκελετός της 4-κινολόνης.....	30
Σχήμα 1.2: Δομική εξέλιξη των φθοροκινολονών.....	32
Σχήμα 1.3: Δομή και λειτουργία της DNA γυράσης και της τοποισομεράσης IV.....	33
Σχήμα 2.1: Δομή τυπικών παρεμβολέων, άτυπων παρεμβολέων και μόρια που συνδέονται στην αύλακα	40
Σχήμα 2.2: Η καμπύλη θερμικής τήξης του DNA	48
Σχήμα 2.3: Διαδικασία δυαδικής διάσπασης και δημιουργία κυτταρικού τοιχώματος σε ένα Gram θετικό είδος Streptococcus και σε ένα Gram αρνητικό είδος Salmonella. Οι σκουρόχρωμες περιοχές είναι το παλίο κυτταρικό τοίχωμα και οι ανοιχτόχρωμες το νεοσυντεθέν.....	52
Σχήμα 2.4: Γραφική παράσταση τυπικής μορφής καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών.....	53
Σχήμα 4.1: Δομή του συμπλόκου $[Zn(oxo)(phen)Cl]MeOH$ (πάνω αριστερά), $[Zn(flmaq)_2(phen)]_2 MeOH$ (πάνω δεξιά), $[Zn(flmaq)(phen)Cl]$ (κέντρο)	64
Σχήμα 6.1: EPR φάσμα του συμπλόκου (2) και του συμπλόκου (3) σε μεθανολικό διάλυμα ($T=120K$). Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το πείραμα και με γκρι χρώμα η προσομοίωση. Τα βέλη δηλώνουν την συνεισφορά από τις προσμίξεις των διμερών του Cu(II). Ένθετο: χ χαμηλού πεδίου περιοχή στην οποία φαίνεται η υπέρλεπτη σύζευξη του αζώτου. Πειραματικές συνθήκες: συχνότητα μικροκυμάτων (mν) 9.426Hz, mν ισχύς στην κοιλότητα, 1.74 mw. Διαμόρφωση συχνότητας, 100Khz, διαμόρφωση πλάτους, 0.2mT	76
Σχήμα 6.2: Κάθετο και παράλληλο EPR φάσμα από ένα δείγμα του συμπλόκου 3 σε θερμοκρασία δωματίου.....	77
Σχήμα 6.3: α) Ηλεκτρονικό φάσμα του απλού συμπλόκου του χαλκού με την λεβοφλοξασίνη, β) του μικτού συμπλόκου του χαλκού με	

λεβοφλοξασίνη και φαινανθρολίνη και γ) του μικτού συμπλόκου του χαλκού με λεβοφλοξασίνη και διπυριδίνη.....	90
Σχήμα 6.4: Καμπύλες μεταβολής του σημείου τήξεως των συμπλόκων του χαλκού.....	92
Σχήμα 6.5: Ηλεκτρονικό φάσμα α) του απλού συμπλόκου του χαλκού β) του μικτού συμπλόκου του χαλκού με λεβοφλοξασίνη και ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη γ) του μικτού συμπλόκου του χαλκού με λεβοφλοξασίνη και ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη δ) του υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη σε διάλυμα PBS.....	94
Σχήμα 6.6: % επιβίωση των MCF-7 κυττάρων με τα σύμπλοκα του χαλκού α) λεβοφλοξασίνη (μαύρο χρώμα), β) μικτό σύμπλοκο του χαλκού με φαινανθρολίνη (κόκκινο χρώμα), γ) μικτό σύμπλοκο του χαλκού με διπυριδίνη (μπλε χρώμα) και δ) απλό σύμπλοκο του χαλκού (πράσινο χρώμα).	96
Σχήμα 7.1: Πιθανή δομή των συμπλόκων [Zn(levophenCl)]CH ₃ OH [Zn(levobipyCl)]2CH ₃ OH.....	99
Σχήμα 7.2: Θερμογράφημα των συμπλόκων . [Zn(levophenCl)]CH ₃ OH [Zn(levobipyCl)]2CH ₃ OH.....	103
Σχήμα 7.3: Σχήμα με αρίθμηση του υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη. και των ετερουποκαταστατών φαινανθρολίνη και διπυριδίνη	104
Σχήμα 7.4: ¹ H-NMR . του υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη σε DMSO.....	105
Σχήμα 7.5: ¹ H-NMR του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και διπυριδίνη σε DMSO.....	106
Σχήμα 7.6: ¹ H-NMR του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και φαινανθρολίνη σε DMSO.	106
Σχήμα 7.7: ¹³ C-NMR του υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη σε DMSO	107
Σχήμα 7.8: ¹³ C-NMR του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και διπυριδίνη σε DMSO.....	107
Σχήμα 7.9: ¹³ C-NMR του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και φαινανθρολίνη σε DMSO	108

Σχήμα 7.10: α) Ηλεκτρονικό φάσμα του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη, β) του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη.....	110
Σχήμα 7.11: Καμπύλες μεταβολής του σημείου τήξεως των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου α) με τον ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη σύμπλοκο (2) και β) με τον ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη και γ) του υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη.....	112
Σχήμα 7.12: Ηλεκτρονικό φάσμα α) του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη και με τον ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη, β) του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη και τον ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη και γ) του υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη σε διάλυμα (PBS).....	114
Σχήμα 7.13: Κυτταροτοξικότητα των μικτών συμπλόκων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη στην MCF-7 κυτταρική σειρά και συγκεντρώσεις 50-150μg/ml.....	115
Σχήμα 8.1: Το μόριο της καρνιτίνης.....	120
Σχήμα 8.2: Η βιοσύμθεση της L-καρνιτίνης.....	123
Σχήμα 8.3: Ο βιοχημικός ρόλος της καρνιτίνης στα μιτοχόνδρια CTPI: παλμιτική μεταφοράση της καρνιτίνης I, CTPII: Παλμιτική μεταφοράση της καρνιτίνης II, CAT, ακέτυλο μεταφοράση της καρνιτίνης, CoASH: Συνένζυμο A.....	124
Σχήμα 8.4: Η μοριακή δομή του ακέτυλο -CoA.....	125
Σχήμα 8.5: Φάσμα ESR της χαρακτηριστικής ρίζας DMPO-OH που παράγεται μέσω της αντίδρασης Fenton δισθενούς σιδήρου με H ₂ O ₂ απουσία (α) και παρουσία (β) L-προπιόνυλ καρνιτίνης.....	128
Σχήμα 8.6: Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου [Zn(L-καρνιτίνη) ₂ Cl ₂	129
Σχήμα 8.7: Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου [Cu ₂ (L-καρνιτίνης) ₂ Cl ₂ (H ₂ O) ₂ Cl ₂].....	130

Σχήμα 8.8: Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}_2(\text{L-καρνιτίνη})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4$	131
Σχήμα 9.1: Τα ενεργά κέντρα των μονομεταλλικών ενζύμων του μολυβδαινίου	134
Σχήμα 9.2: Μηχανισμοί για τις υδροξυλάσεις του μολυβδαινίου στις αλδεύδες (πάνω) και στην ξανθίνη (κάτω).....	135
Σχήμα 9.3: Η κρυσταλλική δομή του ανιόντος $[\text{MoO}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2)_2]^{3-}$	136
Σχήμα 9.4: Η κρυσταλλική δομή του τετραμερούς μολυβδαινικού συμπλόκου με κατεχόλη $[\text{Mo}_4\text{O}_{10}(\text{OCH}_3)_2(\text{catechol})_2]^{2-}$	137
Σχήμα 10.1: Σχήμα προτεινόμενων κυτταρικών στόχων των δεκαβαναδικών. Το βανάδιο μπορεί να αλληλεπιδρά με πρωτεϊνικές μεμβράνες. Σχηματισμός δεκαβαναδικών έπειτα από ενδοκυτταρική οξίνιση του βαναδίου στο κυτταρόπλασμα καθώς και σε άλλα όξινα οργανίδια. Αναγωγή των μονομερών βαναδικών από αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Σύνθεση των δεκαβαναδικών σε πρωτεΐνες στόχους. Έχει προταθεί ότι τα δεκαβαναδικά συσσωρεύονται στα κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια και επηρεάζουν την λειτουργία τους.....	141
Σχήμα 10.2: Δομή του δεκαβαναδικού $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}\text{H}_2]^{4-}$	142
Σχήμα 10.3: Δομή του δεκαβαναδικού α) $(\text{H}_2\text{tmen})_3\text{V}_{10}\text{O}_{28}6\text{H}_2\text{O}$ β) $(\text{H}_2\text{en})_3\text{V}_{10}\text{O}_{28}2\text{H}_2\text{O}$	143
Σχήμα 11.1: Η δομή της καρνιτίνης με αριθμημένα τα άτομα άνθρακα.....	145
Σχήμα 11.2: Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου 1	147
Σχήμα 11.3: Το φάσμα IR της καρνιτίνης.....	148
Σχήμα 11.4: Το φάσμα IR του συμπλόκου 1	148
Σχήμα 11.5: Το φάσμα IR του δεκαβαναδικού άλατος με την καρνιτίνη 2	149
Σχήμα 11.6: Διάγραμμα θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA) της καρνιτίνης.....	150
Σχήμα 11.7: Διάγραμμα (TGA) του συμπλόκου του μολυβδαινίου (1).....	150
Σχήμα 11.8: Το φάσμα TGA του άλατος του βαναδίου με την καρνιτίνη (2)	151

Σχήμα 11.9: Το ηλεκτρονικό φάσμα του άλατος του βαναδίου με την καρνιτίνη 2.....	153
Σχήμα 11.10: Αριθμημένος συντακτικός τύπος της καρνιτίνης	154
Σχήμα 11.11: ¹ H-NMR φάσμα της καρνιτίνης σε δευτεριωμένο D ₂ O	155
Σχήμα 11.12: ¹ H-NMR του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης σε δευτεριωμένο D ₂ O	155
Σχήμα 11.13: ¹ H-NMR φάσμα του περόξο συμπλόκου της καρνιτίνης σε δευτεριωμένο DMSO	156
Σχήμα 11.14: Η % επιβίωση ποικίλων καρκινικών σειρών συναρτήση της συγκέντρωσης του δεκαβαναδικού ως IC ₅₀	165
Σχήμα 11.15: Αποτελέσματα αντιδιαβητικής δράσης της καρνιτίνης	167
Σχήμα 12.1: Η αντίδραση σύνθεσης του μαλονικού	170
Σχήμα 12.2: Αποτελέσματα της αντιδιαβητικής δράσης των συμπλόκων 1, 2 και 3	174
Σχήμα 13.1: Κρυσταλλική δομή περόξο συμπλόκου1	176
Σχήμα 13.2: IR φάσμα του μαλονικού.....	179
Σχήμα 13.3: IR φάσμα της καρβοξυλικής γουανιδίνης.....	180
Σχήμα 13.4: IR φάσμα στερεού συμπλόκου του Mo που προέκυψε από την επίδραση μαλονικού σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία H ₂ O ₂	180
Σχήμα 13.5: Το ηλεκτρονικό φάσμα του συμπλόκου του Mo που προέκυψε από την επίδραση μαλονικού σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία υπεροξειδίου	181
Σχήμα 13.6: Το NMR του συμπλόκου του Mo που προέκυψε από την επίδραση μαλονικού σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία H ₂ O ₂	182
Σχήμα 13.7: Προτεινόμενη δομή του στερεού 2.....	182
Σχήμα 14.1: Δομή του καφεϊκού οξέος με τις δυο ανταγωνιστικές θέσεις δέσμησης	185
Σχήμα 14.2: Σύμπλοκα του καφεϊκού οξέος με τα μεταλλικά ιόντα του κοβαλτίου και του χαλκού	186

Σχήμα 14.3: Σύμπλοκο του καφεϊκού οξέος με το μεταλλικό ιόν του μολύβδου και θειοσεμικαρβαζόνη.....	186
Σχήμα 15.1: IR φάσμα του συμπλόκου του ψευδαργύρου με καφεϊκό οξύ.....	190
Σχήμα 15.2: IR φάσμα του καφεϊκού οξέος.....	191
Σχήμα 15.3: $^1\text{H-NMR}$ του καφεϊκού οξέος.....	192
Σχήμα 15.4: $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με ψευδάργυρο.....	192
Σχήμα 15.5: Το θερμογράφημα (TGA) του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με ψευδάργυρο.....	194

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Τρόπος δράσης των φθοροκινολονών στο βακτηριακό DNA.....	34
Εικόνα 2.1: Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η δέσμευση στην μικρή αύλακα του DNA και στην δεξιά ένας παρεμβολέας	42
Εικόνα 2.2: Διαστάσεις της β μορφής του DNA	43
Εικόνα 2.3: Η κανονική δεξιόστροφη διπλή έλικα του DNA γνωστή και ως β μορφή	45
Εικόνα 2.4: Σύγκριση μεταξύ της β και ζ μορφής.....	46
Εικόνα 2.5: Μετουσίωση και επανουσίωση του DNA.....	47
Εικόνα 2.6: Η διπλή έλικα του DNA	47
Εικόνα 2.7: Στην εικόνα αυτή παρουσιάζονται κύτταρα τα οποία έχουν πεθάνει Α) με νέκρωση Β και Γ) με απόπτωση.	49
Εικόνα 2.8: Κυτταρική δομή ενός βακτηρίου.....	50
Εικόνα 2.9: Επισκόπηση των βακτηριακών μολύνσεων	51
Εικόνα 6.1: Αρίθμηση και διευθέτηση των μονάδων χαλκού [Cu(levn)2] του συμπλόκου 1. Levo 1 και Levo 1' υποκαταστάτες που αναφέρονται στο κείμενο αποτελούνται από O(1), O(2), O(3), O(4), N(1), N(2), N(3) και C(1) ...C(18) άτομα αντίστοιχα. Επίσης οι Levo 2 και Levo 2' υποκαταστάτες αποτελούνται από O(21), O(22), O(23), O(24), N(21),N(22), N(23) και C(21)...C(38) άτομα αντίστοιχα. Κώδικες συμμετρίας:('):1-x,-y,z, ("'):1.5-x, 0.5-y, z, (*):0.5+x, 0.5+y, z, (**): -0.5+x, -0.5+y, z. Οι κόκκινες διακεκκομένες γραμμές αναπαριστούν ασθενείς δεσμούς κατιόντων χαλκού Cu(II) με άτομα οξυγόνου τα οποία ανήκουν σε γειτονικούς υποκαταστάτες λεβοφλοξασίνης β) zigzag αλυσίδες του[Cu(levn)2] εκτεταμένες κατά μήκος [110] της κρυσταλλογραφικής διεύθυνσης φαίνονται στον άξονα c	80
Εικόνα 6.2: α) Διευθέτηση των γειτονικών στρωμάτων των zigzag αλυσίδων. β) 3D διευθέτηση των αλυσίδων του συμπλόκου (1).....	83

Εικόνα 6.3: α) Διμερή του [Cu (Levo) (Bipy) Cl] και αρίθμηση των ετεροατόμων β) Διάγραμμα διευθέτησης των διμερών της δομής του 2.....	86
Εικόνα 7.1: Εικόνα φθορισμού της κυτταρικής σειράς MCF-7 έπειτα από κατεργασία με το μικτό σύμπλοκο του ψευδαργύρου με την διπυριδίνη, (σύμπλοκο 1) σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις α) 75 μg/ml β) 150 μg/ml	117
Εικόνα 7.2: Εικόνα φθορισμού της κυτταρικής σειράς MCF-7 έπειτα από κατεργασία με το μικτό σύμπλοκο του ψευδαργύρου με την φαινανθρολίνη, (σύμπλοκο 2) σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις α) 75 μg/ml β) 150 μg/ml	117
Εικόνα 7.3: Η δομή του συμπλόκου που απομονώθηκε μετά από ανακρυστάλλωση των συμπλόκων του ψευδαργύρου.....	118
Εικόνα 10.1: α) Δομή του δεκαβαναδικού με την τριγγολεΐνη και β) Δομή του συμπλόκου V(v)-(Gly-Bet).....	140
Εικόνα 11.1: Δομή με αρίθμηση (α) των ανιόντων [V10O28] ⁶⁻ και των κατιόντων [Na ₄ (H ₂ O) ₁₆] ⁴⁺ (β) Διεργασίες συμμετρίας (')-x, 2-y, -z (")=1-x, 1-y, 1-z	159
Εικόνα 11.2: Ένα μικρό τμήμα της μονοδιάστατης δομής της ένωσης 2	159
Εικόνα 11.3: Αριθμημένη δομή του κατιόντος της καρνιτίνης.....	159
Εικόνα 11.4: Τμήμα της τρισδιάστατης δομής του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης	160
Εικόνα 11.5: Κύτταρα του μελανώματος (α) και ανθρώπινοι ινοβλάστες (β) καλλιεργήθηκαν παρουσία του συμπλόκου του βαναδίου	166
Εικόνα 12.1: Δομή του συμπλόκου [Li ₂ (H ₂ O) ₃][VO(mal) ₂ (H ₂ O)].....	173
Εικόνα 12.2: Δομή του συμπλόκου [Na ₂ (H ₂ O)][VO(mal) ₂ (H ₂ O)].....	173
Εικόνα 12.3: Δομή του συμπλόκου [K ₂ (H ₂ O) ₃][VO(mal) ₂ (H ₂ O)].....	174

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 6.1: Χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των συμπλόκων ενώσεων του χαλκού	73
Πίνακας 6.2: Επιλεγμένες αποστάσεις δεσμών (A) και γωνίες ($^{\circ}$) για το σύμπλοκο 1.	80
Πίνακας 6.3: Επιλεγμένες αποστάσεις δεσμών (A) και γωνίες ($^{\circ}$) για το σύμπλοκο 2.	86
Πίνακας 6.4: Χαρακτηριστικές γεωμετρικές παράμετροι για το τμήμα πυραμίδας της ένωσης 2, για τα διμερή και τα αλληλεπιδρώντα διμερή της παρούσας εργασίας και ανάλογων συμπλόκων	87
Πίνακας 6.5: Χαρακτηριστικές τιμές MIC για τα σύμπλοκα του χαλκού	89
Πίνακας 7.1: Χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου.....	100
Πίνακας 7.2: Χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου.....	102
Πίνακας 7.3: $^1\text{H-NMR}$ Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις των συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου.....	104
Πίνακας 7.4: $^{13}\text{C-NMR}$ Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις των συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου.....	105
Πίνακας 7.5: Χαρακτηριστικές τιμές MIC για τα σύμπλοκα του ψευδαργύρου.....	109
Πίνακας 9.1: Ένζυμα μολυβδαινίου και αντιδράσεις που καταλύουν	133
Πίνακας 10.1: Παρενέργειες της δράσης των βαναδικών στα ποντίκια.....	144
Πίνακας 11.1: $^1\text{H-NMR}$ Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις της καρνιτίνης, του περόξο συμπλόκου της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο καθώς επίσης του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης	154
Πίνακας 11.2: Επιλεγμένες αποστάσεις δεσμών και γωνιών της ένωσης 2.....	160

Πίνακας 11.3: δεσμοί υδρογόνου της ένωσης 2	162
Πίνακας 11.4: Μέση τιμή επιβίωσης (%) και τυπική απόκλιση της ένωσης 1 σε διάφορες καρκινικές σειρές και πρωταρχικά κύτταρα	164
Πίνακας 11.5: Μέση τιμή επιβίωσης (%) και τυπική απόκλιση της ένωσης 2 σε διάφορες καρκινικές σειρές και πρωταρχικά κύτταρα	164
Πίνακας 13.1: Πίνακας με επιλεγμένα μήκη δεσμών του περόξο συμπλόκου	177
Πίνακας 16.1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις ελληνικών και ξενόγλωσσων	196

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτελεί η σύνθεση νέων ενώσεων με υποκαταστάτες που παρουσιάζουν φαρμακευτικό-ιατρικό ενδιαφέρον, όπως οι κινολόνες, η καρνιτίνη, το μαλονικό οξύ και το καφεϊκό οξύ, ενώσεις οι οποίες λειτουργούν είτε ως μεταφορείς φαρμάκων εκλεκτικά μέσα στον οργανισμό, είτε παρουσιάζουν αντικαρκινική ή αντιδιαβητική δράση. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητο να προηγηθεί μια σύντομη περιγραφή των όσων παρασκευάστηκαν, χαρακτηρίστηκαν και μελετήθηκαν από άποψη βιολογικής δράσης.

Η παρούσα διατριβή αποτελείται από τέσσερις θεματικές ενότητες, οι οποίες σκοπεύουν στην σύνθεση φαρμάκων με βελτιωμένη διαλυτότητα και δράση.

Η πρώτη θεματική ενότητα αφορά μια κατηγορία φαρμάκων ήδη χρησιμοποιούμενων στον χώρο της ιατρικής, τις κινολόνες. Πραγματοποιήθηκε σύνθεση ενός αριθμού συμπλόκων ενώσεων με την κινολόνη τρίτης γενεάς τη λεβοφλοξασίνη με τα μεταλλικά ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου. Ακολούθησε η κρυστάλλωση και ο χαρακτηρισμός των ενώσεων αυτών, ενώ παράλληλα μελετήθηκε και η βιολογική τους δράση. Τα βιολογικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων αυτών με DNA, η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης, και της κυτταροτοξικότητας ενώ παράλληλα έγιναν και πειράματα παρατήρησης του φθορισμού που παρουσιάζουν οι ενώσεις αυτές εφόσον εισαχθούν στα κύτταρα.

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης με το DNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση της φασματοσκοπίας απορρόφησης (UV) ενώ για τα πειράματα αντιμικροβιακής δράσης χρησιμοποιήθηκαν τρεις μικροοργανισμοί: *E. Coli*, *Pseudomonas* (Gram negative) και *Staphylococcus Aureus* (Gram positive) και μελετήθηκε η ελάχιστη συγκέντρωση της αναπτυξης αυτών (MIC).

Η δεύτερη ενότητα αφορά την σύνθεση συμπλόκων ενώσεων της καρνιτίνης, ένωσης γνωστής στην ερευνητική κοινότητα για την αντιδιαβητική της δράση. Ακολούθησε κρυστάλλωση και χαρακτηρισμός των ενώσεων αυτών, μελετήθηκαν δε και από βιολογικής άποψης.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης της αντικαρκινικής και αντιδιαβητικής δράσης των ενώσεων αυτών.

Η τρίτη ενότητα αφορά την σύνθεση συμπλόκων ενώσεων του μαλονικού οξέος και η τέταρτη την σύνθεση συμπλόκων ενώσεων του καφεϊκού οξέος, ενώσεις γνωστές επίσης στην ερευνητική κοινότητα για την αντιδιαβητική τους δράση.

.

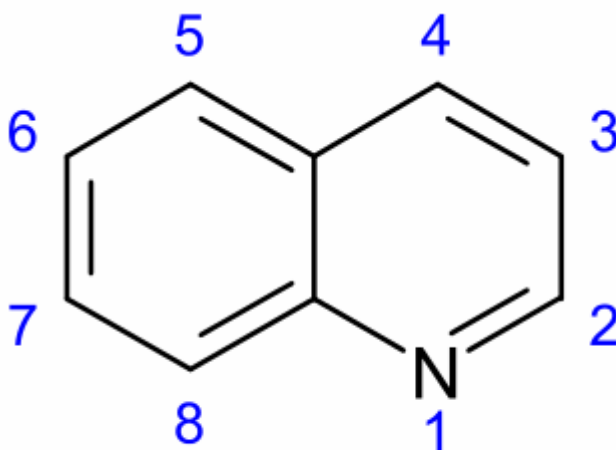
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ-ΚΑΤΑΤΑΞΗ-ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΛΕΒΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ

1.1 Κατάταξη κινολονών

Οι κινολόνες είναι συνθετικά μόρια τα οποία αναπτύχθηκαν κατά την διάρκεια δομικών τροποποιήσεων του σκελετού των 4-κινολονών [1]. Η πρώτη κινολόνη που μελετήθηκε ήταν το ναλιδιχικό οξύ, το έτος 1962, η οποία είχε περιορισμένη δράση έναντι των Gram-αρνητικών οργανισμών. Τα επόμενα χρόνια, σε μια προσπάθεια να διευρυνθεί το φάσμα δράσης των κινολονών, επακολούθησαν δομικές τροποποιήσεις της πρώτης γενεάς.



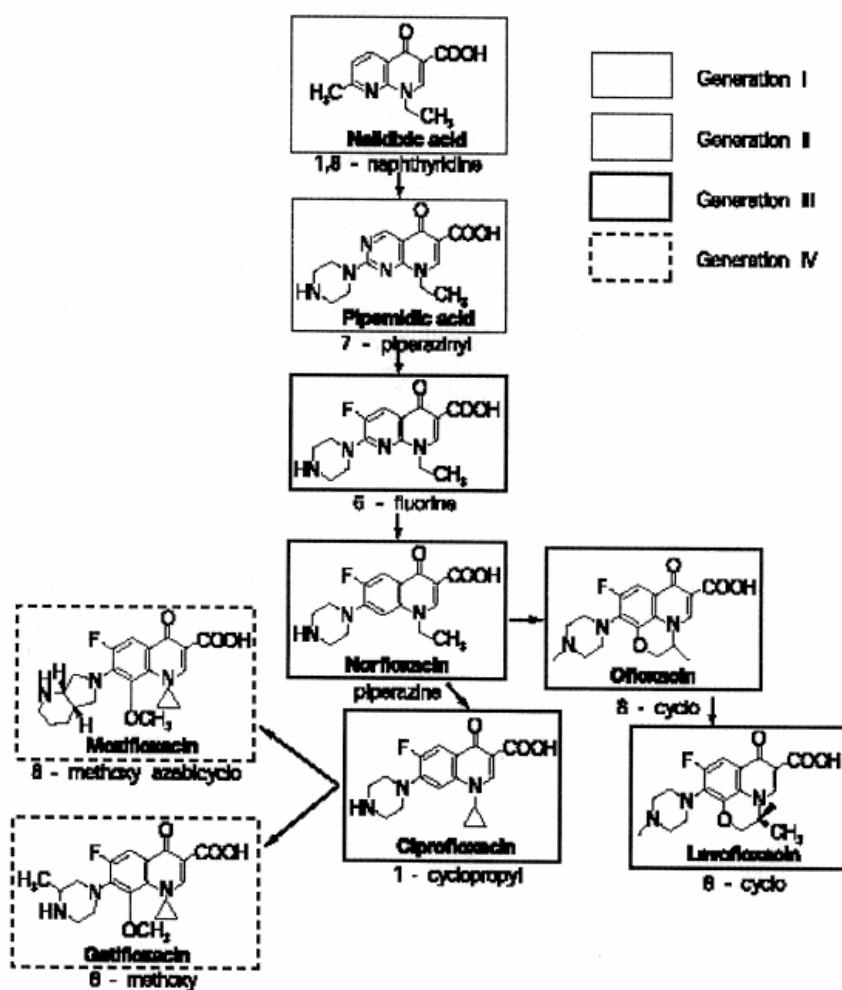
Σχήμα 1.1: Ο σκελετός της 4-κινολόνης.

Έτσι λοιπόν, οι κινολόνες ανάλογα με το εύρος και τις παρενέργειες της αντιμικροβιακής τους δράσης ταξινομήθηκαν σε τέσσερις γενεές: [2]

1. **Πρώτη γενεά:** η οποία είναι η λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενη σήμερα και έχει δράση κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων.
2. **Δεύτερη γενεά:** Οι κινολόνες δεύτερης γενεάς παρουσιάζουν εκτεταμένη Gram αρνητική δράση και ασυνήθιστη κάλυψη, έναντι των παθογόνων οργανισμών, αλλά περιορισμένη Gram θετική δράση.

Επιπλέον είναι περισσότερο ενεργές έναντι αερόβιων Gram αρνητικών βακίλλων. Η σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin) παραμένει η πιο δραστική κινολόνη έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*: [2] Οι πιο μεγάλες βελτιώσεις όσον αφορά την Gram αρνητική κάλυψη, παρατηρήθηκαν με την υποκατάσταση της R7 θέσης του πιπεραζινικού δακτυλίου. Παρά το ότι παρατηρήθηκε μια επέκταση στην αντιβακτηριακή δράση, η χρήση των κινολονών δεύτερης γενιάς παρέμεινε περιορισμένη εξαιτίας της ανεπαρκούς βιοδιαθεσιμότητας τους και της νεφρικής τοξικότητας που επεδείκνυαν [1].

3. **Τρίτη γενιά:** Οι κινολόνες αυτής της κατηγορίας προήλθαν μέσω φθορίωσης της R6 θέσης του πιπεραζινικού δακτυλίου δίνοντας αφορμή για την μελλοντική ταξινόμηση των ενώσεων αυτών ως φθοροκινολόνες. Οι εκπρόσωποι αυτής της γενιάς, διατήρησαν την εκτεταμένη Gram αρνητική και άτυπη ενδοκυτταρική δράση τους αλλά συγχρόνως βελτίωσαν την Gram θετική τους κάλυψη [2]. Η νορφλοξασίνη (norfloxacin), ήταν η πρώτη κινολόνη η οποία χρησιμοποιήθηκε στην θεραπεία οφθαλμικών μολύνσεων καθώς εισήχθη αρχικά για την θεραπεία της βακτηριακής επιπεφυκίτιδας. Υποκατάσταση άνθρακα στην θέση του αζώτου σε συνδυασμό με τροποποιήσεις στις θέσεις R1 και R8 οδήγησαν στην ανάπτυξη κλινικά βελτιωμένων κινολονών τρίτης γενιάς. Η προσθήκη επιπλέον ενός κυκλοπρόπυλ-δακτυλίου στην R1 θέση και ενός εξαμελούς δακτυλίου ανάμεσα στην R1 και R8 θέση οδήγησαν στην ανάπτυξη της οφλοξασίνης (ofloxacin), η οποία προσέφερε βελτιωμένη Gram αρνητική δράση καθώς επίσης εκτεταμένη δράση έναντι των Gram θετικών οργανισμών σε οφθαλμικές μολύνσεις [1].
4. **Και τέλος η τέταρτη γενιά:** Στις κινολόνες αυτής της γενιάς πραγματοποιήθηκε προσθήκη μιας μεθόξυ πλευρικής αλυσίδας στην R8 θέση η οποία οδήγησε στην ανάπτυξη των φθοροκινολονών τέταρτης γενιάς όπως είναι η γκατιφλοξασίνη (gatifloxacin) και η μοξιφλοξασίνη (moxifloxacin) [1]. Οι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας παρουσίασαν βελτιωμένη Gram θετική δράση ενώ παράλληλα διατήρησαν την Gram αρνητική και αύξησαν την αναερόβια δράση.



Σχήμα 1.2: Δομική εξέλιξη των φθοροκινολονών.

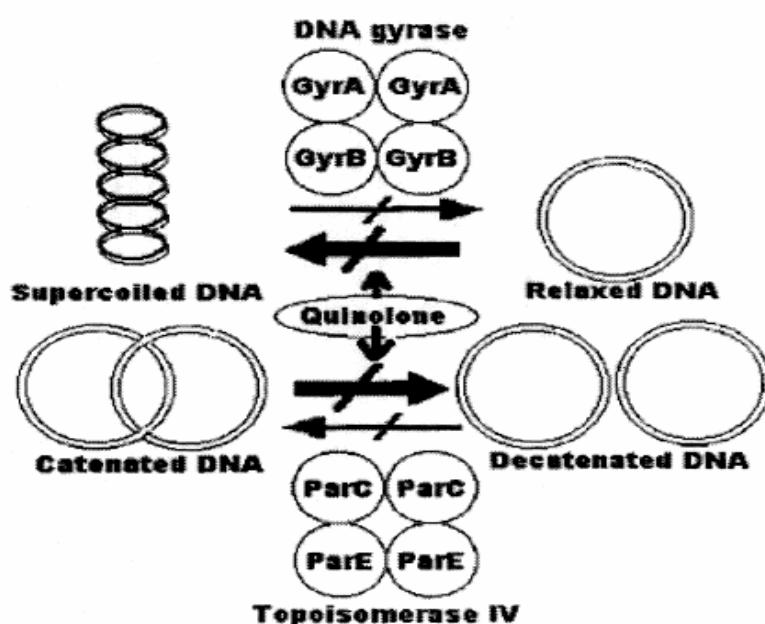
1.2 Μηχανισμός δράσης των κινολονών

Οι φθοροκινολόνες όπως και άλλα αντιβακτηριακά φάρμακα έχουν ενδοκυτταρικές θέσεις στόχους. Το ευρύ φάσμα δράσης τους οφείλεται στην ικανότητα τους να διαπερνούν τους βακτηριακούς φακέλους και την κυτταροπλασματική μεμβράνη με άμεση συνέπεια η αντιβακτηριακή δράση τους να προέρχεται από έναν συνδυασμό τόσο της διείσδυσης στην κυτταρική μεμβράνη όσο και από την αναστολή της δράσης της DNA γυράσης.

Οι πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην εισαγωγή των φθοροκινολονών στα Gram-αρνητικά βακτήρια δια μέσω της εξωτερικής μεμβράνης. Εν τω μεταξύ, η μεταφορά δια μέσω της εσωτερικής μεμβράνης λαμβάνει χώρα μέσω παθητικής διάχυσης και στα δυο,

στα Gram αρνητικά βακτήρια και στην μεμβράνη των Gram θετικών οργανισμών. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το 80% των φθοροκινολονών διαπερνά την μεμβράνη παθητικά ενώ μόνο το 20% την διαπερνά δια μέσου των πόρων. Αυτό είναι φυσιολογικό εάν λάβει κανείς υπόψιν του τις δυο καταστάσεις ιοντισμού που συνυπάρχουν στα μόρια αυτά σε φυσιολογικά pH [3].

Οι φθοροκινολόνες επιπλέον δρουν αναστέλλοντας δυο ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στην σύνθεση του βακτηριακού DNA. Πρόκειται για DNA τοποϊσομεράσες οι οποίες είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του βακτηριακού DNA. Οι τοποϊσομεράσες αυτές είναι υπεύθυνες για τον διαχωρισμό των ελίκων του βακτηριακού DNA, εισάγοντας μια επιπλέον έλικα και έπειτα σφραγίζουν τις αρχικά διαχωρισμένες έλικες.

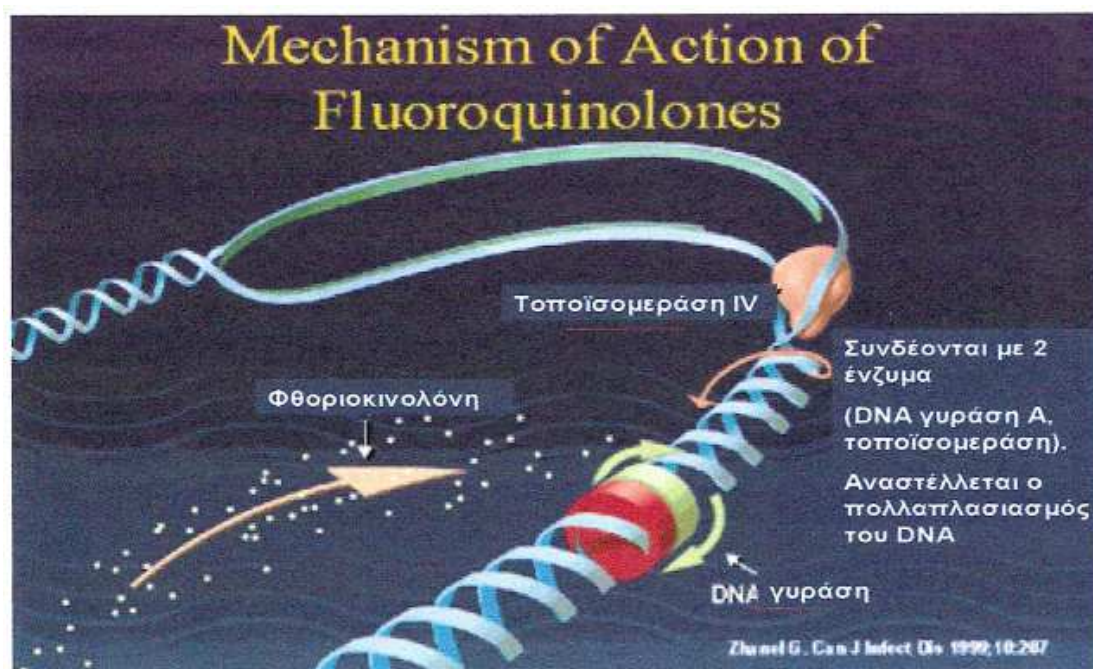


Σχήμα 1.3 : Δομή και λειτουργία της DNA γυράσης και της τοποϊσομεράσης IV.

Πιο συγκεκριμένα οι φθοροκινολόνες αναστέλλουν την DNA γυράση και την τοποϊσομεράση IV. Η DNA γυράση εισάγει αρνητικά υπερσπειράματα στην διπλή έλικα του βακτηριακού DNA μπροστά από την διχάλα αντιγραφής, καταλύοντας με αυτό τον τρόπο τον διαχωρισμό των θυγατρικών χρωμοσωμάτων. Η δραστηριότητα αυτή είναι απαραίτητη για την έναρξη της

αντιγραφής του DNA και επιτρέπει την σύνδεση των πρωτεϊνών έναρξης. Η DNA γυράση αποτελείται από δυο υπομονάδες την GyrA και την GyrB οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gyrA* και *gyrB* αντίστοιχα. Η τοποϊσομεράση IV από την άλλη είναι υπεύθυνη για την απαλυσίδωση δηλαδή απομακρύνει τα διασυνδεδεμένα χρωμοσώματα επιτρέποντας έτσι τον διαχωρισμό σε δύο θυγατρικά κύτταρα στο τέλος της αντιγραφής. Η τοποϊσομεράση IV συνίσταται από τέσσερις υπομονάδες δυο ParC και δυο ParE. Η δομή καθώς και η δράση της DNA γυράσης και της τοποϊσομεράσης IV φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα.

Οι φθοροκινολόνες αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ του ενζύμου και του DNA προκειμένου να δημιουργήσουν αλλαγές στην διαμόρφωση οι οποίες καταλήγουν στην αναστολή της κανονικής δράσης του ενζύμου. Με αποτέλεσμα το νέο σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ φαρμάκου, ενζύμου και DNA να μπλοκάρει την αλληλουχία στην διχάλα της αντιγραφής, αναστέλλοντας έτσι την κανονική αντιγραφή του βακτηριακού DNA και αναπόφευκτα καταλήγοντας σε βακτηριακό θάνατο.



Εικόνα 1.1: Τρόπος δράσης των φθοροκινολονών στο βακτηριακό DNA

Οι παλαιότερες φθοροκινολόνες παρουσίαζαν ένα παρόμοιο μοτίβο όσον αφορά την αναστολή του ενζύμου στους διάφορους τύπους των

βακτηρίων. Παρά τα κοινά χαρακτηριστικά, η DNA γυράση τείνει να είναι ο πρωταρχικός στόχος των φθοροκινολονων στους Gram αρνητικούς οργανισμούς ενώ η τοποϊσομεράση IV στους Gram θετικούς [1].

1.3 Μηχανισμοί ανάπτυξης αντίστασης

Οι κινολόνες και οι φθοροκινολόνες είναι τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα φάρμακα για την θεραπεία βακτηριακών μολύνσεων τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα. Δυστυχώς όμως η ευρεία χρήση τους οδήγησε στην ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης από τα βακτήρια. Η συνεπαγόμενη ανάπτυξη της βακτηριακής αντίστασης στις φθοροκινολόνες προήλθε από χρωμοσωμικές μεταλλάξεις οι οποίες καταλήγουν σε διαφοροποιήσεις στα ένζυμα στόχους (δηλαδή την DNA γυράση και την τοποϊσομεράση IV), στα κανάλια πουρινών της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και αλλαγές όσον αφορά την είσοδο και την εκροή του φαρμάκου. Η πρώτη από τις προαναφερθείσες είναι η πιο συχνά απαντώμενη μετάλλαξη.

Οι διαφοροποιήσεις αυτές εμφανίζονται στην Gyr A υπομονάδα και πιο συγκεκριμένα σε μια περιορισμένη περιοχή που ονομάζεται “προσδιορισμένη περιοχή αντίστασης στην κινολόνη”. Η πιο συνήθης μετάλλαξη εμφανίζεται στην ακολουθία Ser83Ieu και asp87asn του γονιδίου *gyrA* του βακτηρίου *E. Coli*. Το επίπεδο της αντίστασης ποικίλει και εξαρτάται τόσο από την μετάλλαξη όσο και από το βακτηριακό είδος.

Η αναστολή της γυράσης από την κινολόνη επέρχεται δια μέσου του σχηματισμού ενός σταθερού συμπλόκου μεταξύ της κινολόνης, της γυράσης και του DNA το οποίο μπλοκάρει την ακολουθία της αντιγραφής του DNA. Η γυράση είναι το ένζυμο στόχος της κινολόνης. Παρόλα αυτά οι μοριακές λεπτομέρειες της αλληλεπίδρασης μεταξύ κινολόνης και γυράσης δεν έχουν πλήρως αποσαφηνισθεί. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης στις κινολόνες συχνά εμφανίζονται στα κατάλοιπα Ser83 και Asp87 της GyrA υπομονάδας, έτσι είναι λογικό πως αυτά τα κατάλοιπα εμπλέκονται στην σύνδεση του φαρμάκου [4].

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *gyrA* επιτρέπει στην υπομονάδα A της γυράσης να έχει χαμηλότερη συγγένεια σύνδεσης στις κινολόνες. Συνακόλουθα, το φάρμακο είναι ανίκανο να συνδεθεί στον υποδοχέα με

αποτέλεσμα η δράση του να αναστέλλεται. Αυτού του είδους οι χρωμοσομικές μεταλλάξεις εμφανίζονται και στους Gram θετικούς αλλά και Gram αρνητικούς οργανισμούς. Στους περισσότερους όμως, Gram αρνητικούς οργανισμούς, μια απλή μετάλλαξη στο γονίδιο *gyrA* δεν είναι αρκετή προκειμένου να αναπτυχθεί μηχανισμός αντίστασης στην κινολόνη. Διαφοροποιήσεις έχουν παρατηρηθεί και στην υπομονάδα B της γυράσης σε βακτήρια όπως η *Escherichia Coli*.

Ο μηχανισμός βάση του οποίου εισέρχονται οι φθοροκινολόνες στην βακτηριακή μεμβράνη είναι πολύπλοκος και δεν είναι εντελώς κατανοητός. Οι ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις φθοροκινολόνης εξαρτώνται από την ισορροπία μεταξύ της εισροής του φαρμάκου μέσω των καναλιών της πουρίνης, της μεταφοράς του κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και της εκροής του από το κυτταρόπλασμα και το κύτταρο. Αλλαγές στα κανάλια της πουρίνης και ιδιαίτερα ελαττωμένη έκφραση από την *πρωτεΐνη* της εξωτερικής μεμβράνης OmpF μπορεί να επηρεάσει τη διείσδυση του φαρμάκου εντός του κυττάρου ή ακόμη και συσσώρευση του φαρμάκου στο κύτταρο. Βέβαια οι κλινικές περιπτώσεις αυτού του είδους είναι ελάχιστες.

Τέλος ένα χρωμοσωμικά κωδικοποιημένο σύστημα εκροής μπορεί να είναι υπεύθυνο για την εκροή των φθοροκινολονων από την βακτηριακή μεμβράνη. Το *nor A* γονίδιο το οποίο απαντάται σε είδη σταφυλόκοκκου, έχει συσχετιστεί με αποβολή του φαρμάκου και με υψηλότερες τιμές MIC (ελάχιστη συγκεντρώση αναστολής). Η ανάπτυξη αντίστασης σε είδη σταφυλόκοκκου ως προς το φάρμακο πιθανόν να προέρχεται από υπερέκφραση του γονιδίου *nor A*.

1.4 Λεβοφλοξασίνη

Η λεβοφλοξασίνη (levofloxacin) είναι το L-ισομερές του D,L-ρακεμικού μίγματος της οφλοξασίνης (ofloxacin). Το L-ισομερές είναι περισσότερο ενεργό από το D-ισομερές και αποτελεί το δραστικό συστατικό της οφλοξασίνης. Δεδομένου ότι η λεβοφλοξασίνη δεν περιέχει το ανενεργό D-ισομερές, η εντός του σωλήνα (*in vitro*) δράση της είναι γενικά καλύτερη από της οφλοξασίνης έναντι των περισσότερων οργανισμών. Πιο συγκεκριμένα συγκρινόμενη με την οφλοξασίνη και την σιπροφλοξασίνη, η λεβοφλοξασίνη

εμφανίζει βελτιωμένη *in vitro* δράση έναντι των περισσότερων Gram θετικών αερόβιων οργανισμών. Η MIC_{90} έναντι *Staphylococcus aureus* και στα δύο στελέχη στα ανθεκτικά και μη στην μεθισιλίνη (methicillin), είναι 2 έως 4 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη της σιπροφλοξασίνης και της οφλοξασίνης. Παρόμοια δράση της λεβοφλοξασίνης έχει αναφερθεί και για το *Staphylococcus epidermitis*. Επιπλέον και πάλι συγκρινόμενη με την σιπροφλοξασίνη, η λεβοφλοξασίνη εμφανίζει βελτιωμένη δράση έναντι στελεχών του γένους *S. Pneumoniae*, τα οποία είναι και ανθεκτικά αλλά και μη-ανθεκτικά στην πενικιλίνη. Ο George και ο Morrissey κατά την διάρκεια έρευνας την οποία διεξήγαγαν όσον αφορά την δράση της λεβοφλοξασίνης, (levofloxacin) οφλοξασίνης, (ofloxacin) σιπροφλοξασίνης (ciprofloxacin) και σπαρφλοξασίνης (sparfloxacin) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η λεβοφλοξασίνη είναι η πιο βακτηριοκτόνος από τις κινολόνες. Σε πρόσφατη έρευνα από τον Thornberry και τους συνεργάτες του αναφέρθηκαν δεδομένα ευαισθησίας για 11368 στελέχη *S pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, και *Moraxella catarrhalis* από 434 ινστιτούτα σε 45 πολιτείες καθώς και από την περιοχή της Κολούμπια. Από τα 9190 στελέχη του *S pneumoniae*, το 33.5 % δεν ήταν ευαίσθητα στην πενικιλίνη. Από τους εκπροσώπους των κινολονών που χρησιμοποιήθηκαν η λεβοφλοξασίνη είχε υψηλότερη τοξικότητα έναντι του *S. Pneumoniae*, (97.3%), ακολουθούσε η σεφτριαξόνη (ceftriaxone), (87.1%) και η αμοξισιλίνη (amoxicillin/clavulate) (81.7%). Ενώ μόνο 248 μόλις το (2.7%) από τα 9190 στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά στην λεβοφλοξασίνη.

Οι φθοροκινολόνες είναι γνωστές για την *in vitro* και *in vivo* δράση τους έναντι ενός ευρέως φάσματος Gram-αρνητικών οργανισμών. Τα περισσότερα εντεροβακτήρια αναστέλλονται από χαμηλές συγκεντρώσεις λεβοφλοξασίνης. Η λεβοφλοξασίνη επιδεικνύει άριστη *in vitro* δράση με MIC_{90} περίπου 50% χαμηλότερα από τα αντίστοιχα της οφλοξασίνης. Τα περισσότερα απομονωμένα είδη *P. aeruginosa* αναστέλλονται από θεραπευτικές συγκεντρώσεις λεβοφλοξασίνης. Τα *Neisseria gonorrhoeae*, και *M. catarrhalis* είναι ευαίσθητα στην λεβοφλοξασίνη. Επιπροσθέτως η λεβοφλοξασίνη παρουσιάζει εξαιρετική δράση έναντι στελεχών του *H. influenzae*.

Η σιπροφλοξασίνη καταδεικνύει φτωχή δράση έναντι του *Bacteroides fragilis*. Η MIC_{90} της λεβοφλοξασίνης βρέθηκε 2 έως 3 φορές λιγότερη από την αντίστοιχη της σιπροφλοξασίνης και της οφλοξασίνης. Επιπλέον η

λεβοφλοξασίνη είναι 2 έως 3 φορές περισσότερο δραστική από τις προαναφερθείσες φθοροκινολόνες έναντι του *Clostridium perfringens*. Παρά την ενδιάμεση δράση της λεβοφλοξασίνης έναντι *Bacteroides fragilis* και άλλων αναερόβιων οργανισμών, η χρήση της στην θεραπεία αναερόβιων οργανισμών είναι περιορισμένη.

Η λεβοφλοξασίνη απορροφάται ταχύτατα από τον γαστρεντερικό σωλήνα αμέσως μετά την χορήγηση της από του στόματος. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα συγκέντρωσης της λεβοφλοξασίνης στο πλάσμα είναι παρόμοιο είτε χορηγηθεί από του στόματος είτε ενδοφλέβια, για τον λόγο αυτό οι δυο διαδρομές μπορούν να θεωρηθούν εναλλάξιμες. Όσον αφορά τώρα την κατανομή της, ο μέσος όγκος κατανομής της ποικίλει από 1,09 σε 1,26 L/Kg έπειτα από απλή ή πολλαπλή χορήγηση δόσεων των 500mg, υποδεικνύοντας ευρεία διείσδυση στον ιστό. Συγκεντρώσεις της λεβοφλοξασίνης στον ιστό του πνεύμονα αναφέρεται να είναι 2 έως 5 φορές μεγαλύτερη από ότι στον ορό. Η ελάχιστη διείσδυση της λεβοφλοξασίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα περιορίζει την χρήση της στην θεραπεία της μηνιγγίτιδας καθώς επίσης και άλλων λοιμώξεων του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι μεταξύ 4 και 8 ωρών. Ο χρόνος ημίσειας ζωής παραμένει αμετάβλητος με την επαναλαμβανόμενη χορήγηση.

Επιπλέον είναι στερεοχημικά σταθερή και δεν μετατρέπεται στο λιγότερο ενεργό ισομερές της. Η λεβοφλοξασίνη χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις: χρόνιας βρογχίτιδας, οξείας ιγμορίτιδας, οξείας πνευμονοφρίτιδας καθώς επίσης και σε σύνθετες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος [5].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΘΟΡΟΚΙΝΟΛΟΝΩΝ ΜΕ DNA

2.1 Εισαγωγή - DNA

Τα τελευταία χρόνια παρατηρούμε την εξέλιξη της γονιδιακής ιατρικής, με σκοπό την ανάπτυξη θεραπευτικών ουσιών για μια ποικιλία ανθρώπινων διαταραχών. Πολυάριθμα πρωτότυπα βιοφαρμακευτικά με βάση το DNA, μπορούν να ελέγξουν πλέον την εξέλιξη της νόσου με επαγωγή ή και αναστολή των γονιδίων. Το μόριο του DNA είναι μια από τις σημαντικότερες πηγές όχι μόνο για την κατανόηση της θεμελιώδους βάσης της ανθρώπινης ζωής αλλά επίσης και για την ανάπτυξη μιας νέας ομάδας θεραπευτικών [6]. Αποτελεί τον ενδοκυτταρικό στόχο μιας ποικιλίας τόσο φυσικών όσο και τεχνητών σκευασμάτων που διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους ως προς την δομή και το μέγεθος.

Η μελέτη της δομής και του τρόπου σύνδεσης του συμπλόκου φαρμάκου με το DNA έχει διπτό ρόλο: Να διευκρινίσει τις ιδιότητες του φαρμάκου καθώς και να εξετάσει την αλληλεπίδραση του <μορίου υποδοχέα> δηλαδή του DNA με αυτή του φαρμάκου<υποδοχέα-φιλοξενούμενου>.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ φαρμάκου-κινολόνης και DNA μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- ✘ Παρεμβολή
- ✘ Δέσμευση στις Αύλακες

2.2 Παρεμβολή

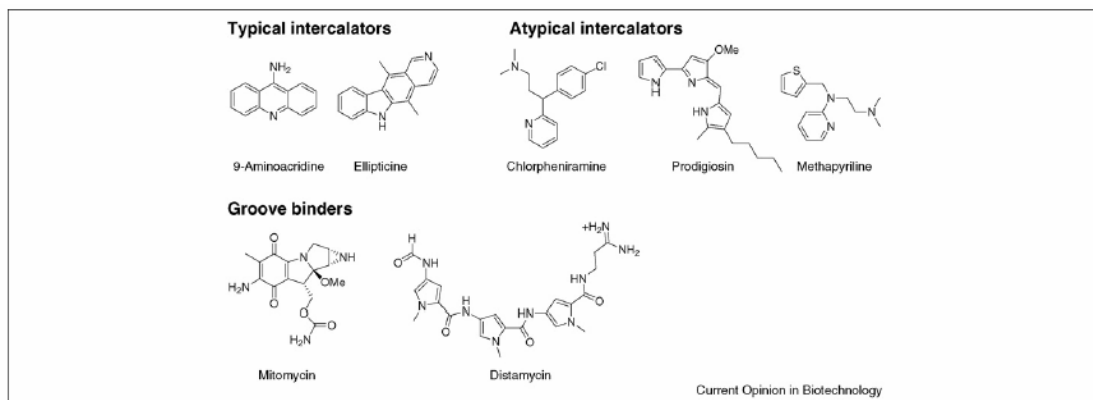
Η παρεμβολή περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός επίπεδου μορίου ανάμεσα στα ζευγάρια βάσεων του DNA, η οποία καταλήγει σε μείωση της ελικοειδούς περιστροφής του DNA και κατά συνέπεια στην επιμήκυνση του. Πιο συγκεκριμένα η παρεμβολή προκαλεί στο μόριο του DNA τις ακόλουθες μεταβολές:

- ✘ Αποέλιξη και επιμήκυνση της διπλής έλικας. Οι αλλαγές αυτές είναι συνέπεια της απομάκρυνσης των ζευγών βάσεων αλλά και

της επιμήκυνσης του σκελετού σακχάρου-φωσφορικού προκειμένου να δεχτεί τον παρεμβολέα.

- ✧ Αλληλεπίδραση του παρεμβολέα μέσα στην διπλή έλικα του DNA. Το επίπεδο αρωματικό σύστημα του μορίου παρεμβολέα τοποθετείται παράλληλα στα επίπεδα των διαδοχικών ζευγών βάσεων. Η τοποθέτηση αυτή επιτρέπει το στοίβαγμα των πνεφών των βάσεων και του παρεμβολέα με αποτέλεσμα την δημιουργία αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου.
- ✧ Τέλος προκαλείται ακαμψία και προσανατολισμός του παρεμβολέα μέσα στην διπλή έλικα. Πιο συγκεκριμένα δημιουργείται μια δομική επικάλυψη μεταξύ των βάσεων και του μορίου που παρεμβάλεται. Έτσι το μόριο του φαρμάκου γίνεται άκαμπτο και το επίπεδο αρωματικό σύστημα που διαθέτει προσανατολίζεται κάθετα ως προς τον άξονα της διπλής έλικας.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχει ένα σημαντικό ενεργειακό κόστος για την δημιουργία της κοιλότητας παρεμβολής, ευνοϊκές εισφορές από (υδροφобες αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der waals) οδηγούν σε σταθερές σύνδεσης της τάξης 10^5 - 10^{11}M^{-1} Παρόλο που η παρεμβολή έχει παραδοσιακά συνδεθεί με μόρια τα

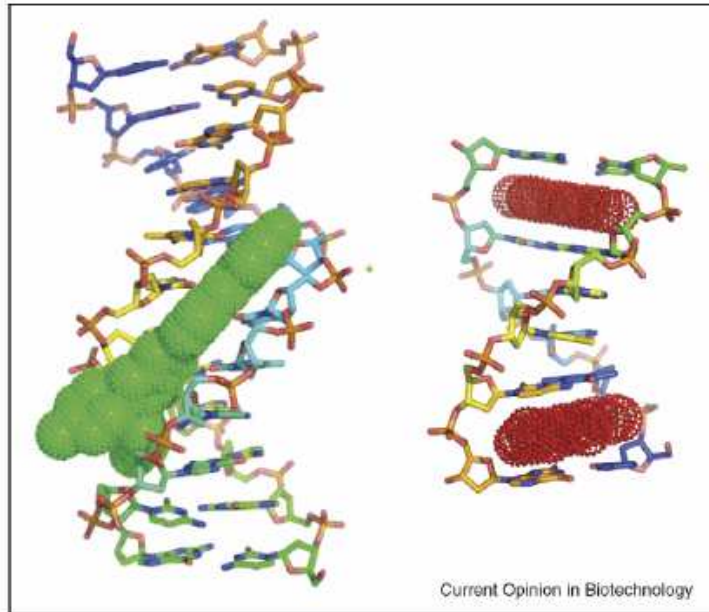


Σχήμα 2.1: Δομή τυπικών παρεμβολέων, άτυπων παρεμβολέων και μόρια που συνδέονται στην αύλακα.

οποία περιέχουν δι- και τρικυκλικούς δακτυλίους, άτυπα, παρεμβολείς με συστήματα μη συντηγμένων δακτυλίων μπορεί να είναι επικρατέστερα. Αν και οι παρεμβολείς στο DNA χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς σαν αντικαρκινικά, αντινεοπλασματικά, αντιελονοσιακά, αντιβιοτικά και αντιμυκητιακά, δεν είναι όλοι οι παρεμβολείς γονοτοξικοί (αυτό ορίζεται από την ικανότητά τους να μεταβάλλουν το γενετικό υλικό ενός κυττάρου ως ένα μέσο παρακίνησης τοξικής επίδρασης). Η παρουσία πολλές φορές βασικών, κατιονικών ή και ηλεκτρόφιλων λειτουργικών ομάδων είναι συχνά απαραίτητο για γονοτοξικότητα [7].

2.3 Δέσμευση στις αύλακες

Η δέσμευση στις αύλακες δεν προκαλεί μεγάλες διαμορφωτικές αλλαγές στο DNA σε αντίθεση με την παρεμβολή και μπορεί να θεωρηθεί παρόμοια με το μοντέλο κλειδαρίας και κλειδιού για την σύνδεση υποκαταστάτη-μακρομορίου. Τα μόρια τα οποία δεσμεύονται στις αύλακες είναι συνήθως σε σχήμα ημισελήνου, τα οποία δεσμεύονται στην μικρή αύλακα του DNA. Η μικρή αύλακα είναι περισσότερο εκτεθειμένη σε προσβολή επειδή πιθανώς δεν είναι κατειλημμένη από κάποιο άλλο μόριο. Τα μόρια αυτά σταθεροποιούνται με ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και τυπικά έχουν μεγαλύτερες σταθερές σύνδεσης από τους παρεμβολείς (περίπου 10^{11} M^{-1}), μιας και δεν απαιτείται ενεργειακό κόστος για την δημιουργία της δέσμευσης. Όπως και οι παρεμβολείς τα μόρια αυτά χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά και αντιμικροβιακά. Για παράδειγμα η μιτομυκίνη (η οποία είναι ένας παράγοντας σταυρωτής σύνδεσης με το DNA). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε πως οι ανθρακυκλίνες (anthracyclines) μια τάξη πολύ σημαντικών ενώσεων, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως αντινεοπλασματικά και αντιβακτηριακά παρουσιάζουν τα πλεονεκτήματα και των δύο τρόπων σύνδεσης, μιας και κατέχουν μια ομάδα παρεμβολέα αλλά και μια ομάδα δέσμευσης στην αύλακα [7].



Εικόνα 2.1: Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η δέσμευση στην μικρή αύλακα του DNA και στην δεξιά εικόνα ένας παρεμβολέας.

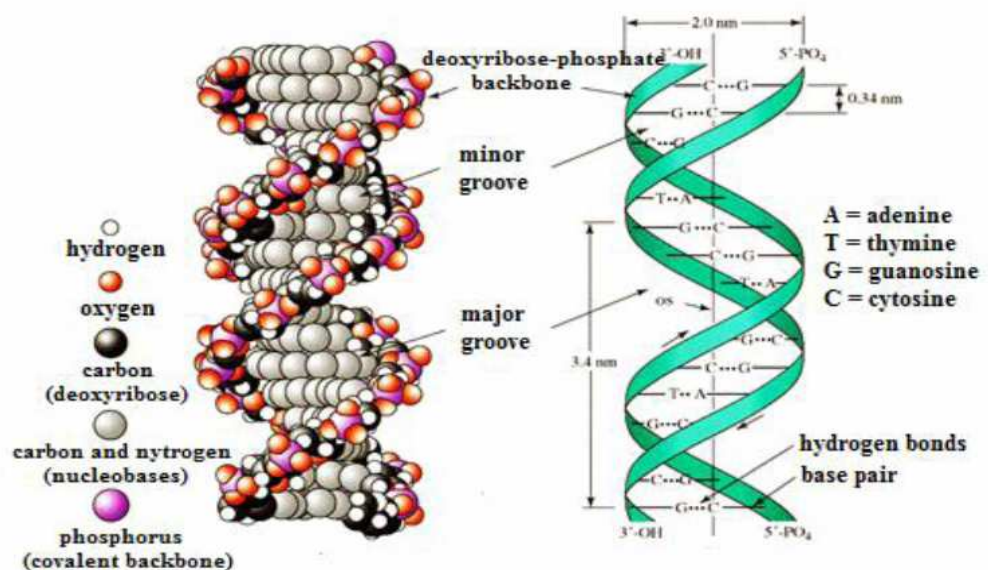
Περιοχές στην διπλή έλικα πλούσιες σε ακολουθία γουανίνης κυτοσίνης εμφανίζουν μεγαλύτερη στερεοχημική παρεμπόδιση σε σχέση με περιοχές οι οποίες είναι πλούσιες σε ακολουθία αδενίνης θυμίνης εξαιτίας της ογκώδους άμινο ομάδας της γουανίνης. Επιπρόσθετα το αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό σε περιοχές πλούσιες σε αδενίνη-θυμίνη είναι μεγαλύτερο. Αυτός είναι και ο λόγος που τα φάρμακα της κατηγορίας αυτής φέρουν θετικό φορτίο καθώς προτιμούν να δεσμεύονται σε περιοχές πλούσιες σε αδενίνη-θυμίνη.

2.4 Αλληλεπίδραση μετάλλων με το DNA

Το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) απομονώθηκε για πρώτη φορά το έτος 1868 από τον γιατρό Swiss Friderich Misch. Τότε το μόριο αυτό δεν είχε καμία σημασία μιας και κανείς δεν γνώριζε ότι περιέχει την γενετική πληροφορία η οποία χρησιμοποιούταν στην ανάπτυξη και λειτουργία σχεδόν όλων των ζωντανών οργανισμών. Μετά την ανακάλυψη της τρισδιάστατης δομής του από τους Watson και Crick, το μόριο του DNA έγινε το κέντρο απεριόριστου αριθμού μελετών καλύπτοντας πολλά διαφορετικά πεδία. Η πιο συνήθης διαμόρφωση του DNA εντός οργανισμού είναι η B, η οποία αποτελείται από δυο μεγάλες πολυμερικές αλυσίδες από απλές μονάδες οι

οποίες καλούνται νουκλεοτίδια. Τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από τις νουκλεοβάσεις (αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη), την δεσοξυριβόζη και την φωσφορική ομάδα. Οι αυτοσυναρμολογούμενες συμπληρωματικές νουκλεοβάσεις συνδέονται μέσω δεσμών υδρογόνου και αποτελούν το εσωτερικό του μορίου του DNA ενώ η ομοιοπολική ραχοκοκαλιά αποτελείται από δεσοξυριβόζες.

Το δίκλωνο DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο πολυμερές με πυκνότητα φορτίου $-2e/0,34 \text{ nm}$ η οποία αντιστοιχεί σε δύο ηλεκτρόνια ανά ζευγάρι βάσεων. Το αρνητικό φορτίο μπορεί να αντισταθμιστεί από ανόργανα κατιόντα, αλλά επίσης και από θετικά φορτισμένα οργανικά μόρια (π.χ αμινοξέα και πολυαμίνες). Είναι εξίσου σημαντικό να υπενθυμίσουμε πως το DNA μπορεί να εμφανίζεται στο κύτταρο ή σε ένα ιϊκό καψίδιο. Όπως γνωρίζουμε το DNA είναι ένα πολύ μεγάλο μόριο το οποίο όμως έχει την εντυπωσιακή ιδιότητα να πακετάρεται σε ένα πολύ μικρό χώρο στο εσωτερικό ενός κυττάρου ή ενός ιϊκού καψιδίου. Μπορεί για παράδειγμα να συμπιεστεί 540 φορές. Στην πραγματικότητα η συμπίκνωση του DNA εκτός οργανισμού μπορεί να συμβεί αυθόρμητα με την προσθήκη χαμηλής συγκέντρωσης πολυσθενών ιόντων.



Εικόνα 2.2: Διαστάσεις της Β-μορφής του DNA

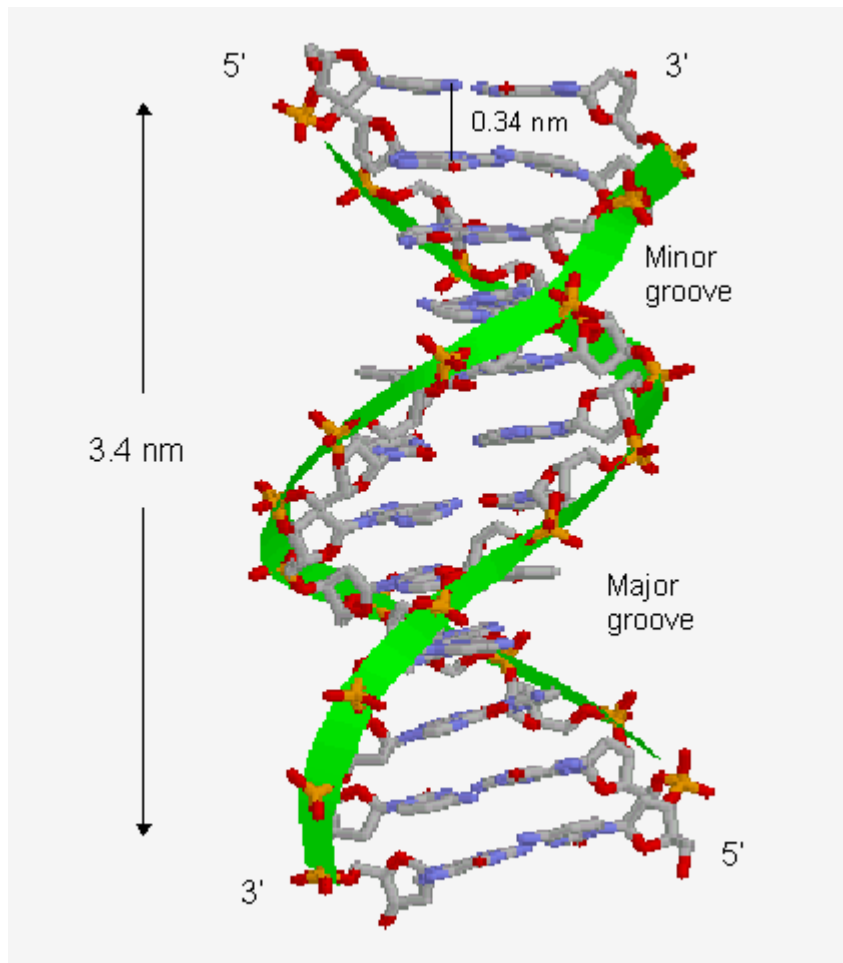
Όπως αναφέραμε και παραπάνω η παρουσία μεταλλικών ιόντων επηρεάζει σημαντικά την λειτουργία του DNA. Πολλά μεταλλικά ιόντα ελέγχουν απαραίτητες βιολογικές διεργασίες των ζωντανών οργανισμών και κατά συνέπεια χωρίς την παρουσία τους πολλές βιολογικές αντιδράσεις δεν θα λάβαιναν χώρα. Ιόντα όπως Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} είναι νευροδιαβιβαστές ενώ ο Zn^{2+} συμμετέχει στην ρύθμιση της μεταγραφής και αντιγραφής του DNA μέσω των zinc finger πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα η σύνδεση μεταλλικών ιόντων στο DNA σταθεροποιεί ή αποσταθεροποιεί την δευτεροταγή δομή του, καθώς επίσης μπορεί να αλλάξει την διαμόρφωσή του.

Θετικά φορτισμένα μεταλλικά ιόντα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με δότες/δέκτες ομάδες των νουκλεοβάσεων ή ακόμη και με αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Η σύνδεση στις υδροξυλομάδες των σακχάρων είναι εξαιρετικά σπάνιες.

Τα τελευταία 50 χρόνια οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην αλληλεπίδραση των μετάλλων μετάπτωσης με το DNA. Αυτού του είδους η αλληλεπίδραση μπορεί να οδηγήσει σε μη αντιστρεπτή βλάβη των κυττάρων ακόμη και σε απόπτωση και αυτό γιατί όταν συνδέονται στα νουκλεϊκά οξέα επηρεάζουν τα ζευγάρια των βάσεων [8].

2.5 Μορφές του DNA A, B και Z

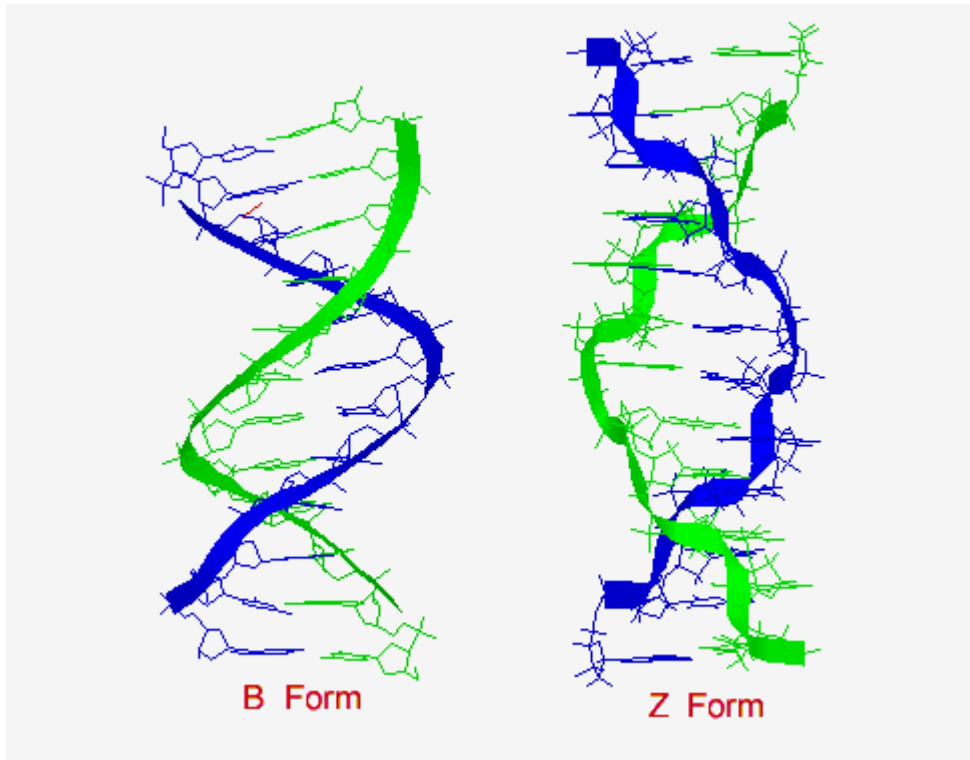
Στο μόριο του DNA, οι δύο κλώνοι δεν είναι παράλληλοι αλλά συμπλέκονται μεταξύ τους έτσι ώστε ο κάθε κλώνος μοιάζει με μία έλικα. Οι δύο κλώνοι σχηματίζουν μια διπλή έλικα, η οποία αρχικά ανακαλύφθηκε από τους James D. Watson and Francis Crick το έτος 1953. Σε αυτή την δομή, η οποία είναι γνωστή και ως B-μορφή του DNA, η έλικα κάνει μια στροφή κάθε 3.4 nm και η απόσταση ανάμεσα σε δύο γειτονικές βάσεις είναι 0.34 nm. Ως εκ τούτου υπάρχουν περίπου 10 ζεύγη βάσεων ανά στροφή. Ανάμεσα στους περιπλεγμένους κλώνους σχηματίζονται δύο αύλακες διαφορετικού πλάτους, γνωστές ως η μεγάλη αύλακα και η μικρή αύλακα, οι οποίες διευκολύνουν την σύνδεση με συγκεκριμένες πρωτεΐνες .



Εικόνα 2.3: Η κανονική δεξιόστροφη διπλή έλικα του DNA, γνωστή και ως B μορφή.

Σε ένα διάλυμα τώρα με υψηλή συγκέντρωση αλάτων ή με προσθήκη αλκοόλης, η δομή του DNA μπορεί να αλλάξει στην A μορφή. Η A-μορφή συγκριτικά με την B-μορφή έχει μια κοντόχοντρη δομή, εξακολουθεί να είναι δεξιόστροφη, αλλά κάθε 2.3 nm κάνει μια στροφή με 11 ζεύγη βάσεων σε κάθε πλήρη στροφή.

Είναι όμως δυνατή η ύπαρξη και μιας τρίτης μορφής του DNA, η Z. Η μορφή αυτή υιοθετεί μια αριστερόστροφη ελικοειδή διαμόρφωση. Επιπλέον είναι πιο επιμήκης και λεπτή με 12 ζεύγη βάσεων σε κάθε στροφή και βήμα έλικας 45 Å.

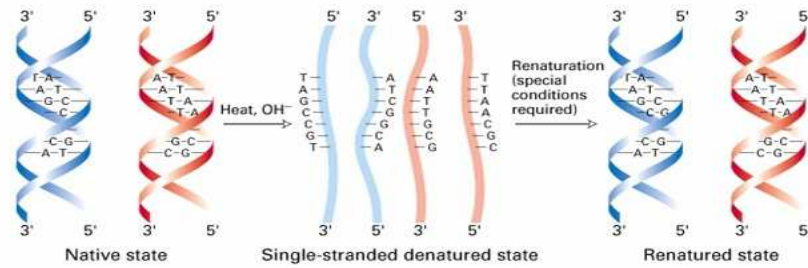


Εικόνα 2.4: Σύγκριση μεταξύ της B και Z μορφής.

Η μετάπτωση στην Z μορφή απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και εναλλασσόμενη ακολουθία γουανίνης-κυτοσίνης [9].

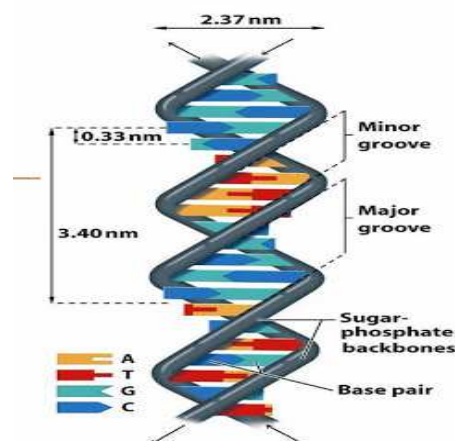
2.6 Μετουσίωση του DNA

Η μετουσίωση του DNA αναφέρεται στο ξεδίπλωμα της διπλής έλικας του DNA έτσι ώστε να δημιουργηθούν δύο μονοί κλώνοι. Αυτό προϋποθέτει το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις. Από θερμοδυναμικής άποψης, η πιο σημαντική συνεισφορά στην σταθερότητα της έλικας του DNA είναι η τοποθέτηση των βάσεων η μια πάνω στην άλλη κατά στοιβάδες. Επιπλέον, για να μετουσιωθεί το DNA, το κύριο εμπόδιο που πρέπει να ξεπερασθεί είναι οι ενέργειες «στοιβάγματος» που παρέχουν συνοχή μεταξύ των γειτονικών ζευγών βάσεων. Γενικά οι ενέργειες αυτές είναι ισχυρότερες για τα βήματα πυριμιδίνης-πουρίνης και πιο αδύναμες για τις πλούσιες σε αδενίνη-θυμίνη περιοχές. Έτσι η αλληλουχία θυμίνη-αδενίνη αναμένεται να σπάσει αρκετά εύκολα όπως και πράγματι συμβαίνει τόσο σε δοκιμαστικό σωλήνα όσο και στο εσωτερικό του κυττάρου.



Εικόνα 2.5: Μετουσίωση και επανουσίωση του DNA

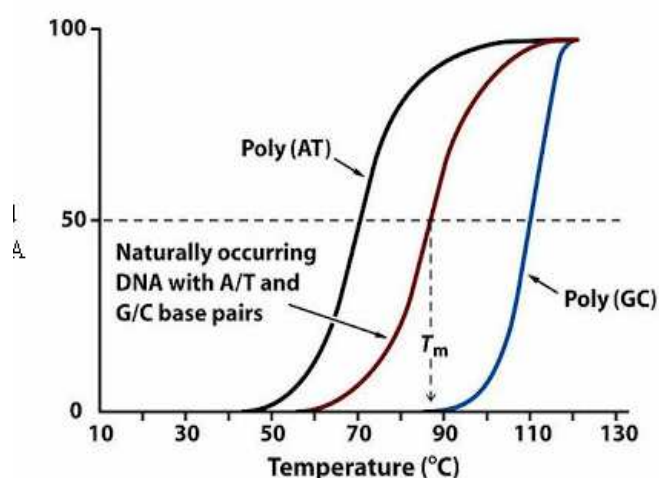
Υπάρχουν πολλοί τρόποι για να μετουσιωθεί το DNA. Ο πιο απλός τρόπος που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο είναι να θερμάνουμε το DNA πάνω από το σημείο τήξεως. Ο διαχωρισμός των ζευγών βάσεων του DNA παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά. Το DNA απορροφά ισχυρά στα 260 nm και καθώς λιώνει, η απορρόφηση θα αυξάνει έως την πλήρη τήξη του DNA οπότε η απορρόφηση θα παραμείνει σταθερή με επιπλέον θέρμανση. Η διαδικασία αυτή είναι αντιστρεπτή και ο χρόνος επανουσίωσης του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να εκτιμηθεί η σύσταση των βάσεων καθώς επίσης η παρουσία επαναλαμβανόμενων κλασμάτων μέσα στην ακολουθία. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε το 1960 για να παρακολουθήσει αλλαγές στην σύσταση των βάσεων σε DNA από διαφορετικούς οργανισμούς καθώς επίσης για να καταδείξει ότι το ευκαριωτικό DNA περιέχει ένα μεγάλο κλάσμα από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες.



Εικόνα 2.6: Η διπλή έλικα του DNA

Η πραγματική θερμοκρασία τήξης ενός δοθέντος κομματιού DNA εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι το μήκος της αλληλουχίας

του DNA (μικρότερα κομμάτια DNA λιώνουν πιο εύκολα από τα μακρύτερα), την σύσταση των βάσεων του DNA (γενικά περιοχές με εναλλασσόμενα τμήματα πυριμιδίνης πουρίνης και περιοχές πλούσιες σε αδενίνη θυμίνη λιώνουν ευκολότερα), η τοπολογική κατάσταση του DNA (π.χ εάν είναι ένας κλειστός κύκλος που είναι χαλαρός, ή υπερσπείραμα, ή ένα γραμμικό κομμάτι) καθώς επίσης και η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος (από πλευράς περιεκτικότητας αλατιού καθώς και πιο ιόν είναι παρόν). Δεδομένου των παραπάνω παραμέτρων είναι πολύ δύσκολο να προβλεφθεί η ακριβής θερμοκρασία τήξεως μιας δεδομένης ακολουθίας αν και είναι γενικά εύκολο να πούμε ποια περιοχή μέσα σε ένα μεγάλο κομμάτι του DNA θα μετουσιωθεί.



Σχήμα 2.2: Η καμπύλη θερμικής τήξης του DNA

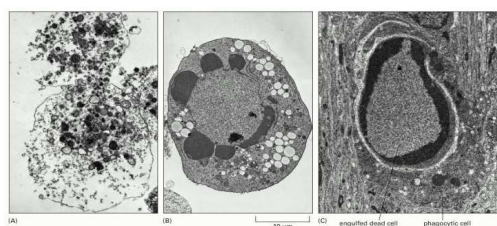
Υπάρχουν δύο τουλάχιστον βασικοί βιολογικοί λόγοι για την μετουσίωση του DNA μέσα στο κύτταρο. Η αντιγραφή και η μεταγραφή του DNA. Και στις δύο περιπτώσεις, οι πρωτεΐνες δεσμεύονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA και έπειτα ασκώντας ροπή αναγκάζουν το δίκλωνο DNA να ανοίξει σε συγκεκριμένο σημείο.

2.7 Απόπτωση-Κυτταρικός Θάνατος

Τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού είναι μέλη μιας πολύ καλά οργανωμένης κοινότητας. Ο αριθμός των κυττάρων σε αυτή την κοινότητα ρυθμίζεται όχι απλώς με έλεγχο του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης αλλά επίσης και με έλεγχο του ρυθμού του κυτταρικού θανάτου. Στην περίπτωση

που τα κύτταρα δεν είναι πλέον αναγκαία οδηγούνται σε εκουσιο θάνατο ενεργοποιώντας ένα ενδοκυτταρικό πρόγραμμα θανάτου. Αυτή η προγραμματισμένη διαδικασία καλείται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση. Το ποσοστό της απόπτωσης στους ενήλικους οργανισμούς είναι εκπληκτικό. Στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα για παράδειγμα περισσότερα από τα μισά νευρικά κύτταρα πεθαίνουν αμέσως μετά τον σχηματισμό τους. Σε έναν υγιή ενήλικα, δισεκατομμύρια κύτταρα πεθαίνουν στον μυελό των οστών και το έντερο κάθε μια ώρα. Φαίνεται εξαιρετική σπατάλη τόσα πολλά κύτταρα να πεθαίνουν ειδικά καθώς η συντριπτική τους πλειοψηφία είναι απόλυτα υγιής την στιγμή που αυτοκτονούν [10].

Τα κύτταρα τα οποία πεθαίνουν εξαιτίας μίας οξείας βλάβης διογκώνονται και έπειτα διαρύνονται. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να διοχετευθεί το περιεχόμενό τους στα γειτονικά κύτταρα οδηγώντας σε μια φλεγμονώδη αντίδραση. Αντίθετα ένα κύτταρο το οποίο υφίσταται απόπτωση πεθαίνει χωρίς να βλάψει τα γειτονικά του κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα το κύτταρο συρρικνώνεται και συμπυκνώνεται. Ο κυτταροσκελετός καταρρέει, ο πυρηνικός φάκελος αποσυναρμολογείται και το πυρηνικό DNA διασπάται σε θραύσματα. Αλλά το σημαντικότερο όλων είναι ότι η κυτταρική επιφάνεια εναλλάσσεται με αποτέλεσμα το κύτταρο που πεθαίνει να καταναλώνεται με φαγοκυτταρική δράση είτε από ένα γειτονικό κύτταρο είτε από ένα μακροφάγο, πριν από οποιαδήποτε διαρροή του εσωτερικού του περιεχομένου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα όχι μόνο να αποφευχθούν οι βλαβερές συνέπειες της νέκρωσης των κυττάρων αλλά επιτρέπει στα οργανικά συστατικά των νεκρών κυττάρων να ανακυκλωθούν από το κύτταρο που τα καταναλώνει [10].



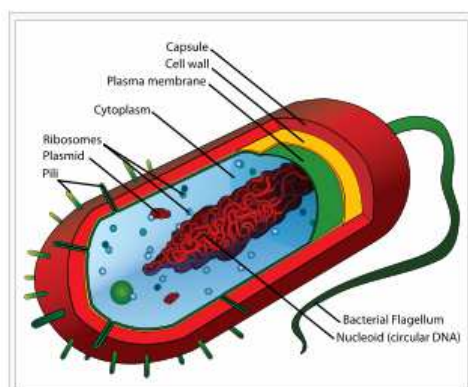
Εικόνα 2.7: Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται κύτταρα τα οποία έχουν πεθάνει Α) με νέκρωση Β) και Γ) με απόπτωση.

2.8 Προκαρυωτικοί και ευκαριωτικοί μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί χωρίζονται από άποψη κυτταρικής οργάνωσης σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- ☼ Τους προκαρυωτικούς και τους
- ☼ Ευκαριωτικούς.

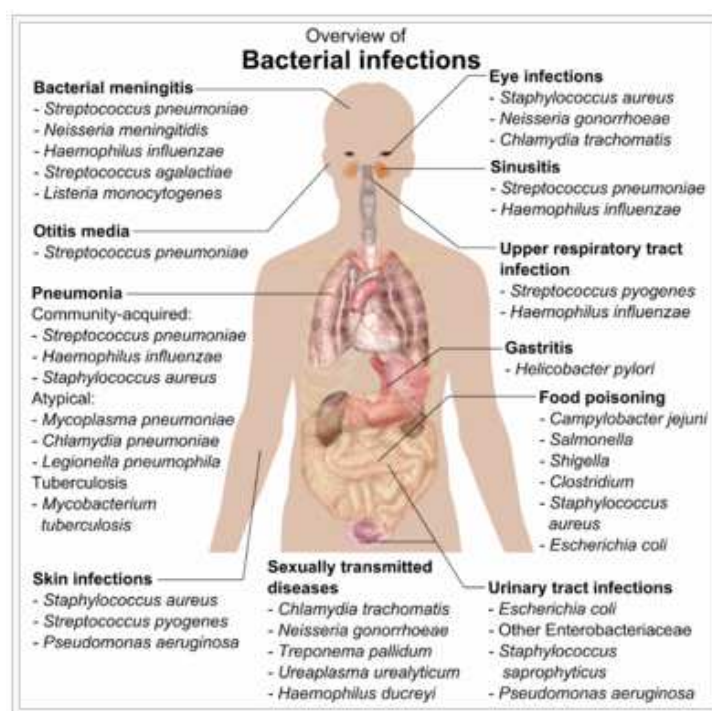
Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι μια ομάδα οργανισμών των οποίων τα κύτταρα δεν έχουν πυρήνα. Αντίθετα οι οργανισμοί των οποίων τα κύτταρα έχουν πυρήνα λέγονται ευκαρυωτικοί. Οι περισσότεροι προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι μονοκύτταροι, αν και λίγοι όπως τα μυκοβακτήρια παρουσιάζουν πολυκύτταρα στάδια στους κύκλους ζωής τους ή ακόμη δημιουργούν εκτεταμένες αποικίες όπως τα κυανοβακτήρια. Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί δεν έχουν πυρήνα, μιτοχόνδρια ή άλλα κυτταρικά οργανίδια συνδεδεμένα στην μεμβράνη. Με άλλα λόγια όλα τα ενδοκυτταρικά υδατοδιαλυτά συστατικά τους (πρωτεΐνες, DNA και μεταβολίτες) εδρεύουν όλα στην ίδια περιοχή εσώκλειστα από την κυτταρική μεμβράνη, παρά να βρίσκονται διαχωρισμένα σε διαφορετικά κυψελοειδή τμήματα. Ο διαχωρισμός ανάμεσα σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς αναπαριστά δύο διακριτά επίπεδα κυτταρικής διαίρεσης από ότι μια βιολογική ταξινόμηση των ειδών.



Εικόνα 2.8: Κυτταρική δομή ενός βακτηρίου.

Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί περιλαμβάνουν δύο μεγάλες κατηγορίες: Τα βακτήρια και τα αρχαιοβακτήρια.

Τα βακτήρια, τυπικά έχουν μήκος μόλις μερικά μικρόμετρα, το δε σχήμα τους ποικίλει από σφαιρικό, ραβδόμορφο ή σπειροειδές. Τα βακτήρια ήταν η πρώτη μορφή ζωής που εμφανίστηκε πάνω στην Γη και υπάρχουν παντού, στο έδαφος, στα νερά, στα ραδιενεργά απόβλητα ακόμη και στον εσωτερικό φλοιό της Γης. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το αποτέλεσμα μιας χρωστικής αντίδρασης που δίνουν κατά την βαφή με την μέθοδο Gram: τα Gram-θετικά και τα Gram-αρνητικά. Από άποψη σπουδαιότητας διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο μιας και πολλά από αυτά ευθύνονται για πολλές ασθένειες [11].

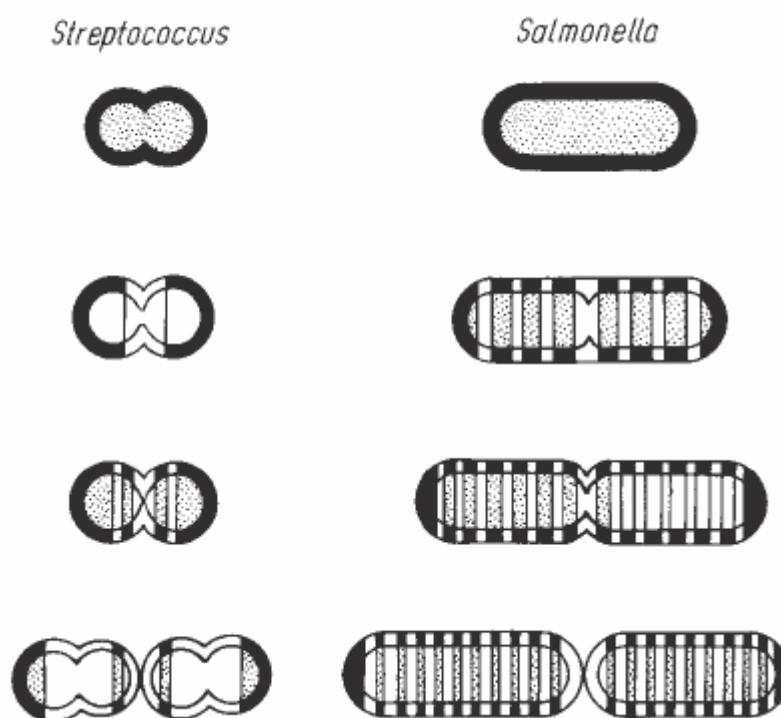


Εικόνα 2.9: Επισκόπηση των βακτηριακών μολύνσεων.

2.9 Ανάπτυξη των βακτηρίων

Τα βακτήρια αναπαράγονται με την μέθοδο της δυαδικής διάσπασης όπως φαίνεται και στο ακόλουθο σχήμα, καταλήγοντας σε δύο θυγατρικά κύτταρα ίδιου μεγέθους. Το κύτταρο αυξάνει σε μέγεθος, ενώ κατά την διάρκεια αυτή κάθε νέο κυτταρικό στοιχείο για παράδειγμα, πρωτεΐνες RNA, κ.λ.π διπλασιάζεται και το γονιδίωμα αντιγράφεται. Η κυτταρική διαίρεση ξεκινά από εσωτερική αύξηση του κυτταρικού τοιχώματος και τελικά έχουμε

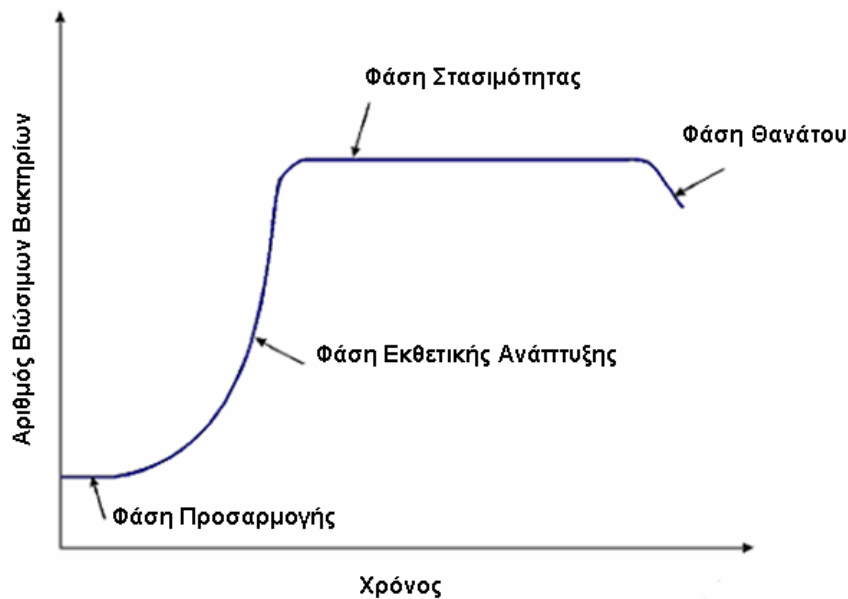
τον σχηματισμό ενός εγκάρσιου διαφράγματος. Η κυτταρική διαίρεση επέρχεται με κόψιμο του διαφράγματος οπότε και σχηματίζονται δύο θυγατρικά κύτταρα [12].



Σχήμα 2.3: Διαδικασία δυαδικής διάσπασης και δημιουργία κυτταρικού τοιχώματος σε ένα Gram-θετικό είδος *Streptococcus* και σε ένα Gram-αρνητικό είδος *Salmonella*. Οι σκουρόχρωμες περιοχές είναι το παλιό κυτταρικό τοίχωμα ενώ οι ανοιχτόχρωμες είναι το νεοσυντεθέν.

2.10 Η καμπύλη ανάπτυξης

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών γίνεται μέσω της καμπύλης ανάπτυξης. Στην περίπτωση που οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε υγρά θρεπτικά μέσα, συνήθως σε κλειστά συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας, δεν υπάρχει προσθήκη θρεπτικού μέσου με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των προϊόντων μεταβολισμού να αυξάνει συνεχώς. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών οι οποίοι πολλαπλασιάζονται συνεχώς μπορεί να παρασταθεί ως ο λογάριθμος του αριθμού των κυττάρων σε σχέση με τον χρόνο.



Σχήμα 2.4: Γραφική παράσταση τυπικής μορφής καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Η μορφή της καμπύλης που προκύπτει παρουσιάζει τέσσερις διακριτές περιοχές.

α) Φάση προσαρμογής

Κατά την διάρκεια της φάσης αυτής και ενώ οι μικροοργανισμοί προστίθενται σε νέο θρεπτικό μέσο, δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους για κάποιο χρονικό διάστημα. Το στάδιο αυτό ονομάζεται φάση προσαρμογής. Τα κύτταρα στην φάση αυτή συνθέτουν τα νέα τους συστατικά. Η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, εξαρτάται από την κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα δηλαδή στην φύση και την θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού, τον όγκο του εμβολίου κ.ο.κ. Η φάση προσαρμογής μπορεί να είναι μεγαλύτερη και αυτό συμβαίνει στην περίπτωση που το εμβόλιο που χρησιμοποιείται είναι γερασμένο ή ακόμη και όταν το θρεπτικό υλικό αποτελείται από καθαρά χημικές ενώσεις. Σε αντίθετη περίπτωση όταν το εμβόλιο προέρχεται από καλλιέργεια που βρίσκεται σε εκθετική φάση ανάπτυξης και η σύνθεση του μέσου καλλιέργειας είναι όμοια με αυτή του εμβολίου τότε η φάση προσαρμογής είναι μικρότερη σε διάρκεια.

β) Φάση εκθετικής ανάπτυξης

Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με έναν μέγιστο σταθερό ρυθμό ανάπτυξης σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα.

γ) Φάση στασιμότητας

Μετά το πέρας της εκθετικής φάσης η ανάπτυξη των κυττάρων σταματά και η καμπύλη ανάπτυξης καθίστανται παράλληλη ως προς τον οριζόντιο άξονα. Στην φάση αυτή, ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων παραμένει σταθερός με εξισορρόπηση των ρυθμών ανάπτυξης και θανάτου. Ο μικροβιακός πληθυσμός εισέρχεται στην φάση της στασιμότητας για διάφορους λόγους. Ένας προφανής λόγος είναι η έλλειψη θρεπτικών συστατικών από το μέσο καλλιέργειας ή η μείωση ενός σημαντικού θρεπτικού παράγοντα. Στις περιπτώσεις αερόβιας καλλιέργειας για παράδειγμα το διαλυμένο οξυγόνο είναι ο περιοριστικός παράγοντας της ανάπτυξης και αυτό δε διότι το οξυγόνο έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και δεν επαρκεί για να διατηρήσει την μικροβιακή καλλιέργεια σε ρυθμούς εκθετικής ανάπτυξης. Ένας εξίσου σημαντικός λόγος για να σταματήσει η ανάπτυξη είναι αυτός της συσσώρευσης τοξικών μεταβολικών προϊόντων στο μέσο ανάπτυξης.

δ) Η φάση θανάτου.

Κατά την διάρκεια της φάσης αυτής, η αύξηση των τοξικών συστατικών στο μέσο ανάπτυξης οδηγούν την καλλιέργεια στην φάση θανάτου. Ο θάνατος των κυττάρων όπως και η ανάπτυξή τους είναι λογαριθμική [13].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

3.1 Εισαγωγή

Η Ανόργανη Βιοϊατρική αποτελεί έναν ταχέως αναπτυσσόμενο τομέα της χημείας. Παρέχει την δυνατότητα για τον σχεδιασμό νέων θεραπευτικών και διαγνωστικών μέσων και για αυτό χρησιμοποιείται στην θεραπεία ασθενειών που προς το παρόν δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Τα ανόργανα στοιχεία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις βιοϊατρικές διεργασίες μιας και πολλές οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην ιατρική ενεργοποιούνται από τα μεταλλικά ιόντα.

3.2 Η δράση του χαλκού στα βιολογικά συστήματα

Ο χαλκός δείχνει μια αξιοσημείωτη βιοχημική δράση είτε ως απαραίτητο ιχνοστοιχείο είτε ως βασικό συστατικό πολλών εξωγενών ενώσεων που χορηγούνται στον άνθρωπο. Συνδέεται με τις σερουλοπλασμίνες, αλβουμίνες και άλλες πρωτεΐνες.

Ο χαλκός είναι απαραίτητο στοιχείο στον ανθρώπινο μεταβολισμό. Βρίσκεται στους ιστούς με την μορφή συμπλόκων του με οργανικούς υποκαταστάτες, όπως πρωτεΐνες και ένζυμα. Μερικά σύμπλοκα του χαλκού διευκολύνουν την αποθήκευσή του, άλλα την μεταφορά του και άλλα παίζουν σημαντικό ρόλο σε βασικές κυτταρικές και μεταβολικές διεργασίες. Μελέτες όσον αφορά τον ρόλο των συμπλόκων του χαλκού καθώς επίσης και των μηχανισμών δράσης του και των διαδικασιών στις οποίες εμπλέκεται, έχουν επιβεβαιώσει, ότι ο χαλκός ευθύνεται για την αποκατάσταση αρκετών ασθενειών. Όπως θα δούμε και στην συνέχεια το κλειδί για την αποτελεσματική χρήση του χαλκού σαν φάρμακο, είναι υπό την μορφή ανόργανων ενώσεων ή μέταλλο οργανικών ενώσεων του ή χηλικών του συμπλοκων. Το βασικό πλεονέκτημα των χηλικών συμπλόκων είναι ότι μπορούν λόγω της σταθερότητας και της διαλυτότητας τους να διαπεράσουν το εντερικό τοίχωμα και έτσι να περάσουν στο κυρίως ρεύμα ροής των θρεπτικών συστατικών [15].

Το πρόσφατο ενδιαφέρον που εκδηλώθηκε για τα σύμπλοκα του χαλκού απορρέει από το ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακά, αντιϊικά, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινικά φάρμακα, επιπλέον ως αναστολείς ενζύμων ή ως χημικές νουκλεάσες ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Πολυάριθμα είναι τα σύμπλοκα του χαλκού με το NSAIDS τα οποία δείχνουν βελτιωμένη αντιφλεγμονώδη δράση καθώς και δράση ενάντια στο έλκος σε συνδυασμό πάντα με ελαττωμένη τοξικότητα σε σύγκριση με το ελεύθερο φάρμακο. Αποτελούν δε, μια τάξη αντιφλεγμονωδών φαρμάκων με μειωμένες παρενέργειες ενώ ένας τρόπος δράσης τους έγκειται στο ότι μπορούν να μιμηθούν την δράση του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD). Άλλες μελέτες έχουν εστιαστεί τόσο στις χημειοθεραπευτικές ιδιότητες των συμπλόκων ενώσεων του χαλκού όσο και στις αντιβακτηριακές. Για παράδειγμα βρέθηκε πως η μολυσματικότητα του ιού influenza ελαττώθηκε μετά την έκθεση του σε επιφάνειες χαλκού [14].

3.3 Θεραπευτική δράση των συμπλόκων του χαλκού έναντι του έλκους και των πληγών.

Έχει αποδειχθεί ότι τα σύμπλοκα του χαλκού, αυξάνουν σημαντικά το ποσοστό επούλωσης πληγών γενικά άλλα και του έλκους ειδικότερα. Είναι γεγονός, η θεραπεία του γαστρικού έλκους από σύμπλοκα του χαλκού σε διάστημα πέντε μόλις ημερών, σε σύγκριση με άλλα φάρμακα. Περαιτέρω έχει αποδειχθεί π.χ ότι ενώ τα μη στερεοειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως είναι το ιμبوπροφέν (ibuprofen) και το ενεφεναμικό οξύ (enfenamic acid), καταστέλλουν την επούλωση των πληγών, τα σύμπλοκα του χαλκού με τα αντίστοιχα φάρμακα προωθούν την επούλωση των πληγών ενώ παράλληλα διατηρούν την αντιφλεγμονώδη δράση τους [15].

3.4 Αντιεπιληπτική δράση των συμπλόκων του χαλκού.

Ο εγκέφαλος περιέχει τον περισσότερο χαλκό από οποιοδήποτε άλλο όργανο του ανθρώπινου σώματος, εκτός από το συκώτι. Το παραπάνω γεγονός, υποδηλώνει ότι ο χαλκός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην

λειτουργία του εγκεφάλου. Επιπρόσθετη απόδειξη του ρόλου του χαλκού στην λειτουργία του εγκεφάλου, αποτελεί το ότι η παρατεταμένη κατανάλωση τροφών οι οποίες είναι ελλιπείς σε χαλκό οδήγησε σε επιληπτικές κρίσεις τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα. Στη συνέχεια ανακαλύφθηκε ότι οργανικές ενώσεις οι οποίες δεν έχουν από μόνες τους αντι-επιληπτική δράση, όταν συμπλεχθούν με τον χαλκό παρουσιάζουν σπασμολυτική δράση. Βρέθηκε δε, ότι τα σύμπλοκα του χαλκού σε σύγκριση με όλα τα αντι-επιληπτικά φάρμακα, είναι περισσότερο αποτελεσματικά και συνάμα λιγότερο τοξικά από ότι τα αντίστοιχα φάρμακα-υποκαταστάτες [15].

3.5 Προστασία και αποκατάσταση από την ακτινοβολία με σύμπλοκα του χαλκού.

Ιοντίζουσα ακτινοβολία, όπως είναι αυτή που χρησιμοποιείται στην θεραπεία του καρκίνου, έχει αποδειχθεί ότι καταστρέφει τα κύτταρα. Στην καλύτερη περίπτωση η ακτινοβολία αυτή προκαλεί τραυματισμό ο οποίος μπορεί να βελτιωθεί από μηχανισμούς χημικής επανόρθωσης του ανθρώπινου οργανισμού. Έτσι απαιτούνται φαρμακολογικές εφαρμογές για την αποκατάσταση των κατεστραμμένων ιστών από την ακτινοβολία. Ήδη από το 1984, ανακαλύφθηκε ότι σύμπλοκα του χαλκού με οργανικούς υποκαταστάτες παρέχουν προστασία από τις ακτινοβολίες ενώ παράλληλα συντελούν στην αποκατάσταση των βλαβών που προκλήθηκαν στους ιστούς. Ο μηχανισμός της εν λόγω δράσης φαίνεται να συνδέεται με την δυνατότητα των συμπλόκων του χαλκού να απενεργοποιούν υπεροξειδία ή τις ελεύθερες ρίζες που ελευθερώνονται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία. Επιπλέον, δεδομένου ότι η ακτινοβολία έχει την ικανότητα να σπάζει τους δεσμούς των φυσικά απαντώμενων ενζύμων του χαλκού στο σώμα, η συμπλήρωση αυτών με μη τοξικές δόσεις φαρμακευτικών συμπλόκων του χαλκού επαναφέρει την χαμένη ικανότητα επανόρθωσης του ιστού. Το γεγονός ότι τα σύμπλοκα αυτά παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση, προτείνεται να χρησιμοποιηθούν τα συμπλόκα αυτά για την θεραπεία του καρκίνου, και ειδικότερα σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία ιοντίζουσας ακτινοβολίας [20].

3.6 Καρδιακές παθήσεις και σύμπλοκα του χαλκού.

Πολυάριθμες είναι οι μελέτες οι οποίες εστιάζει την προσοχή τους στην σχέση μεταξύ έλλειψης χαλκού και καρδιακών παθήσεων. Πρώτα παρατηρήθηκε σε αρουραίους το έτος 1936, σήμερα αυτό έχει αποδοθεί σε έναν συνδυασμό ανεπάρκειας χαλκού και διατάραξης της ισορροπίας στην σχέση χαλκού-ψευδαργύρου στον ανθρώπινο οργανισμό. Έρευνα του δρ. Klevay από το κέντρο Ανθρώπινων Ερευνών (Human research Center) το 1973 οδήγησε στην διαπίστωση ότι ο χαλκός επιδρά και στον έλεγχο της χοληστερόλης. Συνεχίζοντας την ερευνά του στην εργασία που δημοσιεύθηκε το έτος 1975, θεώρησε ότι μια μεταβολική ανισορροπία μεταξύ ψευδαργύρου και χαλκού, οδηγεί στην δημιουργία στεφανιαίας νόσου [15].

3.7 Αντικαρκινική δράση των συμπλόκων του χαλκού.

Ήδη από το 1912, ασθενείς στην Γερμανία υποβλήθηκαν σε θεραπεία για επιθυλίωμα του προσώπου με ένα μίγμα από χλωριούχο χαλκό και λεκιθίνη. Η επιτυχία αυτής της θεραπείας υποδήλωσε ότι τα σύμπλοκα του χαλκού παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση. Έρευνα του Πανεπιστημίου του Λίβερπουλ από το 1913 έδειξε ότι υποδόριες και ενδοφλέβιες ενέσεις αλάτων του χαλκού καθώς και κολλοειδούς χαλκού, μαλάκωναν και εκφύλιζαν καρκινώματα που είχαν μεταμοσχευθεί σε ποντίκια. Πρόσφατη έρευνα στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής έδειξαν ότι πράγματι, η θεραπεία στερεών όγκων με μη τοξικές δόσεις οργανικών συμπλόκων του χαλκού ελάττωσαν την ανάπτυξη όγκων καθώς και την μετάσταση με άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού επιβίωσης. Στην πραγματικότητα αυτά τα σύμπλοκα του χαλκού δεν σκότωναν τα καρκινικά κύτταρα άλλα επιβράδυναν τον πολλαπλασιασμό τους [15].

Αρκετά είναι και τα σύμπλοκα των κινολονών τα οποία παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αντικαρκινική δράση. Η σύμπλεξη με μέταλλα παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην αντικαρκινική δράση των κινολονών. Οι E. Ευθυμιάδου και οι συνεργάτες της παρουσίασαν το έτος 2008 την αντικαρκινική δράση δύο νέων συμπλόκων του χαλκού με την κινολόνη σπαρφλοξασίνη (sparfloxacin) έναντι ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων της σειράς HL-60. Τα αποτελέσματα παρουσίαζαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον μιας και έδειξαν ότι τα

σύμπλοκα αυτά προκαλούσαν μείωση της επιβίωσης των κυττάρων κατά ένα χρονοεξαρτώμενο τρόπο [16]. Ο Padhye και οι συνεργάτες του περιέγραψαν ένα διμερές σύμπλοκο της σπαρλοφλοξασίνης με σπουδαία αντικαρκινική δράση έναντι της σειράς BT20 (καρκινικών κυττάρων του μαστού). Οι Li και οι συνεργάτες του εξέτασαν την αντικαρκινική δράση των τετραμερών συμπλόκων του χαλκού με οφλοξασίνη και λεβοφλοξασίνη αντίστοιχα έναντι της σειράς HL-60 (καρκινικά κύτταρα με οξεία μυελοειδή λευχαιμία) [17].

3.8 Αντιβακτηριακή-Αντιμικροβιακή δράση των συμπλόκων του χαλκού.

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα του χαλκού με τις κινολόνες περιλαμβάνουν είτε καθαρές κινολόνες ή συνδυασμό αυτών με άλλα φάρμακα. Οι E. Ευθυμιάδου και οι συνεργάτες της ανέφεραν το 2006 την σύνθεση και αντιβακτηριακή δράση τόσο του μονοπυρηνικού συμπλόκου του χαλκού με την κινόλη σπαρφλοξασίνη όσο και την σύνθεση και μέλετη της αντιμικροβιακής δράσης συμπλόκων του χαλκού με τις κινολόνες οξολινικό οξύ (oxolinic acid) και ερνοφλοξασίνη (ernofloxacin) παρουσία των ετερουποκαταστατών 2.2'-διπυριδίνη (2.2'-bipyridine) και 1.10-φαινανθρολίνη (1.10-phenanthroline) [18,19]. Δύο χρόνια μετά, η ίδια ερευνητική ομάδα παρουσιάζει την σύνθεση και μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης τριών νέων μονοπυρηνικών συμπλόκων του χαλκού με το αντιβακτηριακό φάρμακο σπαρφλοξασίνη (sparfloxacin), παρουσία των ετερουποκαταστατών 2.2'-διπυριδίνης και 1.10-φαινανθρολίνης [20]. Ένας άλλος σημαντικός υποκαταστάτης που σχηματίζει αντιμικροβιακά σύμπλοκα με τον χαλκό είναι η λεβοφλοξασίνη (levofloxacin) [21].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

4.1 Ο Ψευδάργυρος-Εισαγωγή

Ο ψευδάργυρος είναι το 23^ο πιο άφθονο στοιχείο που απαντάται στον στερεό φλοιό της Γης ενώ είναι το δεύτερο μέταλλο στον ανθρώπινο οργανισμό μετά τον σίδηρο και το τέταρτο σε σειρά περισσότερο χρησιμοποιούμενο μέταλλο στον κόσμο μετά τον σίδηρο, το αλουμίνιο και τον χαλκό. Ο ψευδάργυρος είναι γνωστός από την εποχή των αρχαίων Αιγυπτίων, όπου χρησιμοποιούνταν για την επούλωση τραυμάτων, με την μορφή του οξειδίου του ψευδαργύρου. Στην Δύση, η ανακάλυψη του ψευδαργύρου έγινε από τον Γερμανό χημικό Andrea Marggraf [22].

Ο ψευδάργυρος βρίσκεται σε όλους τους βιολογικούς οργανισμούς, και έχει ρόλο καταλυτικό, δομικό και ρυθμιστικό. Απαιράιτητο για την δράση περισσότερων των 300 ένζυμων, τα οποία εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένου και του νευρικού κεντρικού συστήματος αλλά και σαν δομικό στοιχείο των ειδικού τύπου πρωτεϊνών (zinc finger) που ρυθμίζουν την μεταγραφή του DNA. Συνεπώς ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος σε ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών και ανοσολογικών λειτουργιών [26]. Επιπρόσθετα, ο ψευδάργυρος βρίσκεται σε όλους τους ιστούς και τα υγρά των ιστών. Σε έναν άνθρωπο μέσου βάρους 70 κιλών, η συνολική ποσότητα ψευδαργύρου υπολογίζεται να είναι 2,3 g καθιστώντας τον έτσι ως το πιο διαδεδομένο στοιχείο που βρέθηκε ποτέ σε ιστό. Πάνω από το 75% του ψευδαργύρου βρίσκεται στους σκελετικούς μυς και στα κόκαλα. Επιπρόσθετα, ο ψευδάργυρος είναι το μόνο στοιχείο εκτός από τον σίδηρο για τον οποίο έχουν θεσπιστεί θρεπτικές απαιτήσεις [22].

Σε περίπτωση ανεπάρκειας ψευδαργύρου, εμφανίζονται πολλαπλές διαταραχές όπως μειωμένη ανάπτυξη, ανωμαλίες στο ανοσολογικό σύστημα, δερματίτιδα, διάρροια, καθυστερημένη σεξουαλική ωρίμανση καθώς και καθυστερημένη ανάπτυξη των οστών, εξασθενημένη οξύτητα γεύσης και αλλαγές στην συμπεριφορά.

4.2 Ο Ψευδάργυρος στα βιολογικά συστήματα

Ο Ψευδάργυρος βρίσκεται στους περισσότερους ιστούς του ανθρώπινου σώματος με μεγαλύτερη αναλογία στο πάγκρεας, ακολουθεί το συκώτι και τα οστά. Σε μοριακό επίπεδο ο ψευδάργυρος είναι πολύ σημαντικός εφόσον είναι απαραίτητος σε περισσότερες από 300 ενζυμικές αντιδράσεις και αποτελεί τμήμα περισσότερων από 2000 παραγόντων αντιγραφής και άλλων πρωτεϊνών. Βρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων, στον πυρηνίσκο, και στα χρωμοσώματα. Παίζει ζωτικό ρόλο στην σύνθεση του DNA και του RNA, διαμέσου των μεταλλοενζύμων του ψευδαργύρου, όπως οι RNA πολυμεράσες, οι αντίστροφες μεταγραφάσες και ο μεταγραφικός παράγοντας ΙΙΑ. Επιπροσθέτως έχει σταθεροποιητικό ρόλο στην δομή του DNA, του RNA και των ριβοσωμάτων. Ο ψευδάργυρος σχηματίζει συγκεκριμένες δομές με τα μεταλλοένζυμα. Η πιο κοινή είναι οι ειδικού τύπου πρωτεΐνες (zinc finger) στην οποία ο ψευδάργυρος σχηματίζει έναν βρόγχο στην πολυπεπτιδική αλυσίδα δημιουργώντας μια γέφυρα ανάμεσα στα κατάλοιπα κυστεΐνης και ιστιδίνης. Η Zinc finger περιοχή σε αυτά τα ένζυμα βρέθηκε να είναι απαραίτητη για την σύνδεση των ευκαριωτικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε ειδική αλληλουχία του DNA. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι οι ειδικού τύπου πρωτεΐνες (zinc finger) προσδένονται στο RNA καθώς και ότι εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνη.

Ο έλεγχος της ομοιόστασης του ψευδαργύρου πραγματοποιείται από πρωτεΐνες όπως η μεταλλοθειονίνη. Οι μεταλλοθειονίνες είναι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, πλούσιες σε κυστεΐνη, και με μεγάλη χημική συγγένεια για δισθενή βαρέα μέταλλα όπως ο ψευδάργυρος, ο λευκόχρυσος, ο υδράργυρος και το κάδμιο. Βρίσκονται κυρίως στο συκώτι στο πάγκρεας και στα νεφρά και προστατεύουν τα κύτταρα και τους ιστούς από τα βαρέα μέταλλα. Επίσης προστατεύουν τα κύτταρα έναντι των ελεύθερων ριζών, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες οδηγώντας σε κυτταρική απόπτωση. Οι μεταλλοθειονίνες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση καθώς και στην εναλλαγή μετάλλων με ένζυμα εξαρτημένα από τον ψευδάργυρο, όπως είναι η καρβονική ανυδράση. Έτσι η καρβονική ανυδράση και κατά συνέπεια ο ψευδάργυρος εμπλέκονται σε ζωτικές διεργασίες όπως η αναπνοή, η

μεταφορά διοξειδίου του άνθρακα, διτανθρακικού ανάμεσα στους πνεύμονες και τους ιστούς, στο pH και στην ισορροπία διοξειδίου του άνθρακα και τέλος στην γλυκογένεση και λιπογένεση.

Εκτός από τις μεταλλοθειονίνες υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στην ρύθμιση των επιπέδων του ψευδαργύρου στα κύτταρα όπως οι Zn²⁺ και οι Zn²⁺. Οι Zn²⁺ μεταφέρουν τον ψευδάργυρο είτε μέσα στην κοιλότητα των ενδοκυτταρικών οργανιδίων είτε στο εξωτερικό των κυττάρων ενώ οι Zn²⁺ μεταφέρουν τον εξωκυτταρικό ψευδάργυρο στο κυτταρόπλασμα. Αξιοσημείωτος είναι και ο ρόλος των ZnT8 οι οποίες μεταφέρουν τον ψευδάργυρο από το κυτταρόπλασμα στα κυστίδια. Σε μια γονιδιακή μελέτη αναφέρεται ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην τελευταία πρωτεΐνη και στον διαβήτη τύπου 2 ενώ σε άλλες δημοσιεύσεις αναφέρεται ότι δυσλειτουργία αυτής της πρωτεΐνης παρεμποδίζει την έκκριση της ινσουλίνης σε διαβητικά ποντίκια [25].

4.3 Ψευδάργυρος και διαβήτης

Τα επίπεδα του κυτταρικού ψευδαργύρου ρυθμίζονται με μεγάλη ακρίβεια και οι διαταραχές στην ομοιόσταση του ψευδαργύρου έχουν συσχετισθεί με σακχαρώδη διαβήτη, μια ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, αποτέλεσμα της μειωμένης έκκρισης (διαβήτης τύπου I) ή μειωμένης δράσης (διαβήτης τύπου II) της ινσουλίνης. Η δυσλειτουργία του ομοιοστατικού μεταβολισμού του ψευδαργύρου μέσα στο πάγκρεας, διαταράσσει έναν μεγάλο αριθμό διαδικασιών συμπεριλαμβανομένου και του γλυκαιμικού ελέγχου. Έτσι η δυσλειτουργία της ομοιόστασης του ψευδαργύρου τόσο συστηματικά όσο και στο πάγκρεας διαδραματίζει έναν περίπλοκο ρόλο στην παθολογία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και 2. Η ανεπάρκεια ψευδαργύρου παρακινεί υπεργλυκαιμία και υπερινσουλιναιμία, οδηγώντας στο συμπέρασμα της άμεσης εμπλοκής του ψευδαργύρου στην ρύθμιση της γλυκόζης. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι ο ψευδάργυρος αποθηκεύεται αλλά και εκκρίνεται στο πάγκρεας μαζί με την ινσουλίνη, οδήγησε τους επιστήμονες να μελετήσουν την αντιδιαβητική και ινσουλινομιμητική δράση του ψευδαργύρου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

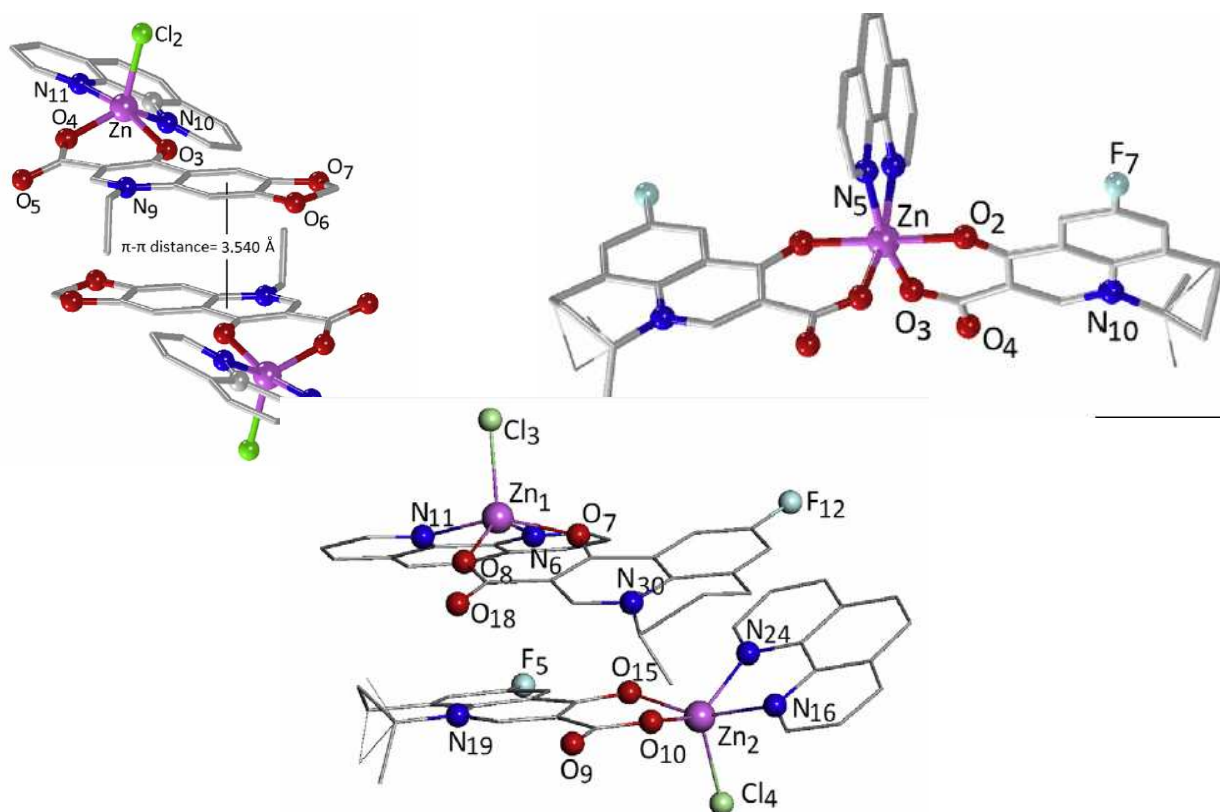
Έτσι λοιπόν η πρώτη αναφορά που δημοσιεύτηκε το 1980 έδειξε ότι ο ψευδάργυρος μπορεί να μιμηθεί την ινσουλίνη [25].

4.4 Ψευδάργυρος και κινολόνες

Ο ρόλος του ψευδαργύρου στα βιολογικά συστήματα είναι αρκετά σημαντικός, μιας και αποτελεί το κύριο ρυθμιστικό ιόν στον μεταβολισμό των κυττάρων και συμμετέχει σε πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες. Στην βιβλιογραφία γίνεται λόγος για διάφορα σύμπλοκα του ψευδαργύρου με υποκαταστάτες με αξιοσημείωτη βιολογική δράση. Πιο συγκεκριμένα σύμπλοκα του ψευδαργύρου με διάφορα φάρμακα, χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του Αλτςχάϊμερ, ως αντιδιαβητικά, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακά και αντικαρκινικά [25α].

Οι κινολόνες από την άλλη πλευρά χρησιμοποιούνται για την θεραπεία πολλών λοιμώξεων, μιας και δρουν σαν αντιβακτηριακά φάρμακα, τα οποία αναστέλλουν αποτελεσματικά την αντιγραφή του DNA των βακτηρίων. Αρκετά είναι τα σύμπλοκα του ψευδαργύρου με κινολόνες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία: Χαρακτηριστικά αναφέρουμε τα ακόλουθα: Το 2007 η Ε. Ευθυμιάδου και οι συνεργάτες της, συνέθεσαν και μελέτησαν την αντιμικροβιακή δράση, έναντι τριων διαφορετικών μικροοργανισμών, συμπλόκων του ψευδαργύρου με την κινολόνη νορβλοξασίνη (norfloxacin). [24] Το 2009 η Α. Ταρούση και οι συνεργάτες της μελέτησαν την βιολογική δράση μονοπυρηνικών συμπλόκων του ψευδαργύρου με την κινολόνη οξολινικό οξύ (oxolinic acid), παρουσία και απουσία ετεροκυκλικών υποκαταστατών όπως η διπυριδίνη (2.2'-bipyridine) και η φαινανθρολίνη (1.10-phenanthroline) [25β]. Την επόμενη χρονιά η ίδια ερευνητική ομάδα παρουσιάζει την σύνθεση μονοπυρηνικών συμπλόκων του ψευδαργύρου με την κινολόνη δεύτερης γενεάς ερνοφλοξασίνη (ernofloxacin), παρουσία και πάλι ετεροκυκλικών υποκαταστατών όπως η διπυριδίνη και η φαινανθρολίνη. Η βιολογική δράση των συμπλόκων αυτών αξιολογήθηκε από την ικανότητα τους να δεσμεύονται στο θύμου αδένα μόσχου (Ct-DNA) [26]. Την ίδια χρονική περίοδο στο Πανεπιστήμιο Sardar Patel στην Ινδία, ο Patel και οι συνεργάτες του μελέτησαν την σύνθεση και την βιολογική δράση συμπλόκων του ψευδαργύρου με την δεύτερης γενεάς κινολόνη σιπροφλοξασίνη

(ciprofloxacin). Επιπρόσθετα μελέτησαν και την ικανότητα δέσμευσης των συμπλόκων αυτών στο DNA καθώς και τα χαρακτηριστικά διάσπασης τους. Με την πάροδο των χρόνων η μέλετη των συμπλόκων του ψευδαργύρου με υποκαταστάτες κινολόνες επεκτάθηκε ακόμη περισσότερο [27,28]. Έτσι το 2013 η Α. Ταρούση και οι συνεργάτες της μελετούν την αλληλεπίδραση ισομοριακών ποσοτήτων χλωριούχου ψευδαργύρου με τα αντιβακτηριακά φάρμακα φλουμεκίνη (flumequine), οξολινικό οξύ (oxolinic acid) και ερνοφλοξασίνη (ernofloxacin) απουσία και παρουσία ετεροκυκλικών δοτών αζώτου όπως η διπυριδίνη (2.2'-bipyridine) και η φαινανθρολίνη (1.10-phenanthroline) [33]. Όλα τα προαναφερθέντα σύμπλοκα εμφανίζουν σημαντική τάση σύνδεσης με τις ανθρώπινες πρωτεΐνες και δείχνουν υψηλές σταθερές σύνδεσης, ενώ παράλληλα παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση έναντι πέντε διαφορετικών μικροοργανισμών.



Σχήμα 4.1: Δομή του συμπλόκου $[Zn(oxo)(phen)Cl]MeOH$ (πάνω αριστερά), $[Zn(flmq)_2(phen)]2 MeOH$ (πάνω δεξιά), $[Zn(flmq)(phen)Cl]$ (κέντρο)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

5.1 Αντιδραστήρια-Πρώτες Ύλες

Η φθοροκινολόνη λεβοφλοξασίνη (Levofloxacin) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich όπως επίσης και η 1.10-φαινανθρολίνη (1.10-phenanthroline) και η 2.2'-διπυριδίνη (2.2'-dipyridine). Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε μαγνητική ανάδευση. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε γυάλινα σκεύη, τα οποία είχαν απαλλαγεί από την υγρασία, σε προθερμαινόμενο φούρνο στους 100°C .

5.2 Μικροσυσκείες

Ζυγός: Για τις ζυγίσεις χρησιμοποιήθηκε ζυγός Acculab με ακρίβεια 4^{ου} δεκαδικού.

Δευτερωμένοι διαλύτες: Οι δευτερωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας 99.95%.

Κυψελίδες: Οι κυψελίδες που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ηλεκτρονικών φασμάτων ήταν guarzglas Spectrosil, κατάλληλης κάθε φορά οπτικής διαδρομής.

Πιπέτες: Για την προσθήκη διαλυτών συγκεκριμένου όγκου χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες ακριβείας Laborette των 100μl.

5.3 Πειραματικές μέθοδοι χαρακτηρισμού δομής

Οι στοιχειακές αναλύσεις C, N, και H πραγματοποιήθηκαν σε στοιχειακό αναλυτή Perkin-Elmer 240B.

Τα φάσματα υπερύθρου ελήφθησαν στην περιοχή 4000-200 cm⁻¹ σε φασματοφωτόμετρο a Perkin Elmer 880. Όλα τα φάσματα ελήφθησαν σε μορφή δισκίου με KBr.

Τα ηλεκτρονικά φάσματα των διαλυμάτων των συμπλόκων σε H₂O, DMSO, ΜΕΟΗ σε συγκεντρώσεις 1*10⁻³-10⁻⁵ Μ ελήφθησαν σε

φασματοφωτόμετρο Cary 3E με χρήση κυψελίδας κατάλληλης κάθε φοράς οπτικής διαδρομής.

Τα φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) ελήφθησαν σε φασματοφωτομετρο Bruker ER 200D εφοδιασμένο με σύστημα ελέγχου μεταβλητών θερμοκρασιών με κρουστάτη Oxford instruments ESR900 και μετρητή συχνότητας μικροκυμάτων Anritsu.

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ελήφθησαν σε φασματόμετρο Bruker Avance 500MHz σε διάλυμα.

Τα φάσματα θερμικής ανάλυσης (TGA) ελήφθησαν σε όργανο Mettler Star^e SW9.30.

Η αντιμικροβιακή δράση των συμπλόκων εξετάστηκε ως προς την αναστολή ανάπτυξης των μικροοργανισμών *E.Coli*, *Staphylococcus Aureus* και *Pseudomonas Aurugenosa* στο μέσο καλλιέργειας MMS και LB. Οι δοκιμές εκτελέστηκαν για τον προσδιορισμό της ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής MIC (=minimum inhibitory concentration) σε $\mu\text{g/ml}$. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκεντρώσεις 1600, 800, 400, 200, 100, 50 και προσδιορίστηκε η MIC για κάθε σύμπλοκη ένωση.

5.4 Καλλιέργειες κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές MCF-7. Οι συνθήκες ανάπτυξης εξαρτώνται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της κάθε σειράς.

A:Υλικά κυτταροκαλλιεργειών.

- ☼ Θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης κυττάρων: DMEM εμπλουτισμένο με 2mM γλουταμίνης, 0.85 g/L NaHCO_3 , 25mM HEPES, 10% FBS , $6.8 < \text{pH} < 7.2$.
- ☼ Διάλυμα διαχωρισμού κυττάρων: 0.02% EDTA, 0.2% w/v στρεπτομυκίνη και $2 \cdot 10^3$ U/ml πενικιλίνη σε PBS. Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση και τον διαχωρισμό των μονόστιβων καλλιεργειών.

B: Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Εναιωρήματα

- ⊗ Αραίωση της καλλιέργειας με φρέσκο θρεπτικό διάλυμα, σε τελική συγκέντρωση $2-4 \cdot 10^5$ κύτταρα/ml, ανάλογα με την κυτταρική σειρά και διατήρησή τους στους 37°C .

Γ. Μονοστίβες

- ⊗ Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από την καλλιέργεια.
- ⊗ Προσθήκη διαλύματος διαχωρισμού κυττάρων (4ml/φιάλη 75 cm^3) και επώαση στους 37°C για 4 λεπτά.
- ⊗ Απομάκρυνση του διαλύματος.
- ⊗ Προσθήκη εκ νέου 0.4 ml διαλύματος διαχωρισμού κυττάρων και επώαση στους 37°C για 15-20 λεπτά, προκειμένου να γίνει αποκόλληση του ταπητίου και διαχωρισμός των κυττάρων.
- ⊗ Προσθήκη θρεπτικού διαλύματος DMEM και ανάπτυξη των κυττάρων στους 37°C .

Δ. Διατήρηση κυττάρων σε υγρό άζωτο.

Οι κυτταρικές σειρές μπορούν να υποστούν ανεξέλεγκτες αλλαγές που αφορούν τόσο την μορφολογία τους, την ανάπτυξη, την ζωτικότητα και τον καρύοτυπο τους λόγω παρατεταμένων ανακαλλιιεργειών ή τυχόν άτυχων επιμολύνσεων. Ο κίνδυνος αυτός αποφεύγεται με την δημιουργία μιας ανανεώσιμης τράπεζας κυτταρικών σειρών, μετά από ψύξη των κυττάρων και διατήρηση τους σε υγρό άζωτο για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Σε ψύξη οδηγούνται τα κύτταρα που βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Η μεθοδολογία που ακολουθείται συνοψίζεται páρακάτω:

- ⊗ Εμφύτευση κυττάρων σε συγκέντρωση $4 \cdot 10^5$ κύτταρα/ml.
- ⊗ Σε 48 ώρες, όπου τα κύτταρα βρίσκονται στην ολοκλήρωση της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, φυγοκέντρωση σε 1000rpm για 5 λεπτά.
- ⊗ Επαναδιάλυση των κυττάρων σε DMEM παρουσία 20% FBS και 10% DMSO (που λειτουργεί ως κρυπροστατευτική ουσία) σε τελική συγκέντρωση $4 \cdot 10^6 - 10 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml.
- ⊗ Μεταφορά σε αμπούλες οι οποίες στη συνέχεια υφίστανται βαθμιαία κατάψυξη, έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων στο εσωτερικό των κυττάρων και συνεπώς κυτταρική λύση.
- ⊗ Τέλος τοποθετούνται σε υγρό άζωτο για αρκετά χρόνια.

Z. Επαναφορά τώρα των κυττάρων που ήταν αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο, σε τρέχουσα καλλιέργεια.

- ⊗ Γρήγορη απόψυξη της αμπούλας στους 37 °C.
- ⊗ Φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του κρυοπροστατευτικού DMSO

Υλικού από την καλλιέργεια. Η γρήγορη απομάκρυνση του DMSO είναι πολύ σημαντική διότι δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και σε ορισμένες περιπτώσεις ενεργοποιεί την διαφοροποίηση, την απόπτωση ή ακόμα και την νέκρωση ανάλογα βέβαια με τον κυτταρικό τύπο.

- ⊗ Επαναδιάλυση των κυττάρων σε θρεπτικό διάλυμα και ανάπτυξη των καλλιεργειών στους 37 °C.
- ⊗ Συχνές ανακαλλιέργειες των κυττάρων στην αρχή είναι απαραίτητες για την πλήρη επαναφορά του φυσιολογικού ρυθμού ανάπτυξης της καλλιέργειας.

5.5 Διερεύνηση της επιβίωσης των κυττάρων

Η διερεύνηση της ζωτικότητας των κυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη και αναγκαία προϋπόθεση σε περιπτώσεις μελέτης της κυτταροστατικής και κυτταροτοξικής δράσης φαρμάκων. Πραγματοποιείται προσδιορίζοντας ζωτικής σημασίας λειτουργίες των κυττάρων.

Ζωτικότητα των κυττάρων

Η ζωτικότητα των κυττάρων αναφέρεται στο ποσοστό των υγιών κυττάρων σε μια καλλιέργεια. Ο δείκτης αυτός, εξορισμού ασαφής, προσδιορίζεται ελέγχοντας ζωτικής σημασίας λειτουργίες όπως:

1. Τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων (MTT)

I. Αρχή μεθόδου

Η χρωματομετρική μέθοδος MTT μετράει την μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων, βασισμένη στην μετατροπή του MTT (3-(4,5-διμεθυλειαζολ-2-υλ)2,5-διφαινυλ τετραζόλιο) σε φορμαζάνη, από το ένζυμο υδρογενάση στα μιτοχόνδρια. Η φορμαζάνη απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος (550-570 nm) από το MTT (400 nm, κίτρινο). Οι

διαφορές στα επίπεδα φορμαζάνης αντανακλούν την μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων παρουσία-απουσία φαρμάκου και επιτρέπουν να εκτιμήσουμε το ποσοστό (%) ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια σε σχέση με τον μάρτυρα. Θεωρείται ο ακριβέστερος δείκτης, με υψηλή ευαισθησία, ποιότητα αλλά και επαναληπτικότητα.

Διαλύματα

☞ Παρασκευάζεται διάλυμα (5mg/ml σε PBS pH=7.5): Διατήρηση του διαλύματος στους 4°C, για σύντομη χρήση, σε σκουρόχρωμη φιάλη. Κατάψυξη του διαλύματος σε μικρές ποσότητες, προκειμένου να διατηρηθεί μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

☞ Διάλυμα λύσης κυττάρων (DMF): 12.5% SDS, 45% διμεθυλφορμαμίδιο, ρύθμιση pH=4.7 με HCl.

Πειραματική διαδικασία

- ☼ Επώαση κυττάρων στους 37 °C παρουσία φαρμάκου για μεγάλα χρονικά διαστήματα.
- ☼ Προσθήκη 50μl διαλύματος MTT, το οποίο αποκτά κίτρινο χρωματισμό και επώαση στους 37 °C για 4 ώρες. Στο τέλος της 4ώρης επώασης τα δείγματα έχουν αποκτήσει ιώδη χρωματισμό (λόγω μετατροπής του MTT σε φορμαζάνη)
- ☼ Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm και αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού.
- ☼ Προσθήκη διαλύματος λύσης (DMF) και επώαση στους 37 °C όλη την νύχτα με ήπια ανάδευση.
- ☼ Φυγοκέντρηση και φωτομέτρηση σε ELIZA reader στα 570 nm με μήκος κύματος αναφοράς στα 630nm.
- ☼ Δείκτης ζωτικότητας MTT: OD δείγματος φαρμάκου / OD μάρτυρα αντίστοιχου χρόνου*100.

5.6 Μελέτη της αντιδιαβητικής δράσης της καρνιτίνης και των συμπλόκων της *in vivo*.

Τα αρσενικά ποντίκια *C57BL/6* παρέμειναν σε εργαστηριακά κλουβιά σε θερμοκρασία 25°C, για 12 μερόνυχτα. Τα ποντίκια τα καταστήσαμε διαβητικά, με ενδοπεριτοναϊκή ένεση στρεπτοζωτοκίνης (STZ) των 65 mg/kg (η οποία είχε πρόσφατα παρασκευασθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM κιτρικού νατρίου, pH=4.5) για 3 διαδοχικές ημέρες. Εν συνεχεία ελήφθει αίμα από την ουρά των ποντικών και μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης με ένα όργανο τύπου (ACCU-CHEKAniva). Επιπρόσθετα υπήρχαν και οι ομάδες αναφοράς, στις οποίες συμμετείχαν ποντίκια τυχαία επιλεγμένα, τα οποία ακολουθούσαν κανονική δίαιτα. Το βάρος αυτών μετριόταν εβδομαδιαίως. Τα ποντίκια θανατώθηκαν με αυχενική εξάρθρωση και οι ιστοί τους τοποθετήθηκαν σε ξηρό πάγο και έπειτα στους -80° C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΛΕΒΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗΣ ΜΕ ΧΑΛΚΟ- ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ-ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ DNA ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

6.1 Σύνθεση απλών και μικτών συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με χαλκό.

Η σύνθεση των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με χαλκό πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

$\{[\text{Cu}_2 (\text{levo})_4] \times 1.6 \text{ MeOH} \cdot 1.2 \text{ H}_2\text{O}\}_n$ (1)

Σε υδατικό διάλυμα (5ml) της λεβοφλοξασίνης (0,28mmol, 100,0 mg) το οποίο έχει αποπρωτονιωθεί παρουσία διαλύματος NH_3 (2M), προστίθενται υδατικό διάλυμα (5ml) από $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,28 mmol, 48,0 mg) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε συνθήκες επαναροής για τουλάχιστον τρεις ώρες. Λαμβάνεται ένα άμορφο πράσινο προϊόν, το οποίο διηθείται, εκπλύνεται με κρύο νερό και στη συνέχεια ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού. Ανακρυστάλλωση του στερεού από μεθανόλη και αργή εξάτμιση στους 4°C έδωσε πράσινους κρυστάλλους, κατάλληλους για ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Από την στοιχειακή ανάλυση προέκυψε: **CuC_{37.6}H_{46.8}F₂N₆O_{10.8}** **Θεωρητική:** C: 52.69 H: 5.50 N: 9.81 **Πειραματική:** C: 51.40, H: 5.08, N: 9.88

$[\text{Cu}_2 (\text{levo})_2 (\text{bipy})_2 \text{Cl}_2] \cdot 10.84 \text{ H}_2\text{O}$ (2)

Σε μεθανολικό διάλυμα (5ml) της λεβοφλοξασίνης (0,14mmol, 50,0 mg) το οποίο έχει αποπρωτονιωθεί παρουσία μεθανολικού διαλύματος CH_3ONa , προστίθενται στάγδην μεθανολικό διάλυμα (5ml) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,14 mmol, 23,9 mg) και διπυριδίνη (0.14mmol, 21.9 mg,) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται περίπου για μισή ώρα σε θερμοκρασία βρασμού. Ένα άμορφο πράσινο προϊόν λαμβάνεται το οποίο διηθείται και εκπλένεται με ψυχρή μεθανόλη, ενώ ανακρυστάλλωσή του έδωσε πράσινους κρυστάλλους που

χαρακτηρίστηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Από την στοιχειακή ανάλυση προέκυψε: **Cu₂C₅₆H_{75.68}F₂N₁₀O_{18.44}Cl₂** **Θεωρητική:** C:47.37, H: 5.37 N:9.87 **Πειραματική:** C:48,27, H: 5,25, N:10,04

{[Cu₂ (levo)₂ (phen)₂ Cl₂] •20 H₂O} (3)

Σε μεθανολικό διάλυμα (5ml) της λεβοφλοξασίνης (0,14mmol, 50,0 mg) το οποίο έχει αποπρωτονιωθεί παρουσία μεθανολικού διαλύματος CH₃ONa, προστίθενται στάγδην μεθανολικό διάλυμα (5ml) CuCl₂•2H₂O (0,14 mmol, 23,9 mg) και φαινανθρολίνη (0.14mmol, 27.8 mg,) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για περίπου μισή ώρα σε θερμοκρασία βρασμού. Ένα άμορφο πράσινο προϊόν λαμβάνεται το οποίο διηθείται και εκπλένεται με ψυχρή μεθανόλη. Από την στοιχειακή του ανάλυση προέκυψε: **Cu₂C₆₀H₉₄F₂N₁₀O₂₈Cl₂**. **Θεωρητική:** C:43.96, H: 5.77 N:8.54 **Πειραματική:** C:43.28, H: 4.46, N:9.04

6.2 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με χαλκό.

6.2.1 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)

Ο δομικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων του χαλκού πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικά, με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR). Στα φάσματα υπερύθρου των συμπλόκων, η περιοχή που παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες για την δομή τους είναι η περιοχή 1750-1350 cm⁻¹, όπου παρουσιάζονται αρκετές ισχυρές δονήσεις τάσης των διπλών κυρίως δεσμών. Χρήσιμες βέβαια συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την δομή του συμπλόκου μας παρέχουν και άλλες περιοχές των φασμάτων. Έτσι, στο φάσμα υπερύθρου, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν δύο ισχυρές κορυφές που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης της καρβοξυλικής ομάδας και είναι ενδεικτικές του τρόπου συναρμογής. Πρόκειται για την ασύμμετρη ν_{ασυμ} (C-O) και την συμμετρική ν_{συμ} (C-O) δόνηση τάσης. Η

ασύμμετρη δόνηση τάσης $\nu_{\text{ασυμ}}$ (C=O) γενικά εμφανίζεται σε υψηλότερες τιμές συχνότητας περίπου στα 1500-1730 cm^{-1} σε σχέση με την συμμετρική $\nu_{\text{συμ}}$ (C=O) που εμφανίζεται στα 1360-1430 cm^{-1} . Πιο συγκεκριμένα η χαρακτηριστική ταινία στα 1720 cm^{-1} , η οποία υπάρχει στο φάσμα της ελεύθερης λεβοφλοξασίνης και αποδίδεται στην ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα ν (C=O), απουσιάζει από τα φάσματα των συμπλόκων ενώσεων του χαλκού (ΠΙ.1-3) και μάλιστα έχει αντικατασταθεί από δύο ισχυρές ταινίες στα 1586 cm^{-1} και στα 1365 cm^{-1} όσον αφορά το σύμπλοκο (1), στα 1579 cm^{-1} και στα 1385 cm^{-1} όσον αφορά το μικτό σύμπλοκο του χαλκού με την διπυριδίνη και τέλος στα 1581 cm^{-1} και στα 1380 cm^{-1} για το μικτό σύμπλοκο του χαλκού με την φαινανθρολίνη, οι οποίες αποδίδονται στην ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση τάσης, αντίστοιχα. Οι χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης των φασμάτων (IR) των συμπλόκων ενώσεων του χαλκού παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6.1: Χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των συμπλόκων ενώσεων του χαλκού.

	$\nu(\text{C=O})_{\text{p}}$	$\nu(\text{C=O})_{\text{asym}}$	$\nu(\text{C=O})_{\text{sym}}$	Δ^{a}	Cu-O	Cu-N
Hlevo	1614	1720	-	-	-	-
1	1617	1586	1365	221	520	-
2	1614	1579	1385	194	515	554
3	1631	1581	1380	201	511	549

Επιπρόσθετα, η συχνότητα δόνησης του πυριδινικού καρβονυλίου ν (C=O)_{πυρ} μετατοπίζεται στα 1617 cm^{-1} για το πρώτο σύμπλοκο, στα 1614 cm^{-1} για το δεύτερο και στα 1631 cm^{-1} για το τρίτο. Σύμφωνα λοιπόν με τα προαναφερθέντα μπορούμε να πούμε ότι η λεβοφλοξασίνη συνδέεται με το μεταλλικό ιόν δια μέσου ενός πυριδινικού και ενός καρβοξυλικού οξυγόνου. Επιπρόσθετα η ισχυρή ταινία στα 724 cm^{-1} αποδίδεται στην εκτός επιπέδου δόνηση του ετεροκυκλικού δακτυλίου της φαινανθρολίνης ενώ η χαρακτηριστική ταινία στα 774 cm^{-1} αποδίδεται στον ετεροκυκλικό δακτύλιο της διπυριδίνης. Η ταινία στα 3421 cm^{-1} , στην οποία εμφανίζονται μέτριας έντασης κορυφή θα μπορούσε να αποδοθεί στην δόνηση τάσης του δεσμού

O-H του μορίου του νερού [29]. Επιπροσθέτως ο παραπάνω τρόπος ένταξης υποστηρίζεται και από τις δονήσεις του δεσμού (Cu-O) και (Cu-N) οι οποίες παρατηρούνται στα 520, 515, και 511 cm^{-1} για τα σύμπλοκα (1, 2 και 3) και στα 554 και 549 για τα σύμπλοκα (2, 3) αντίστοιχα [30].

Η διαφορά τώρα μεταξύ της συμμετρικής και της ασύμμετρης δόνησης τάσης της καρβοξυλικής ομάδας κυμαίνεται από 194-221 cm^{-1} και αποτελεί ένδειξη ότι η καρβοξυλική ομάδα εντάσσεται μονοσχιδώς.

6.2.2 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους (UV-vis)

Τα φάσματα υπεριώδους των συμπλόκων του χαλκού ελήφθησαν σε διάλυμα μεθανόλης με σκοπό την διερεύνηση της δομής τους.

Τα φάσματα απορρόφησης των συμπλόκων είναι ενδεικτικά των θέσεων συναρμογής του μετάλλου με το πυριδινικό και το καρβοξυλικό οξυγόνο του υποκαταστάτη. Στην περιοχή του ορατού εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ταινίες που αφορούν d-d μεταπτώσεις, του συμπλεγμένου χαλκού. Αναλυτικά, το φάσμα υπεριώδους του μορίου της λεβοφλοξασίνης σε μεθανολικό διάλυμα εμφανίζει δυο χαρακτηριστικές ταινίες στα 297 και 325 nm. Τα ηλεκτρονικά φάσματα των συμπλόκων του χαλκού είναι παρόμοια με αυτό της λεβοφλοξασίνης ελαφρώς όμως μετατοπισμένα, γεγονός που είναι ενδεικτικό της σύμπλεξης.

Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο (1) του χαλκού με την λεβοφλοξασίνη εμφανίζει ταινία απρρόφησης εσωτερικής μεταφοράς του υποκαταστάτη (intra-ligand) στην περιοχή 302 και 332 nm ενώ η d-d μετάπτωση στα 670 nm είναι χαρακτηριστική για σύμπλοκα Cu^{2+} με επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Όσον αφορά τώρα τα μικτά σύμπλοκα του χαλκού με τους ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη εμφανίζουν την d-d μετάπτωση στα 630 nm που είναι αντίστοιχα χαρακτηριστική για δομές παραμορφωμένης τετραγωνικής πυραμίδας [30,31].

Επιπλέον ελήφθησαν τα φάσματα σε $\text{ni}(\text{H}_2\text{O})_2$ των παραπάνω ενώσεων.
(Π II.1)

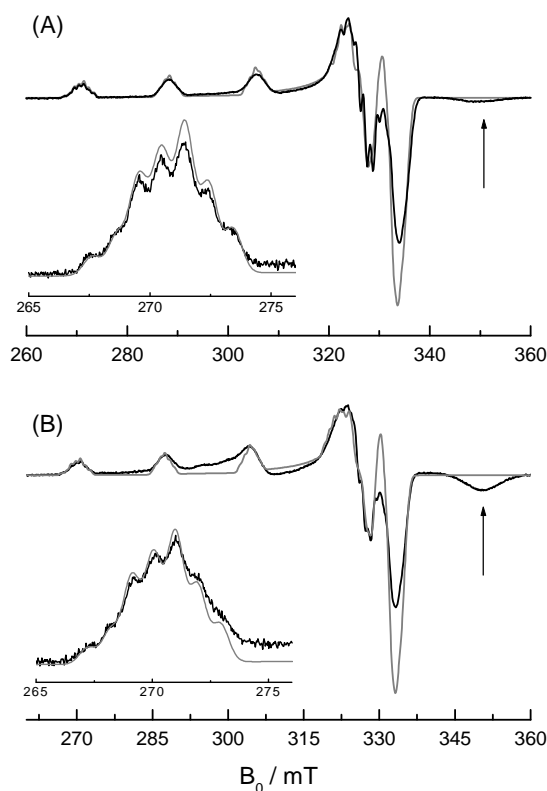
6.2.3 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων με φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού, (EPR).

Προκειμένου να μελετηθεί η ηλεκτρονική διαμόρφωση των μονομερών μονάδων του δισθενούς χαλκού, μελετήσαμε τα σύμπλοκα (2) και (3) σε μεθανολικά διαλύματα συγκέντρωσης 2×10^{-3} M, στους 0°C . Το EPR των συμπλόκων του χαλκού παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 6.1) και παρουσιάζει καλά καθορισμένη γεωμετρία. Η χαμηλού πεδίου περιοχή και των δύο φασμάτων εμφανίζει καλά διαχωρισμένες υπέρλεπτες δομές του υποκαταστάτη με ένταση 1:2:3:2:1, υποδεικνύοντας έτσι την αλληλεπίδραση με δυο μαγνητικά ισοδύναμους πυρήνες $I=1$. Αυτό το τμήμα του φάσματος μπορεί να προσομοιωθεί θεωρώντας δυο πυρήνες αζώτου με τιμές $|A_{||}| \approx 31 \pm 2$ MHz για το σύμπλοκο (2) ή $|A_{||}| \approx 30 \pm 2$ MHz για το σύμπλοκο (3) και λαμβάνοντας υπόψιν την υπέρλεπτη μετατόπιση σύζευξης που οφείλεται στα δύο ισότοπα ^{63}Cu και ^{65}Cu . Παρατηρείται ότι και στα δύο σύμπλοκα το ιόν του δισθενούς χαλκού συνδέεται με δύο άτομα αζώτου, πιθανώς με επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Η διαπίστωση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από την τιμή του g και τις τιμές του ^{63}Cu που καθορίζονται από την προσομοίωση του CW EPR φάσματος: $(g_x, g_y, g_z) = (2.061, 2.061, 2.276) \pm 0.005$ και $|A_{\perp}| = 30 \pm 10$ MHz, $|A_{||}| = 535 \pm 5$ MHz (για το σύμπλοκο 2), και $(g_x, g_y, g_z) = (2.061, 2.061, 2.269) \pm 0.005$ και $|A_{\perp}| = 30 \pm 10$ MHz, $|A_{||}| = 540 \pm 5$ MHz (για το σύμπλοκο 3). Οι g_z και A_z τιμές βρίσκονται σε συμφωνία με το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο $d_{x^2-y^2}$ και τον ισημερινό τρόπο σύνδεσης με δύο άζωτα (N) και δύο οξυγόνα (O) [32].

Στην συνέχεια, προκειμένου να μελετήσουμε την πιθανή ύπαρξη διμερών μονάδων στο σύμπλοκο (3) (στο οποίο δεν καταφέραμε να κάνουμε ανάλυση κρυσταλλικής δομής), πραγματοποιήθηκε EPR διπλής ακτινοβολίας σε δείγμα άμορφης σκόνης του συμπλόκου (3), σε θερμοκρασία δωματίου (σχήμα 6.2). Η πλειοψηφία των σημάτων, έδειξε πως πρόκειται για διμερές [33]. Πιο συγκεκριμένα, ο ισχυρός συντονισμός σε $g \approx 2$, αποδίδεται στις επιτρεπόμενες μεταπτώσεις $\Delta Ms = \pm 1$ ενός διμερούς. Πιο προσεκτική εξέταση του φάσματος αποκαλύπτει ένα ασθενέστερο σήμα σε $g \approx 4$ το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με την απαγορευμένη μετάπτωση $\Delta Ms = \pm 2$. Αυτό θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί τρέχοντας τα EPR φάσματα παράλληλα. Στην

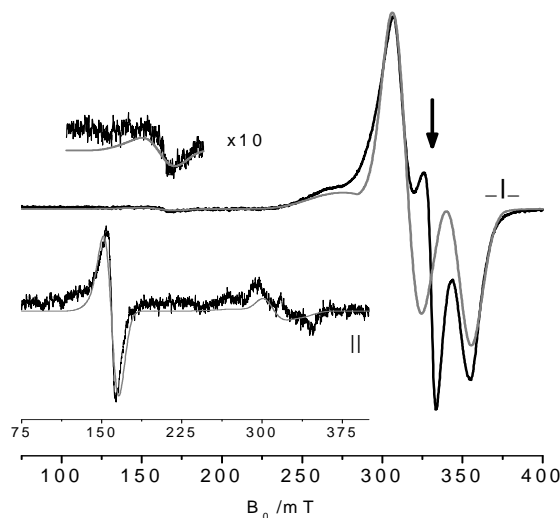
περίπτωση αυτή οι μεταπτώσεις $\Delta M_s = \pm 1$ καταστέλλονται, ενώ οι μεταπτώσεις $\Delta M_s = \pm 2$ βελτιώνονται [34]. Πράγματι, τα παράλληλα φάσματα επιδεικνύουν ένα παράγωγο χαρακτηριστικό στο $g \approx 4$ παρέχοντας απόδειξη για την θέση της μετάπτωσης από αυτή την τιμή g σε μια $\Delta M_s = \pm 2$ απαγορευμένη μετάπτωση από ένα σύστημα με δυο χαλκούς. Αναλύσαμε το διπλής δέσμης X-band EPR με βάση την ακόλουθη Χαμιλτονιανή:

$$H = \beta S_1 g_1 B_0 + \beta S_2 g_2 B_0 + I_1 A_1 S_1 + I_2 A_2 S_2 + S_1 J S_2$$



Σχήμα 6.1: EPR φάσμα του συμπλόκου (2) και του συμπλόκου (3) σε μεθανολικά διαλύματα $T=120$ K. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το πείραμα ενώ με γκρί χρώμα η προσομοίωση. Τα βέλη δηλώνουν την συνεισφορά από τις προσμίξεις των διμερών του Cu(II). Στο ένθετο απεικονίζεται η χαμηλού πεδίου περιοχή στην οποία φαίνεται η υπέρλεπτη σύζευξη του αζώτου. Οι πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες: συχνότητα μικροκυμάτων (mw) 9.426 GHz mw, ισχύς στην κοιλότητα 1.74 mW, συχνότητα διαμόρφωσης 100 kHz, διαμόρφωση εύρους 0.2 mT.

Στην παραπάνω εξίσωση το J είναι ένας τελεστής που αποτελείται από ιστροπικούς και ανισότροπικούς όρους [35]. Το φάσμα του σχήματος 6.1 εξαρτάται μόνο από το ανισοτροπικό τμήμα και στην παρούσα περίπτωση υποθέτουμε ότι αυτός ο όρος αντανακλά κυρίως αλληλεπιδράσεις διπόλου. Στις συνθήκες αυτές η ανάλυση του φάσματος μπορεί να καθορίσει την (inter-spin) απόσταση. Στο σχήμα που ακολουθεί με γκρι χρώμα παριστάνονται οι προσομοιώσεις των πειραματικών δεδομένων υποθέτωντας περαιτέρω ότι οι τελεστές g_i και A_i είναι γραμμικοί και το διάνυσμα είναι παράλληλο στον ζ άξονα του g τελεστή. Οι παράμετροι που προήλθαν από την προσομοίωση ήταν $g_{1,2\parallel} = 2.25(\pm 0.02)$, $g_{1,2\perp} = 2.07(\pm 0.02)$ και $r = 4.3 (\pm 0.1) \text{ \AA}$. Παρά το γεγονός ότι δεν αναλύθηκαν υπέρλεπτες γραμμές στο πειραματικό φάσμα του σχήματος 6.1, κρίθηκε απαραίτητο να συμπεριλάβουμε αυτούς τους όρους ($A_{1,2\parallel} = 550(\pm 50) \text{ MHz}$, $A_{1,2\perp} = 50(\pm 10) \text{ MHz}$) ώστε να ερμηνευθούν σωστά το σχήμα και η σχετική ένταση των μεταπτώσεων.



Σχήμα 6.2: EPR φάσμα του συμπλόκου (3) σε θερμοκρασία δωματίου. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το πείραμα και με γκρι χρώμα η προσομοίωση. Το βέλος δηλώνει την συνεισφορά από την πρόσμιξη του μονομερούς χαλκού Cu(II) . Οι πειραματικές συνθήκες είναι οι ακόλουθες Κάθετη λειτουργία: συχνότητα μικροκυμάτων 9.60 GHz, διαμόρφωση εύρους 0.1 mT, ισχύς μικροκυμάτων 2 mW, Παράλληλη λειτουργία: συχνότητα μικροκυμάτων 9.35 GHz, διαμόρφωση εύρους 0.1 mT, ισχύς μικροκυμάτων, 50 mW.

Η μελέτη του φάσματος EPR σε θερμοκρασία δωματίου διπλής ακτινοβολίας, δείχνει ότι στην στερεή κατάσταση ο χαλκός οργανώνεται σε διμερή. Η απόσταση ανάμεσα στα ιόντα χαλκού όπως καθορίστηκε από την προσομοίωση του φάσματος (4.3 Å) βρέθηκε παρόμοια με του μικτού συμπλόκου (2) (4.208 Å) που προέκυψε από την κρυσταλλογραφική ανάλυση καθώς και με άλλες δομικά χαρακτηρισμένες ενώσεις που σχηματίζουν διμερή.

6.2.4 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων με θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η θερμοσταθμική ανάλυση και των τριών συμπλόκων του χαλκού προσδιορίστηκε με σκοπό να εξακριβωθούν τα στάδια διάσπασης των συμπλόκων του χαλκού. Σύμφωνα με το θερμογράφημα του συμπλόκου (1), η πρώτη απώλεια βάρους (**πειραματική:6.9 %, θεωρητική:8.5 %**) συμβαίνει στην περιοχή θερμοκρασίας (25-120 °C), και αντιστοιχεί στην απομάκρυνση από το δείγμα των μορίων νερού και μεθανόλης. Η δεύτερη κύρια απώλεια βάρους (**πειραματική:84.1 %, θεωρητική:86.0 %**) συμβαίνει στην περιοχή (220-550 °C) και προέρχεται από την διάσπαση των δύο μορίων του υποκαταστάτη. Το τελικό υπόλειμμα οφείλεται στο οξειδίο του χαλκού [30].

Όσον αφορά το δεύτερο σύμπλοκο τώρα, η διάσπαση του λαμβάνει χώρα σε τρία αυστηρά καθορισμένα στάδια. Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου, στην περιοχή (28-116 °C) η πρώτη απώλεια βάρους (**πειραματική:11.7 θεωρητική: 13.7 %**) αντιστοιχεί στην απομάκρυνση των κρυσταλλικών μορίων νερού ενώ η απώλεια βάρους που πραγματοποιείται κατά την διάρκεια του δεύτερου και τρίτου σταδίου (**πειραματική:74.4% %, θεωρητική:72.4 %**) αντιστοιχεί στην διάσπαση τόσο της διπυριδίνης όσο και του υποκαταστάτη της λεβοφλοξασίνης. Το τελικό υπόλειμμα αποτελείται από οξειδίο του χαλκού.

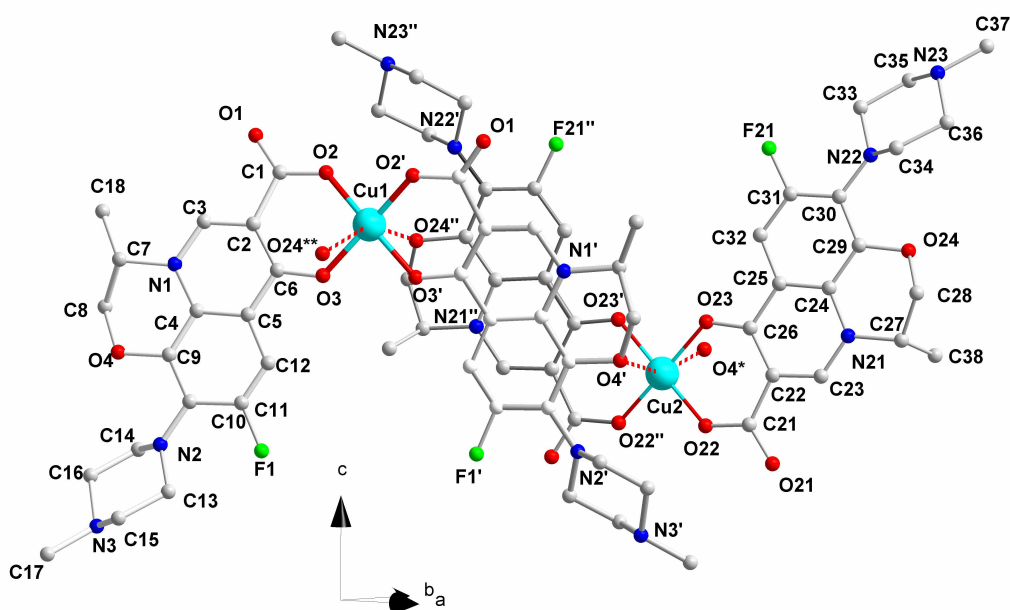
Το θερμοσταθμικό προφίλ του τρίτου συμπλόκου αποτελείται από τέσσερα ευδιάκριτα στάδια. Κατά την διάρκεια των δύο πρώτων σταδίων, η απώλεια βάρους (**πειραματική:19.6%, θεωρητική:21.9%**) προέρχεται από την απομάκρυνση 20 μορίων νερού, ενώ κατά την διάρκεια των δύο επόμενων σταδίων η απώλεια βάρους (**πειραματική:64.4%, θεωρητική:66.1%**) προέρχεται από την αποσύνθεση των δύο

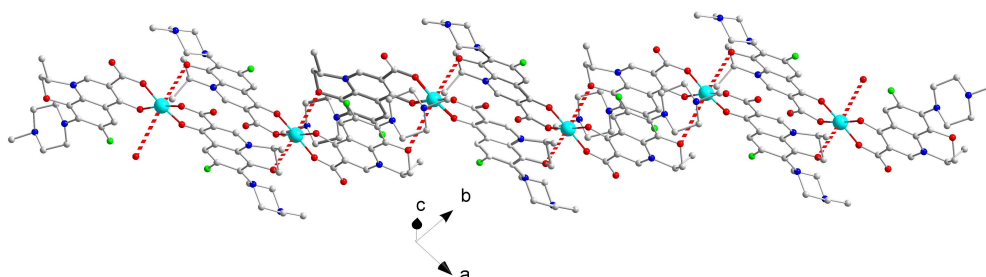
υποκαταστατών, της φαινανθρολίνης και της λεβοφλοξασίνης, αφήνοντας οξειδίο του χαλκού.

6.2.5 Προσδιορισμός της δομής των συμπλόκων του χαλκού με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.

6.2.5.1 Περιγραφή της δομής του συμπλόκου (1)

Σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική ανάλυση, το απλό σύμπλοκο του χαλκού με τον υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη, κρυσταλλώνεται στην ορθορομβική Ομάδα Συμμετρίας Χώρου (ΟΣΧ) $F 2 2 2$ και στην ασύμμετρη μονάδα της κυψελίδας υπάρχουν τα δύο μισά από δυο ουδέτερες συμμετρικά ανεξάρτητες μονάδες $[Cu(leno)_2]$ και 1.6 μόρια μεθανόλης και 1.2 μόρια νερού ως διαλύτες πλέγματος, καταναμημένα σε τρεις και πέντε διαφορετικές θέσεις αντίστοιχα. Όλες οι θέσεις είναι μερικώς κατειλημμένες από τα αντίστοιχα μόρια διαλυτών. Τα δύο συναρμοσμένα μόρια λεβοφλοξασίνης είναι αποπροτονιομένα και τα κατιόντα χαλκού είναι δισθενή. Η σχετική διάταξη των δύο συμπλόκων στην κρυσταλλική δομή και επιλεγμένα μήκη δεσμών παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.1 και στον Πίνακα 6.2 αντίστοιχα.





Εικόνα 6.1: α) Αρίθμηση και διεύθυνση των μονάδων χαλκού $[Cu(levn)_2]$ του συμπλόκου (1) σε αλυσίδες. Οι $Levo1$ και $Levo1'$ είναι οι υποκαταστάτες που αναφέρονται στο κείμενο και αποτελούνται από $O(1), O(2), O(3), O(4), N(1), N(2), N(3)$ και $C(1) \dots C(18)$ άτομα αντίστοιχα. Επίσης οι $Levo2$ and $Levo2'$ υποκαταστάτες αποτελούνται από $O(21), O(22), O(23), O(24), N(21), N(22), N(23)$ και $C(21) \dots C(38)$ άτομα αντίστοιχα. Κώδικας συμμετρίας: ('): $1-x, -y, z$; (''): $1.5-x, 0.5-y, z$; (*): $0.5+x, 0.5+y, z$; (**): $-0.5+x, -0.5+y, z$. Οι κόκκινες διακεκομμένες γραμμές αναπαριστούν ασθενείς δεσμούς κατιόντων χαλκού $Cu(II)$ με άτομα οξυγόνου τα οποία ανήκουν σε γειτονικούς υποκαταστάτες λεβοφλοξασίνης β) Οι zigzag αλυσίδες $[Cu(levn)_2]$ του συμπλόκου 1 εκτείνονται κατά μήκος της $[110]$ κρυσταλλογραφικής διεύθυνσης. Στο Σχήμα παρουσιάζονται όπως φαίνονται κοιτώντας προς τον αρνητικό c κρυσταλλογραφικό άξονα.

Πίνακας 6.2: <Επιλεγμένες αποστάσεις δεσμών (Å) και γωνίες ($^\circ$) για το σύμπλοκο (1).

ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ			
Cu(1)-O(2)	1.891(4)	Cu(2)-O(23)	1.908(4)
Cu(1)-O(3)	1.894(4)	Cu(2)-O(22)	1.905(4)
Cu(1)-O(2')	1.891(4)	Cu(2)-O(23'')	1.908(4)
Cu(1)-O(3')	1.894(4)	Cu(2)-O(22'')	1.905(4)
ΓΩΝΙΕΣ			
O(2)-Cu(1)-O(2')	88.9(2)	O(22)-Cu(2)-O(22'')	89.3(2)
O(2')-Cu(1)-O(3')	92.9(2)	O(23'')-Cu(2)-O(22'')	92.9(2)
O(2)-Cu(1)-O(3')	171.9(2)	O(23)-Cu(2)-O(22'')	175.7(2)
O(2')-Cu(1)-O(3)	171.9(2)	O(23'')-Cu(2)-O(22)	175.7(2)
O(2)-Cu(1)-O(3)	92.9(2)	O(23)-Cu(2)-O(22)	92.9(2)
O(3)-Cu(1)-O(3')	86.3(2)	O(23)-Cu(2)-O(23'')	85.1(2)

Κώδικας συμμετρίας: (') $1-x, -y, z$; (") $1.5-x, 0.5-y, z$.

Κάθε σύμπλοκο $\text{Cu}(\text{levo})_2$ έχει συμμετρία στροφής άξονα 2^{ns} τάξης και ο άξονας στροφής είναι παράλληλος στον c κρυσταλλογραφικό άξονα και περίπου παράλληλος προς το μέσο επίπεδο των δύο υποκαταστατών. Τα κατιόντα του χαλκού βρίσκονται πάνω στον άξονα στροφής και τα δύο μόρια λεβοφλοξασίνης που είναι συναρμοσμένα σε κάθε κατιόν χαλκού είναι συμμετρικά ισοδύναμα μέσω της συμμετρίας στροφής άξονα δεύτερης τάξης με αποτέλεσμα να διευθετούνται σε cis διάταξη γύρω από κάθε κατιόν.

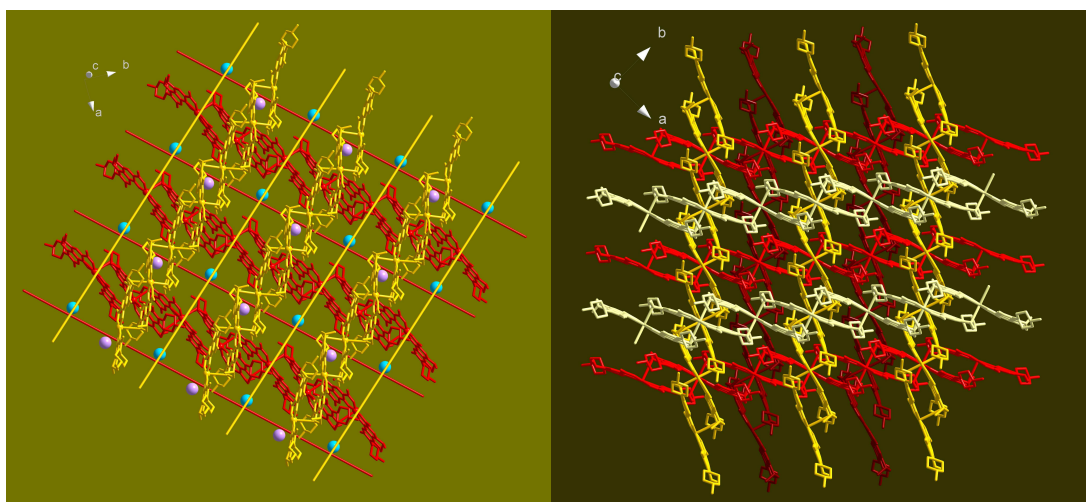
Το κατιόν $\text{Cu}(1)$ του πρώτου συμπλόκου συνδέεται με ένα καρβοξυλικό $\text{O}(2)$ και ένα κετονικό άτομο οξυγόνου $\text{O}(3)$ από τον υποκαταστάτη $\text{levo}1$, τα οποία μαζί με τα αντίστοιχα άτομα $\text{O}'(2)$ και $\text{O}'(3)$ από τον συμμετρικά ισοδύναμο υποκαταστάτη $\text{levo}1'$ [κωδικός συμμετρίας ('): 1-x, -y, z], συμπληρώνουν τη σφαίρα συναρμογής του $\text{Cu}(1)$ που είναι ελαφρά παραμορφωμένη επίπεδη τετραγωνική διάταξη. Το κατιόν $\text{Cu}(2)$ βρίσκεται επίσης σε ένα ισοδύναμο περιβάλλον συνδεδεμένο με τα αντίστοιχα καρβοξυλικά $\text{O}(22)$ και $\text{O}(22)'$ και κετονικά $\text{O}(23)''$ και $\text{O}(23)'''$ άτομα οξυγόνου των συμμετρικά ισοδύναμων υποκαταστατών $\text{levo}2$ και $\text{levo}2'$ [κωδικός συμμετρίας (''): 1.5-x, 0.5-y, z]. Τα μήκη δεσμών $\text{Cu}(1)-\text{O}(2)$, $\text{Cu}(1)-\text{O}(3)$ και $\text{Cu}(2)-\text{O}(22)$, $\text{Cu}(2)-\text{O}(23)$ είναι 1.891 1.894 καθώς και 1.905, 1.909 Å αντίστοιχα. Οι τετράδες των ατόμων $\text{O}(2)$, $\text{O}(3)$, $\text{O}'(2)$, $\text{O}'(3)$ και $\text{O}(22)$, $\text{O}(23)$, $\text{O}''(22)$, $\text{O}''(23)$ βρίσκονται προσεγγιστικά στο ίδιο επίπεδο και έχουν ελαφρώς παραμορφωμένη τετραεδρική γεωμετρία. Γειτονικά σύμπλοκα $[\text{Cu}(1)(\text{levo}1)((\text{levo}1)']$ και $[\text{Cu}(2)(\text{levo}2)((\text{levo}2)''']$ στην κρυσταλλική δομή της ένωσης είναι διατεταγμένα με τέτοιο τρόπο ώστε άτομα οξυγόνου από γειτονικά σύμπλοκα διευθετούνται πάνω και κάτω από το επίπεδο που σχηματίζουν τα τέσσερα άτομα οξυγόνου που βρίσκονται γύρω από κάθε κατιόν $\text{Cu}(\text{II})$ ώστε να σχηματίζεται ένα επίμηκες οκτάεδρο CuO_6 και τελικά η σφαίρα ένταξης να διαμορφώνεται σε 4+2. Συγκεκριμένα, δύο άτομα οξυγόνου από τους δακτυλίους βενζοξαζίνης των δύο συμμετρικών υποκαταστατών, $\text{O}(24)''$ και $\text{O}(24)''''$ για το άτομο $\text{Cu}(1)$ και $\text{O}(4)'$, $\text{O}(4)''$ για το άτομο $\text{Cu}(2)$ σχηματίζουν δυο επιμήκεις δεσμούς με τιμές 3.410 Å για $\text{Cu}(1)-\text{O}(24)''$ [$=\text{Cu}(1)-\text{O}(24)''''$, κώδικας συμμετρίας ('''):-0.5+x, -0.5+y, z] και 2.918 Å για $\text{Cu}(2)-\text{O}(4)'$ [$=\text{Cu}(1)-\text{O}(24)''$, κώδικας συμμετρίας (''):0.5+x, 0.5+y, z]. Παρόλο που οι αποστάσεις αυτές είναι οι μεγαλύτερες που έχουν παρατηρηθεί για $\text{Cu}(\text{II})$ με σφαίρα ένταξης οκταεδρική με αξονική

παραμόρφωση, αναφέρονται γιατί μαζί με την επικάλυψη των γειτονικών υποκαταστατών αποτελούν τα κυρίαρχα χαρακτηριστικά της διάταξης των μορίων σ' αυτή τη δομή.

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των υποκαταστατών λεβοφλοξασίνης είναι ο στερεοϊσομερισμός της μεθυλικής ομάδας της οξαζίνης στο χειρόμορφο κέντρο π.χ C(18) για τον υποκαταστάτη *levo*1 και τον C(38) για τον υποκαταστάτη *levo*2 που συνδέονται στα ασύμμετρα άτομα άνθρακα C(7) και C(27) αντίστοιχα. Ο μεν C(18) βρίσκεται στην ισημερινή θέση ενώ ο C(38) είναι στην αξονική θέση δηλαδή στα ιόντα Cu(1) έχει συναρμοσθεί ο υποκαταστάτης *levo*1 με τη μεθυλική ομάδα της οξαζίνης στο χειρόμορφο κέντρο σε θέση ισημερινή ενώ στα ιόντα Cu(2) έχει συναρμοσθεί ο υποκαταστάτης *levo*2 με τη μεθυλική ομάδα της οξαζίνης στο χειρόμορφο κέντρο σε θέση αξονική. Επίσης στην παρούσα δομή όπως και σε αυτήν της αναφοράς [26] οι υποκαταστάτες όπως αναφέρθηκε, είναι συναρμοσμένοι σε διάταξη *cis* ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις είναι σε διάταξη *trans*.

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της δομής αυτής καθώς και δομών που περιέχουν ουδέτερους ή αποπρωτονιωμένους ή πρωτονιωμένους υποκαταστάτες *levo*, είναι ο σχηματισμός διμερών ή εκτεταμένων σχηματισμών από ομάδες λεβοφλοξασίνης που βασίζονται σε π-π διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Η απόσταση των επιπέδων που ορίζονται από τους φαινιλικούς και τους πυραζινικούς δακτυλίους των γειτονικών μορίων *levo*1' και *levo*1'' (Εικόνα 6-1^α) είναι 3.099Å. Η τάση αυτή του υποκαταστάτη *levo* να αναπτύσει τις συγκεκριμένες π-π διαμοριακές αλληλεπιδράσεις καθορίζει και τη διάταξη των συμπλόκων Cu(*levo*)₂ στη δομή της ένωσης 1. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 6.1α και 6.1β τα σύμπλοκα Cu(*levo*)₂ σχηματίζουν αλυσίδες με διαμόρφωση Zig-Zag παράλληλα στη κρυσταλλογραφική διεύθυνση [110]. Στη συνέχεια αυτές οι αλυσίδες οι οποίες είναι σε αρκετά μεγάλη απόσταση διατάσσονται σε στρώσεις παράλληλα προς το (001) επίπεδο και στα ενδιάμεσα κενά-κανάλια διευθετούνται τα μόρια των διαλυτών. Η τριδιάστατη διάταξη των αλυσίδων γίνεται με επανάληψη διαδοχικών στρώσεων κατά μήκος του άξονα c με στροφή της κάθε στρώσης σε σχέση με την προηγούμενη κατά 90°. Στην Εικόνα 6-2α παρουσιάζεται η σχετική διάταξη δύο διαδοχικών στρώσεων των αλυσίδων που είναι παράλληλες στα κρυσταλλογραφικά επίπεδα (001), όπως διευθετούνται κατά μήκος του άξονα

c όπου είναι σαφής η σχετική στροφή κατά 90° των δύο διαδοχικών στρώσεων. Επίσης παρουσιάζονται και οι σχετικές θέσεις των καναλιών και τα κενά που καταλαμβάνονται από τα μόρια των διαλυτών πλέγματος. Στην Εικόνα 6-2β παρουσιάζεται η σχετική τρισδιάστατη διάταξη πολλών διαδοχικών στρώσεων αλυσίδων κατά μήκος του άξονα c.



Εικόνα 6.2: α) Διευθέτηση των γειτονικών στρωμάτων των zigzag αλυσίδων. Οι αλυσίδες με το κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στην κάτω στρώση ενώ οι πορτοκαλί αλυσίδες αντιστοιχούν στην ακριβώς από πάνω στρώση. Τα στρώματα των αλυσίδων είναι κάθετα στον c-άξονα. Οι κόκκινες και πορτοκαλί παχιές γραμμές δείχνουν τα κανάλια που σχηματίζονται ανάμεσα στις αλυσίδες. Οι γαλάζιες και μοβ σφαίρες δείχνουν την θέση των διάκενων στην δομή του συμπλόκου (1) β) 3D διευθέτηση των αλυσίδων του (1).

6.2.5.2 Περιγραφή της δομής του συμπλόκου (2)

Η δομή του συμπλόκου (2) περιγράφεται στην ΟΣΧ P1 και η κυψελίδα η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η ασύμμετρη μονάδα, αποτελείται από δύο ουδέτερα σύμπλοκα (τα οποία περιέχουν τα άτομα Cu (1) και Cu (2) αντίστοιχα) με τύπο $\text{Cu}(\text{Levo})(\text{Bipy})\text{Cl}$ και 10.84 μόρια νερού. Τα επτά από αυτά τα μόρια νερού βρίσκονται σε θέσεις πλήρως κατειλημμένες και τα εναπομείναντα βρίσκονται διαμοιρασμένα σε έξι διαφορετικές θέσεις με μερική κάλυψη. Η διευθέτηση των δύο συμμετρικών ανεξάρτητων συμπλεγμάτων $\text{Cu}(\text{Levo})(\text{Bipy})\text{Cl}$ που βρίσκονται στην κυψελίδα, παρουσιάζονται στην εικόνα 6.3α και επιλεγμένα μήκη δεσμών και γωνίες παρατίθενται στον πίνακα 6.3. Σύγκριση των χαρακτηριστικών γεωμετρικών

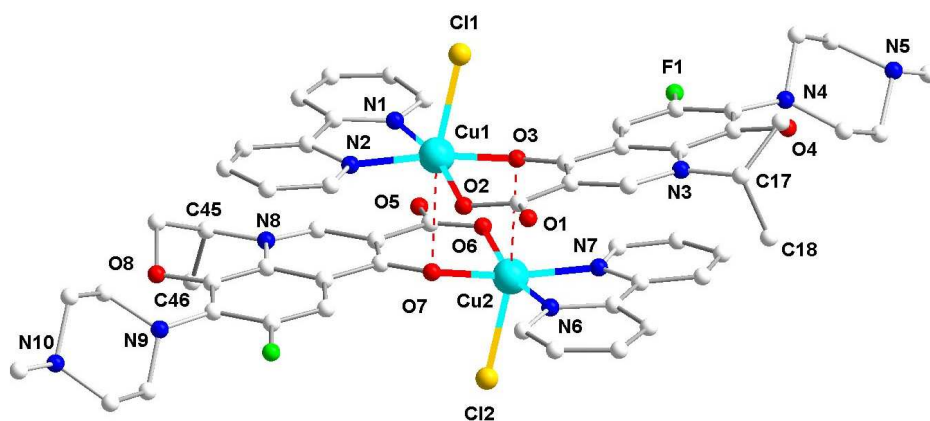
παραμέτρων του συμπλόκου (2) και ανάλογων ενώσεων παρατίθενται στον πίνακα 6.4. Σύγκριση των χαρακτηριστικών γεωμετρικών παραμέτρων του συμπλόκου (2) και ανάλογων ενώσεων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 6.4). Είναι φανερό πως οι τιμές των παραμέτρων του συμπλόκου (2) μοιάζουν με αυτές των άλλων ενώσεων. Και τα δύο άτομα χαλκού είναι συναρμοσμένα με πέντε άτομα, δύο άτομα αζώτου από το μόριο της διπυριδίνης, δύο άτομα οξυγόνου (ένα καρβοξυλικό και το άλλο κετονικό από τον υποκαταστάτη της λεβοφλοξασίνης) και ένα άτομο χλωρίου σε αξονική θέση. Το πολυέδρο ένταξης είναι παραμορφωμένη τετραγωνική πυραμίδα. Στην πραγματικότητα το περιβάλλον κάθε ατόμου χαλκού είναι 5+1, με το έκτο άτομο, O(7) για τον Cu(1) και O(3) για το Cu(2), να είναι ένα άτομο οξυγόνου από τον υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη ο οποίος προέρχεται από το δεύτερο σύμπλοκο της κυψελίδας να είναι ασθενώς συνδεδεμένο στο αντίστοιχο άτομο χαλκού (εικόνα 6.3α). Αυτοί οι ασθενείς δεσμοί έχουν σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό διμερών όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.3α. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η μεθυλική ομάδα στο χειρόμορφο κέντρο και για τους δυο υποκαταστάτες που παρουσιάζονται στην κυψελίδα είναι σε αξονική θέση (C(18) και C(46) άτομα, εικόνα-6.3α).

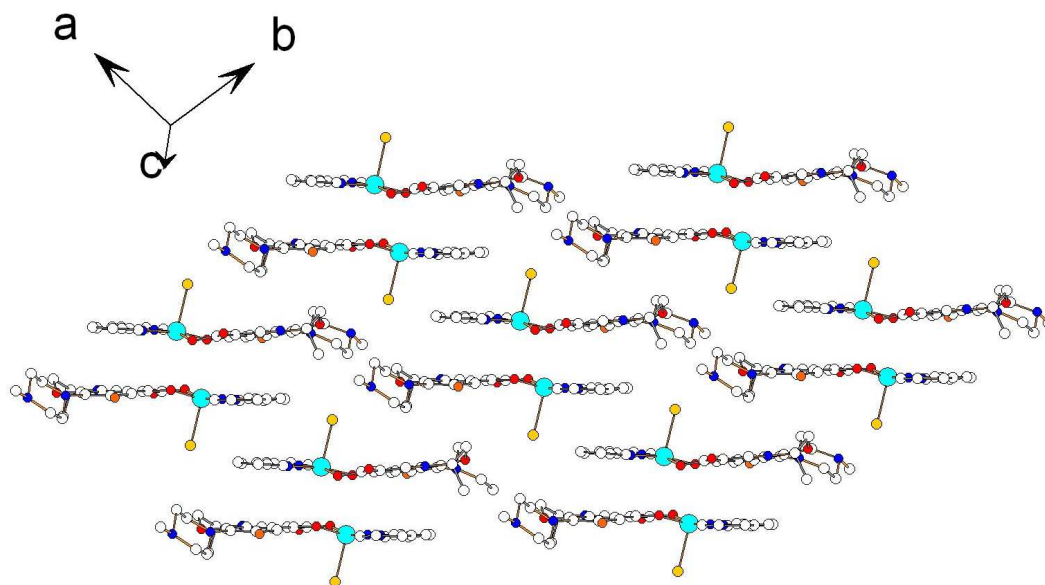
Στον πίνακα 6.4 δίνονται οι παράμετροι για αντίστοιχα σύμπλοκα που βρέθηκαν στην βάση δεδομένων του Cambridge (CSD έκδοση 5.34, [36]). Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν όλα τα σύμπλοκα με τα ίδια χαρακτηριστικά στη σφαίρα συναρμογής στα άτομα Cu όπως και αυτά της ένωσης (2), δηλαδή στη βάση της τετραγωνικής πυραμίδας να συμμετέχουν άτομα N από χηλικούς N-N υποκαταστάτες που σχηματίζουν πενταμελείς δακτύλιους, άτομα O από O-O χηλικοί υποκαταστάτες που σχηματίζουν εξαμελείς δακτύλιους και με ένα άτομο χλωρίου στην αξονική θέση. Ένας ακόμη περιορισμός κατά την αναζήτηση ήταν η παρουσία της ομάδας καρβοξυλίου, στο ένα άκρο του O-O χηλικού υποκαταστάτη. Με τους περιορισμούς αυτούς που τέθηκαν κατά την έρευνα προέκυψε μια οικογένεια ενώσεων με κοινά χαρακτηριστικά όχι μόνο ως προς τον πυρήνα των συμπλόκων αλλά και του τρόπου διάταξης τους στη κρυσταλλική δομή. Ο σχηματισμός των διμερών είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό για όλα τα σύμπλοκα που εντοπίστηκαν εκτός από αυτό που αναφέρεται στην αναφορά [45]. Η παρουσία διμερών στην κρυσταλλική δομή επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του φάσματος EPR και η

μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ισχυρή ένδειξη για την παρουσία διμερών σε ανάλογα σύμπλοκα.

Ακόμη ένα χαρακτηριστικό της δομής αυτής είναι οι ένδο- και δια-διμερείς διαμοριακές αλληλεπιδράσεις τύπου π-π, οι οποίες ρυθμίζουν τη διάταξη των αντίστοιχων συμπλόκων στη δομή τους [37].

Οι ενδο-διμερείς π-π αλληλεπιδράσεις προκύπτουν από την επικάλυψη των γειτονικών υποκαταστατών λεβοφλοξασίνης και διπυριδίνης οι οποίες και σχηματίζουν τα διμερή. Γειτονικά διμερή αλληλεπιδρούν μέσω π-π αλληλεπιδράσεων των μορίων διπυριδίνης (κόκκινες εστιγμένες γραμμές στην Εικόνα 6.3-β) με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των διμερών σε διάταξη κλίμακας. Γειτονικά διμερή σε διάταξη κλίμακας πακετάρονται με τον τρόπο που παρουσιάζεται στην εικόνα 6.3β και σχηματίζουν στρώσεις παράλληλα στο επίπεδο (001). Τα μόρια των διαλυτών πλέγματος, στη συγκεκριμένη περίπτωση μόρια νερού, πακετάρονται ανάμεσα στις στρώσεις των διμερών. Το πακετάρισμα των διμερών που φαίνονται στην εικόνα 6.3β, είναι όμοιο για όλα τα συμπλόκα που δίνονται στον Πίνακα 6.4.





Εικόνα 6.3: α) Διμερή των [Cu (Leno) (Bipy) Cl] συμπλόκων που παρουσιάζονται στο σύμπλοκο (2) και αρίθμηση. Οι μπλε διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τις αλληλεπιδράσεις των ατόμων Cu στα διμερή.

β) Διάγραμμα πακεταρίσματος των διμερών της δομής του συμπλόκου (2). Οι τυρκουάζ και κόκκινες διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τις ένδο- και δια-διμερείς αλληλεπιδράσεις των διμερών αντίστοιχα τύπου π-π. Οι δια-διμερείς αλληλεπιδράσεις των διμερών είναι μεταξύ των μορίων διπυριδίνης, των γειτονικών διμερών.

Πίνακας 6.3: Επιλεγμένες αποστάσεις δεσμών (Å) και γωνίες (°) για το σύμπλοκο (2).

Αποστάσεις			
Cu(1)-Cl(1)	2.531(3)	Cu(2)-Cl(2)	2.545(3)
Cu(1)-O(2)	1.936(7)	Cu(2)-O(6)	1.923(7)
Cu(1)-O(3)	1.947(7)	Cu(2)-O(7)	1.929(7)
Cu(1)-N(2)	1.982(9)	Cu(2)-N(6)	1.971(8)
Cu(1)-N(1)	2.038(8)	Cu(2)-N(7)	2.009(8)
Γωνίες			
O(2)-Cu(1)-O(3)	92.5(3)	O(6)-Cu(2)-O(7)	91.9(3)
O(2)-Cu(1)-N(2)	90.3(3)	O(7)-Cu(2)-N(6)	92.0(3)
O(3)-Cu(1)-N(2)	167.8(3)	O(6)-Cu(2)-N(6)	165.1(4)
O(2)-Cu(1)-N(1)	165.6(4)	O(7)-Cu(2)-N(7)	166.6(4)
O(3)-Cu(1)-N(1)	93.1(3)	O(6)-Cu(2)-N(7)	92.1(3)
N(2)-Cu(1)-N(1)	81.6(3)	N(6)-Cu(2)-N(7)	81.0(3)
O(2)-Cu(1)-Cl(1)	95.2(3)	O(6)-Cu(2)-Cl(2)	95.4(2)
O(3)-Cu(1)-Cl(1)	93.2(2)	O(7)-Cu(2)-Cl(2)	93.3(2)
N(2)-Cu(1)-Cl(1)	98.4(3)	N(6)-Cu(2)-Cl(2)	98.8(3)
N(1)-Cu(1)-Cl(1)	97.8(3)	N(7)-Cu(2)-Cl(2)	99.0(3)

Πίνακας 6.4: Χαρακτηριστικές γεωμετρικές παράμετροι για το τμήμα πυραμίδας της ένωσης (2), για τα διμερή και τα αλληλεπιδρώντα διμερή της παρούσας εργασίας και ανάλογων συμπλόκων.

	Cu1- Σύμπλεγμα Παρούσα εργασία		Cu2- Σύμπλεγμα Παρούσα εργασία	[37]	[38]	[39]
Θερμοκρασία (K)	160		160	200	293	293
Υποκαταστάτες	BIPY ^I		BIPY ^I	BIPY ^{II}	BIPY ^{III}	BIPY ^{IV}
Cu1-O2 *(Å)	1.936(7)	Cu2-O6*(Å)	1.923(7)	1.913(2)	1.923(3)	1.910(3)
Cu1-O3 *(Å)	1.947(7)	Cu2-O7*(Å)	1.929(6)	1.904(19)	1.976(3)	1.892(4)
Cu1-N1**(Å)	2.038(8)	Cu2-N6**(Å)	1.971(8)	2.003(3)	2.020(4)	1.995(4)
Cu1-N2**(Å)	1.982(9)	Cu2-N7**(Å)	2.009(9)	1.996(3)	1.992(4)	2.013
Cu1-Cl (Å)	2.531(3)	Cu2-Cl2(Å)	2.545(3)	2.5229(9)	2.506(2)	2.658(1)
O2-Cu1-O3 (°)	92.5(3)	O6-Cu2- O7(°)	91.9(3)	94.03(9)	91.1(6)	92.0(1)
N1-Cu1-N2 (°)	81.6(3)	N6-Cu2- N7(°)	81.0(3)	80.80(11)	80.1(2)	80.7(1)
Τετραγωνικότητα [45]	0.781		0.769	0.778	0.789	0.735
Δείκτης τριγωνικότητας [46]	0.036		0.025	0.052	0.058	0.0
Απόσταση Cu- Βάση επιπέδου (Å)	0.220 (1)		0.222(1)	0.2497(4)	0.2404	0.2143(6)
Cu1...O7 (Å) Cu2...O3 (Å) Cu1...Cu2 (Å)	3.232 3.249 4.208		-	-	3.310(3) - 4.182(1)	-
Ενδο-Διμερείς απόσταση*** (Å)	3.497		-	-	3.562	-
Δια-Διμερείς απόσταση*** (Å)	3.629		-	-	3.667	-

	[40]	[41]	[42]	[43]	[44]	[45]
Θερμοκρασία (K)	298	200	200	293	298	298
Υποκαταστάτες	BIPY ^V	PHEN ^{VI}	PHEN ^{VII}	PHEN ^{VII}	PHEN ^{IX}	PHEN ^X
Cu1-O2 (Å)	1.897(4)	1.9143(13)	1.9402(17)	1.923(4)	1.923(4)	1.931(7)
Cu2-O3 (Å)	1.901(4)	1.9454(12)	1.9440(17)	1.921(4)	1.940(4)	1.957(7)
Cu1-N1 (Å)	1.983(5)	2.028(2)	2.0151(19)	2.008(5)	2.017(5)	2.029(8)
Cu2-N2 (Å)	1.987(4)	2.008(2)	2.0060(18)	2.006(5)	2.021(5)	2.021(8)
Cu-Cl (Å)	2.597(2)	2.6064(5)	2.5667(8)	2.505	2.506(2)	2.501(3)
O2-Cu1-O3	92.5(2)	93.67(5)	92.51(7)	92.7(2)	92.6(2)	91.9(3)
N1-Cu1-N2	80.0(2)	81.99(6)	81.89(8)	82.4(2)	81.8(2)	81.1(3)
Τετραγωνικότητα	0.746	0.757	0.770	0.784	0.788	0.792

[44]						
Δείκτης Τριγωνικότητας [45]	0.0167	0.087	0.027	0.08	0.075	0.047
Απόσταση Cu-Βάση επιπέδου (Å)	0.2066	0.166	0.2481(3)	0.2188(8)	0.2330	
Cu1...O7 (Å)	3.428(4)	3.362	3.288	3.295	3.289	4.491
Cu1...O3 (Å)	-	-	-	-	-	-
Cu1...Cu2 (Å)	4.157(2)	4.220	4.203	4.170	4.107	5.839
Ένδο-Διμερείς Απόσταση *** (Å)	3.622	3.468	3.458	3.441	-	3.445
Δια-Διμερείς Απόσταση *** (Å)	3.747	4.775	4.130	4.123	-	3.627

*: Τα O2 και O3 άτομα οξυγόνου αντιστοιχούν στα οξυγόνα με αριθμούς 24 και 22 στο σχήμα 1

** : N1 και N2 βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές στα O2 και O3 αντίστοιχα

***: αυτές οι αποστάσεις είναι ανάμεσα στο κέντρο βαρύτητας των δυο γειτονικών μορίων

i: 2.2'-bipyridine, levofloxacin (S-) (παρούσα εργασία)

ii: 2.2'-bipyridine, ciprofloxacin

iii: 2.2'-bipyridine, cip⁻ (Hcip: 1-cyclopropyl-6-fluoro-7-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid)iv: 2.2'-bipyridine, 4-pyridoxato

v: 2.2'-bipyridine, pr-norfloxacin⁻, (Hpr-norf = 1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(4-propyl-1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid)

vi: 1.10-phenanthroline, ciprofloxacin (1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(piperazin-4-ium-

1-yl)-3-quinolinecarboxylate-κ² O³,O⁴)

vii: 1.10-phenanthroline, Ciprofloxacin

viii: 1.10-phenanthroline, Ciprofloxacin

ix: 1.10-phenanthroline, Oxolinic acid, (Hoxo:5,8-dihydro-5-ethyl-8-oxo-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid)

x: 1.10-phenanthroline, Enrfloxacin, (Herx: 1-Cyclopropyl-7-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinoline-3-carboxylic acid)

6.3 Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των συμπλόκων του χαλκού με την λεβοφλοξασίνη.

Η δρατικότητα των συμπλόκων του χαλκού εξετάστηκε έναντι τριών μικροοργανισμών, δύο Gram αρνητικών, όπως είναι ο *Escherichia Coli* ATCC 25922 και ο *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853 και ενός Gram θετικού, του *Staphylococcus Aureus* ATCC 29213. Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 6.5), τα σύμπλοκα του χαλκού με την λεβοφλοξασίνη είναι λιγότερο ενεργά από την ελεύθερη λεβοφλοξασίνη.

Πίνακας 6.5: Χαρακτηριστικές τιμές MIC (μg/mL) για τα σύμπλοκα του χαλκού

Complex	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>St. aureus</i>
LVX	0.25 ± 0.025	0.125 ± 0.0125	0.25 ± 0.025
1 [§]	64 ± 0.1	64 ± 0.5	128 ± 0.5
2 [§]	32 ± 0.25	16 ± 0.5	16 ± 0.25
3 [§]	0.5 ± 0.064	0.5 ± 0.0125	32 ± 0.0125
Phen	32 ± 0.025	32 ± 0.025	32 ± 0.0125
Bipy	256 ± 0.5	256 ± 0.1	256 ± 0.64

Πιο συγκεκριμένα το σύμπλοκο (3) είναι περισσότερο ενεργό έναντι των Gram αρνητικών και θετικών μικροοργανισμών από ότι τα άλλα δυο σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα (1) και (2) είναι και τα δύο δραστικά σύμπλοκα συγκρίνοντας τα με άλλα κινολονικά σύμπλοκα παλαιότερων κινολονών. Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα η σειρά αντιμικροβιακής δράσης των συμπλόκων είναι η ακόλουθη: 1 < 2 < 3 < LVX. Η διαφορά ανάμεσα στα σύμπλοκα (2) και (3) μπορεί να αποδοθεί στον διαφορετικό ετεροκυκλικό δακτύλιο της σφαίρας ένταξης. Βασιζόμενοι στην βιβλιογραφία η 1.10-φαινανθρολίνη είναι πιο δραστική από την 2.2'-διπυριδίνη γεγονός το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα.

Η λεβοφλοξασίνη όπως και οι άλλες φθοροκινολόνες, διαπερνούν την βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη δημιουργώντας λιπόφοβα λυσοσώματα από τις αλληλεπιδράσεις των καρβόνυλ- και καρβοξυλ-ομάδων της λεβοφλοξασίνης με τα μεταλλικά ιόντα του μαγνησίου. Σε γενικές γραμμές οι φθοροκινολόνες διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη δια μέσω των μονοπατιών πουρίνης ή δια μέσω παθητικής διάχυσης. Στην παρούσα περίπτωση η λεβοφλοξασίνη έχει ήδη καλύψει τις δραστικές της ομάδες λόγω της συμμετοχής τους στην σύμπλεξη με τον χαλκό, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο ένα νέο μη πολικό σύμπλοκο. Για τον λόγο αυτό τα ιόντα μαγνησίου δεν παίζουν τον ρόλο του μεσολαβητή αλλά ο πιθανός μηχανισμός δράσης βασίζεται σε ουδέτερα σύμπλοκα, τα οποία διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη ευκολότερα από τον ελεύθερο υποκαταστάτη.

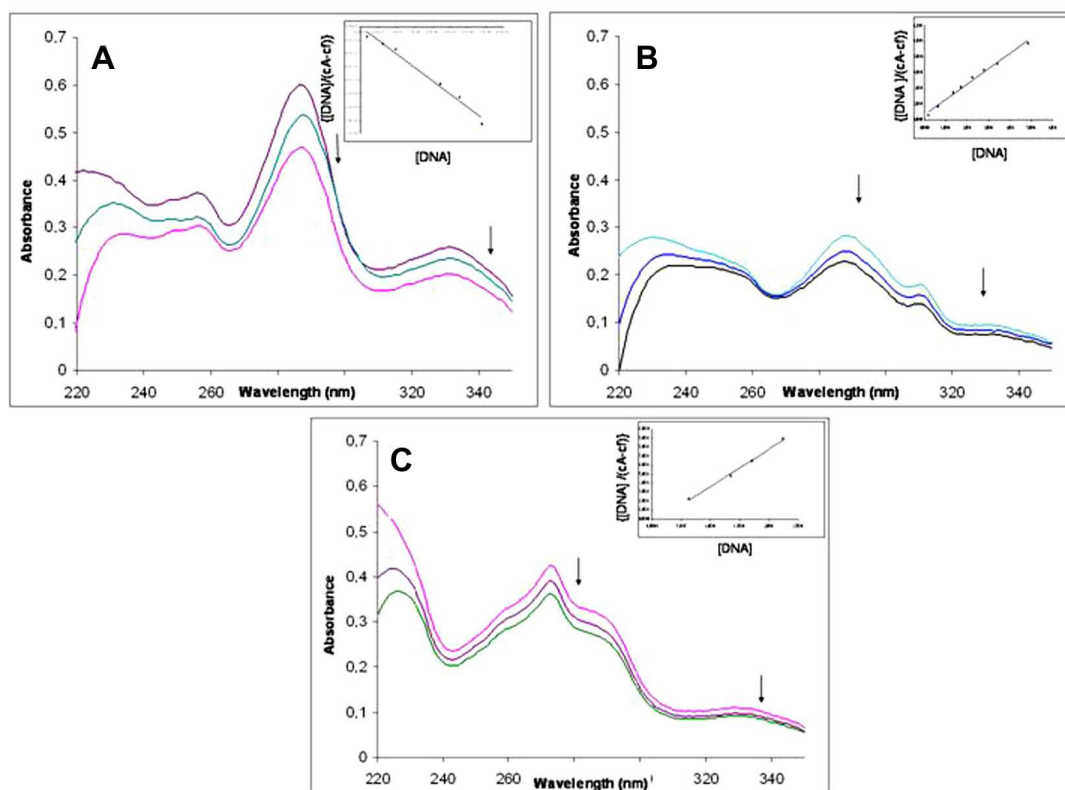
6.4 Μελέτη της αλληλεπίδρασης με DNA

6.4.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με DNA μέσω μελέτης της κινητικής και προσδιορισμού της σταθεράς σταθερότητας των συμπλόκων του χαλκού.

Το DNA παρουσιάζει τρεις πιθανές θέσεις δέσμησης με τα κινολονικά σύμπλοκα των μετάλλων όπως:

- ☼ δέσμηση στις αύλακες
- ☼ δέσμηση στις φωσφορικές ομάδες και
- ☼ παρεμβολή ανάμεσα στις βάσεις του DNA.

Ο προσδιορισμός της συμπεριφοράς ενός συμπλόκου ως προς το DNA είναι σημαντικός παράγοντας για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης αυτού. Τα φάσματα απορρόφησης της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA, ελήφθησαν διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του συμπλόκου και αυξάνοντας την ποσότητα του προστιθέμενου (Ct-DNA).



Σχήμα 6.3: α) Ηλεκτρονικό φάσμα του απλού συμπλόκου του χαλκού με την λεβοφλοξασίνη, β) του μικτού συμπλόκου με λεβοφλοξασίνη και την φαινανθρολίνη, και γ) του μικτού συμπλόκου του χαλκού με λεβοφλοξασίνη και την διπυριδίνη.

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω φάσματα απορρόφησης, η προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων από θύμο αδένος μόσχου (Ct-DNA) για το απλό σύμπλοκο, αλλάζει την θέση της ταινίας στα 288 nm προκαλώντας υποχρωμισμό γύρω στο 13 % επιδεικνύοντας έτσι ισχυρή αλληλεπίδραση με το DNA πιθανόν δια μέσου παρεμβολής. Η ταινία στα 332 nm παρουσιάζει επίσης υποχρωμισμό σε χαμηλότερη έκταση δηλαδή περίπου 5% σε σχέση με την προαναφερθείσα καθώς και μετατόπιση στην περιοχή του υπερύθρου (red shift). Το μικτό τώρα σύμπλοκο του χαλκού με την διπυριδίνη παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με το απλό δηλαδή, υποχρωμισμό περίπου 5% για την ταινία 290 nm και 4% για την ταινία στα 311 nm ενώ για την ταινία στα 332 nm παρουσιάζεται και υποχρωμισμός και μετατόπιση στην περιοχή του υπερύθρου (red shift) στα 335 nm.

Τέλος όσον αφορά το μικτό σύμπλοκο της λεβοφλοξασίνης με την φαιναιθρολίνη παρουσιάζεται υποχρωμισμός γύρω στο 6% για την ταινία στα 274 nm, 2% για την ταινία στα 332 nm ενώ η ταινία στα 288 nm παρουσιάζει υποχρωμισμό 5% που συνοδεύεται από μετατόπιση στην περιοχή του κυανού (blue shift) στα 286 nm.

Η σταθερά σχηματισμού K_b των συμπλόκων του χαλκού με το (Ct-DNA), παρουσιάζει την σταθερά δέσμευσης του συμπλόκου ανά ζεύγος βάσεων, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί με τον έλεγχο των μεταβολών της απορρόφησης στο μέγιστο, με την αύξηση της συγκέντρωσης του (Ct-DNA), σε σχέση με την συγκέντρωση του DNA και δίνεται από την κλίση της ευθείας της ακόλουθης εξίσωσης:

$$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)$$

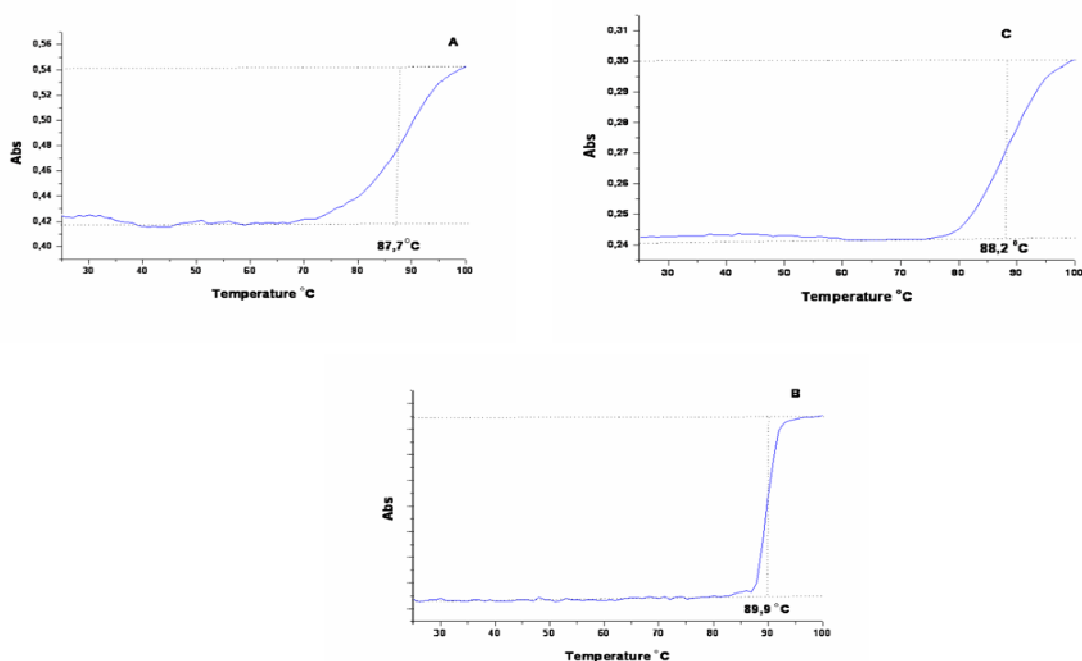
Όπου $\epsilon_a = A_{\text{obsd}}/[(1), (2), (3)]$, $\epsilon_f = 0$ συντελεστής απόσβεσης για το ελεύθερο σύμπλοκο και $\epsilon_b = 0$ συντελεστής απόσβεσης για το σύμπλοκο που έχει δεσμευτεί.

Όπως παρατηρούμε από τις τιμές των K_b , είναι ξεκάθαρο ότι όλα τα σύμπλοκα του χαλκού και τα απλά και τα μικτά, με τους ετερουποκαταστάτες φαιναιθρολίνη και διπυριδίνη αλληλεπιδρούν με το DNA, πιθανότατα μέσω ενός τρόπου που περιλαμβάνει αλληλεπίδραση μεταξύ ενός αρωματικού χρωμοφόρου και των ζευγών βάσεων του DNA [46]. Οι υψηλές τιμές K_b των

συμπλόκων του χαλκού (1) ($=5.71 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), (2) ($=3.33 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) και (3) ($=1.00 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), σε σχέση με την K_b του ελεύθερου υποκαταστάτη ($=4.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) σημαίνει ότι η σύμπλεξη του υποκαταστάτη με τον χαλκό βελτιώνει σημαντικά την ικανότητα δέσμευσης με το DNA. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε ότι η υψηλότερη συγγένεια σύνδεσης, οφείλεται πιθανώς στην επέκταση του π-π συστήματος του παρεμβαλλόμενου υποκαταστάτη, η οποία οδηγεί επιπλέον σε μία επίπεδη επιφάνεια μεγαλύτερη από αυτή του ελεύθερου υποκαταστάτη. Αποτέλεσμα ο συνδεδεμένος υποκαταστάτης να διεισδύει πιο βαθιά και να διευθετείται ισχυρότερα μεταξύ των ζευγών βάσεων [47,29].

6.4.2 Μελέτη της μεταβολής του σημείου τήξεως (T_m)

Τόσο ο υποκαταστάτης λεβοφλοξασίνη, όσο και τα σύμπλοκα του με τον χαλκό μελετήθηκαν με σκοπό την διερεύνηση του πιθανού μηχανισμού δράσης τους. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκαν οι καμπύλες μεταβολής του σημείου τήξεως του DNA και των συμπλόκων του με χαλκό, ακολουθώντας τις μεταβολές της απορρόφησης στα 260 nm συναρτήσει της θερμοκρασίας. Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνονται τα σχετικά διαγράμματα.

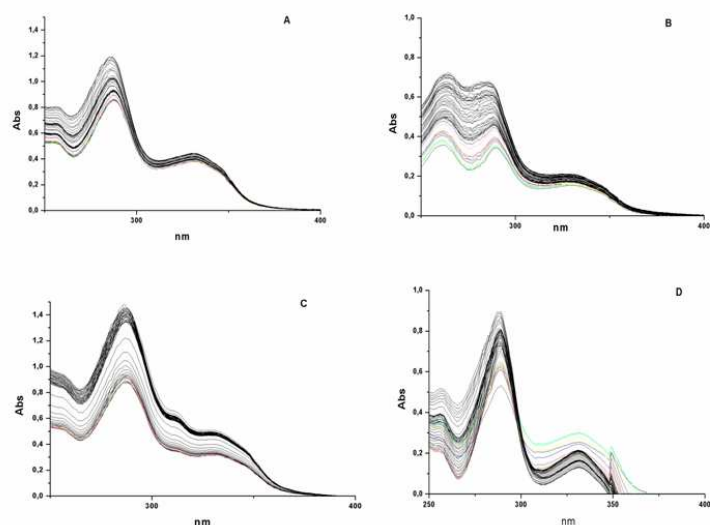


Σχήμα 6.4: Καμπύλες μεταβολής του σημείου τήξεως των συμπλόκων του χαλκού.

Συγκρίνοντας τις καμπύλες μεταβολής του σημείου τήξεως των συμπλόκων του χαλκού με αυτή του ελεύθερου υποκαταστάτη, παρατηρείται μια ελαφριά μετατόπιση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες τιμές, ένδειξη του σχηματισμού ενός νέου συμπλόκου με το μόριο του DNA, το οποίο συνδέεται περισσότερο ισχυρά με τα ζεύγη βάσεων του DNA. Το γεγονός αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων του χαλκού με το DNA, που οδηγεί σε σταθεροποίηση της διπλής έλικας. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το σημείο τήξεως του (Ct-DNA) είναι περίπου 65°C, τα σημεία τήξεως τόσο του υποκαταστάτη όσο και των συμπλόκων αυξάνουν σε LVX (85.0°C), (1), 89.9 °C, (2) 87.7 °C (3) 88.2°C. Οι τιμές αυτές υποδηλώνουν ότι υπάρχει μια επιπλέον σταθεροποίηση της διπλής έλικας του DNA έπειτα από την κατεργασία με τα σύμπλοκα αυτά. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στην δημιουργία ενός νέου συμπλόκου, του συμπλόκου με το DNA. Οι αρωματικοί δακτύλιοι του συμπλόκου του χαλκού παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA αναπτύσσοντας τοιουτοτρόπως υδροφοβικές και π-π αλληλεπιδράσεις.

6.4.3 Μελέτη της σταθερότητας των συμπλόκων του χαλκού με λεβοφλοξασίνη εκτός οργανισμού (in vitro).

Σύμφωνα πάντα με την βιβλιογραφία οι πρωτεΐνες του ορού του αίματος παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην μεταφορά των συμπλόκων στην πάσχουσα περιοχή. Προκειμένου να μελετήσουμε την συμπεριφορά των συμπλόκων του χαλκού με τον υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη καθώς και με τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη σε προσομοιωμένα υγρά ανθρώπινου σώματος, τα σύμπλοκα κατεργάστηκαν με διάλυμα (PBS) το οποίο περιέχει 10 % (FBS). Απορροφήσεις λαμβάνονταν κάθε 30 λεπτά για συνολικό χρονικό διάστημα 24 ωρών. Παρακολουθώντας τις αλλαγές της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου, συμπεραίνουμε ότι κατά την διάρκεια των πέντε πρώτων ωρών τα σύμπλοκα παραμένουν σταθερά. Μετά την πάροδο των πέντε ωρών παρατηρείται μια αύξηση στην ένταση της απορρόφησης η οποία πιθανότατα να οφείλεται στην σταδιακή υδρόλυση των συμπλόκων του χαλκού [48].



Σχήμα 6.5: Ηλεκτρονικό φάσμα α) του απλού συμπλόκου του χαλκού, β) του μικτού συμπλόκου του χαλκού με φαινανθρολίνη, γ) του μικτού συμπλόκου του χαλκού με διπυριδίνη και τέλος δ) του υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη σε διάλυμα PBS.

6.4.4 Αντικαρκινική δράση των συμπλόκων του χαλκού με λεβοφλοξασίνη.

6.4.4.1 Κυτταροτοξική Αξιολόγηση

Για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων του χαλκού χρησιμοποιήθηκαν MCF-7 (ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του μαστού). Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αναπτύχθηκε σε διάλυμα DMEM το οποίο περιέχει επιπλέον 10% FBS, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 units / mL πενικιλίνης και 100 μg / mL στρεπτομυκίνη. Όλα αυτά διατηρήθηκαν σε διάλυμα DMEM υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% ως προς διοξείδιο του άνθρακα. Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά τοποθετούνται ανά 5×10^5 σε πλάκες των 95 φρεατίων και έπειτα από επώαση 24 ωρών και ενώ βρίσκονται στην φάση της εκθετικής ανάπτυξης, υποβάλλονται σε θεραπεία με τον υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη και τα σύμπλοκα του με τον χαλκό.

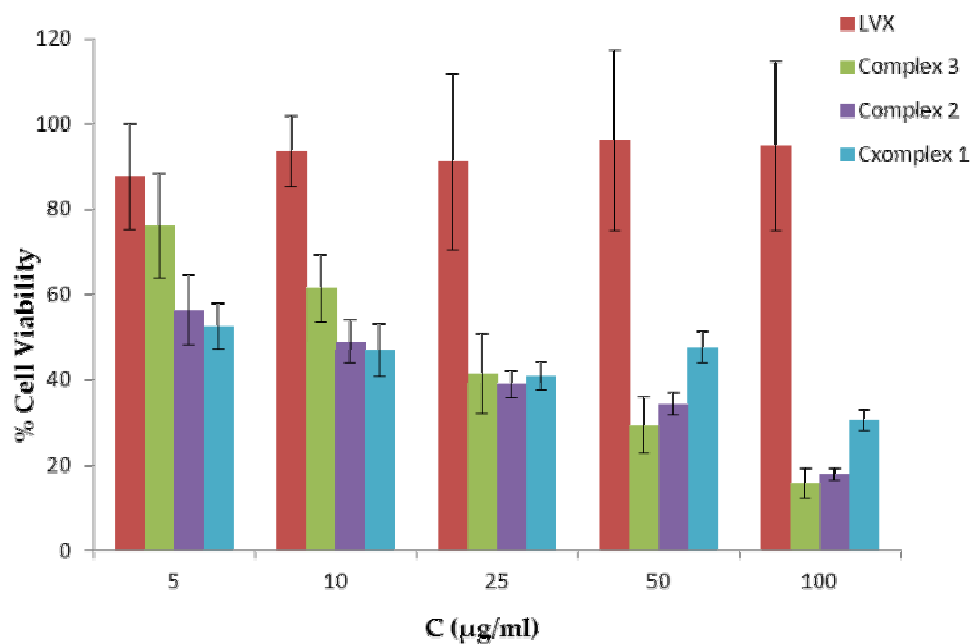
Η χρωματομετρική μέθοδος του MTT χρησιμοποιείται προκειμένου να διερευνηθεί η ζωτικότητα των κυττάρων μετά από 24 ωρη επώαση με τον υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη και τα συμπλοκά του με τον χαλκό σε

διαφορετικές συγκεντρώσεις τους. Είναι γνωστό ότι η χρωματομετρική μέθοδος του MTT μετράει την μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων, βασισμένη στην μετατροπή του MTT σε φορμαζάνη, από το ένζυμο υδρογενάση.

Αρχικά τοποθετούνται 5×10^5 κύτταρα στην πλάκα των 96 φρεατίων και υποβάλλονται σε θεραπεία για ένα 24 ωρο με διαλύματα συγκεντρώσεων 100, 50, 25, 10 και 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ της κάθε ένωσης ενώ επωάζονται στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% ως προς διοξείδιο του άνθρακα. Εν συνεχεία προστίθενται διάλυμα MTT συγκέντρωσης 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και τα κύτταρα επωάζονται στις ίδιες ακριβώς συνθήκες για επιπλέον τέσσερις ώρες, στοχεύοντας στην μέτρηση της μετατροπής του MTT (κίτρινο χρώμα) σε κρυστάλλους φορμαζάνης (μοβ χρώμα) από τα ζωντανά κύτταρα.

Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλύθηκαν μετά την προσθήκη του DMSO και επωάστηκαν στους 37°C για τέσσερις ώρες. Η απορρόφηση του διαλύματος μετρήθηκε στα 520 nm (μήκος κύματος αναφοράς 640 nm). Τα αποτελέσματα από την δοκιμασία MTT παρουσιάζονται με βάση τις απορροφήσεις στα $520 \pm \text{SD}$, χρησιμοποιώντας δεδομένα από δύο διαφορετικά πειράματα (πειράματα εις τριπλούν) [52-54].

Όπως παρατηρείται από το ακόλουθο διάγραμμα (σχήμα 6.6), η % επιβίωση όλων των συμπλόκων μειώνεται συναρτήσει της συγκέντρωσης. Η λεβοφλοξασίνη ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν είναι τοξική. Εν αντιθέση τα σύμπλοκα του χαλκού με την λεβοφλοξασίνη, δίνουν μια εντελώς διαφορετική εικόνα μιας και εμφανίζονται πιο δραστικά από την ελεύθερη λεβοφλοξασίνη. Τα σύμπλοκα (1-3) είναι πολύ τοξικά στην περιοχή συγκεντρώσεων 25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και το σύμπλοκο (3), τοξικότερο, γεγονός το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία [49, 50, 51].



Σχήμα 6.6: % Επιβίωση των MCF-7 κυττάρων με τα σύμπλοκα του χαλκού, α) λεβοφλοξασίνη (κόκκινο χρώμα), β) μικτό σύμπλοκο του χαλκού με φαινανθρολίνη (πράσινο χρώμα), γ) μικτό σύμπλοκο του χαλκού με διπυριδίνη (μοβ χρώμα) και δ) απλό σύμπλοκο του χαλκού (γαλάζιο χρώμα).

6.5 Συμπεράσματα

Σε αυτήν την ενότητα μελετήθηκε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η βιολογική δράση τριών συμπλόκων του χαλκού με τον υποκαταστάτη τρίτης γενιάς λεβοφλοξασίνη.

Η κρυσταλλική δομή τόσο του απλού όσο και του μικτού συμπλόκου με διπυριδίνη προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Βάση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ καθώς και της φασματοσκοπικής μελέτης των συμπλόκων, ο υποκαταστάτης λεβοφλοξασίνη συνδέεται με το μεταλλικό ιόν του χαλκού με ένα καρβοξυλικό και ένα κετονικό οξυγόνο.

Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το απλό σύμπλοκο του χαλκού έχει επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία ενώ το μικτό με διπυριδίνη (σύμπλοκο 2) έχει γεωμετρία παραμορφωμένης τετραγωνικής πυραμίδας. Το EPR διαλυμάτων σε μεθανόλη στους $T=120$ K υποστηρίζει την δομή του συμπλόκου (2). Επιπλέον υποστηρίζει ότι τα σύμπλοκα (2) και (3) με τους υποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη αντίστοιχα, έχουν παρόμοιες μαγνητικές παραμέτρους, υποδεικνύοντας ότι τα μονομερή είδη αυτών, σε κανονική θερμοκρασία παρουσιάζουν παρόμοιους τρόπους ένταξης. Ακόμη η μελέτη EPR του συμπλόκου (3) έδειξε ότι τα κέντρα χαλκού διευθετούνται κυρίως σε διμερή όπως έδειξε η κρυσταλλογραφική μελέτη για το μικτό σύμπλοκο με διπυριδίνη.

Μελατήσαμε επίσης την αλληλεπίδραση των τριών συμπλόκων του χαλκού καθώς και της λεβοφλοξασίνης με το (Ct-DNA). Οι μελέτες ηλεκτρονικού φάσματος αποκάλυψαν ότι τα σύμπλοκα του χαλκού εμφανίζουν υψηλότερες σταθερές σύνδεσης με το DNA σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η συμπλοκοποίηση του υποκαταστάτη στο μεταλλικό ιόν ενισχύει την αντικαρκινική δράση έναντι της κυτταρικής σειράς MCF-7. Επιπλέον, η φύση του N-δότη επηρεάζει την αντιβακτηριακή δράση κατά την ακόλουθη σειρά $rhen > biry$ ενώ η καλύτερη αναστολή μεταξύ των συμπλοκών χαλκού καθώς και του ελεύθερου υποκαταστάτη παρέχεται από το μικτό σύμπλοκο του χαλκού με $rhen$. Αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα της μελέτης των συμπλοκών με PBS τα οποία έδειξαν πως η σταθερότητα των συμπλοκών του χαλκού με την λεβοφλοξασίνη σε διάλυμα, μεταβάλλεται με τον χρόνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΥΟ ΜΙΚΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΛΕΒΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗΣ ΜΕ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟ ΜΕ ΕΤΕΡΟΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ ΔΙΠΥΡΙΔΙΝΗ ΚΑΙ ΦΑΙΝΑΝΘΡΟΛΙΝΗ- ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ-ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟ DNA ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ

7.1 Σύνθεση συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο.

Η σύνθεση των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:

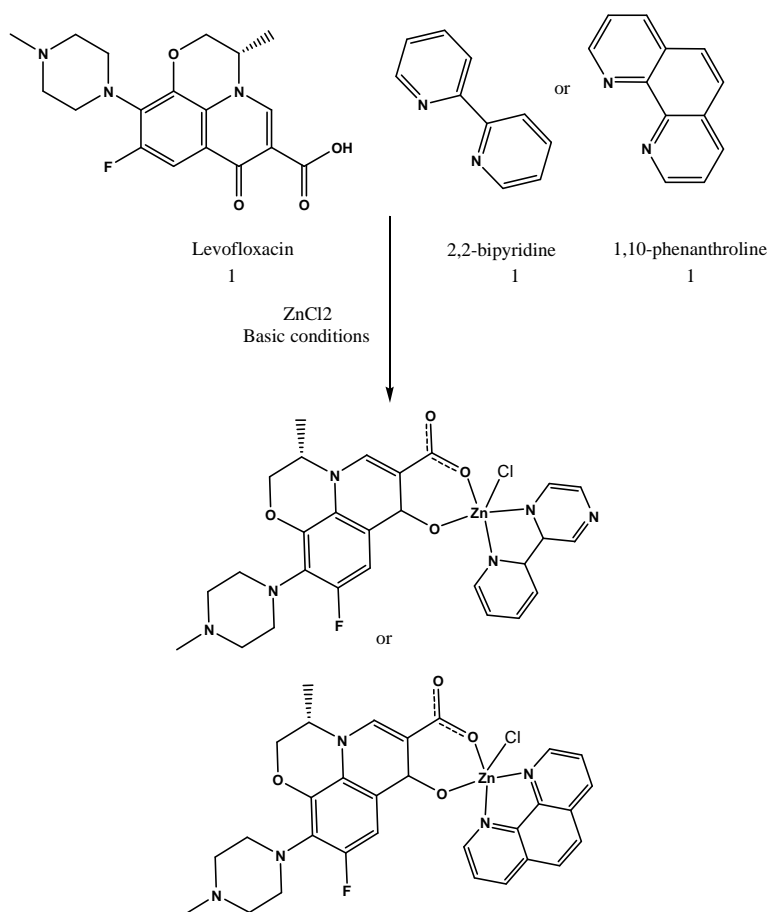
[Zn (levo) bipy Cl] •2CH₃OH (1)

Σε μεθανολικό διάλυμα (5ml) της λεβοφλοξασίνης (0.28mmol, 100.0 mg) το οποίο έχει αποπρωτονιωθεί παρουσία μεθανολικού διαλύματος CH₃ONa, προστίθενται στάγδην μεθανολικό διάλυμα (10ml) ZnCl₂ (0.28 mmol, 38.2 mg) και διπυριδίνη (0.28mmol, 43.7 mg,) και το διάλυμα αναδεύεται περίπου για μισή ώρα σε θερμοκρασία βρασμού ενώ παράλληλα συμπυκνώνεται στο μισό του όγκο. Ένα άμορφο κίτρινο προϊόν λαμβάνεται το οποίο διηθείται και εκπλένεται με ψυχρή μεθανόλη, και τέλος ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού. Η στοιχειακή του ανάλυση έδωσε:**ZnC₃₀H₃₅FN₅O₆Cl (M.B=681.404) Θεωρητική:C:52.88, H: 5.17 N:10.28 Πειραματική: C:52.23, H: 4.50, N:10.35**

[Zn (levo) (phen) Cl] •CH₃OH (2)

Σε μεθανολικό διάλυμα (5ml) της λεβοφλοξασίνης (0.28mmol, 100.0 mg) το οποίο έχει αποπρωτονιωθεί παρουσία μεθανολικού διαλύματος CH₃ONa, προστίθενται στάγδην μεθανολικό διάλυμα (10ml) ZnCl₂ (0.28 mmol, 38.2 mg) και φαινανθρολίνη (0.28mmol, 55.0 mg,) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται περίπου για μισή ώρα σε θερμοκρασία βρασμού συμπυκνώνοντας το στο μισό του όγκο. Ένα άμορφο κίτρινο προϊόν λαμβάνεται το οποίο διηθείται και εκπλένεται με ψυχρή μεθανόλη ενώ ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού. Η στοιχειακή του ανάλυση έδωσε:

$ZnC_{31}H_{31}FN_5O_5Cl$. (M.B=673.393) Θεωρητική: C:55.29, H: 4.64, N:10.40
Πειραματική: C:55.21, H: 4.41, N:10.30.



Σχήμα 7.1: Πιθανή δομή των συμπλόκων [Zn (levo) (phen) Cl] CH₃OH ή [Zn (levo) (bipy) Cl] 2CH₃OH.

7.2 Χαρακτηρισμός των μικτών συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο.

7.2.1 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων με υπέρυθρη φασματοσκοπία (IR)

Στα φάσματα υπέρυθρου των συμπλόκων, η περιοχή που παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες για την δομή τους είναι η περιοχή 1750-1350 cm⁻¹, από όπου παρουσιάζονται αρκετές ισχυρές δονήσεις τάσης των διπλών

κυρίως δεσμών. Χρήσιμες βέβαια συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την δομή του συμπλόκου μας παρέχουν και άλλες περιοχές των φασμάτων.

Έτσι λοιπόν, στο φάσμα υπερύθρου, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν δύο ισχυρές ταινίες που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης της καρβοξυλικής ομάδας και είναι ενδεικτικές του τρόπου συναρμογής της. Πρόκειται για την ασύμμετρη $\nu_{\text{ασυμ}}(\text{C-O})$ και την συμμετρική $\nu_{\text{συμ}}(\text{C-O})$ δόνηση τάσης. Η ασύμμετρη δόνηση τάσης $\nu_{\text{ασυμ}}(\text{C-O})$ γενικά εμφανίζεται σε υψηλότερες τιμές συχνότητας περίπου στα $1500\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ σε σχέση με την συμμετρική $\nu_{\text{συμ}}(\text{C-O})$ που εμφανίζεται στα $1360\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$. Πιο συγκεκριμένα η χαρακτηριστική ταινία στα 1720 cm^{-1} , η οποία υπάρχει στο φάσμα της ελεύθερης λεβοφλοξασίνης και αποδίδεται στην ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα $\nu(\text{C=O})$, απουσιάζει από τα φάσματα των συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου (ΠΙ.4-5) και έχει αντικατασταθεί από δύο ισχυρές ταινίες στα 1617 cm^{-1} και στα 1468 cm^{-1} και αφορούν το σύμπλοκο (1), και στα 1618 cm^{-1} και στα 1462 cm^{-1} το μικτό σύμπλοκο του ψευδαργύρου με την φαινανθρολίνη, οι οποίες αποδίδονται στην ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση τάσης, αντίστοιχα. Οι χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των φασμάτων υπερύθρου (IR) των συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 7.1):

Πίνακας 7.1: Χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου στην περιοχή του υπερύθρου.

	$\nu(\text{C=O})_p$	$\nu(\text{C=C})$	$\nu(\text{C=O})_{\text{asym}}$	$\nu(\text{C=O})_{\text{sym}}$	$\nu(\text{C=N})$	Out of plane	Δ^a	Zn-O	Zn-N
Hlevo	1614	-	1720	-	-	-	-	-	-
Phenanthroline	-	1498	-	-	1418	733	-	-	-
[Zn(levophenCl)]CH₃OH (2)	1574	1512	1618	1462	1427	728	156	504	423
Bipyridine	-	1573	-	-	1450	756	-	-	-
[Zn(levobibyCl)]2CH₃OH (1)	1585	1514	1617	1468	1427	774	149	504	417

Η συχνότητα δόνησης τώρα του πυριδονικού καρβονυλίου $\nu(\text{C=O})_{\text{πυρ}}$ μετατοπίζεται από τα 1614 cm^{-1} στα 1585 cm^{-1} για το σύμπλοκο (1), και στα 1574 cm^{-1} για το σύμπλοκο (2). Σύμφωνα λοιπόν με τα προαναφερθέντα μπορούμε να πούμε ότι η λεβοφλοξασίνη συνδέεται με το μεταλλικό ιόν δια

μέσου ενός πυριδινικού και ενός καρβοξυλικού οξυγόνου. Επιπρόσθετα η ισχυρή ταινία στα 728 cm^{-1} του συμπλόκου (2) αποδίδεται στην εκτός επιπέδου δόνηση του ετεροκυκλικού δακτυλίου της φαινανθρολίνης ενώ η χαρακτηριστική ταινία στα 774 cm^{-1} του συμπλόκου (1) αποδίδεται στον ετεροκυκλικό δακτύλιο της διπυριδίνης. Ο παραπάνω τρόπος ένταξης υποστηρίζεται και από τις δονήσεις Zn-O οι οποίες παρατηρούνται στα 504 cm^{-1} και για τα δύο σύμπλοκα (1 και 2) αντίστοιχα ενώ οι ταινίες στα 417 και 423 cm^{-1} αποδίδονται στην δόνηση του δεσμού Zn-N. Τέλος οι ταινίες στα 320 και 316 στο φάσμα Raman, αντιστοιχούν στην (Zn-Cl) (ΠΙΙ.2).

Μετατοπίσεις τώρα των ταινιών της ελεύθερης φαινανθρολίνης στην περιοχή των $1400\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$ καθώς επίσης και στην περιοχή $600\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται στο φάσμα του συμπλόκου (2). Πιο συγκεκριμένα οι κορυφές που αντιστοιχούν στην δόνηση του δακτυλίου ν (C=C), και ν (C=N) στους 1498 και 1418 cm^{-1} μετατοπίζονται στους 1512 και 1427 cm^{-1} ένδειξη της ένταξης της 1.10-φαινανθρολίνης στο μεταλλικό ιόν, ενώ οι εκτός επιπέδου δονήσεις κάμψης των υδρογόνων της ελεύθερης φαινανθρολίνης μετατοπίζονται από τους 845 και 733 cm^{-1} στους 844 και 728 αντίστοιχα. Επίσης η μετατόπιση της ταινίας από τους 756 στους 774 cm^{-1} του υποκαταστάτη της διπυριδίνης είναι ενδεικτική της σύμπλεξης του μορίου της διπυριδίνης στο μεταλλικό κέντρο του ψευδαργύρου.

Η διαφορά τώρα μεταξύ της συμμετρικής και της ασύμμετρης δόνησης τάσης της καρβοξυλικής ομάδας κυμαίνεται στα 150 cm^{-1} και αποτελεί ένδειξη ότι η καρβοξυλική ομάδα συναρμόζεται μονοσχιδώς [29,52,53].

7.2.2 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο με ηλεκτρονική φασματοσκοπία (UV-vis).

Τα φάσματα υπεριώδους των συμπλόκων του ψευδαργύρου ελήφθησαν σε διάλυμα διμεθυσουλφοξειδίου (DMSO). Οι απορροφήσεις των ταινιών δίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 7.2).

Τα φάσματα απορρόφησης των συμπλόκων είναι ενδεικτικά των θέσεων συναρμογής του μετάλλου με το πυριδινικό και το καρβοξυλικό οξυγόνο του υποκαταστάτη. Στην περιοχή του ορατού οι χαρακτηριστικές ταινίες που αφορούν d-d μεταπτώσεις, εμφανίζονται μόνο για τα σύμπλοκα

των μετάλλων μετάπτωσης. Αναλυτικά, το φάσμα υπεριώδους του μορίου της λεβοφλοξασίνης σε διάλυμα (DMSO) εμφανίζει τρεις χαρακτηριστικές ταινίες στα 259, 300 και 330 nm. Τα ηλεκτρονικά φάσματα των συμπλόκων του ψευδαργύρου είναι πανομοιότυπα με αυτό της λεβοφλοξασίνης ελαφρώς όμως μετατοπισμένα, γεγονός που είναι ενδεικτικό της σύμπλεξης. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο (1) του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη εμφανίζει (intra)-ligand (IL) απορροφήσεις στα 253, 297, 335 nm και έναν ώμο στα 363 nm ο οποίος μπορεί να αποδοθεί στην μεταφορά φορτίου από τον υποκαταστάτη στο μέταλλο (CT). Όσον αφορά τώρα το μικτό σύμπλοκο του ψευδαργύρου με την φαινανθρολίνη εμφανίζει ταινίες στα 265, 300, 333 και έναν ώμο στα 361 nm. Το γεγονός ότι και τα δύο σύμπλοκα παρουσιάζουν όμοια φάσματα τόσο σε ημιόλι όσο και σε διάλυμα, σημαίνει ότι τα σύμπλοκα διατηρούν την δομή τους σε διάλυμα [54].

Πίνακας 7.2: Χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου.

	IL		CT	
Hlevo	259	300	330	-
[Zn(levophenCl)]CH₃OH	265	300	333	361
[Zn(levobibyCl)]2CH₃OH	253	297	335	363

IL : Intra ligand
CT : Charge transfer

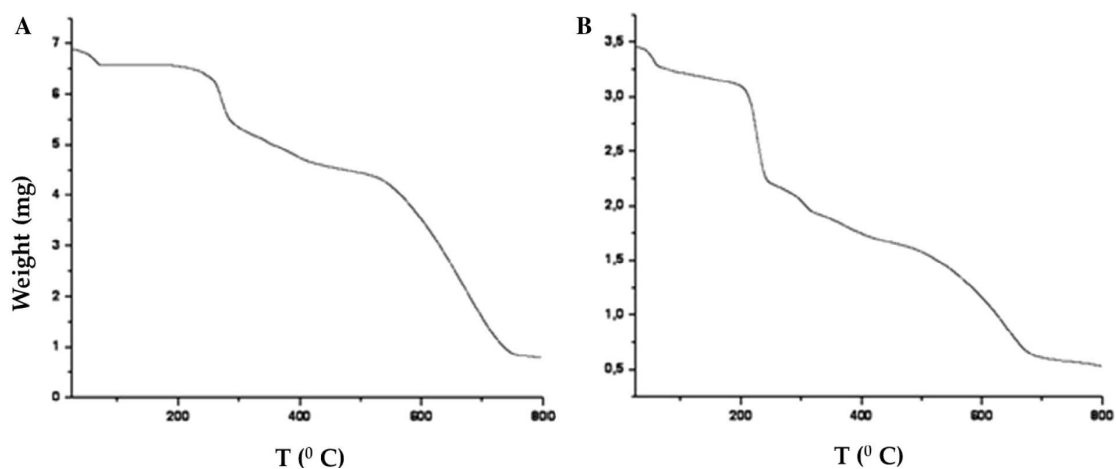
7.2.3 Χαρακτηρισμός των μικτών συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο με θερμική ανάλυση (TGA)

Η θερμοσταθμική ανάλυση των μικτών συμπλόκων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας συσκευή Mettler Star^e SW9.30, η οποία λειτουργούσε με ρυθμό θέρμανσης 10 °C ανά λεπτό σε ατμόσφαιρα N₂, με σκοπό να εξακριβωθούν τα στάδια διάσπασης.

Οι καμπύλες των θερμογραφημάτων των συμπλόκων φαίνονται στο ακόλουθο (σχήμα 7.2). Σύμφωνα με το θερμογράφημα του συμπλόκου (1), η πρώτη απώλεια βάρους (**πειραματική:9.2 %**, **θεωρητική:9.4 %**) συμβαίνει στην περιοχή θερμοκρασίας (25-130 °C), και αντιστοιχεί στην απομάκρυνση

από το σύμπλοκο δυο μορίων μεθανόλης. Η δεύτερη κύρια απώλεια βάρους (**πειραματική:75.8 %**, **θεωρητική:75.9 %**) συμβαίνει στην περιοχή (130-800 °C) και προέρχεται από την αποσύνθεση των δύο μορίων υποκαταστάτων δηλαδή ενός μορίου διπυριδίνης και ενός μορίου λεβοφλοξασίνης. Το τελικό υπόλειμμα οφείλεται στο οξείδιο του ψευδαργύρου (**πειραματική:14.0 %**, **θεωρητική:12.0 %**) [52].

Όσον αφορά το δεύτερο σύμπλοκο, η αποσύνθεσή του λαμβάνει χώρα σε τρία αυστηρά καθορισμένα στάδια. Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου, στην περιοχή (25-130 °C) η πρώτη απώλεια βάρους (**πειραματική:4.4** **θεωρητική: 4.8 %**) αντιστοιχεί σε ένα μόριο μεθανόλης ενώ η απώλεια βάρους που πραγματοποιείται κατά την διάρκεια του δεύτερου και τρίτου σταδίου (**πειραματική:81.3%** **θεωρητική:84.0 %**) αντιστοιχεί στην αποσύνθεση τόσο του υποκαταστάτη της φαινανθρολίνης όσο και του υποκαταστάτη της λεβοφλοξασίνης. Το τελικό υπόλειμμα αποτελείται από οξείδιο του ψευδαργύρου. (**πειραματική:11.2 %**, **θεωρητική:12.0 %**)

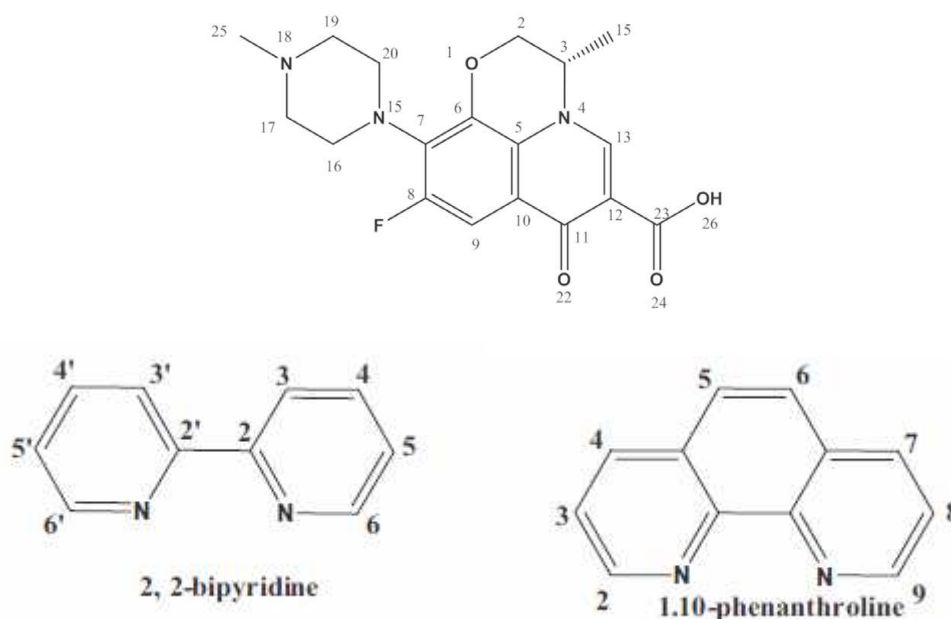


Σχήμα 7.2: Θερμογράφημα των συμπλόκων (A) [Zn (levo) phen Cl] CH₃OH και (B) [Zn (levo) bipy Cl] 2CH₃OH

7.2.4 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, (¹H-NMR).

Ο υποκαταστάτης λεβοφλοξασίνη καθώς επίσης τα μικτά συμπλοκά της με ψευδάργυρο και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και

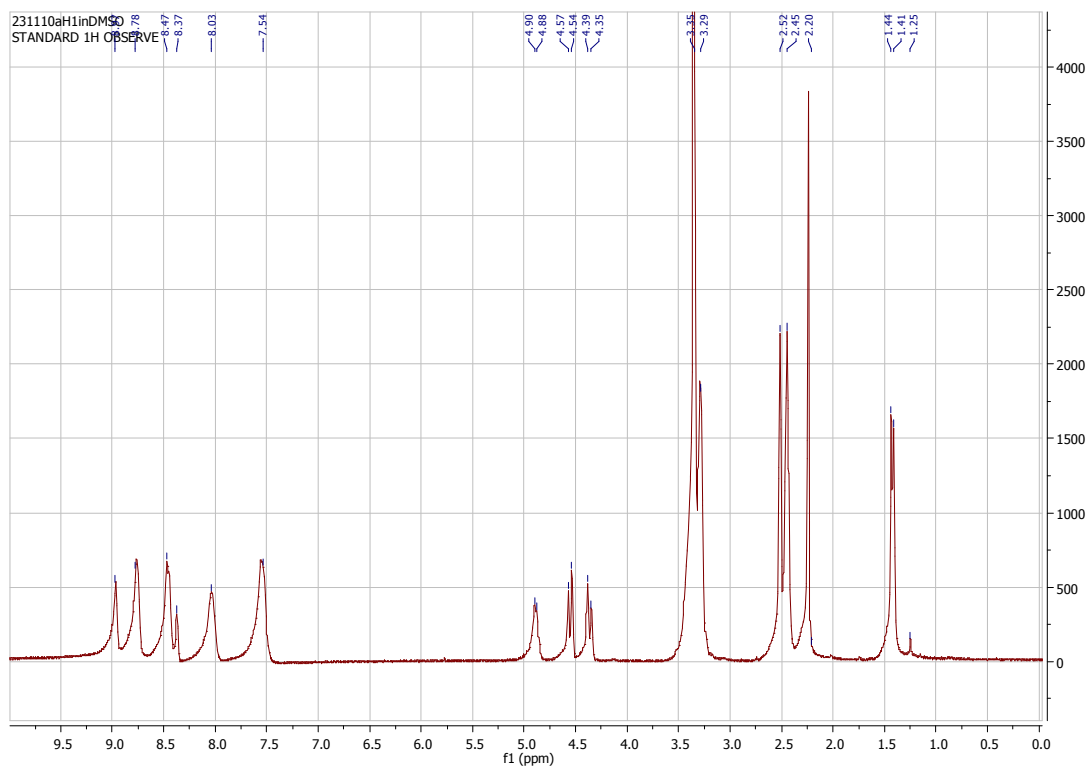
φαινανθρολίνη χαρακτηρίστηκαν σε διάλυμα δευτεριωμένου (DMSO), με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$) και ($^{13}\text{C-NMR}$). Η αποτίμηση του φάσματος πραγματοποιήθηκε μετά από σύγκριση των φασμάτων NMR των ελεύθερων υποκαταστατών με εκείνα των συμπλοκών. Έτσι λοιπόν συγκρίνοντας τα φάσματα των συμπλόκων με αυτά της ελεύθερης λεβοφλοξασίνης καθώς και των ετερουποκαταστατών, φαίνεται η μετατόπιση των πρωτονίων που επιβεβαιώνει την σύμπλεξη τους.



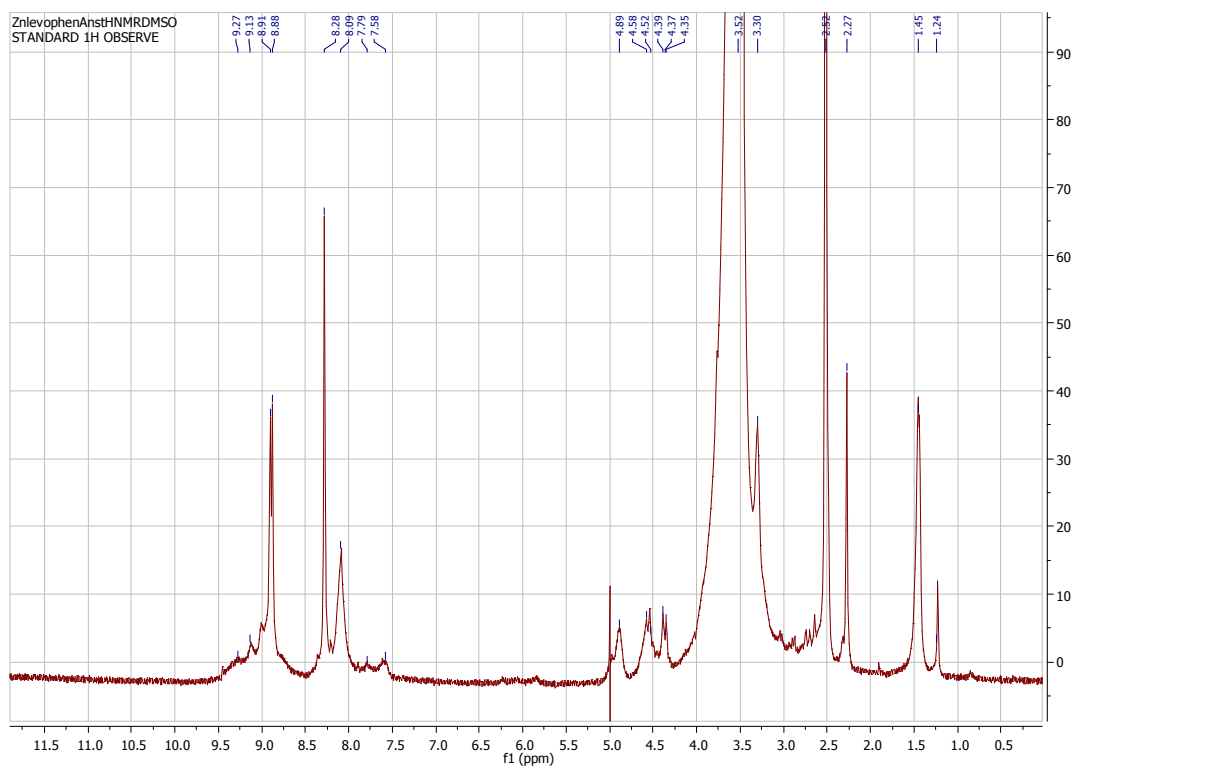
Σχήμα 7.3: Σχήματα με αρίθμηση του υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνης και των ετερουποκαταστατών (2,2'-διπυριδίνης και 1,10-φαινανθρολίνης).

Πίνακας 7.3: $^1\text{H-NMR}$ Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις των συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου.

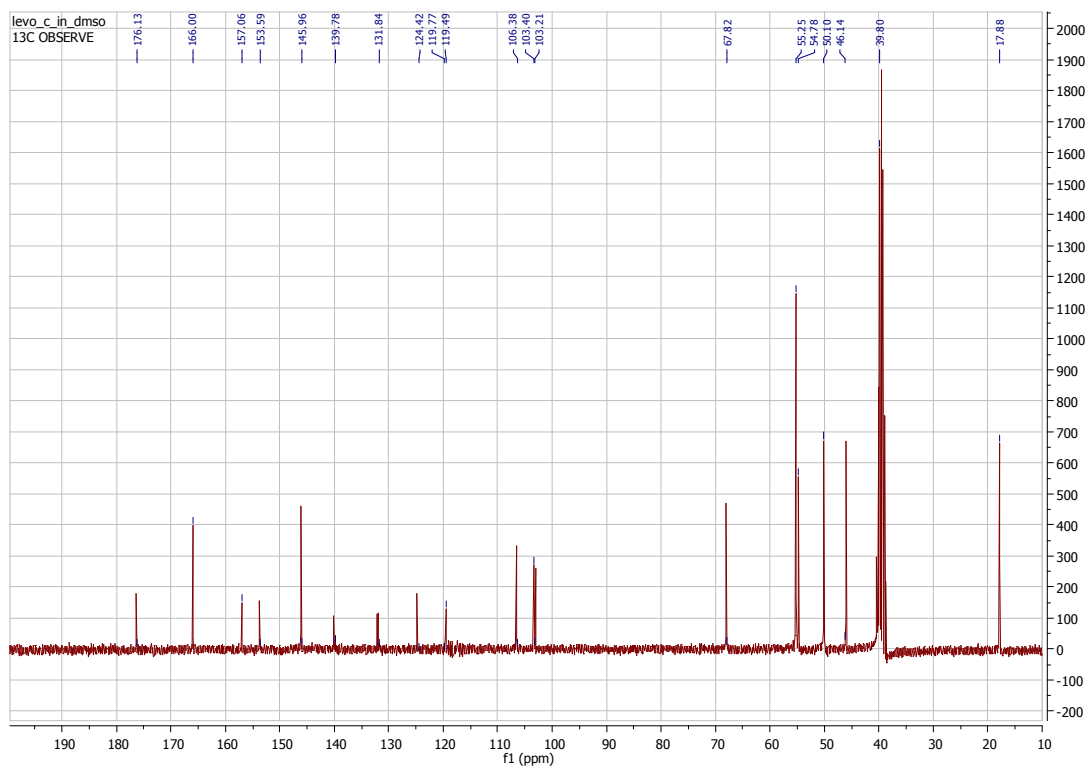
$^1\text{H NMR}$	Levofloxacin	1,10-Phenanthroline	[Zn(levof)(phen)Cl]·MeOH	2,2'-Bipyridine	[Zn(levof)(bipy)Cl]·2MeOH
H13	8.96	-	8.91	-	8.99
H9	7.58	-	7.63	-	7.75
CH3 14	1.45	-	1.45	-	1.45
CH3' 25	2.24	-	2.27	-	2.44
H 2	4.94	-	4.89	-	4.92
H 3	4.40	-	4.39	-	4.42
H 19, 17	2.45	-	2.44	-	2.72
H 20, 16	4.61	-	4.58	-	4.62
H3	-	7.96	7.81	-	-
H6	-	7.77/7.96/7.74/7.73	8.31/8.31/8.24/8.13	-	-
H1	-	9.10/9.10/9.09	9.16/9.04/8.94	-	-
H5	-	8.48/8.45-	8.91	-	-
H2	-	-	-	8.587	8.78
H3	-	-	-	7.124	8.03
H4	-	-	-	7.658	8.37
H5	-	-	-	8.496	8.47



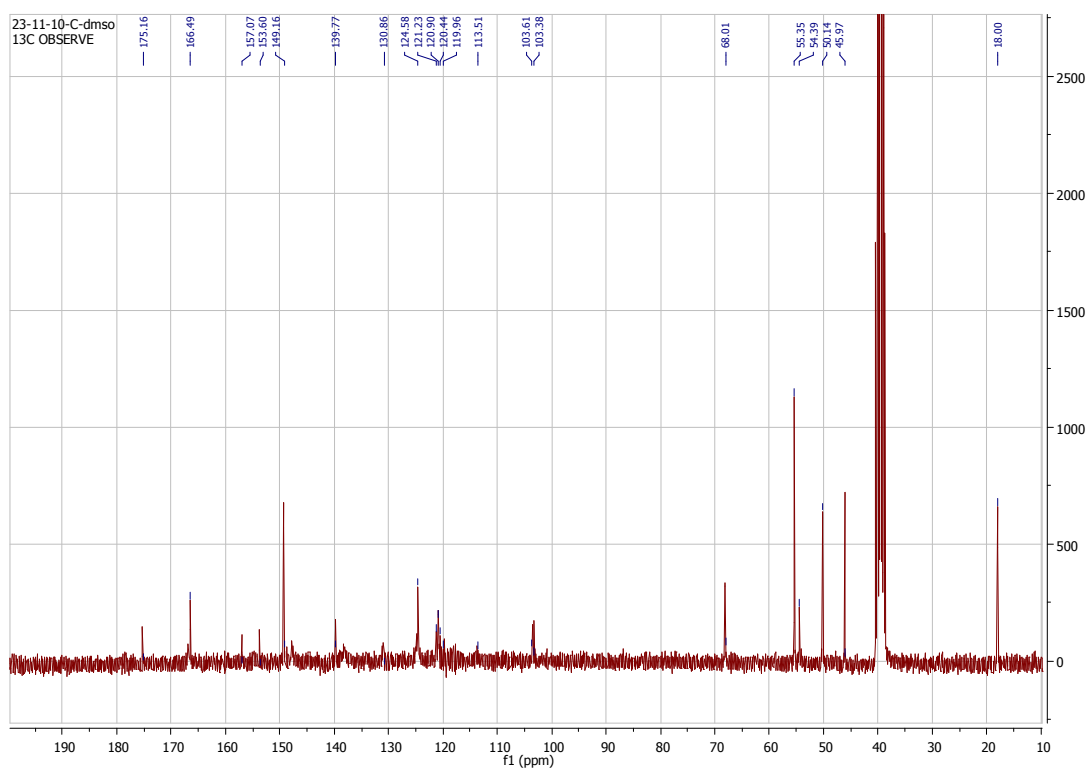
Σχήμα 7.5: $^1\text{H-NMR}$ του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και τον ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη σε DMSO.



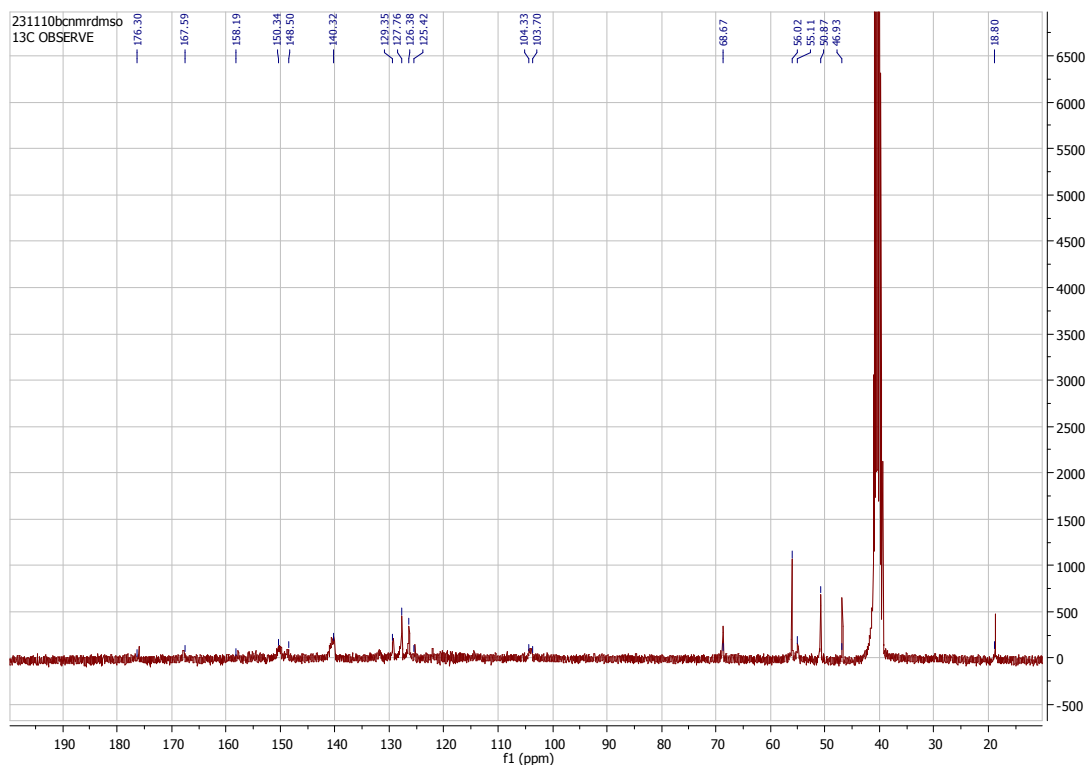
Σχήμα 7.6: $^1\text{H-NMR}$ του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και τον ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη σε DMSO.



Σχήμα 7.7: ^{13}C -NMR του υποκαταστήτη λεβοφλοξασίνη σε DMSO.



Σχήμα 7.8: ^{13}C -NMR του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και τον ετερουποκαταστήτη διπυριδίνη σε DMSO.



Σχήμα 7.9: ^{13}C -NMR του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και τον ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη σε DMSO.

7.3 Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη.

Η δρατικότητα των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου εξετάστηκε έναντι τριών μικροοργανισμών, δύο Gram αρνητικών, όπως είναι ο *Escherichia Coli* και ο *Pseudomonas Aeruginosa* και ενός Gram θετικού, του *Staphylococcus Aureus*. Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 7.5):

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα, τα δύο σύμπλοκα (1,2) είναι περισσότερο δραστικά από το ελεύθερο φάρμακο. Πιο συγκεκριμένα, τα δύο σύμπλοκα είναι 8 φορές δραστικότερα έναντι της *E. Coli*, αλλά δρουν παρόμοια έναντι του *P. Aeruginosa*. Επιπλέον και τα δύο σύμπλοκα είναι 4 φορές δραστικότερα έναντι του *S. Aureus*, σε σχέση με την ελεύθερη λεβοφλοξασίνη. Βάση των παραπάνω μπορούμε να πούμε ότι με την συμπλοκοποίηση, αυξάνει η

αντιβακτηριακή δράση και το γεγονός αυτό αποδίδεται στην συνεργιστική επίδραση των υποκαταστατών.

Πίνακας 7.5: Χαρακτηριστικές τιμές MIC (μg/mL) για τα σύμπλοκα του ψευδαργύρου.

Complex	Gram (-)		Gram (+)
	<i>E. coli</i>	<i>P. Aeruginosa</i>	<i>S. Aureus</i>
Levofloxacin	32	32	64
1,10-Phenanthroline	32	32	32
2,2'-Bipyridine	256	256	256
[Zn(lev)(phen)Cl]-MeOH (1)	4	32	16
[Zn(lev)(bipy)Cl]-2MeOH (2)	4	32	16

Η λεβοφλοξασίνη όπως και οι άλλες φθοροκινολόνες, διαπερνούν την βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη μέσω των αλληλεπιδράσεων των καρβόνυλ- και καρβοξυλ-ομάδων της λεβοφλοξασίνης με τα μεταλλικά ιόντα του μαγνησίου. Σε γενικές γραμμές οι φθοροκινολόνες διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη δια μέσω των μονοπατιών πουρίνης ή δια μέσω παθητικής διάχυσης. Η αύξηση της βιολογικής δράσης των συμπλόκων μπορεί να αποδοθεί στην βελτιωμένη διείσδυση των συμπλόκων στις λιπιδικές μεμβράνες. Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης, είναι ότι η πολικότητα του μεταλλικού ιόντος μειώνεται λόγω του μερικού διαμοιρασμού του θετικού του φορτίου με τις ομάδες δότες και λόγω αποσταθεροποίησης των πηλεκτρονίων στον χηλικό δακτύλιο. Έτσι βελτιώνεται ο λιπόφιλος χαρακτήρας του κεντρικού μεταλλικού ιόντος καθώς και η διείσδυση διαμέσου ημιπερατών λιπόφιλων στρωμάτων του κυττάρου.

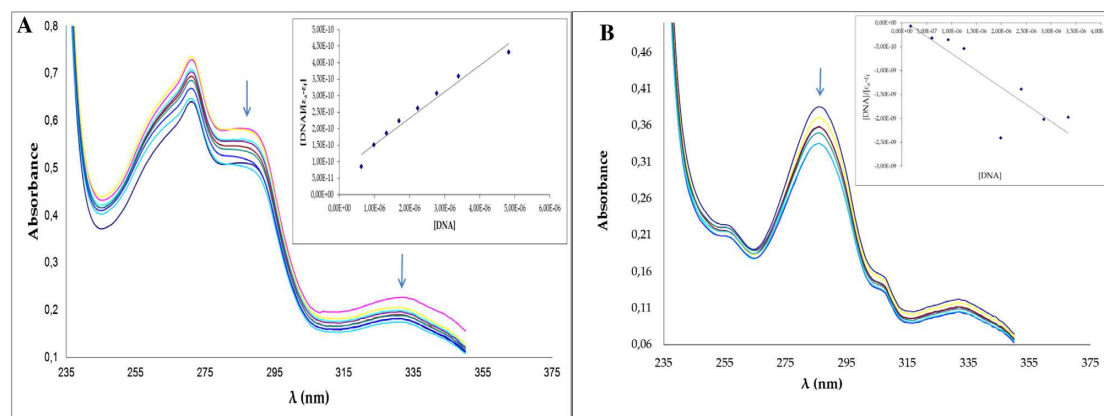
7.4 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με τον υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη με DNA

7.4.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του DNA μέσω μελέτης κινητικής και προσδιορισμού της σταθεράς σταθερότητας των συμπλόκων του ψευδαργύρου.

Το DNA παρουσιάζει όπως αναφέραμε και προτύτερα τρεις πιθανές θέσεις δέσμωσης με τα κινολονικά σύμπλοκα των μετάλλων:

- ☼ δέσμωση στις αύλακες
- ☼ δέσμωση στις φωσφορικές ομάδες και
- ☼ παρεμβολή ανάμεσα στις βάσεις του DNA.

Η συμπεριφορά αυτή έχει σημαντική επίδραση στον βιολογικό ρόλο των κινολονών στα ζωτικά συστήματα. Η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε από το συντελεστή απόσβεσης στα 260 nm. Η καθαρότητα του DNA ελέγχθηκε μετρώντας τις απορροφήσεις στα 260 και 280 nm. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων βρέθηκε 1,8, ένδειξη ότι το DNA είναι ελεύθερο πρωτεϊνών. Τα φάσματα απορρόφησης της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA ελήφθησαν διατηρώντας μια σταθερή συγκέντρωση του συμπλόκου και αυξάνοντας την ποσότητα του προστιθέμενου (Ct-DNA).



Σχήμα 7.10: α) Ηλεκτρονικό φάσμα του μικτού συμπλόκου της λεβοφλοξασίνης με ψευδαργύρου με τον ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη, β) του μικτού συμπλόκου της λεβοφλοξασίνης με ψευδαργύρου με τον ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη.

Η σταθερά σχηματισμού K_b των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με το DNA θύμου αδένος μόσχου (CT), παρουσιάζει την σταθερά δέσμωσης του συμπλόκου ανά ζεύγος βάσεων, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί από την κλίση της ευθείας που δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

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

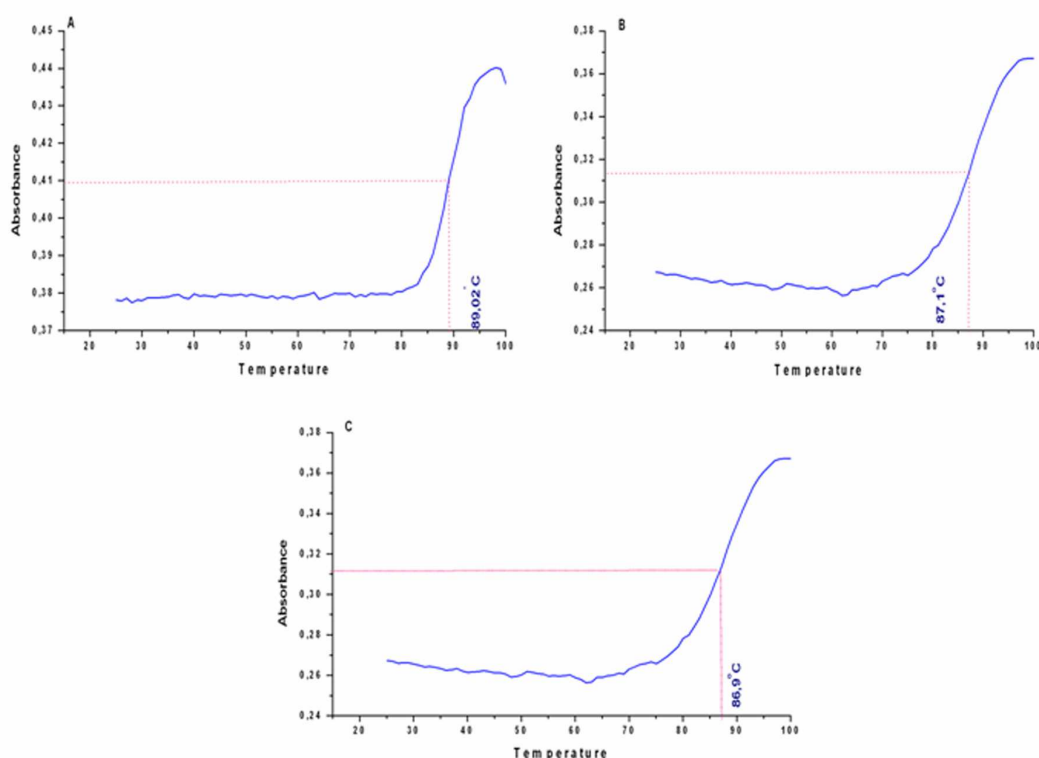
Όπου $\varepsilon_a = A_{\text{obsd}} / [(1), (2)]$, $\varepsilon_f = 0$ συντελεστής απόσβεσης για το ελεύθερο σύμπλοκο και $\varepsilon_b = 0$ συντελεστής απόσβεσης για το σύμπλοκο που έχει δεσμευτεί.

Όπως παρατηρούμε από το παραπάνω διάγραμμα και στα δύο σύμπλοκα η προσθήκη DNA καταλήγει σε υποχρωμισμό και σε μετατόπιση προς την περιοχή του κυανού. Αυτό σημαίνει ότι και τα δύο σύμπλοκα αλληλεπιδρούν με το DNA πιθανότατα δια μέσω ενός τρόπου ο οποίος περιλαμβάνει αλληλεπίδραση ανάμεσα στο αρωματικό χρωμοφόρο και τα ζευγάρια βάσεων του DNA [55]. Η μεγάλη τιμή του $K_b (=1,35 \times 10^6 \text{ M}^{-1})$ για το σύμπλοκο (1) και $(=1,14 \times 10^6 \text{ M}^{-1})$ για το σύμπλοκο (2) υποδηλώνει ισχυρή δέσμευση των συμπλόκων του ψευδαργύρου με το DNA. Πράγματι η τιμή του K_b , των συμπλόκων είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή του ελεύθερου υποκαταστάτη $(=6.67 \times 10^5 \text{ M}^{-1})$, τονίζοντας με αυτό τον τρόπο ότι η σύμπλεξη του υποκαταστάτη στο μεταλλικό κέντρο βελτιώνει σημαντικά την ικανότητα δέσμευσης των συμπλόκων στο DNA. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε ότι η υψηλότερη συγγένεια σύνδεσης, οφείλεται πιθανώς στην επέκταση του π-π συστήματος του παρεμβαλλόμενου υποκαταστάτη, η οποία οδηγεί επιπλέον σε μία επίπεδη επιφάνεια μεγαλύτερη από αυτή του ελεύθερου υποκαταστάτη, με αποτέλεσμα ο συνδεδεμένος υποκαταστάτης να διεισδύει πιο βαθιά και να στοιβάζεται ισχυρότερα μεταξύ των ζευγών βάσεων [47].

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία υπάρχουν δύο τρόποι για έναν αρωματικό δακτύλιο να συνδεθεί στο DNA. Είτε μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης είτε μέσω υπο φοβικής επίδρασης. Σε κάθε περίπτωση η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο φάρμακο και το DNA θα βελτιωθεί. Επιπρόσθετα θα λάβει χώρα και πακετάρισμα μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων με αποτέλεσμα οι π-π αποστάσεις στο εσωτερικό του μορίου να έρθουν τόσο κοντά σε αυτές των ζευγών βάσεων του DNA υποδηλώνοντας αλληλεπίδραση τόσο μέσω παρεμβολής όσο και μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [29].

7.4.2 Μελέτη μεταβολής του σημείου τήξεως (Tm)

Τόσο ο υποκαταστάτης λεβοφλοξασίνη, όσο και τα μικτά σύμπλοκα του με τον ψευδάργυρο μελετήθηκαν με σκοπό την διερεύνηση του πιθανού μηχανισμού δράσης τους. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκαν οι καμπύλες μεταβολής του σημείου τήξεως του DNA και των συμπλόκων του με ψευδάργυρο, ακολουθώντας τις μεταβολές της απορρόφησης στα 260 nm συναρτήσει της θερμοκρασίας [56]. Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνονται τα σχετικά διαγράμματα.



Σχήμα 7.11: Καμπύλες μεταβολής του σημείου τήξεως των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου α). με τον ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη σύμπλοκο (2), β) με τον ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη σύμπλοκο (1) και γ) του υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη.

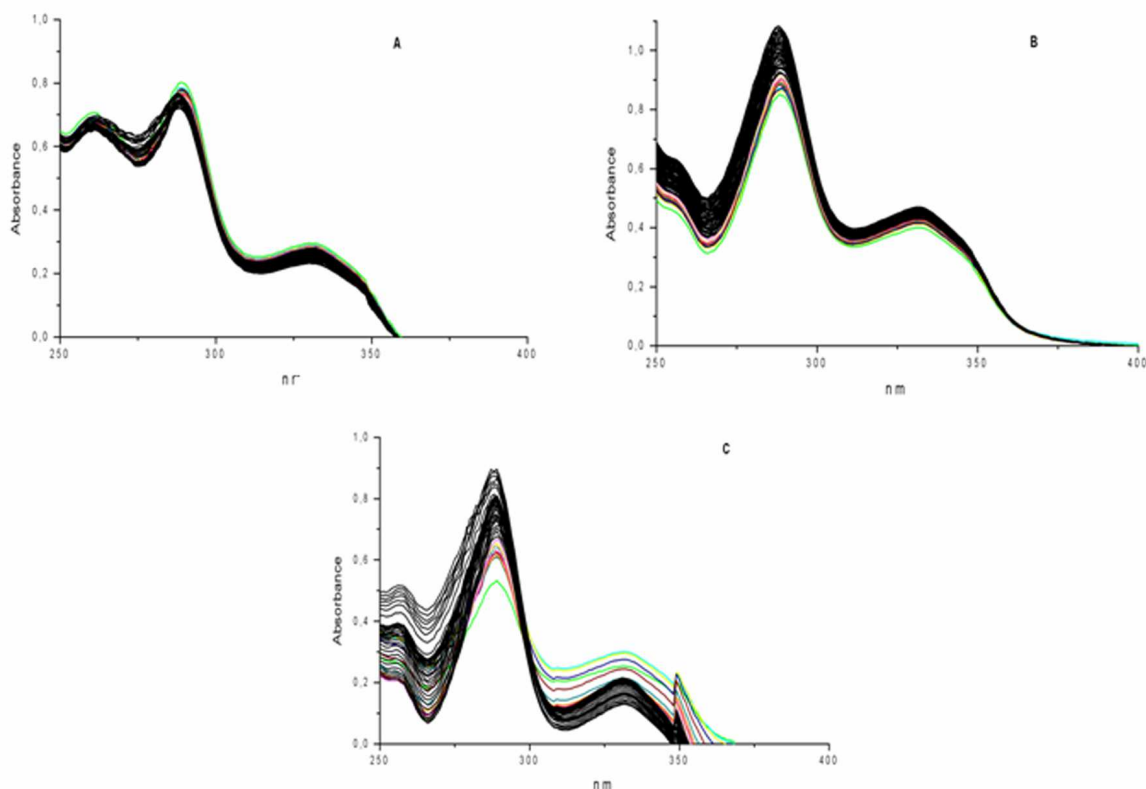
Συγκρίνοντας τις καμπύλες μεταβολής του σημείου τήξεως των συμπλόκων του ψευδαργύρου με αυτή του ελεύθερου υποκαταστάτη, παρατηρείται μια ελαφρά μετατόπιση της θερμοκρασίας σε υψηλότερες τιμές, ένδειξη του σχηματισμού ενός νέου συμπλόκου με το μόριο του DNA, το οποίο συνδέεται περισσότερο ισχυρά με τα ζεύγη βάσεων του DNA. Σύμφωνα

με τα αποτελέσματα που προκύπτουν, τα μικτά συμπλοκά του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη αλληλεπιδρούν με το DNA, και η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε σταθεροποίηση της διπλής έλικας [57]. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί θεωρώντας ότι οι αρωματικοί δακτύλιοι των συμπλόκων του ψευδαργύρου παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA αναπτύσσοντας τοιουτοτρόπως υδροφοβικές και π-π αλληλεπιδράσεις.

Είναι γνωστό πως η θερμοκρασία τήξεως του DNA είναι περίπου 60 °C. Όπως φαίνεται από το παραπάνω σχήμα η θερμοκρασία τήξεως και για τα δύο σύμπλοκα του ψευδαργύρου αλλά και για τον ελεύθερο υποκαταστάτη αυξάνει στους 87.1 για το σύμπλοκο (1), στους 89.0 για το σύμπλοκο (2) και στους 86.9 °C για τον ελεύθερο υποκαταστάτη. Οι προαναφερθείσες τιμές μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια επιπρόσθετη σταθεροποίηση της διπλής έλικας του DNA έπειτα από κατεργασία με τα μικτά σύμπλοκα του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη.

7.4.3 Μελέτη της σταθερότητας των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη εκτός οργανισμού.

Προκειμένου να μελετήσουμε την συμπεριφορά των συμπλόκων του ψευδαργύρου με τον υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη καθώς και με τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη σε προσομοιωμένα υγρά ανθρώπινου σώματος, τα σύμπλοκα (1,2) κατεργάστηκαν με διάλυμα (PBS) το οποίο περιέχει 10 % (FBS). Οι απορροφήσεις των διαλυμάτων λαμβανόταν κάθε 30 λεπτά για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Παρακολουθώντας τις μεταβολές της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου, συμπεράναμε ότι κατά την διάρκεια των πέντε πρώτων ωρών τα σύμπλοκα παραμένουν σταθερά. Μετά όμως την πάροδο των πέντε ωρών παρατηρείται μια αύξηση στην ένταση της απορρόφησης η οποία πιθανότατα να οφείλεται στην σταδιακή υδρόλυση των συμπλόκων του ψευδαργύρου [57].



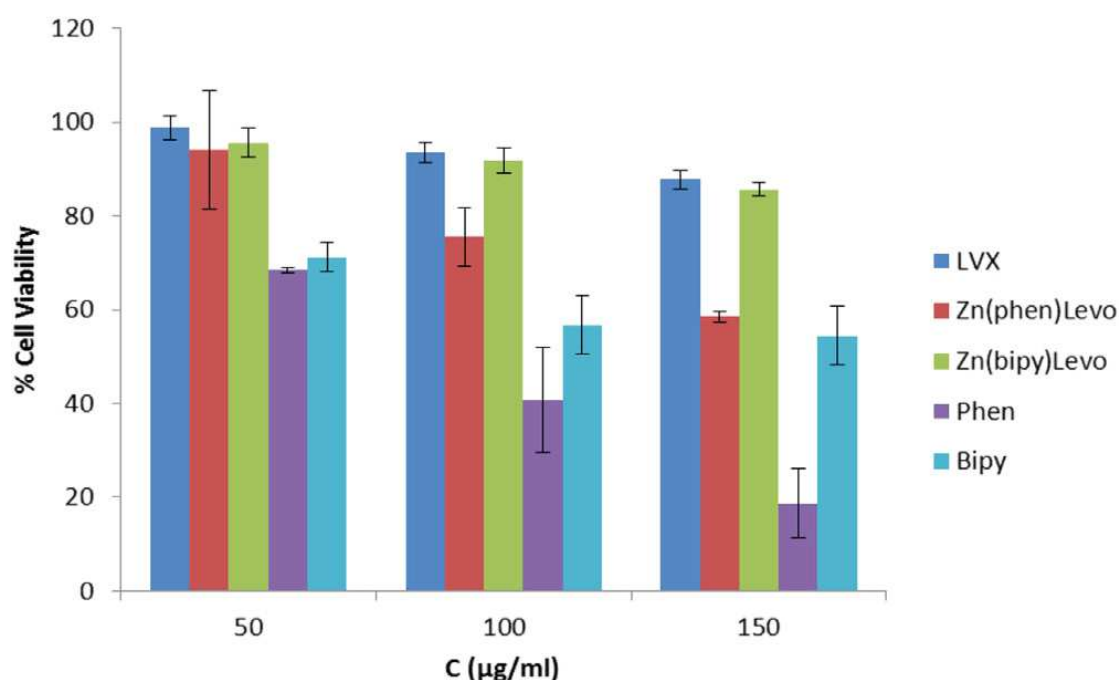
Σχήμα 7.12: Ηλεκτρονικό φάσμα α) του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη και τον ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη, β) του μικτού συμπλόκου του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη και τον ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη γ) του υποκαταστάτη λεβοφλοξασίνη σε διάλυμα PBS.

7.4.4 Αντικαρκινική δράση των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη.

Τα αποτελέσματα της αντικαρκινικής δράσης των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη, φαίνονται στο ακόλουθο σχήμα (σχήμα 7.13) Σύμφωνα με αυτό, η % επιβίωση και των δύο συμπλόκων μειώνεται συναρτήσεως της συγκέντρωσης με ανάλογο τρόπο με τους ελεύθερους υποκαταστάτες. Η υψηλότερη επίδραση παρατηρείται κατά την εφαρμογή του συμπλόκου (2).

Βρέθηκε ότι στην συγκεκριμένη περιοχή συγκεντρώσεων 50-150 μg/ml και οι δύο ετερουποκαταστάτες, 1.10-φαινανθρολίνη και 2.2'-διπυριδίνη

παρουσιάζουν τοξικότητα στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και πιο συγκεκριμένα η 1.10-φαινανθρολίνη είναι η πιο τοξική. Όσον αφορά τώρα τα δύο σύμπλοκα, το συμπλοκο (2) είναι πιο τοξικό από το (1) το οποίο δεν φαίνεται να είναι τοξικό σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 50 µg/ml. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα αντιμικροβιακά αποτελέσματα μας επιτρέπει να τονίσουμε την χρησιμότητα του συμπλόκου (1) κυρίως σαν αντιμικροβιακό φάρμακο παρά σαν αντικαρκινικό. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε ότι η λεβοφλοξασίνη δρα συνεργιστικά καθώς αυξάνει την τοξικότητα και στις δυο περιπτώσεις. Αυτό είναι πολύ εμφανές στο ακόλουθο σχήμα (σχήμα 7.13). Σύμφωνα με αυτό το σύμπλοκο (2) στην συγκέντρωση 150 µg/ml περιέχει το 1/3 της φαινανθρολίνης. Αυτό σημαίνει ότι το σύμπλοκο (2) θα έπρεπε να παρουσιάζει 65% επιβίωση αν'αυτού όμως παρουσιάζει 58%. Κατά συνέπεια λοιπόν, η επιπλέον μείωση προέρχεται από την επίδραση του μορίου της λεβοφλοξασίνης.



Σχήμα 7.13. Κυτταροτοξικότητα των μικτών συμπλόκων της λεβοφλοξασίνης με ψευδαργύρο και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη στην MCF-7 κυτταρική σειρά και συγκεντρώσεις 50-150 µg/ml.

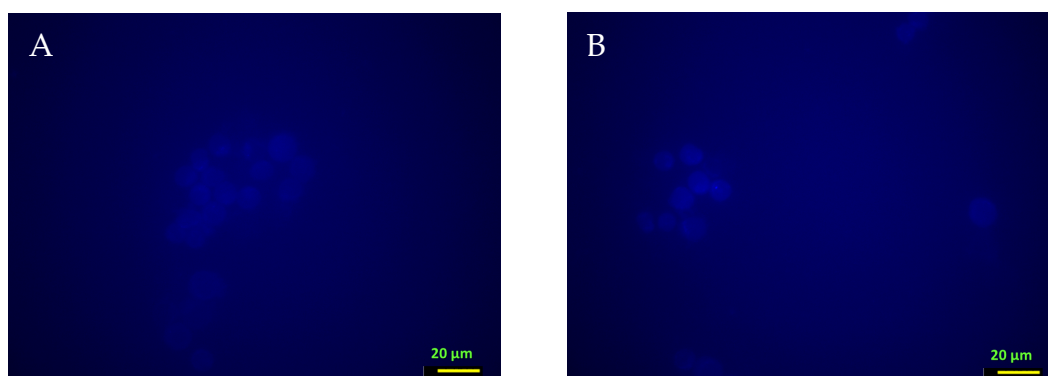
7.4.5 Μελέτη της μικροσκοπίας φθορισμού των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη.

Η κυτταρική σειρά MCF-7 επεξεργάστηκε με τα νεοσυντιθέμενα σύμπλοκα (1) και (2), για 2 ώρες στους 37°C, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, στοχεύοντας να διερευνηθεί ο πιθανός μηχανισμός δράσης τους. Οι παρακάτω εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της κατεργασίας των κυττάρων με τα μικτά σύμπλοκα του ψευδαργύρου.

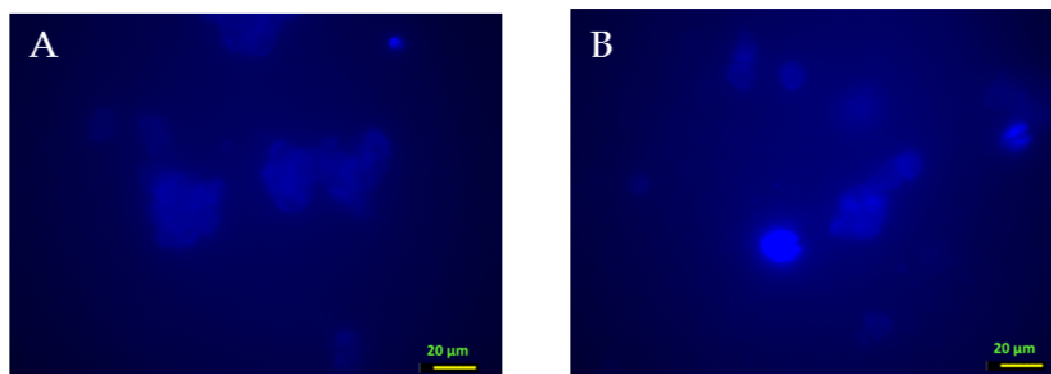
Οι εικόνες 7.1 και 7.2 παρουσιάζουν τα κύτταρα μετά από κατεργασία με τα μικτά σύμπλοκα του ψευδαργύρου, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις 75 και 150 µg/ml. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας το μικτό σύμπλοκο του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη με τον ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη διαπερνά πιο αποτελεσματικά την κυτταρική μεμβράνη και εισέρχεται μέσα στο κύτταρο. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν μετά από κατεργασία των κυττάρων με το συμπλόκο (1), του μικτού δηλαδή συμπλόκου του ψευδαργύρου με τον ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη, κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Η διείσδυση και στις δυο περιπτώσεις φαίνεται να εξαρτάται από την συγκέντρωση, από το γεγονός ότι καθώς η συγκέντρωση αυξάνει, τα κύτταρα γίνονται περισσότερο ανιχνεύσιμα. Σύγκριση μεταξύ των δύο συμπλόκων μας οδηγεί στο ότι το μικτό σύμπλοκο του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη είναι καλύτερος ανιχνευτής φθορισμού από το αντίστοιχο σύμπλοκο του ψευδαργύρου με λεβοφλοξασίνη και ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη.

Η σύμπλεξη του ψευδαργύρου με ετερουποκαταστάτες, πλούσιους σε ηλεκτρόνια, οδηγεί στην δημιουργία του επιθυμητού ανιχνευτή φθορισμού [58,59,60]. Επίσης είναι γνωστό ότι το φάρμακο λεβοφλοξασίνη δρα ως αναστολέας της αντιγραφής του DNA στον πυρήνα [50]. Ο συνδυασμός αυτών των δεδομένων με τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα [61,62,63,64] καθώς και την μελέτη φθορισμού δίνει την ευκαιρία να εξάγουμε μια συσχέτιση μεταξύ τους. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω διαγράμματα κυτταροτοξικότητας, παρατηρείται ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης των συμπλόκων, μειώνεται η % επιβίωση των κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό

μπορεί να αποδοθεί στην μεγαλύτερη διείσδυση του συμπλόκου στα κύτταρα στις υψηλότερες αυτές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα και για το σύμπλοκο (2). Το σύμπλοκο (2) επιδεικνύει υψηλότερη κυτταροτοξικότητα από το σύμπλοκο (1) και η διείσδυση του στο κύτταρο μοιάζει να είναι περισσότερο αποτελεσματική. Το γεγονός ότι και τα δυο σύμπλοκα διεισδύουν στην κυτταρική μεμβράνη και παρατηρούνται στο εσωτερικό, δείχνει ότι ο μηχανισμός δράσης παραμένει όμοιος με αυτόν του ελεύθερου υποκαταστάτη. Η συμπεριφορά αυτή είναι επιθυμητή για αναστολή της αντιγραφής του DNA διαμέσου παρεμβολής. Επιπρόσθετα τα σύμπλοκα του ψευδαργύρου δεν δίστανται με την πάροδο του χρόνου εξαιτίας του θερμοδυναμικά σταθερού τους χαρακτήρα.



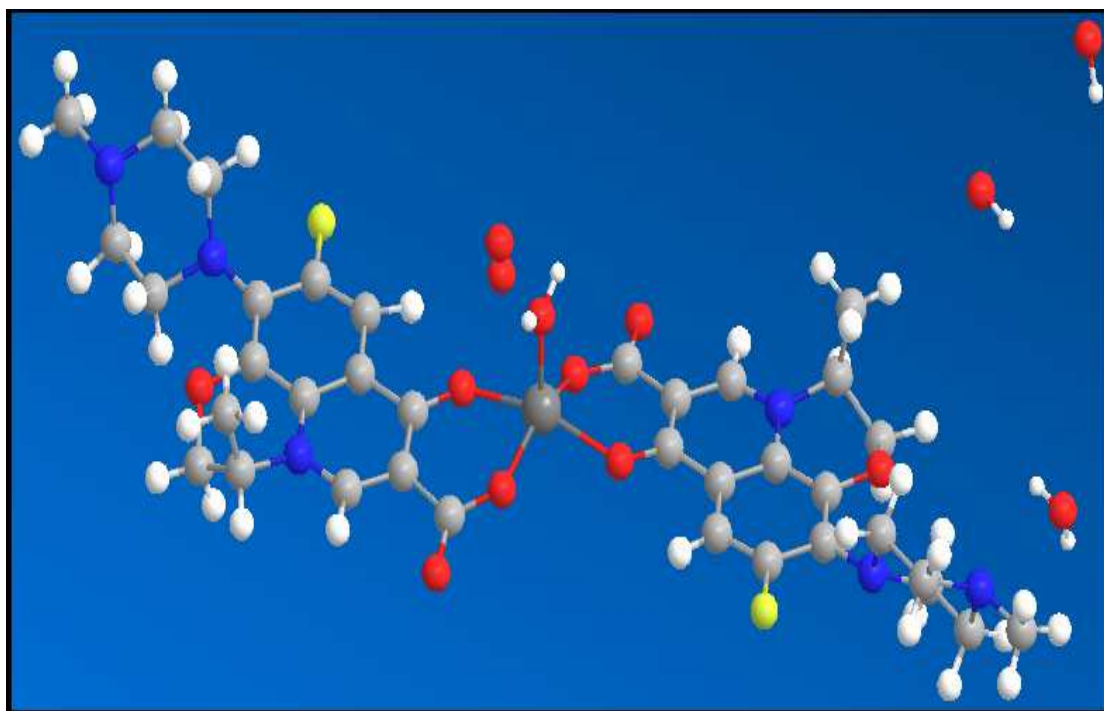
Εικόνα 7.1: Εικόνα φθορισμού της κυτταρικής σειράς MCF-7 έπειτα από κατεργασία με το μικτό σύμπλοκο του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη και τον ετερουποκαταστάτη διπυριδίνη σύμπλοκο (1) σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις α) 75 µg/ml β) 150 µg/ml



Εικόνα 7.2: Εικόνα φθορισμού της κυτταρικής σειράς MCF-7 έπειτα από κατεργασία με το μικτό σύμπλοκο του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη και τον ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη σύμπλοκο (2) σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις α) 75 µg/ml β) 150 µg/ml

7.5 Προσδιορισμός της δομής του απλού συμπλόκου με λεβοφλοξασίνη που απομονώθηκε μετά από παραμονή και των δύο μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου με τους ετερουποκαταστάτες φαινανθρολίνη αφενός και διπυριδίνη αφετέρου.

Η παρακάτω κρυσταλλική δομή προέκυψε μετά από παραμονή και των δύο μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου σε διάλυμα DMSO, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Πιθανολογούμε ότι στο DMSO σχηματίστηκε και το σύμπλοκο του ψευδαργύρου με DMSO, (το ιόν ψευδαργύρου σχηματίζει σύμπλοκα εξωτερικής σφαίρας με μαλακές και σκληρές βάσεις κατά Lewis). Το σύμπλοκο αυτό με παραμονή και παρουσία περίσσειας λεβοφλοξασίνης (από τον υποκαταστάτη που απομακρύνθηκε από το αρχικό σύμπλοκο, έδωσε το απλό σύμπλοκο του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη, το οποίο ως σχετικά αδιάλυτο στο DMSO καταβυθίστηκε σε κρυσταλλική μορφή.



Εικόνα 7.3 Δομή του συμπλόκου $[Zn(Levo)_2(H_2O)]$ που απομονώθηκε μετά από παραμονή των μικτών συμπλόκων του ψευδαργύρου.

7.6 Συμπεράσματα

Σε αυτή την ενότητα μελετήθηκε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η βιολογική δράση δύο συμπλόκων του ψευδαργύρου με τον υποκαταστάτη τρίτης γενιάς λεβοφλοξασίνη και τους ετερουποκαταστάτες διπυριδίνη και φαινανθρολίνη. Βάση της φασματοσκοπικής μελέτης, στα σύμπλοκα αυτά, ο υποκαταστάτης λεβοφλοξασίνη συνδέεται με το μεταλλικό ιόν του ψευδαργύρου με ένα καρβοξυλικό και ένα κετονικό οξυγόνο και με δυο άζωτα των ετερουποκαταστάτων φαινανθρολίνη και διπυριδίνη.

Επιπρόσθετα μελετήσαμε την αλληλεπίδραση των συμπλόκων του ψευδαργύρου αλλά και της λεβοφλοξασίνης με το (Ct-DNA). Οι μελέτες αποκάλυψαν ότι τα μικτά σύμπλοκα του ψευδαργύρου με την λεβοφλοξασίνη επιδεικνύουν υψηλότερες σταθερές σύνδεσης με το DNA σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη.

Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η συμπλοκοποίηση του υποκαταστάτη αλλά και των ετερουποκαταστατών στο μεταλλικό ιόν, ενισχύει την αντιβακτηριακή δράση του φαρμάκου. Διαπιστώθηκε για ακόμη μια φορά ότι η φύση του N-δότη επηρεάζει την αντιβακτηριακή δράση.

Ακόμη μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση των συμπλόκων του ψευδαργύρου έναντι της MCF-7 κυτταρικής σειράς και διαπιστώθηκε ότι η κυτταροτοξικότητα είναι αποτέλεσμα συνεργίας του κάθε υποκαταστάτη.

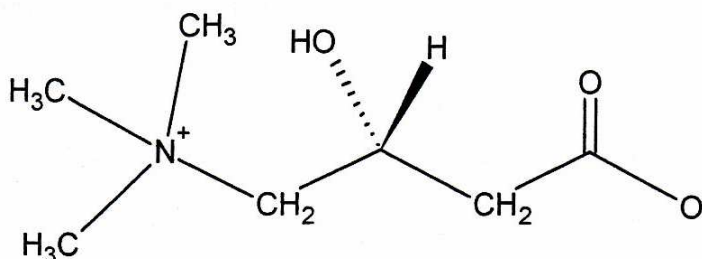
Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού στην κυτταρική σειρά MCF-7, οπότε και διαπιστώθηκε ότι η διείσδυση των συμπλόκων στην κυτταρική μεμβράνη είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης καθώς αυξάνοντας την συγκέντρωση των συμπλόκων, αυτά γίνονται περισσότερο ανιχνεύσιμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΚΑΡΝΙΤΙΝΗ

8.1 Εισαγωγή

Η καρνιτίνη είναι ένα τριμεθυλιωμένο αμινοξύ, με το χημικό όνομα γ-τριμέθυλο-β-υδρόξυ-βουτυρο-βεταίνη ή R-(-)-3-υδρόξυ-4-τριμεθυλαμινο-βουτυρικό οξύ (σχήμα 8.1) Η δομή της είναι παρόμοια με της χολίνης, που είναι ο απαιτούμενος συμπαράγοντας για τον μετασχηματισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε μόρια άκυλο-καρνιτίνης και στη συνέχεια την μεταφορά τους στην μιτοχονδριακή μήτρα, όπου υποβάλλονται σε βήτα οξειδωση για την παραγωγή κυτταρικής ενέργειας. Πρόκειται για μια άκρως υγροσκοπική ένωση που διαλύεται εύκολα στο νερό. Για πρώτη φορά απομονώθηκε από το κρέας (carnus) από όπου πήρε και το ονομά της. Η σημαντικότερη πηγή της καρνιτίνης είναι το κρέας, αν και ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να την συνθέσει και από αμινοξέα που λαμβάνει από την διατροφή του. Ονομάστηκε και βιταμίνη B_T, καθώς δρα ως βιταμίνη σε ένα γένος κάμπιας (*Tenebrio molitor*). Ο χαρακτηρισμός της ως βιταμίνη άρχισε να παρεξηγείται όταν οι επιστήμονες ανακάλυψαν ότι άλλοι ανώτεροι οργανισμοί συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, μπορούν να την συνθέσουν. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες η απαίτηση του οργανισμού για καρνιτίνη υπερβαίνει την ποσότητα που συνθέτει, κάνοντάς την έτσι απαραίτητο θρεπτικό υλικό, όπως συμβαίνει και με πολλές άλλες ενώσεις. Το D-ισομερές της είναι λιγότερο δραστικό ή βιολογικά αδρανές αναλόγως του οργανισμού [65, 65α].



Σχήμα 8.1 Τα μόριο της καρνιτίνης.

8.2 Πηγές της L-καρνιτίνης

Οι τροφές και τα φάρμακα επηρεάζουν τις βιοχημικές διεργασίες στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι επιδράσεις λόγω των φαρμάκων λέγονται φαρμακολογικές. Όσον αφορά τα τρόφιμα τώρα, οι επιδράσεις από τις ουσίες που περιέχουν θεωρούνται ως φυσιολογικές. Η διάκριση μεταξύ των φυσιολογικών και των φαρμακολογικών επιδράσεων έχει γίνει λόγος πολλών αντιπαραθέσεων ως προς την ταξινόμηση διαφόρων προϊόντων. Οι βασικοί παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη έχουν να κάνουν με την ύπαρξη της ένωσης στο σώμα και την διατροφή, την ένταση και τον τύπο των προκυπτόντων αντιδράσεων, την εμφάνιση παράλληλων επιδράσεων κ.α. Η καρνιτίνη έχει διατροφική αξία ανάλογη των βιταμινών. Το κόκκινο κρέας είναι η καλύτερη πηγή της καρνιτίνης (περιέχει 500-1200 mg/kg) και ακολουθούν το ψάρι, το κοτόπουλο και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (16-64 mg/kg). Τα λαχανικά, τα φρούτα και τα δημητριακά περιέχουν πολύ μικρή ποσότητα καρνιτίνης <0.5 mg/kg. Ο ανθρώπινος οργανισμός συνθέτει περίπου 20-25 mg. Μια επιπρόσθετη ποσότητα των 10-300 mg ανά ημέρα μπορεί να ληφθεί μέσω της διατροφής μας. Από μελέτες έχει βρεθεί ότι μια δοσολογία γύρω στα 20 mg ανά kg σωματικού βάρους είναι ασφαλής για τον οργανισμό. Το LD₅₀ της καρνιτίνης στα ποντίκια φτάνει τα 9000 mg/kg [66].

Αναφορές περί διατροφικής ανεπάρκειας της είναι πολύ σπάνιες. Κατά την διάρκεια των πρώτων σταδίων της ζωής, η καρνιτίνη που παράγει ο οργανισμός δεν επαρκεί να καλύψει τις αυξημένες απαιτήσεις του, που σχετίζονται με την γρήγορη ανάπτυξη [67].

Η ανεπάρκεια της καρνιτίνης συνεπάγεται ότι η οξειδωση των λιπαρών οξέων ελαττώνεται και τα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε τριακυλογλυκερόλη, με την διαδικασία αυτή να λαμβάνει χώρα κυρίως στο συκώτι. Επίσης η έλλειψή της προκαλεί βλάβη στο μιτοχόνδριο. Οι τοξικές αυτές ποσότητες επηρεάζουν τον κύκλο του κιτρικού οξέος, την γλυκονεογένεση και την οξειδωση των λιπαρών οξέων. Οι διαδικασίες αυτές επανέρχονται με την λήψη επαρκών ποσοτήτων καρνιτίνης.

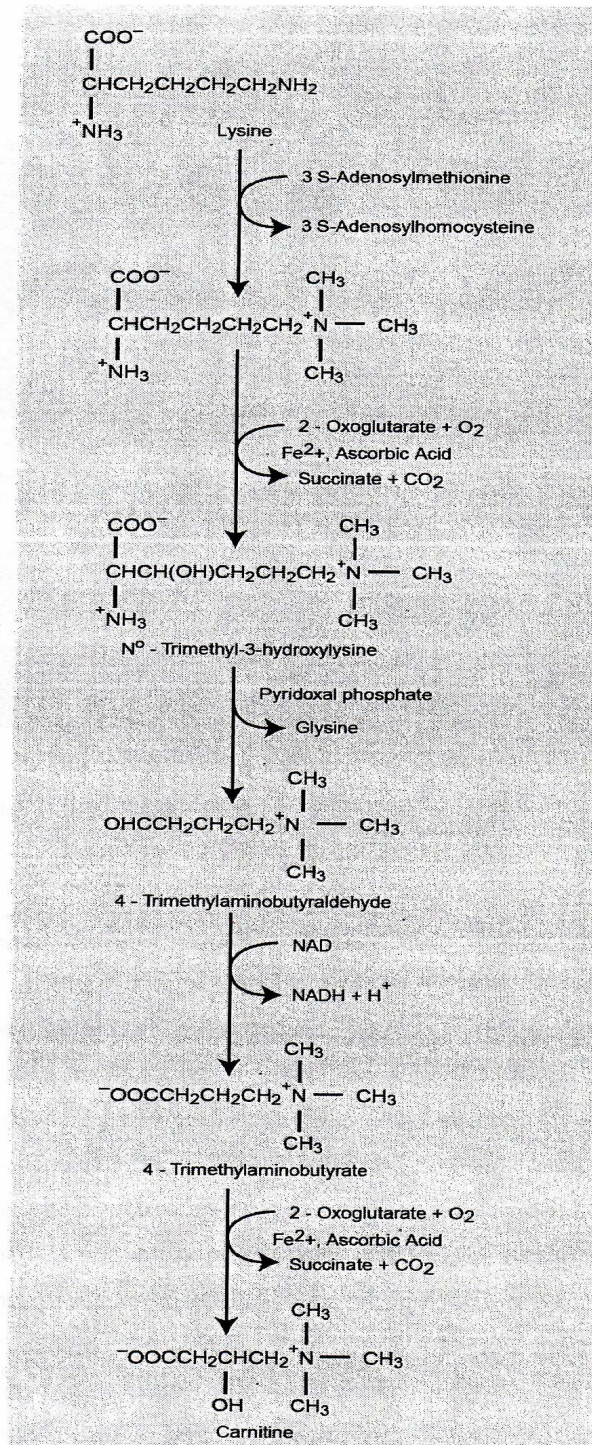
Παθήσεις που φαίνεται να δρα ευεργετικά η εξωγενής χορήγηση καρνιτίνης είναι η ανορεξία, η χρόνια κούραση, η ηπατίτιδα, η υπογλυκαιμία, ο υπερθυρεοειδισμός, η αρσενική στειρότητα, η νεφρική ανεπάρκεια, η αναιμία, οι μυϊκές δυσλειτουργίες και το σύνδρομο (Rett). Επίσης τα πρόωρα μωρά όπως και οι

φορείς του ιού (HIV) φαίνεται να είναι επιρρεπείς σε ανεπάρκεια καρνιτίνης ενώ επωφελούνται από την χορήγησή της [65,68-72].

8.3 Η βιοχημεία της L-καρνιτίνης

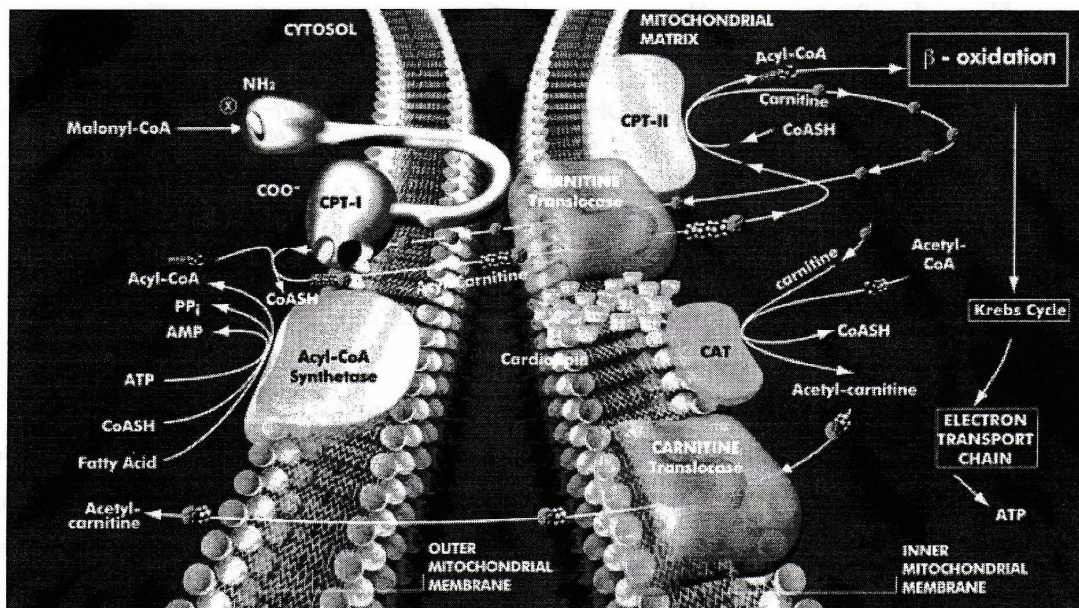
Η σύνθεση της L-καρνιτίνης αρχίζει με την μεθυλίωση του αμινοξέος L-λυσίνη από την S-αδενοσυλμεθειονίνη. Το μαγνήσιο, η βιταμίνη C, ο σίδηρος, οι βιταμίνες B3 και B6, το άλφα-κετογλουταρικό οξύ και η νιασίνη με την μορφή του νικοτάμιδο-αδενινο-νουκλεοτιδίου (NAD), μαζί με τους συμπαραγόντες που είναι υπεύθυνοι για την παρασκευή της S-αδενοσυλμεθειονίνης (μεθειονίνη, φολικό οξύ, βιταμίνη B12 και βεταΐνη) είναι όλα εκείνα τα μεταλλικά στοιχεία και βιολογικά μόρια που απαιτούνται για την ενδογενή σύνθεση της καρνιτίνης (σχήμα 8.2). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα τελευταία συμπτώματα της ανεπάρκειας βιταμίνης C είναι η κόπωση, η οποία σχετίζεται με μείωση της παραγωγής της καρνιτίνης. Στην βιοσύνθεση της, βρέθηκε ότι τα μεθύλια της καρνιτίνης προέρχονται από την μεθειονίνη (και όχι την χολίνη) και ότι η γ-βουτυροβεταΐνη (και όχι το γ-αμινοβουτυρικό ή το γ-διμέθυλο αμινοβουτυρικό οξύ) μετατρέπεται σε καρνιτίνη. Βρέθηκε επίσης ότι η λυσίνη μετατρέπεται σε καρνιτίνη με ενδιάμεσο προιον την 6-N τριμεθυλολυσίνη. Ο ενδογενής σχηματισμός της καρνιτίνης στα σπονδηλωτά λαμβάνει χώρα κυρίως στο συκώτι όπως και στα νεφρά και τον εγκέφαλο, καθώς εκεί υπάρχει το ένζυμο της υδροξυλάσης της 4-βουτυροβεταΐνης. Η σύνθεση της καρνιτίνης καταλύεται από την συνεργική δράση πέντε διαφορετικών ενζύμων.

Αφού συντεθεί η καρνιτίνη πρέπει να μεταφερθεί σε άλλους ιστούς. Κυρίως συγκεντρώνεται σε ιστούς που χρησιμοποιούν λιπαρά οξέα ως κύρια διατροφική τους πηγή όπως οι σκελετοί και οι καρδιακοί ιστοί. Ο σημαντικός ρόλος της καρνιτίνης εστιάζεται στην παραγωγή ενέργειας με την μεταβίβαση των ενωμένων σε αυτή ενεργοποιημένων λιπαρών οξέων (άκυλο -CoA) στην μιτοχονδριακή μήτρα και την απομάκρυνση ενδιάμεσων προϊόντων από αυτή προς αποφυγή συσσώρευσής τους [73].



Σχήμα 8.2 Η βιοσύνθεση της L-καρνιτίνης.

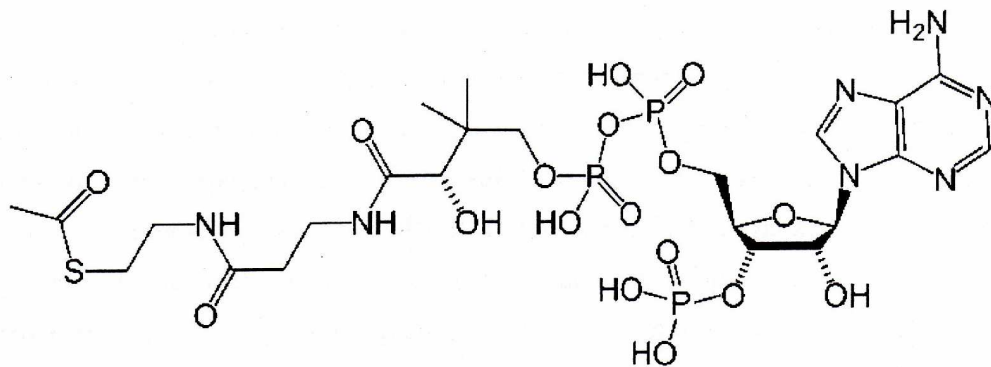
Η βιοχημική διεργασία διάσπασης των μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων στην οποία συμμετέχει η L-καρνιτίνη αποτελείται από πέντε βασικά στάδια (σχήμα 8.3).



Σχήμα 8.3 Ο βιοχημικός ρόλος της καρνιτίνης στα μιτοχόνδρια. CPT-I: Παλμιτική Μεταφοράση της Καρνιτίνης I, CPT-II: Παλμιτική Μεταφοράση της Καρνιτίνης II, CAT: Ακετυλο-Μεταφοράση της Καρνιτίνης, CoASH: Συνένζυμο A

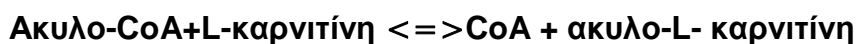
α) κατά το πρώτο στάδιο, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα διαπερνούν το κύτταρο και μετατρέπονται σε ακυλο-CoA με την συνθετάση του ακυλο-CoA, στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, β) κατά το δεύτερο στάδιο, λόγω του μεγάλου μεγέθους του άκυλο-CoA, αυτό μετατρέπεται σε ακυλο καρνιτίνη από το ένζυμο τρανσφεράση I της ακυλο καρνιτίνης γ) κατά το τρίτο στάδιο, η άκυλο καρνιτίνη μεταφέρεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου από το ένζυμο τρανσλοκάση της καρνιτίνης, δ) κατά το τέταρτο στάδιο, η άκυλο καρνιτίνη επαναμετατρέπεται σε άκυλο-CoA από την τρανσφεράση II της ακυλο καρνιτίνης ε) κατά το τελευταίο στάδιο, μέσα στο μιτοχόνδριο το ακυλο CoA μετατρέπεται σε ακέτυλο συνένζυμο A (ακέτυλο CoA) μέσω β-οξειδωσης. Το ακέτυλο CoA εισέρχεται στον κύκλο του Krebs, από τον οποίο παράγεται ωφέλιμη για τον οργανισμό ενέργεια με την μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP).

Η κύρια δράση του συνενζύμου A είναι να μεταφέρει ομάδες ακυλίων όπως οι ακέτυλο ομάδες όπου μετονομάζεται τότε σε ακέτυλο CoA ή θειεστέρας (σχήμα 8.4). Μπορεί επίσης να μεταφέρει ενεργοποιημένα υποστρώματα σε πολλές μεταβολικές πορείες κλειδιά του ανθρώπινου οργανισμού όπως ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος, η σύνθεση της χοληστερόλης και των λιπιδίων καθώς και η τροποποίηση των μεταφερόμενων πρωτεϊνών ή και για μηχανισμούς αποτοξίνωσης.



Σχήμα 8.4 Η μοριακή δομή του ακέτυλο-CoA.

Η τρανσλοκάση της καρνιτίνης/ακυλο καρνιτίνης είναι υπεύθυνη για την μεταφορά της καρνιτίνης και των εστέρων στο εσωτερικό της μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Το σύστημα της καρνιτίνης αποτελείται από πρωτεΐνες οι οποίες την μεταφέρουν στις μεμβράνες και τα ένζυμα, τις ακυλο-τρανσφεράσες, που καταλύουν την αμφίδρομη αντίδραση.



Σύμφωνα με τα ανωτέρω η καρνιτίνη είναι ένα φυσιολογικό συστατικό των ιστών και του πλάσματος των ζώων, το οποίο απαιτείται για την μεταφορά των μεγάλης αλυσίδας οργανικών οξέων από τα μιτοχόνδρια, με σύγχρονη ελευθέρωση του ενδοκυτταρικού συνενζύμου A ώστε αυτό να συμμετέχει στους κύκλους της β-οξειδωσης και του τρικαρβοξυλικού οξέος. Τέλος, είναι ένα υπόστρωμα για τις παλμιτοτρανσφεράσες I και II καθώς και της ακυλο τρανσφεράσες της καρνιτίνης, ενζύμων που επίσης συμμετέχουν και ρυθμίζουν την περαιτέρω αξιοποίηση των λιπαρών οξέων από τον οργανισμό [74].

Η ακέτυλο-τρανσφεράση της καρνιτίνης βρίσκεται στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών, στα υπεροξυσώματα και το ενδοπλασματικό ιστό. Στα θηλαστικά, τουλάχιστον σε καρδιές ποντικών, η ακετυλοτρανσφεράση δεν είναι ένα κυτταρολυματικό ένζυμο. Μεταφρασμένη ως μια πρόδρομος ένωση 626 αμινοξέων η ανθρώπινη μιτοχονδριακή ακέτυλο-τρανσφεράση περιέχει ένα μιτοχονδριακό σήμα

στόχο αποτελούμενο από 28 ή 29 κατάλοιπα με ακραίο άτομο αζώτου, το οποίο αποκόπτεται κατά την διάρκεια της μετάθεσης από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Η παλμιτοτρανφεράση της καρνιτίνης I (CPT I) βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη και καταλύει την μεταφορά των ακυλομάδων από το ακυλο-CoA στην καρνιτίνη προς σχηματισμό ακυλο-καρνιτίνης και παραγωγή ελεύθερου συνενζύμου A. Το ένζυμο τρανσλοκάση της ακυλο-καρνιτίνης/καρνιτίνης βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και ανταλλάσει την ακυλο-καρνιτίνη του κυτταροπλάσματος με ελεύθερη καρνιτίνη. Η παλμιτοτρανφεράση της καρνιτίνης II (CPT II), η οποία βρίσκεται στην μητρική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, καταλύει μια αντίδραση που είναι αντίστροφη της CPT II, επαναμετατρέποντας την άκυλο καρνιτίνη σε ακυλο-CoA προς την β-οξειδωση, ενώ παράγεται ελεύθερη καρνιτίνη. Οι δυο παλμιτοτρανφεράσες βρίσκονται σε τέτοια θέση στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη ώστε η μεταξύ τους απόσταση είναι η κοντύτερη (4nm) Αυτό συνεπάγεται ότι η κατανομή τους στην μεταφορά των λιπιδίων στο τμήμα μεταξύ του κυτταροσώματος και του ενδοχώρου του μιτοχονδρίου είναι σημαντική καθώς τα μόρια ακυλο καρνιτίνης που σχηματίζονται από την (CPT I) οδηγούνται αποκλειστικά στην (CPT II). Η δράση της (CPT I) έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζεται από την ρευστότητα της μεμβράνης συμπεραίνοντας έτσι ότι τα κινητικά χαρακτηριστικά της (CPT I) εξαρτώνται άμεσα από τυχόν μεταβολές της σύστασης των λιπιδίων στον οποίο ανήκει η (CPT I). Από την άλλη η τρανσλοκάση της ακυλο καρνιτίνης (CT) δεν βρίσκεται μόνο στα σημεία επικοινωνίας των (CPT) αλλά είναι και ομοιόμορφα κατανεμημένοι εντός της κυτταρικής μεμβράνης. Η ευρεία κατανομή της (CT) υποδεικνύει έναν ειδικό ρόλο αυτού του ενζύμου στην ρύθμιση των επιπέδων ελεύθερης καρνιτίνης εντός και εκτός μιτοχονδρίου καθώς και του λόγου της στο κυτταρόπλασμα και το μιτοχόνδριο [75].

Οι φυσιολογικοί ρόλοι της καρνιτίνης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. Ένας άλλος ρόλος της σχετίζεται με την ικανότητα της να δρα ως αντιοξειδωτικό. Η καρνιτίνη και η παλμιτοτρανσφεράση της καρνιτίνης μπορούν να θεωρηθούν ως δομικά ανταγωνιστικές ενώσεις στην αναδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων στα ανθρώπινα κύτταρα. Καθώς η διαδικασία αυτή σχετίζεται με δευτερεύουσα αντιοξειδωτική απόκριση στα κατεστραμμένα λόγω οξειδωσης φωσφολιπίδια της μεμβράνης, μπορεί να θεωρηθεί ότι η καρνιτίνη συμμετέχει στο αντιοξειδωτικό σύμπλεγμα ως μέλος της δευτερευούσης αμυντικής ζώνης. Επιπλέον, η καρνιτίνη και η παλμιτοτρανφεράση της καρνιτίνης ρυθμίζουν την διακύμανση των

ακυλίων στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων για ασθενείς που πάσχουν από ουραιμία. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται μια αξιοσημείωτη αύξηση του σχηματισμού ελευθέρων λιπαρών οξέων και αυτό έχει ως επακόλουθο ότι η κυτταρική μεμβράνη υπεροξειδώνεται. Για να αποφευχθεί αυτό πρέπει να γίνει η κατάλληλη επιδιόρθωση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης. Χορήγηση της καρνιτίνης είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της αναδιαρθρωσης στα φωσφολιπίδια των λιπαρών οξέων, αποδεικνύοντας τον ενεργό της ρόλο [76].

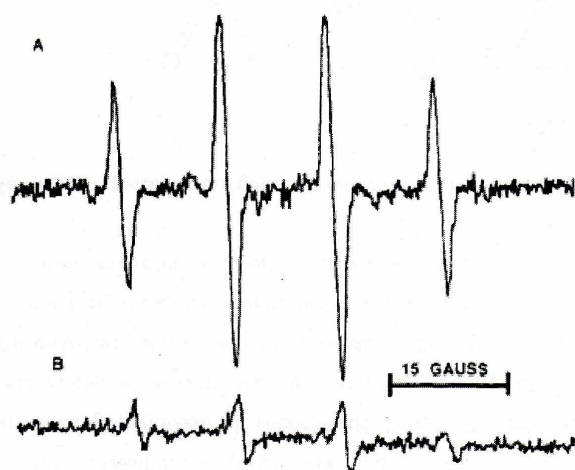
8.4 L-καρνιτίνη και μεταλλικά ιόντα

Το δισθενές ασβέστιο Ca^{2+} είναι υπεύθυνο για την διόγκωση των μιτοχονδρίων, και τα λιπαρά οξέα συμβάλλουν σε αυτή την ιδιότητα του με μία διαδικασία που είναι ακόμα αδιευκρίνιστη. Η διόγκωση εξαρτάται από την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A2 η οποία εξαρτάται από το ποσοστό συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} και ο κύριος ρόλος έχει εστιάσει στα λυσο-φωσφολιπίδια. Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι η άμεση προσθήκη Ca^{2+} και ολεϊκού οξέος εκτός της διόγκωσης που προκαλεί, δρα ανασταλτικά κατά της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης λόγω αύξησης της διαπερατότητας της εσωτερικής μεμβράνης. Η συμβολή στη διόγκωση από τα λιπώδη παράγωγα του άκυλο CoA δίνει στην καρνιτίνη έναν προστατευτικό ρόλο έναντι αυτού του φαινομένου [77].

Στα νεφρά η καρνιτίνη, επαναρροφάται από ένα μηχανισμό εξαρτώμενο από την συγκέντρωση Na^+ και την ενέργεια του συστήματος. Ο μεταφορέας της καρνιτίνης έχει διερευνηθεί σε μοριακό επίπεδο και ονομάζεται (OCTN2). Η εξαρτώμενη από το Na^+ μεταφορά καρνιτίνης έχει επίσης παρατηρηθεί σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Ωστόσο, όσον αφορά τον μηχανισμό μεταφοράς της L-καρνιτίνης στο έντερο οι γνώμες δίστανται. Η μεταφορά της καρνιτίνης στα κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωση των κατιόντων Na^+ , την τάση της μεμβράνης και το pH [78].

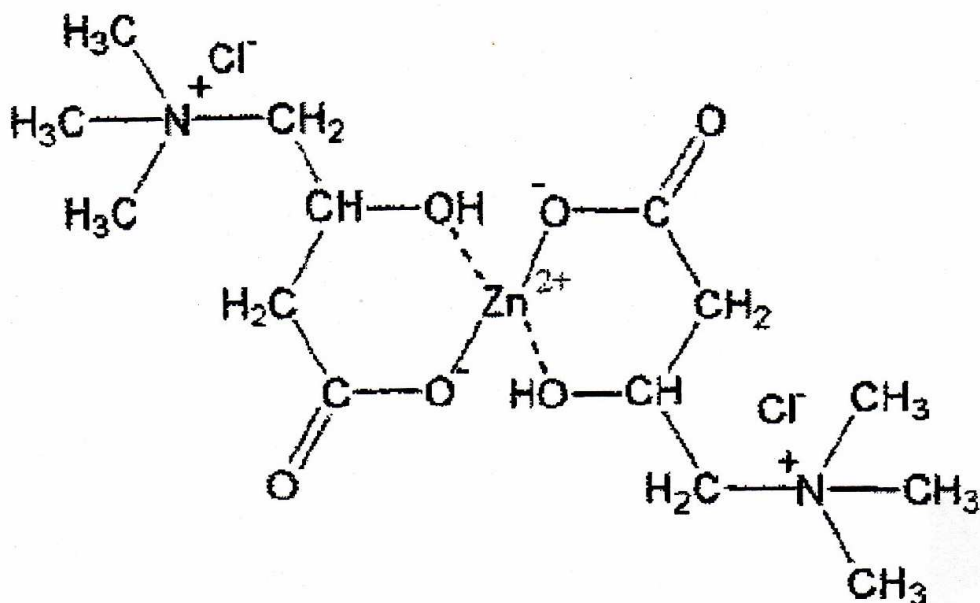
Μελέτες πάνω στις επιπλοκές της λειτουργίας του μυοκαρδίου που συνοδεύονται με την ισχαιμία, έχουν αποδείξει την ανάμειξη των δραστικών ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και αυτή η εξακρίβωση γίνεται με α) απευθείας μεθόδους όπως μετρήσεις ESR (Electron spin resonance) της ρίζας του σουπεροξειδίου και της υδροξυλικής ρίζας καθώς και συγκεκριμένων προϊόντων οξειδωσης χημικών δεικτών που αλληλεπιδρούν με ρίζες, β) με έμμεσες

πληροφορίες στην μερική προστασία της καρδιάς κατά της ισχαιμίας, από εξωγενή αντιοξειδωτικά ένζυμα, δεσμευτές ελευθέρων ριζών και υποκαταστάτες που συμπλέκονται με τα στοιχεία μετάπτωσης. Σε σχετική μελέτη έχει βρεθεί ότι ένα παράγωγο της L-καρνιτίνης, η προπιονυλ-καρνιτίνη αναστέλλει την παραγωγή δραστικών ενώσεων που περιέχουν ρίζα. Σε πείραμα όπου μετράται με ESR η χαρακτηριστική ρίζα του υδροξυλιωμένου προϊόντος της ένωσης 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO) που προκύπτει από την αντίδραση Fenton του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των ιόντων Fe(II), αποδεικνύεται ότι με προσθήκη της προπιονυλ-καρνιτίνης το σήμα μειώνεται αισθητά (σχήμα 8.5) [79,80].



Σχήμα 8.5 Φάσμα ESR της χαρακτηριστικής ρίζας DMPO-OH που παράγεται μέσω της αντίδρασης Fenton δισθενούς σιδήρου με H_2O_2 , απουσία (A) και παρουσία (B) L-προπιονυλ-καρνιτίνης.

Τα μόνα σύμπλοκα της καρνιτίνης με μεταλλικά ιόντα που έχουν χαρακτηριστεί έως τώρα και αναφέρονται στην βιβλιογραφία είναι ένα του δισθενούς ψευδαργύρου [81], Zn(II) και μετά δυο του δισθενούς χαλκού Cu(II) τα οποία προήλθαν από την ομάδα της κ. Α. Καραλίωτας, με την μοναδική κρυσταλλική δομή για σύμπλοκο καρνιτίνης που έχει απομονωθεί παγκοσμίως [82]. Το σύμπλοκο του ψευδαργύρου έχει μοριακό τύπο $Zn(L-carnitine)_2Cl_2$ και παρασκευάστηκε από την ανάμειξη της καρνιτίνης σε υδατικό διάλυμα, L-καρνιτίνης και $ZnCl_2$, σε αναλογία (2:1), αντίστοιχα. Η προτεινόμενη δομή φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα (σχήμα 8.6).



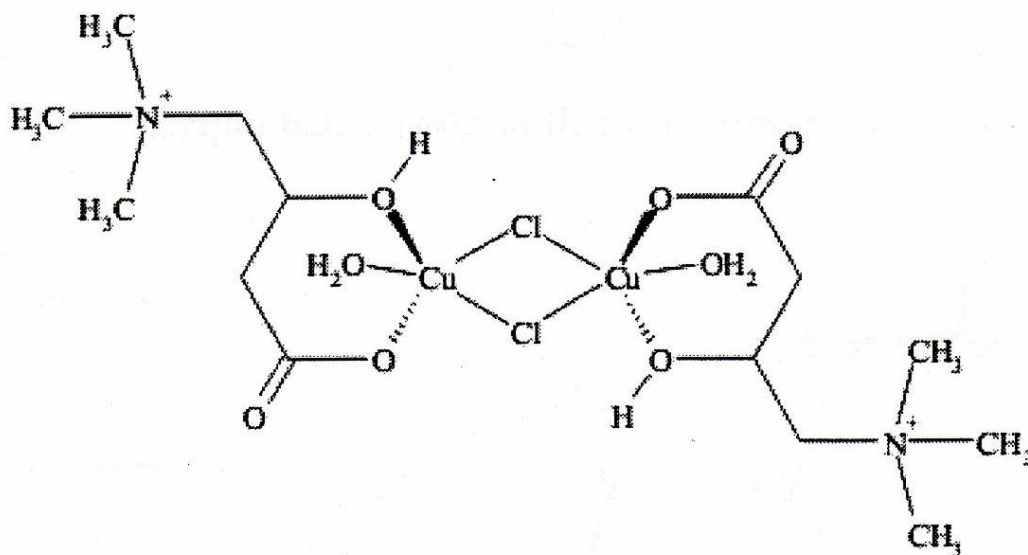
Σχήμα 8.6 Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου $Zn(L\text{-καρνιτίνη})_2Cl_2$.

Τα σύμπλοκα της καρνιτίνης με $Cu(II)$ έχουν μοριακό τύπο $[Cu_2(L\text{-carnitine})_2Cl_2(H_2O)_2]Cl_2$ (1) και $[Cu_2(L\text{-carnitine})_4(H_2O)_2](ClO_4)_4H_2OCH_2Cl_2$ (2) και παρασκευάστηκαν όσον αφορά το σύμπλοκο (1) με ανάμειξη αιθανολικού διαλύματος καρνιτίνης με αιθανολικό διάλυμα $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ σε αναλογία (1:1) (σχήμα 8.7) και όσον αφορά το σύμπλοκο (2) με ανάμειξη υδατικού διαλύματος της καρνιτίνης με υδατικό διάλυμα $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ σε αναλογία (2:1). Το σύμπλοκο (2) μάλιστα αποτελεί την μοναδική κρυσταλλογραφικά επιβεβαιωμένη δομή συμπλόκου της καρνιτίνης (σχήμα 8.8).

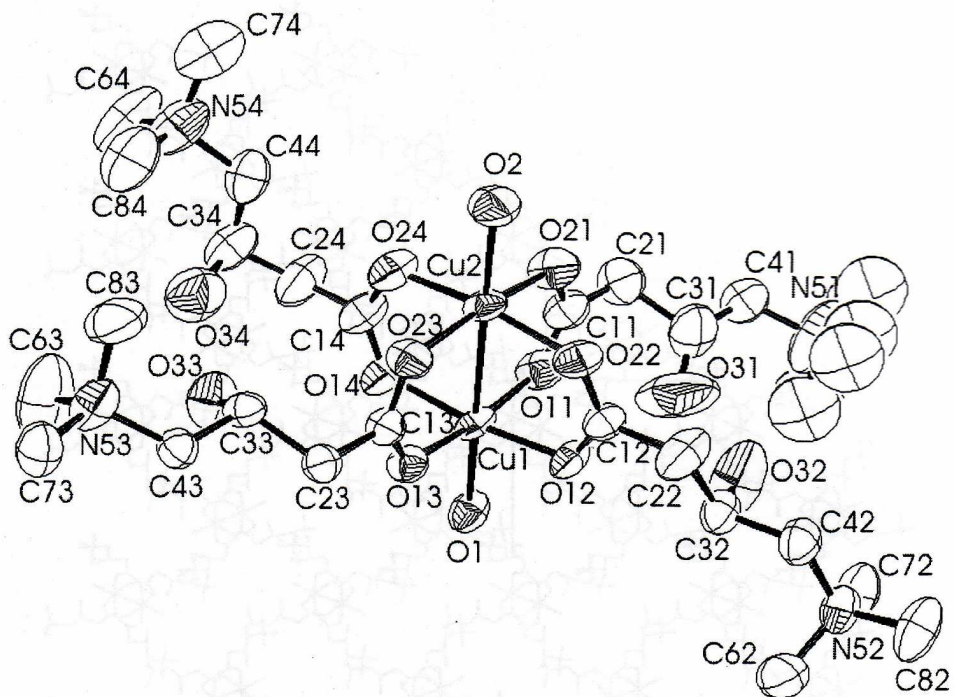
Το άχρωμο σύμπλοκο του ψευδαργύρου όπως και τα έγχρωμα σύμπλοκα του χαλκού χαρακτηρίστηκαν με στοιχειακή ανάλυση, ενώ στο φάσμα υπερύθρου (IR) η συχνότητα δόνησης του διπλού δεσμού $C=O$ της καρβοξυλικής ομάδας της καρνιτίνης μετατοπίστηκε από τα 1601 cm^{-1} που είναι η αντίστοιχη της ελεύθερης καρνιτίνης, στα 1610 cm^{-1} για το σύμπλοκο του ψευδαργύρου, στα 1619 cm^{-1} για το σύμπλοκο $[Cu_2(L\text{-carnitine})_2Cl_2(H_2O)_2]Cl_2$ και στα 1620 cm^{-1} για το σύμπλοκο $[Cu_2(L\text{-carnitine})_4(H_2O)_2](ClO_4)_4H_2OCH_2Cl_2$. Στη δομή που προτείνεται τόσο για το σύμπλοκο του ψευδαργύρου όσο και για το σύμπλοκο του $[Cu_2(L\text{-carnitine})_2Cl_2(H_2O)_2]Cl_2$, καθένα από τα δύο μόρια της καρνιτίνης συνδέεται με το μεταλλικό κέντρο χηλικά με την συμμετοχή ενός ατόμου οξυγόνου του καρβοξυλίου και της υδροξυλικής ομάδας της αλειφατικής αλυσίδας του μορίου. Όσον αφορά

τώρα το σύμπλοκο $[\text{Cu}_2(\text{L-carnitine})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4\text{H}_2\text{OCH}_2\text{Cl}_2$, η δομή του είναι κεντροσυμμετρική, τα άτομα $\text{Cu}(\text{II})$ βρίσκονται σε πολύ κοντινή απόσταση της τάξης των 2.5957 Å. Τέσσερα μόρια καρνιτίνης γεφυρώνουν τα μεταλλικά ιόντα μέσω της καρβοξυλικής ομάδας, ενώ δύο μόρια νερού κατάλαμβάνουν τις αξονικές θέσεις.

Η ινσουλινομιμητική και αντιδιαβητική δράση του συμπλόκου του ψευδαργύρου όσο και του συμπλόκου $[\text{Cu}_2(\text{L-carnitine})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$ εξετάσθηκαν σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια στα οποία έγινε χορήγηση της ένωσης από το στόμα. Και τα δύο σύμπλοκα έδειξαν τάση να κατεβάζουν τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα που συνδέονται με τον διαβήτη τύπου 2.



Σχήμα 8.7 Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}_2(\text{L-carnitine})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$ (1) [82].



Σχήμα 8.8 Κρυσταλλογραφική δομή του συμπλόκου $[\text{Cu}_2(\text{L_carnitine})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2) [82].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΜΟΛΥΒΔΑΙΝΙΟ

9.1 Βιολογική δράση του μολυβδαινίου

Το μολυβδαίνιο, που απαντάται στο ανθρώπινο σώμα ανέρχεται σε ποσότητα ίση με 9 mg και αποτελεί γενικά απαραίτητο στοιχείο των οργανισμών στο ανθρώπινο σώμα. Βρίσκεται κυρίως στο ήπαρ και στο αίμα ενώ ίσως απορροφάται από τα έμβια συστήματα υπό την μορφή του τετραεδρικού ανιόντος MoO_4^{2-} . Η ποσότητα μολυβδαινίου η οποία λαμβάνεται από τα τρόφιμα και η οποία μπορεί να αφομοιωθεί ανέρχεται στο 50% ενώ η υπόλοιπη αποβάλλεται με τα ούρα. Το μολυβδαίνιο υπάρχει στα φυτά και στα ζώα σε ποσότητα μόλις μερικών ppm. Ο βασικός ρόλος του στα ζώα είναι η συμμετοχή του στις αντιδράσεις διάσπασης της πουρίνης και ο σχηματισμός του ουρικού οξέος [83,84].

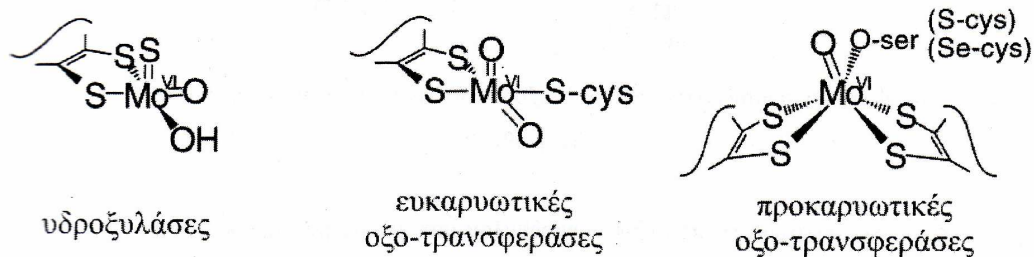
Η έλλειψη του μολυβδαινίου, μπορεί να οδηγήσει σε ορισμένες μορφές καρκίνου. Ενώ η περίσσεια του, έχει παρατηρηθεί ότι οδηγεί σε προβλήματα μεταβολισμού του χαλκού (είναι γνωστή η ανταγωνιστική δράση των δύο ιόντων) καθώς επίσης σε δυσμορφίες ακόμη και σε θάνατο. Η παρουσία του στα βιολογικά συστήματα είναι συνήθης και αυτό οφείλεται στην διαλυτότητα των οξειδίων του εξασθενούς ιόντος του στο νερό. Η σπουδαιότητα του μολυβδαινίου έγκειται στην βιολογική του διαθεσιμότητα καθώς επίσης στην συμμετοχή του σε συγκεκριμένες ενζυματικές διαδικασίες. Τα πολλαπλά οξειδωτικά κέντρα που καταλύουν την μεταφορά του οξυγόνου είναι χαρακτηριστικά των ενζύμων που περιέχουν άτομα μολυβδαινίου. Το μολυβδαίνιο το συναντάμε σε δύο κυρίως ομάδες ενζύμων, τις νιτρογενάσες και τις μολυβδοπτερίνες. Οι νιτρογενάσες βρίσκονται στα βακτήρια και συμμετέχουν στις αντιδράσεις μετατροπής του μοριακού αζώτου σε ενεργές μορφές του π.χ (αμμωνία, νιτρικά και νιτρώδη ανιόντα) [85-88]. Η δεύτερη ομάδα ενζύμων εμπλέκεται σε μια ποικιλία διαδικασιών, όπως στον κύκλο του θείου, του αζώτου και του άνθρακα και γενικά σχετίζονται με την μεταφορά ενός ατόμου οξυγόνου ως μέρος της διαδικασίας. Ακολουθεί πίνακας με ένζυμα του μολυβδαινίου και την αντίδραση που καταλύουν.

Πίνακας 9.1: Ένζυμα μολυβδαινίου και αντιδράσεις που καταλύουν.

Ένζυμο	Αριθμός ατόμων Mo ανά ένζυμο	Προσθετικές ομάδες στο ένζυμο	Καταλυόμενη αντίδραση
Νιτρογενάση πρωτεΐνη Fe-Mo	2	24Fe, 24S	$N_2 + 6H^+ + 6e^- \rightarrow 2NH_3$
Νιτρική αναγωγή	1-2	Κυτόχρωμα b FAD ^b	$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$
Οξειδάση ξανθίνης	2	8Fe, 8S 2FAD	$\text{Ξανθίνη} + H_2O \rightarrow \text{ουρικό οξύ} + 2H^+ + 2e^-$
Οξειδάση αλδεύδης	2	8Fe, 8S 2FAD	$RCHO + H_2O \rightarrow RCOOH + 2H^+ + 2e^-$
Οξειδάση θειωδών	2	2 ομάδες αίμης	$SO_3^{2-} + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e^-$
Υδροξυλάση του νικοτινικού οξέος	2	Fe-S, FAD Se	$\text{Νικοτινικό οξύ} + H_2O + NADP^+ \rightarrow \text{6-υδροξυ-νικοτινικό οξύ} + NADPH + H^+$

Τα περισσότερα ένζυμα περιέχουν την ομάδα (Mo=O) στο ενεργό τους κέντρο για τον λόγο αυτό αναφέρονται και ως όξο-μολύβδαινο ένζυμα. Στις αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα αυτά πραγματοποιείται μεταφορά δύο ηλεκτρονίων και πρωτονίων. Επιπλέον σε πολλά από αυτά υπάρχουν δυο άτομα μολυβδαινίου ανά μόριο, ενώ άλλα περιέχουν συμπάροντες που συμμετέχουν στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, όπως κέντρα σιδήρου ή θείου, ομάδες αίμης ή φλαβόνες. Υπάρχουν δυο κατηγορίες μολυβδαινοενζύμων ανάλογα με το είδος της καταλυόμενης αντίδρασης:

Η πρώτη περιλαμβάνει αυτά τα οποία καταλύουν την οξειδωτική υδροξυλίωση των αλδεύδων και των αρωματικών ενώσεων σε αντιδράσεις που περιλαμβάνουν την διάσπαση ενός C-H δεσμού. Αυτά θεωρούνται υδροξυλάσες παρά το ότι στα προϊόντα τους επικρατεί πολλές φορές η κέτο μορφή έναντι της ενολικής [89,90,91].



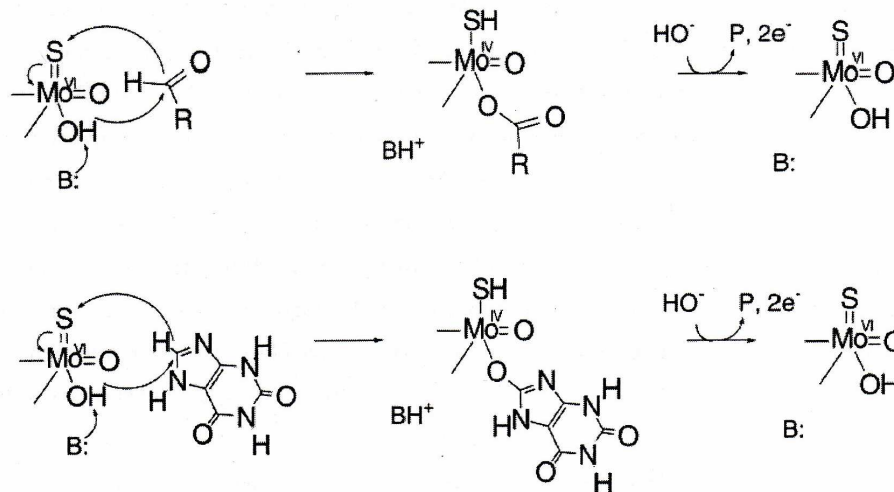
Σχήμα 9.1 Τα ενεργά κέντρα των μονομεταλλικών ενζύμων του μολυβδαινίου.

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα ένζυμα που καταλύουν την μεταφορά ατόμου οξυγόνου και αποκαλούνται οξοτρανσφεράσες, ενώ και αυτά με την σειρά τους χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες: Στην πρώτη ανήκουν τα ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης και η νιτρική αναγωγάση. Η ομάδα $cis\text{-MoO}_2^{2+}$ υπάρχει σε ορισμένα ένζυμα, όπως η οξειδωμένη μορφή της οξειδάσης των θειωδών και η δεϋδρογονάση της ξανθίνης. Η δραστηριότητα της ομάδας μελετάται σε σχέση με τις αντιδράσεις μεταφοράς οξυγόνου, περιγράφοντας έτσι την λειτουργία του ενεργού κέντρου Mo στα μολυβδαινοένζυμα. Τα μολυβδαινοένζυμα καταλύουν μια ποικιλία αντιδράσεων οξειδοαναγωγής δύο ηλεκτρονίων, ανταλλάσσοντας ένα άτομο οξυγόνου μεταξύ υποστρώματος Y και H_2O :



Το νερό παρέχει άτομο O στο υπόστρωμα Y ενώ το μολυβδαίνιο που συμμετέχει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου περνά από διάφορες οξειδωτικές καταστάσεις σε διάφορα στάδια μεταφοράς ηλεκτρονίου [92].

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει ένζυμα όπως η αναγωγάση του (DMSO) και η βιοτινο-αναγωγάση που μετέχουν σε διαδικασίες αναπνοής [93].

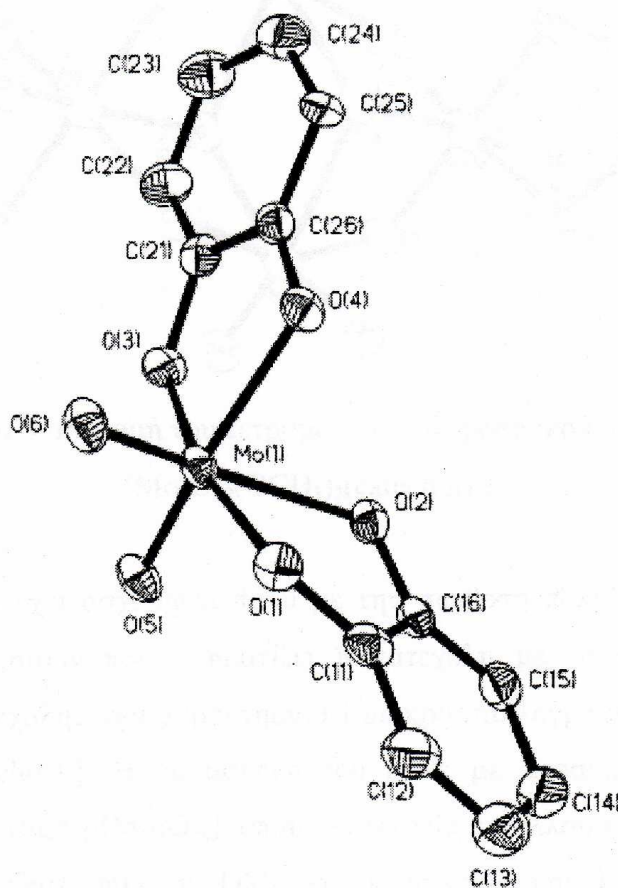


Σχήμα 9.2 Μηχανισμοί για τις υδροξυλάσες του μολυβδαινίου στις αλδεύδες (πάνω) και στην ξανθίνη (κάτω).

9.2 Σύμπλοκα του μολυβδαινίου

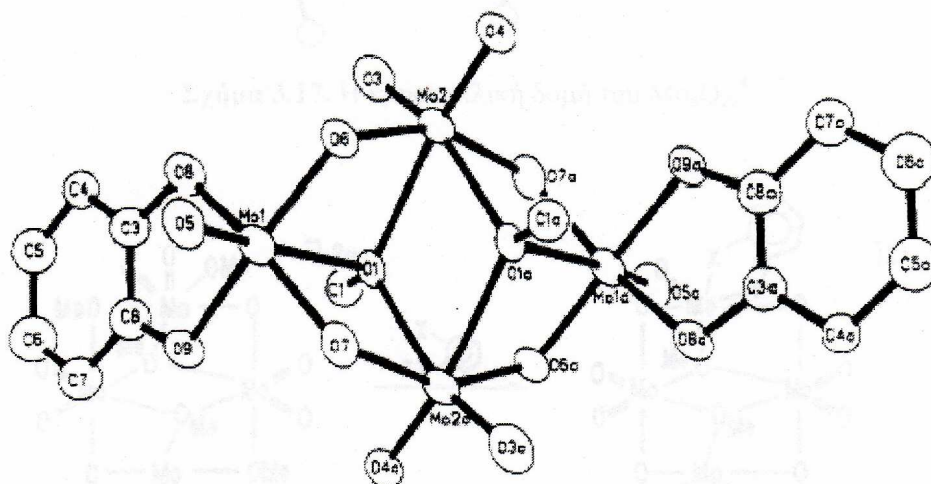
Το μολυβδαίνιο το συναντάμε σε ένα μεγάλο εύρος συμπλόκων από μονομερή ολιγομερή ως και πολυμερή [94-95]. Τα πιο συχνά απαντώμενα σύμπλοκα στην χημεία του μολυβδαινίου είναι αυτά που περιέχουν την ομάδα (*cis*-MoO₂²⁺). Τα περισσότερα από αυτά είναι εξαϋποκατεστημένα και έχουν οκταεδρική δομή. Μελέτες όσον αφορά τα σύμπλοκα αυτά έχουν δείξει ότι μετέχουν σε διάφορα οξειδοαναγωγικά συστήματα [90,96]. Για παράδειγμα, το σύμπλοκο ανιόν MoO₂(cat)₂²⁻ (όπου cat=κατεχόλη=1,2-διοξο-βενζόλιο) σε ελαφρώς όξινα διαλύματα υπόκεινται σε διαδοχικές αναγωγές ενός και δύο ηλεκτρονίων που οδηγούν σε Mo(V) και Mo(III). Κατά την αναγωγή, ο αριθμός των όξο-ομάδων ανά άτομο μολυβδαινίου μειώνεται, γεγονός που μπορεί να συσχετιστεί με την λειτουργία των οξομολυβδαινικών κέντρων στα ένζυμα.

Το μονομερές κατεχολικό σύμπλοκο του μολυβδαινίου έχει χαρακτηριστεί κρυσταλλογραφικά (n-BuN)₃ [MoO₂(C₆H₄O₂)₂] (σχήμα 9.3). Στο σύμπλοκο υπάρχει η ομάδα (*cis*-MoO₂²⁺) με το μολυβδαίνιο να βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση +5, κάτι ασυνήθιστο για σύμπλοκα που περιέχουν αυτήν την ομάδα. Πιθανώς αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη ενός υποκαταστάτη σε μορφή σεμικινόνης [97].



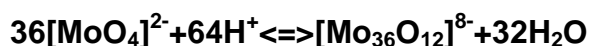
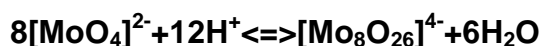
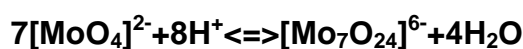
Σχήμα 9.3 Η κρυσταλλική δομή του ανιόντος $[\text{MoO}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2)]^{3-}$

Εξαιρετικού ενδιαφέροντος είναι και η χημεία των πολυοξομεταλλικών ανιόντων. Τα ανιόντα αυτά ενδιαφέρουν την επιστημονική κοινότητα εξαιτίας των πολλών και σημαντικών εφαρμογών τους: Εφαρμογές στην κατάλυση, στην τεχνολογία στερεάς κατάστασης, ακόμη και στα φάρμακα (αντικαρκινική τους δράση) [98-100]. Η κ. Καραλιώτα και οι συνεργάτες της σε πρόσφατη εργασία αναφέρθηκαν σε πολυοξομολυβδαινικά σύμπλοκα με διυδροξοβενζοϊκά οξέα, τα οποία λειτουργούν ως αναστολείς της μεταλλαξογένεσης και καρκινογένεσης [101-104]. Τα παράγωγα των πολυοξομεταλλικών ανιόντων μπορούν να ορισθούν σαν ομάδες που μερικοί οξο-υποκαταστάτες έχουν αντικατασταθεί από άλλους ανόργανους ή και οργανικούς υποκαταστάτες. Από πλευράς ηλεκτρονικής δομής θα ήταν εφικτό να αντικατασταθεί ένας οξο-υποκαταστάτης από ισοηλεκτρονιακούς υποκαταστάτες π.χ F^- , HO^- , HN^{2-} , N^{3-} . Οι υποκαταστάτες αυτοί είναι π-δότες με αποτέλεσμα να σταθεροποιούν την υψηλή οξειδωτική κατάσταση του μετάλλου [105].



Σχήμα 9.4 Η κρυσταλλική δομή του τετραμερούς μολυβδαινικού συμπλόκου με κατεχόλη $[\text{Mo}_4\text{O}_{10}(\text{OCH}_3)_2(\text{catechol})_2]^{2-}$

Ένα τετραμερές μολυβδαινικό σύμπλοκο κατεχόλης έχει χαρακτηριστεί με κρυσταλλογραφία και η δομή του παρατίθενται στο παραπάνω σχήμα (σχήμα 9.3). Υπάρχουν δυο μεγάλες κατηγορίες πολυοξομεταλλικών ανιόντων: Τα ισοπολυοξομεταλλικά και τα ετεροπολυοξομεταλλικά. Τα πρώτα περιέχουν μόνο το ίδιο d^0 μεταλλικό κατιόν με ανιόντα οξυγόνου ενώ τα δεύτερα περιέχουν ένα ή περισσότερα ετεροάτομα. Πιο συγκεκριμένα για το μολυβδαίνιο, το μολυβδαινικό ιόν απαντάται στην μονοπυρηνική του δομή σε διαλύματα με τιμές pH ανώτερες του 7. Σε τιμές κάτω του 6 λαμβάνουν χώρα οι παρακάτω ισορροπίες και δημιουργούνται τα αντίστοιχα πολυοξοανιόντα [106].



Η τετραεδρική δομή του Mo(VI) στα παραπάνω πολυμερή μετατρέπεται σε οκταεδρικές όπου τα γειτονικά άτομα Mo συνδέονται με γέφυρες οξυγόνου με επικρατέστερες δομές, αυτές του παραμολυβδαινικού επταμερούς $[Mo_7O_{24}]^{6-}$ και του οκταμερούς $[Mo_8O_{26}]^{4-}$. Οι περόξο O_2^{2-} υποκαταστάτες είναι επίσης π-δότες όπως οι όξο-υποκαταστάτες και έτσι οι $Mo(O_2)$ και $Mo(O_2)_2$ ομάδες είναι ανάλογες με τις cis-(δι-όξο) και (τρι-όξο) ομάδες. Γι' αυτό περόξο σύμπλοκα του μολυβδαινίου κατέχουν μια ξεχωριστή θέση στην κατηγορία των πολυοξομεταλλικών παραγώγων. Προσθήκη υπεροξειδίου σε υδατικά διαλύματα πολυοξομολυβδαινικών οδηγεί στον σχηματισμό πολυπυρηνικών περόξο-συμπλόκων όταν η συγκέντρωση του υπεροξειδίου είναι χαμηλή [105-106].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

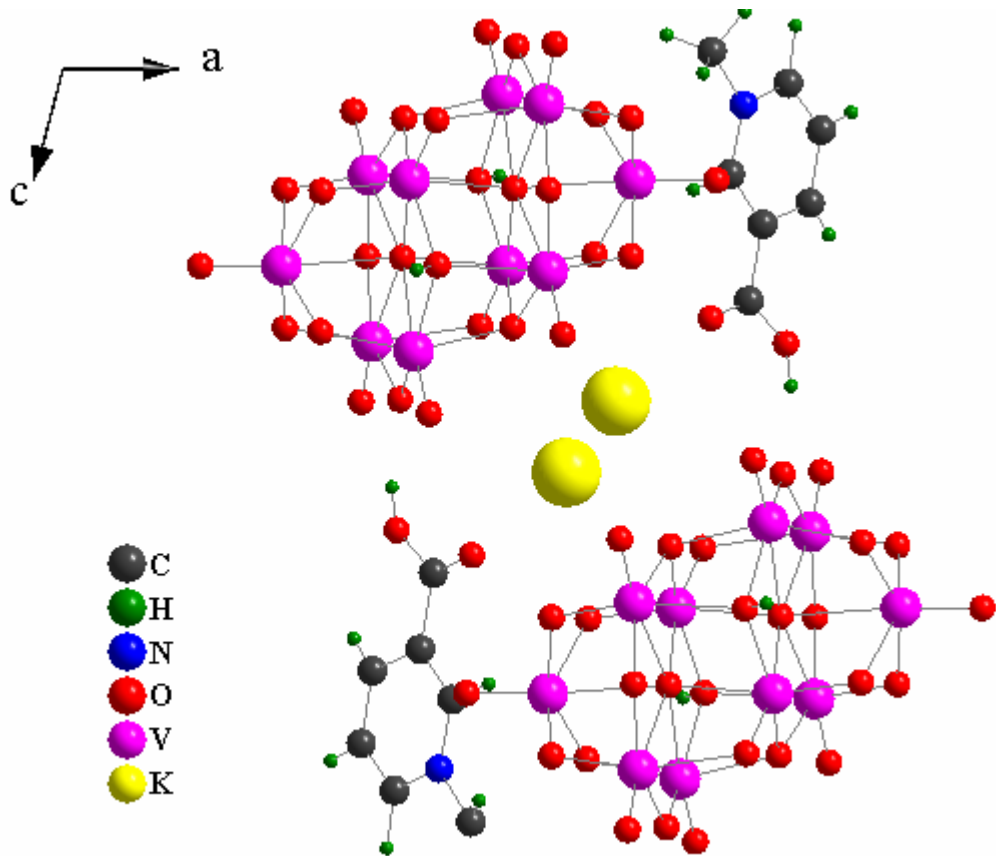
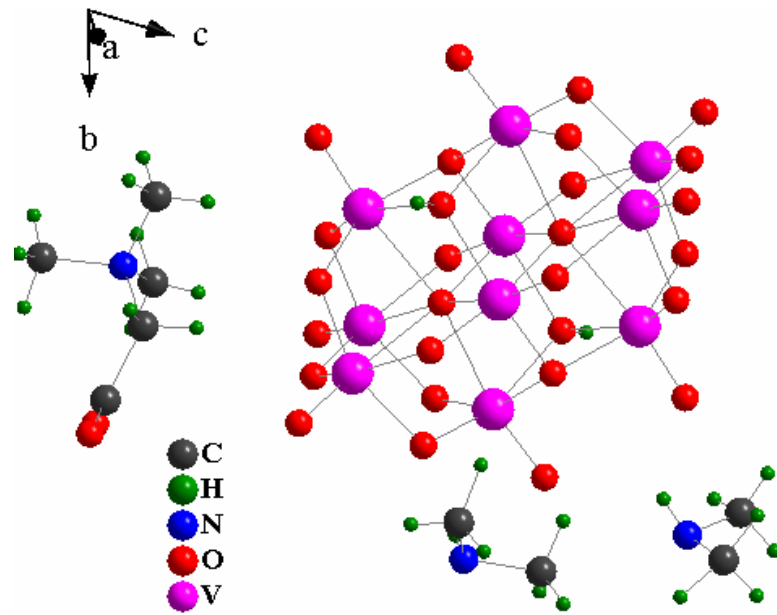
ΒΑΝΑΔΙΟ

10.1 Ο ρόλος του βαναδίου στα βιολογικά συστήματα

Το βανάδιο υπάρχει σε πολλούς οργανισμούς και χρησιμοποιείται από αυτούς σαν ενεργό κέντρο των ενζύμων. Οι σύμπλοκες ενώσεις του βαναδίου με τους κατάλληλους κάθε φορά υποκαταστάτες (μπορεί να είναι ενώσεις χαμηλού αλλά και υψηλού μοριακού βάρους) έχει αποδειχθεί ότι κατέχουν χαμηλή τοξικότητα, καλά ποσοστά απορρόφησης και υψηλή ινσουλινομιμητική δραστηριότητα [107].

Είναι γνωστό ότι οι ενώσεις του βαναδίου έχουν προταθεί σαν νέα αντιδιαβητικά φάρμακα εξαιτίας της ινσουλινο-μιμητικής τους δράσης, με βελτιωμένες επιδράσεις τόσο (in vivo) όσο και (in vitro). Η σημαντικότητα των ενώσεων του βαναδίου σαν ινσουλινο-μιμητικοί παράγοντες όταν λαμβάνονται από το στόμα, έχει περιγραφεί από τους Heyliger, Tahiliani και Mcneil το 1985. Αρκετές είναι οι αναφορές που υποστηρίζουν ότι η θεραπεία με βανάδιο ελαττώνει τα επίπεδα της γλυκόζης στο πλάσμα σε διαφορετικά μοντέλα, τα οποία πάσχουν τόσο από διαβήτη τύπου 1 όσο και διαβήτη τύπου 2 [108].

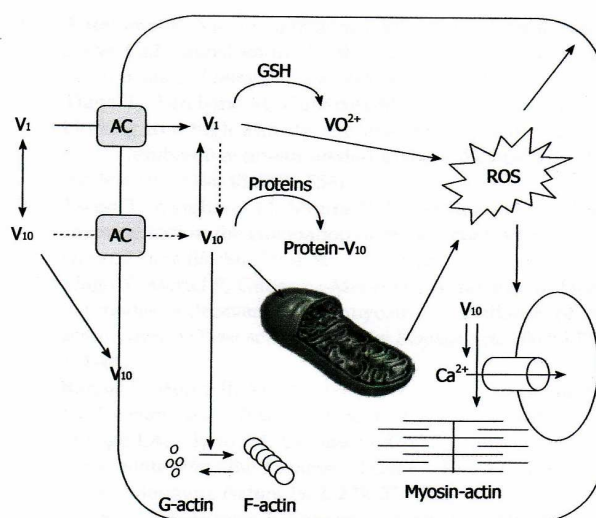
Από την άλλη πάλι πλευρά τα πολυοξοβαναδικά αποτελούν μια ενδιαφέρουσα κατηγορία ανόργανων υλικών με εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως είναι η βιολογία, η ιατρική και η επιστήμη των υλικών. Τα πολυοξοβαναδικά παρότι είναι απίθανο να είναι παρόντα σε φυσιολογικές συνθήκες, ο σχηματισμός τους ωστόσο, σε περιπτώσεις υψηλής συγκέντρωσης μετάλλων, θα μπορούσε να αποτελέσει έναν σημαντικό μηχανισμό αποτοξίνωσης. Επιπλέον όντας σε θέση, να διασχίσουν αποτελεσματικά την κυτταρική επιφάνεια, εμφανίζουν αντιϊική και αντι-HIV δράση. Σε ασθενώς όξινο διάλυμα, τα κυριότερα είδη πολυοξοβαναδικών είναι τα πορτοκαλί δεκαβαναδικά (decavanadate) ανιόντα. Ο E. Κιοσέογλου και ο A. Σαλίφογλου απομόνωσαν ένα σύμπλεγμα δεκαβαναδικού με τριγγολεΐνη και ένα με γλυκίνη και βεταΐνη (εικόνα 10.1) [107].



Εικόνα 10.1 α) Δομή του δεκαβαναδικού με την τριγγολεΐνη και β) δομή του συμπλόκου της V(V)-(Gly-Bet)

Το βανάδιο χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα τόσο στον αβιοτικό όσο και στον βιολογικό κόσμο. Η εμπλοκή του σε ζώντες οργανισμούς καλύπτει ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών διεργασιών, στις οποίες το μέταλλο, επιδεικνύει ενεργό ρόλο στις διάφορες οξειδωτικές καταστάσεις του. Έτσι λοιπόν, το βανάδιο α) ενεργεί σαν ανόργανος συμπράγοντας στις αλοϋπεροξειδάσες και εναλλακτικά στις νιτρογενάσες, β) εμφανίζει ινσουλινο-μιμητική δράση έναντι του σακχαρώδους διαβήτη, γ) παρουσιάζει αντικαρκινική δράση έναντι αρκετών κυτταρικών σειρών με μόρια στόχους όπως ο πυρηνικός παράγοντας-ΚΒ, Akt, ο ενεργοποιητής πρωτεΐνης -1, η κυκλοοξυγενάση-2, η λιποξυγενάση, η συνθάση του οξειδίου του αζώτου κοκ. [109].

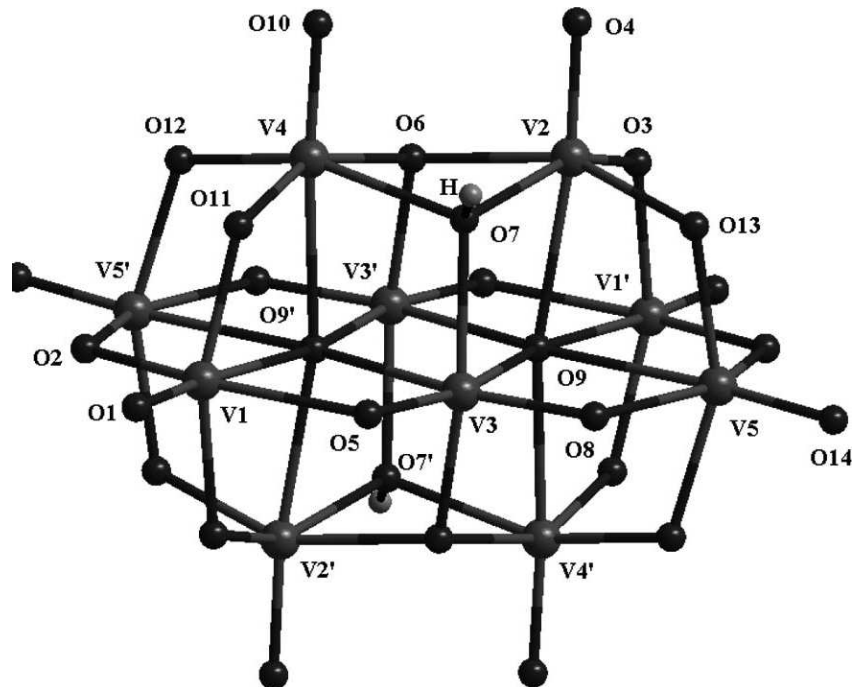
Μεταξύ αρκετών ενώσεων του βαναδίου, τα δεκαβαναδικά έχουν εμφανίσει μεγάλη βιολογική συγγένεια προς συγκεκριμένες κινάσες, φωσφορυλάσες, και αντίστροφες τρανσκριπτάσες, και είναι πολύ χρήσιμα για την διευκόλυνση της κρυστάλλωσης πρωτεϊνών, καθώς επίσης παρέχουν μοντέλα ενώσεων για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης πολυοξομετάλλων-πρωτεϊνών. Πρόσφατα διεξήχθησαν ορισμένες ενδιαφέρουσες μελέτες αλληλεπίδρασης δεκαβαναδικών με οργανικούς υποκαταστάτες. Συντέθηκαν αρκετά ανιονικά σύμπλοκα δεκαβαναδικών ενώ παράλληλα μελετήθηκε η αντιδιαβητική και αντιμικροβιακή τους δράση [110]. Όπως προαναφέραμε τα δεκαβαναδικά αλληλεπιδρούν με αρκετές πρωτεΐνες και παρουσιάζουν βιολογική δράση κυρίως (in vitro) (σχήμα 10.1).



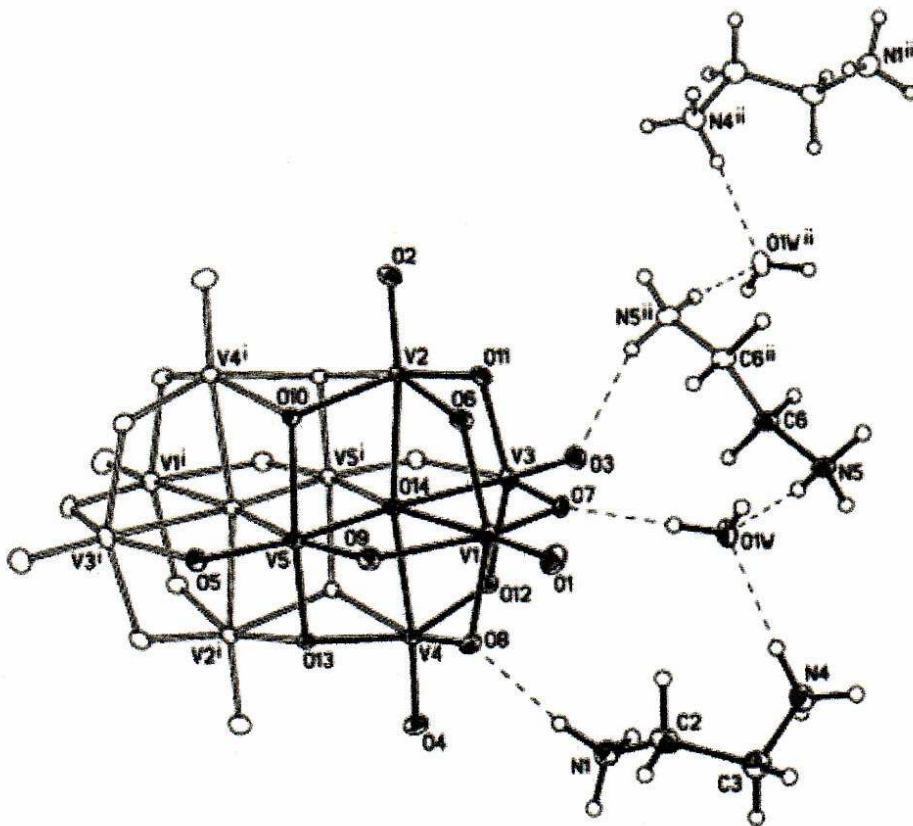
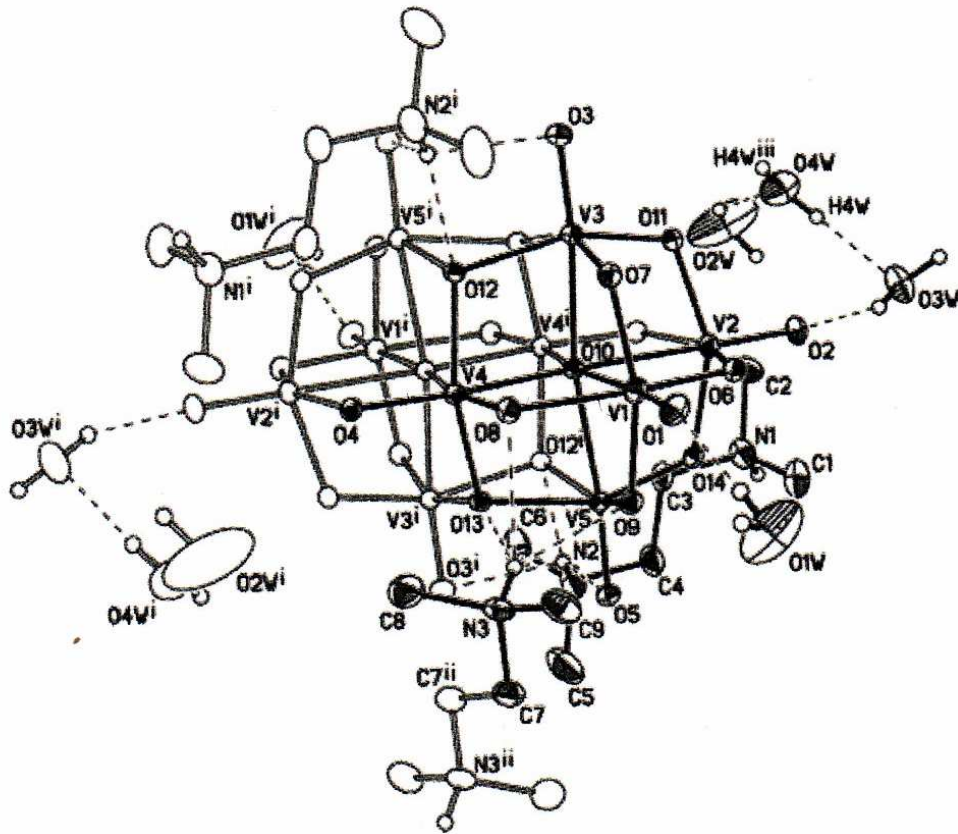
Σχήμα 10.1 Σχήμα προτεινόμενων κυτταρικών στόχων των δεκαβαναδικών. Πρόσληψη του V₁₀ μέσω ανιονικών καναλιών. Το βανάδιο μπορεί να αλληλεπιδρά με

πρωτεϊνικές μεμβράνες. Σχηματισμός δεκαβαναδικού έπειτα από ενδοκυτταρική οξίνιση βαναδίου στο κυτταρόπλασμα καθώς και σε άλλα όξινα οργανίδια. Αναγωγή των μονομερών βαναδικών από αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Σύνδεση των δεκαβαναδικών σε πρωτεΐνες στόχους. Έχει προταθεί ότι τα δεκαβαναδικά συσσωρεύονται στα κυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, επηρεάζοντας τοιουτοτρόπως την λειτουργία τους.

Το πρώτο ένζυμο που αναφέρθηκε ότι αναστέλλεται από τα δεκαβαναδικά είναι η αδενυλική κινάση του μυός. Άλλα ένζυμα είναι η εξοκινάση, η φωσφοφρουκτοκινάση κλπ. Την τελευταία δεκαετία, βρέθηκε ότι τα δεκαβαναδικά αλληλεπιδρούν με την ΑΤΡαση του ασβεστίου, την ακτίνη και την μυοσίνη, προτείνεται ότι μπορούν να επηρεάσουν βιολογικές διαδικασίες όπως είναι η κατασκευή των μυών, ο πολυμερισμός της ακτίνης και η ομοιόσταση του ασβεστίου. Πιστεύεται ότι στις περισσότερες εργασίες που χρησιμοποιούν βαναδικά, σχηματίζονται τα δεκαβαναδικά τα οποία με την σειρά τους συνεισφέρουν στις βιολογικές διεργασίες [111]. Παρακάτω παρουσιάζονται χαρακτηριστικές δομές δεκαβαναδικών ανιόντων (σχήμα 10.2, 10.3).



Σχήμα 10.2 Δομή του δεκαβαναδικού $[V_{10}O_{28}H_2]^{4-}$ [110].



Σχήμα 10.3 α) Δομή του δεκαβαναδικού με ιόντα N,N,N',N' τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμμωνίου και αιθυλενοδιαμμωνίου $(H_2tmen)_3 V_{10}O_{28} \cdot 6H_2O$ και β) $(H_2en)_3 V_{10}O_{28} \cdot 2H_2O$ [110].

10.2 Τοξικότητα του βαναδίου

Μέσα από έναν αριθμό πειραματικών ερευνών πάνω σε θηλαστικά, βρέθηκε ότι ο βαθμός της τοξικότητας του βαναδίου εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως είναι: η χημική μορφή της συγκεκριμένης ένωσης του βαναδίου (π.χ ορθοβαναδικά έναντι μεταβαναδικών, οργανικών έναντι ανόργανων υποκαταστατών κ.λ.π), η οξειδωτική κατάσταση του βαναδίου, ο τρόπος έκθεσης δηλαδή αν η χορήγηση του φαρμάκου είναι στοματική, παρεντερική κ.ο.κ, η περίοδος έκθεσης και τέλος η δόση που χορηγείται.

Οι πιο αξιοσημείωτες τοξικές επιδράσεις βαναδικών σε ποντίκια, συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 10.1: Παρενέργειες της δράσης των βαναδικών στα ποντίκια

<i>Επιδράσεις</i>	<i>Συμπτώματα</i>
Αιματολογικές και βιοχημικές αλλαγές	Υπεροξειδωτικές αλλαγές στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, αιμόλυση. Μείωση στον αριθμό των ερυθροκυττάρων, στα επίπεδα αιμογλοβίνης, και στον αιματοκρίτη. Αναιμία. Μείωση των επιπέδων ασκορβικού στο πλάσμα. Μείωση των επιπέδων των AST, ALT, LDH και ALP.
Αναπαραγωγή και ανάπτυξη	Μειωμένη γονιμότητα, εμβρυοτοξικότητα και τερατογένεση. Μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων χωρίς να επηρεάζει την κινητικότητα.
Νευροσυμπεριφορά	Σημαντική μείωση στην καθημερινή δραστηριότητα και μάθηση
Νεφροτοξικότητα	Αναστολή των ενζύμων $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPάση. Διούρηση. Νεφρική συσσώρευση του βαναδίου.
Άλλα	Καταστροφή των οστών. Μυελοτοξικότητα. Ανοσοτοξικότητα

Έχουν αναφερθεί θάνατοι που προήλθαν από απώλεια βάρους και αύξηση των συγκεντρώσεων ουρίας και κρεατινίνης σε διαβητικά ποντίκια, έπειτα από χορήγηση μεταβαναδικού νατρίου σε μορφή πόσιμου υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης (0.15 mg/ml) για 28 ημέρες ή για δύο εβδομάδες (1.1 mg/ml). Από την άλλη πάλι πλευρά σε αντίθεση με τα βαναδικά, η χορήγηση θειϊκού βαναδυλίου (vanadyl sulfate) (0.5-1.5 mg/ml) δεν παρουσίασε τοξικότητα [112].

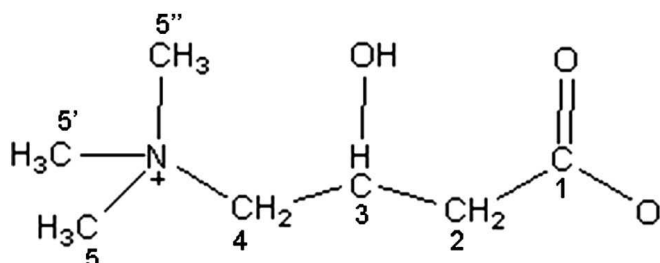
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΚΑΡΝΙΤΙΝΗΣ- ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

11.1 Σύνθεση ενώσεων της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο και βανάδιο.

Στο κεφάλαιο αυτό μελετάται η αντίδραση του μεταλλικού Mo και του βαναδίου με τον υποκαταστάτη καρνιτίνη (σχήμα 11.1), ένα πολύ σημαντικό βιολογικό μόριο. Όπως αναφέρουμε η αντίδραση του μολυβδαινίου πραγματοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου και εν συνεχεία προσθήκη αιθανολικού διαλύματος καρνιτίνης, που οδήγησαν στην απομόνωση ενός διμερούς περόξο συμπλόκου, $[Mo_2O_4(OH)_2(O_2)(Me_3N-CH_2-CH(OH)-CH_2-COO-)]$ (σύμπλοκο 1).

Μια πολυβαναδική ένωση με καρνιτίνη απομονώθηκε σε υδατικό διάλυμα σε αναλογία μετάλλου-υποκαταστάτη (1:2) και η μετέπειτα προσθήκη μεθανόλης οδήγησαν στην απομόνωση του $\{(Me_3N-CH_2-CH(OH)-CH_2-COOH)_2\} \{Na_4(H_2O)_{16}[V_{10}O_{28}]\} \cdot MeOH$ (σύμπλοκο 2). Το σύμπλοκο (1) χαρακτηρίστηκε σε στερεή κατάσταση με στοιχειακή ανάλυση, θερμική ανάλυση (TGA), φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) καθώς και σε διάλυμα με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H-NMR). Από την ένωση (2) απομονώθηκαν κρύσταλλοι, οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, στοιχειακή ανάλυση και φασματοσκοπίες (IR, ^1H-NMR , TGA και UV-Vis). Η σύνθεση των ενώσεων της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο και βανάδιο πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως:



Σχήμα 11.1 Η δομή της καρνιτίνης με αριθμημένα τα άτομα άνθρακα.

11.1.1 Σύνθεση του συμπλόκου $[\text{Mo}_2\text{O}_4(\text{OH})_2(\text{O}_2)(\text{Me}_3\text{N-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COO-})]$ (1)

Σε διάλυμα πυκνού υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 30 % (5 ml) διαλύονται (95.7 mg, 1 mmol) μεταλλικού μολυβδαινίου, αραιώνεται στα 50 ml με απεσταγμένο νερό, και προστίθενται σε αιθανολικό διάλυμα (5 ml) καρνιτίνης (0.3953 g, 2 mmol). Ένα κίτρινο άμορφο προϊόν λαμβάνεται μετά από παραμονή μιας εβδομάδας, με προσθήκη εξανίου (layering). **Στοιχειακή ανάλυση:** $\text{Mo}_2\text{O}_{11}\text{H}_{15}\text{NC}_7$. (M.B=481.003) **Θεωρητική:** C: 17.48 H: 3.14 N: 2.91 **Πειραματική:** C: 17.22, H: 3.41, N: 2.85

11.1.2 Σύνθεση της ένωσης $\{(\text{Me}_3\text{N-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH})_2\} \{\text{Na}_4(\text{H}_2\text{O})_{16}[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\} \cdot \text{MeOH}$ (2)

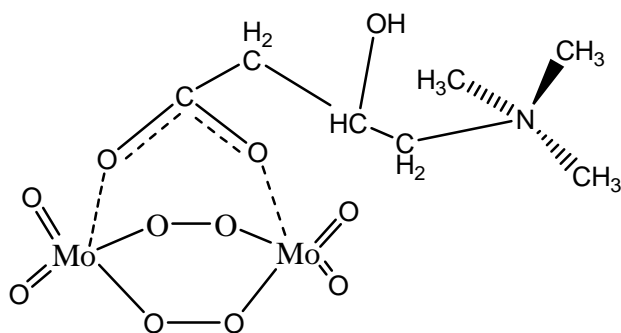
Σε διάλυμα ορθοβαναδικού νατρίου Na_3VO_4 (1.8391 g, 10 mmol) σε (50 ml) H_2O , προστίθενται υδατικό διάλυμα καρνιτίνης (3.9532 g, 20 mmol) (50 ml). Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται για τουλάχιστον μισή ώρα. Έπειτα από προσθήκη μεθανόλης (layering) και παραμονή μιας εβδομάδας με αργή εξάτμιση σε θερμοκρασία δωματίου, απομονώθηκαν πορτοκαλί κρύσταλλοι, κατάλληλοι για ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Από την στοιχειακή ανάλυση προέκυψαν: **Στοιχειακή ανάλυση:** $\text{V}_{10}\text{O}_{51}\text{C}_{15}\text{Na}_4\text{N}_2\text{H}_{68}$. (M.B=1693,717) **Θεωρητική:** C: 10.64 H: 4.04 N: 1.65 **Πειραματική:** C: 10.13, H: 3.89, N: 1.67 Όλες οι κρυσταλλογραφικές πληροφορίες για την ανάλυση της ένωσης (2) σε cif μορφή έχουν κατατεθεί στο Κέντρο Κρυσταλλογραφικών Δεδομένων του Cambridge.

11.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

Το σύμπλοκο (1) παρασκευάστηκε αναμειγνύοντας αιθανολικό διάλυμα καρνιτίνης και υδατικό διάλυμα μεταλλικού μολυβδαινίου σε μοριακή αναλογία (2:1). Η ένωση (2) παρασκευάστηκε με ανάμειξη υδατικού διαλύματος καρνιτίνης με υδατικό διάλυμα ορθοβαναδικού νατρίου σε μοριακή αναλογία (2:1), αντίστοιχα. Οι απομονοθέντες κρύσταλλοι προέκυψαν μετά από

προσθήκη μεθανόλης στο αρχικό διάλυμα (layering) και μετά από αργή εξάτμιση σε θερμοκρασία δωματίου.

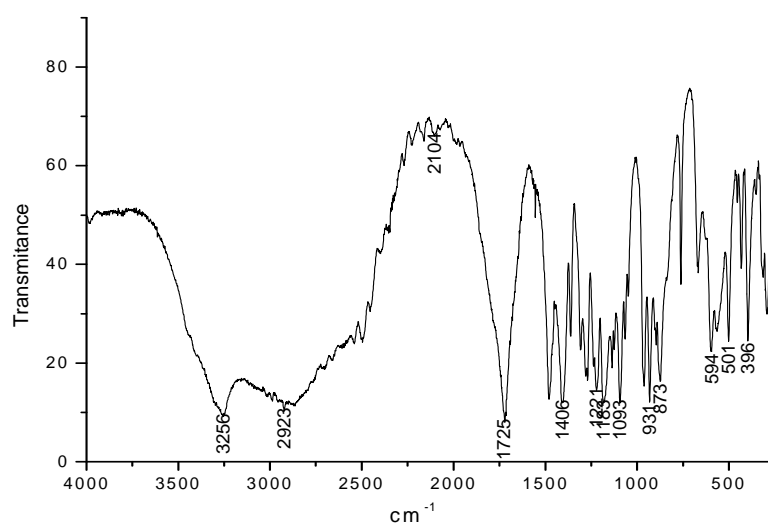
Η προτεινόμενη δομή του συμπλόκου (1) παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα (σχήμα 11.2).



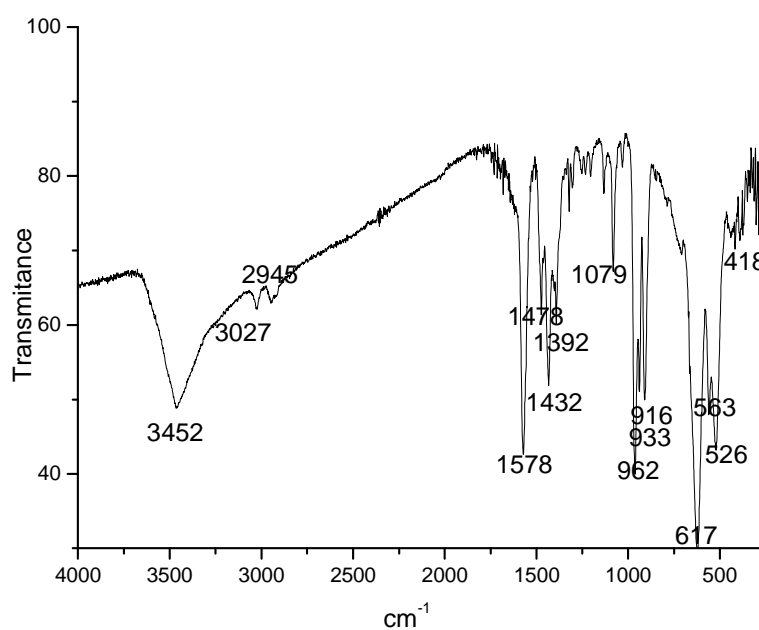
Σχήμα 11.2 Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου (1).

Όπως φαίνεται και στο σχήμα ο υποκαταστάτης συμπλέκεται στο μεταλλικό κέντρο γεφυρωτικά από το καρβοξύλιο, ενώ τα δύο κέντρα μολυβδαινίου συνδέονται επίσης με περόξο γέφυρες. Καθένα από τα δύο κέντρα μολυβδαινίου έχουν από μια ομάδα cis -MoO₂²⁺.

Στο φάσμα υπερύθρου (IR) της καρνιίνης, η πιο χαρακτηριστική συχνότητα είναι η ασύμμετρη δόνηση της ομάδας του καρβοξυλίου της ν(COOH) (σχήμα 11.3), η οποία βρίσκεται στα 1725 cm⁻¹. Στο φάσμα υπερύθρου (IR) του συμπλόκου (1) (σχήμα 11.4), η ασύμμετρη δόνηση του καρβοξυλίου [ν(CO₂)_{ασυμ}] μετατοπίζεται στα 1578 cm⁻¹ καθώς και η συμμετρική στα 1432 cm⁻¹ [ν(CO₂)_{συμ}] με αριθμητική διαφορά (Δν)=146 cm⁻¹ [Δ= ν(CO₂)_{ασυμ}- ν(CO₂)_{συμ}], που είναι ενδεικτική του γεφυρωτικού τρόπου ένταξης της καρβοξυλικής ομάδας του υποκαταστάτη [113].



Σχήμα 11.3 Το φάσμα υπέρυθρου (IR) της καρνιτίνης.

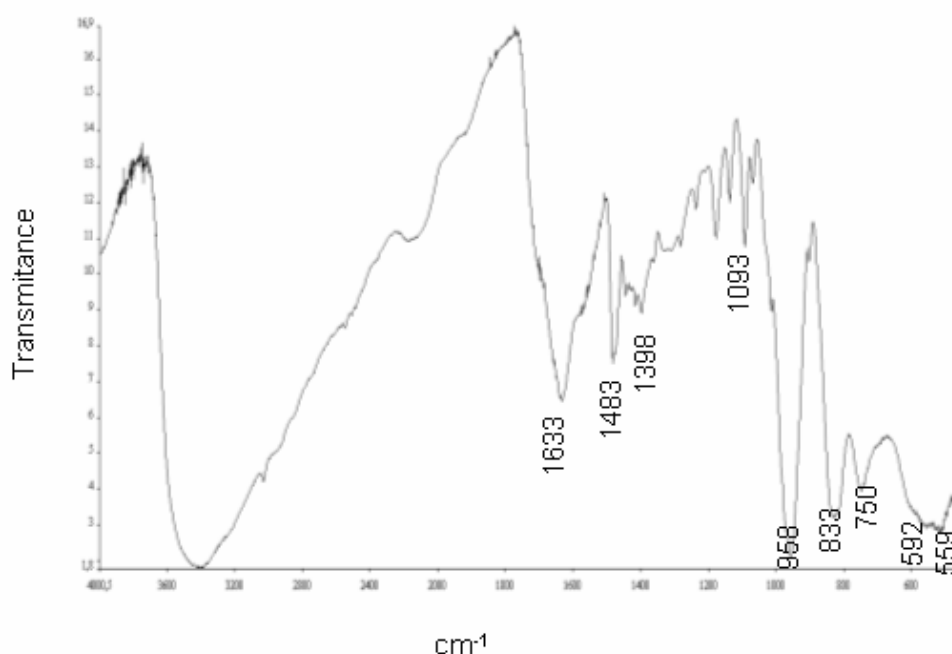


Σχήμα 11.4 Το φάσμα υπέρυθρου (IR) του συμπλόκου (1).

Οι κορυφές που εμφανίζονται στα 962 και 933 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις της ομάδας (MoO_2^{2+}), ενώ η κορυφή στα 916 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση του δεσμού (O-O) της περόξο ομάδας. Αξίζει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι τα μονοπερόξο σύμπλοκα παρουσιάζουν την $\nu(\text{O-O})$ κάτω από τα 900 cm^{-1} ενώ τα διπερόξο πάνω από τα 900 cm^{-1} .

Οι ταινίες που εμφανίζονται στην περιοχή $2900-3100\text{ cm}^{-1}$, αποδίδονται στην δόνηση C-H των μέθυλο- και μεθυλενο-ομάδων του υποκαταστάτη. Τέλος οι κορυφές στα 617 και 563 και 526 cm^{-1} , μπορεί να αποδοθούν στην ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση της Mo-O(O₂).

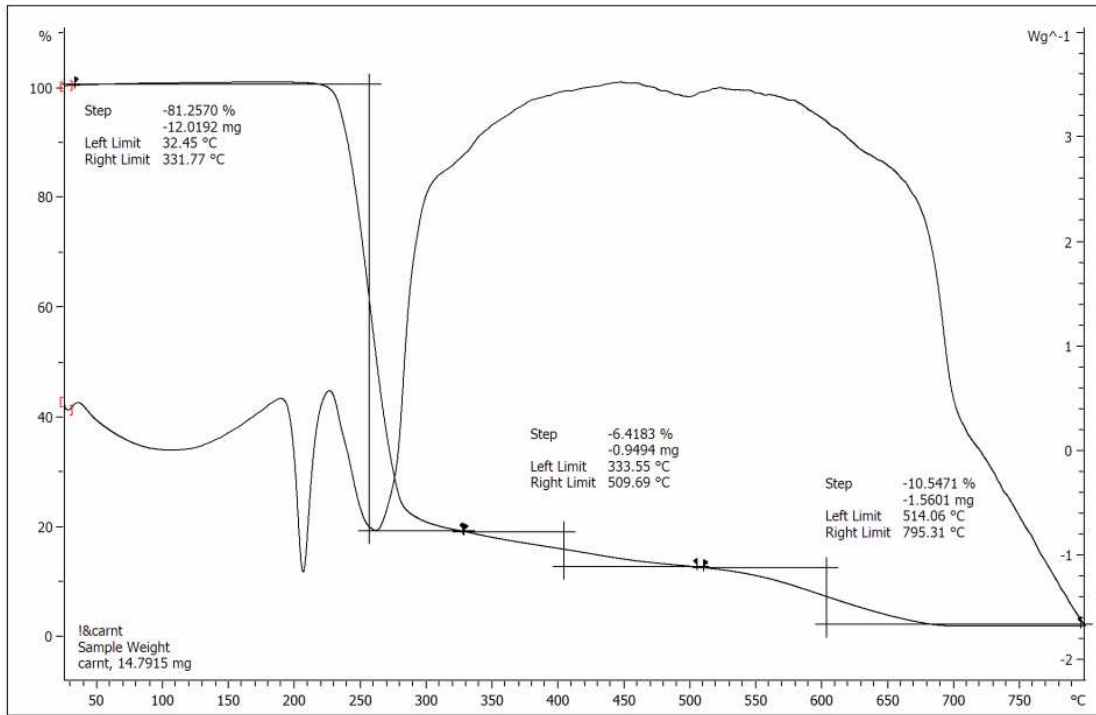
Όσον αφορά το σύμπλοκο (2), το φάσμα υπερέθρου (IR) δίνεται στο (σχήμα 11.5). Στο φάσμα εμφανίζονται δύο ισχυρές ταινίες στα 958 και 982 cm^{-1} , οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στην δόνηση τάσης των τερματικών (V=O). Η ασύμμετρη δόνηση της (V-O-V) γέφυρας πιθανόν να αντιστοιχεί στις ταινίες 750 και 833 cm^{-1} , ενώ η συμμετρική στις ταινίες 559 και 592 cm^{-1} .



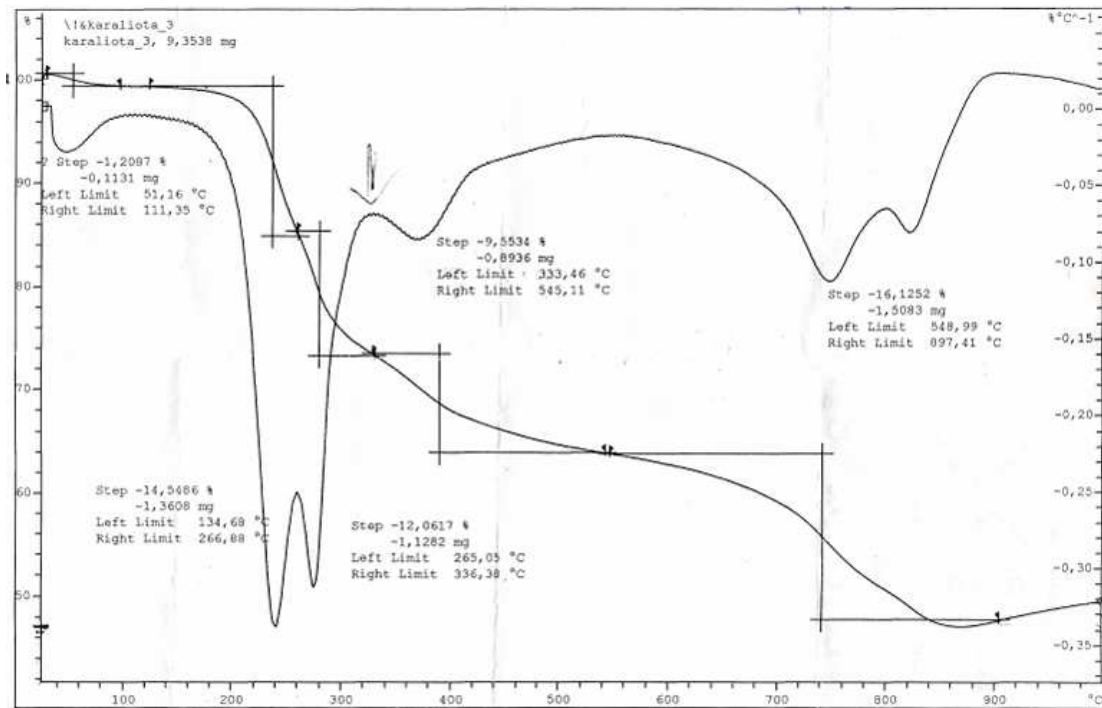
Σχήμα 11.5 Το φάσμα υπερέθρου (IR) του άλατος του βαναδίου με την καρνιτίνη (2).

11.2.1 Χαρακτηρισμός των ενώσεων της καρνιτίνης μέσω θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA).

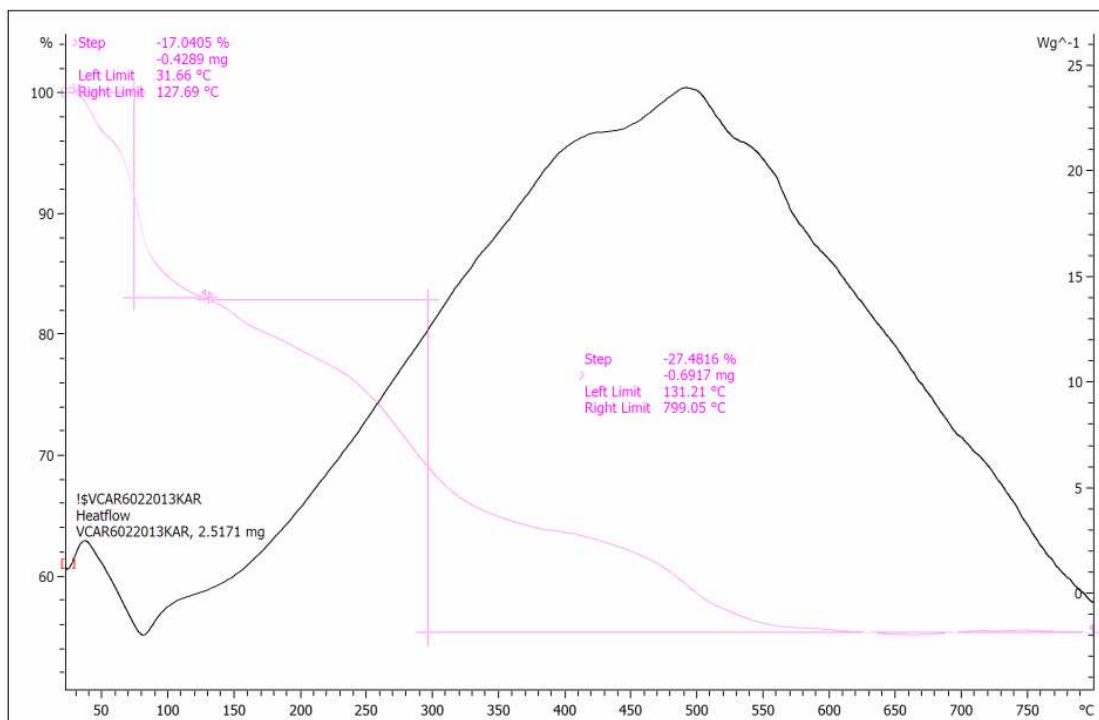
Στα ακόλουθα σχήματα (σχήμα 11.6, 11.7 και 11.8) παρατίθενται τα θερμογραφήματα της καρνιτίνης, του συμπλόκου (1) και της ένωσης (2).



Σχήμα 11.6 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) της καρνιτίνης



Σχήμα 11.7 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) του συμπλόκου (1).



Σχήμα 11.8 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) του άλατος του βαναδίου με την καρνιτίνη (2).

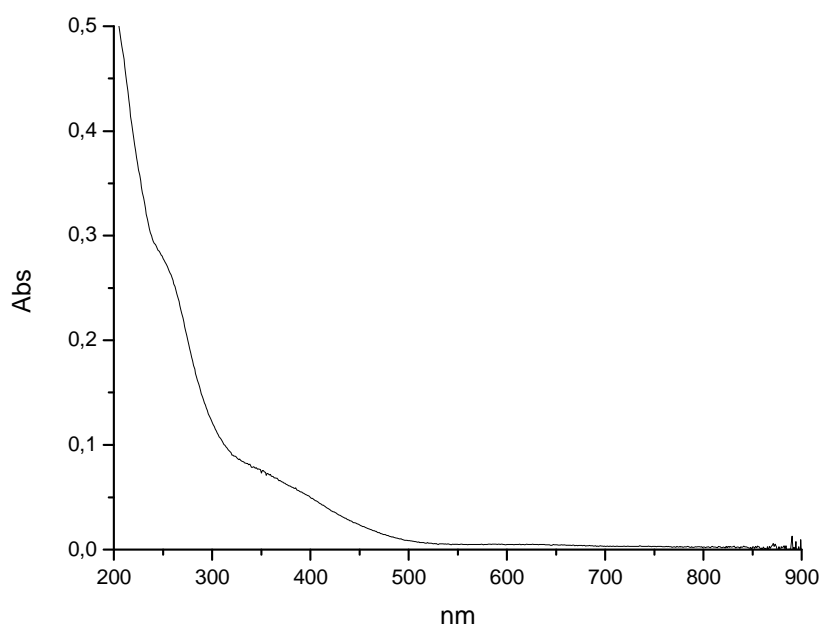
Τα θερμογραφήματα ελήφθησαν σε συσκευή διαφορικής θερμικής ανάλυσης Mettler Star^e SW9.30, με ρυθμό θέρμανσης 10°C ανά λεπτό από τους (25-800°C) σε ατμόσφαιρα αζώτου, με σκοπό να καθορίσουμε και τα στάδια αποσύνθεσης των συμπλόκων της καρνιτίνης. Σύμφωνα λοιπόν, με τις καμπύλες των θερμογραφημάτων, η απώλεια βάρους για το σύμπλοκο (1) (πειραματική:14.5 %, θεωρητική:13.3 %) (σχήμα 11.7) που συμβαίνει στην περιοχή (200-270 °C), αποδίδεται στην διάσπαση των περόξο ομάδων (–O–O–). Η δεύτερη απώλεια βάρους (πειραματική:21.6 %, θεωρητική:24.3 %) στην περιοχή (270-560°C) αποδίδεται στην διάσπαση της καρνιτίνης. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ θεωρητικής και πειραματικής τιμής οφείλεται στο ότι λαμβάνει χώρα μια διαδικασία αποσύνθεσης του συμπλόκου κατά την διάρκεια της διάσπασης των περόξο ομάδων με ταυτόχρονη δημιουργία ενός νέου δεσμού Mo=O ή μιας νέας γέφυρας –Mo-O-Mo– και εκπομπή διοξειδίου του άνθρακα που προέρχεται από την επίδραση οξυγόνου που απελευθερώνεται από την διάσπαση των περόξο ομάδων και τον σχηματισμό μιας ανθρακικής ένωσης του μολυβδαινίου. Το τρίτο και τελευταίο βήμα αντιστοιχεί στην ολική

διάσπαση του υποκαταστάτη και των ανθρακικών, αφήνοντας υπόλειμμα 2MoO_2 . (**πειραματική:51.5 %**, **θεωρητική: 53.2 %**) [114-115].

Όσον αφορά τώρα, το δεκαβαναδικό άλας με την καρνιτίνη, η θερμοσταθμική ανάλυση (σχήμα 11.8) έδειξε ότι ο κρύσταλλος παρουσιάζει μια απώλεια βάρους της τάξης του (**πειραματική:17.04%**, **θεωρητική:17.33%**) στην θερμοκρασιακή περιοχή από (31-127 °C). Αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τον αριθμό των συνδεδεμένων μορίων νερού. Περαιτέρω ερμηνεία του θερμογραφήματος απεδείχθη αδύνατη λόγω της εκρηκτικής συμπεριφοράς του άλατος.

11.2.2 Χαρακτηρισμός του άλατος της καρνιτίνης με βανάδιο με ηλεκτρονική φασματοσκοπία (Uv-Vis).

Το ηλεκτρονικό φάσμα του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης ελήφθη σε υδατικό διάλυμα. Στο φάσμα εμφανίζονται δυο χαρακτηριστικές ταινίες, μια στα 360 nm και μια στα 400 nm οι οποίες αποδίδονται στα δεκαβαναδικά. Αυτές οι απορροφήσεις είναι υπεύθυνες για το τυπικό κίτρινο ή ανοικτό πορτοκαλί χρώμα των διαλυμάτων του βαναδίου. Εάν ένα διάλυμα βαναδίου χρωματιστεί κίτρινο, αυτό αποτελεί ξεκάθαρη απόδειξη της ύπαρξης δεκαβαναδικών ειδών στο διάλυμα [116].



Σχήμα 11.9 Το ηλεκτρονικό φάσμα του δεκαβαναδικού άλατος με την καρνιτίνη (2).

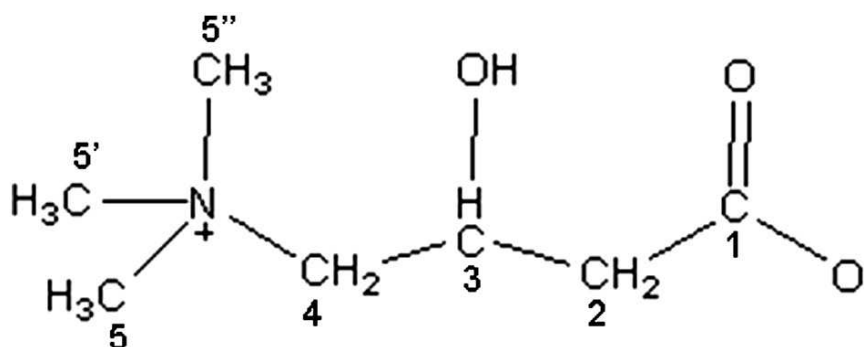
11.2.3 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο και του άλατος της καρνιτίνης με βανάδιο με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$).

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$) επιβεβαίωσαν τον τρόπο σύμπλεξης του υποκαταστάτη και ακολούθως την προτεινόμενη δομή όσον αφορά το περόξο σύμπλοκο του μολυβδαινίου με την καρνιτίνη καθώς επίσης την αλληλεπίδραση του δεκαβαναδικού άλατος με την καρνιτίνη. Το σύμπλοκο του μολυβδαινίου με την καρνιτίνη ελήφθει σε διευτεριωμένο διάλυμα DMSO, ενώ το δεκαβαναδικό άλας της καρνιτίνης καθώς και η καρνιτίνη ελήφθησαν σε διευτεριωμένο D_2O .

Η αποτίμηση του φάσματος διεξήχθη έπειτα από σύγκριση των φασμάτων του ελεύθερου υποκαταστάτη με τα αντίστοιχα των ενώσεων (1) και (2). Αναλυτικά παρατίθενται οι κορυφές στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 11.1 $^1\text{H-NMR}$ Χημικές μετατοπίσεις της καρνιτίνης, του περόξο συμπλόκου της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο καθώς επίσης και του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης.

	1 (-COO)	2 (-CH ₂ COOH)	3 (-CHOH)	4 (-CH ₂ N)	5 [-(CH ₃) ₃ N ⁺]
Καρνιτίνη (D ₂ O)	-	2.27	4.40	3.26	3.07
Σύμπλοκο (1) (DMSO)	-	1.25	4.63	-	3.34-
Σύμπλοκο (2) (D ₂ O)	-	2.40	4.52	3.36	3.16

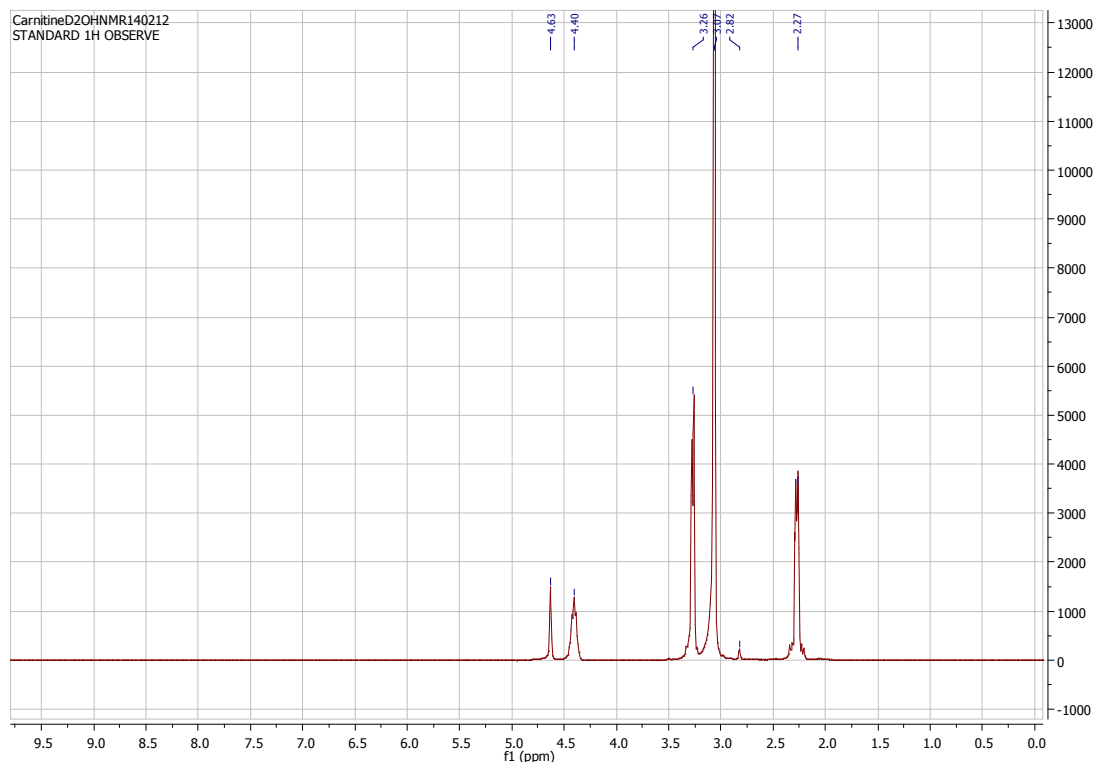


Σχήμα 11.10 Αριθμημένος συντακτικός τύπος του μορίου της καρνιτίνης.

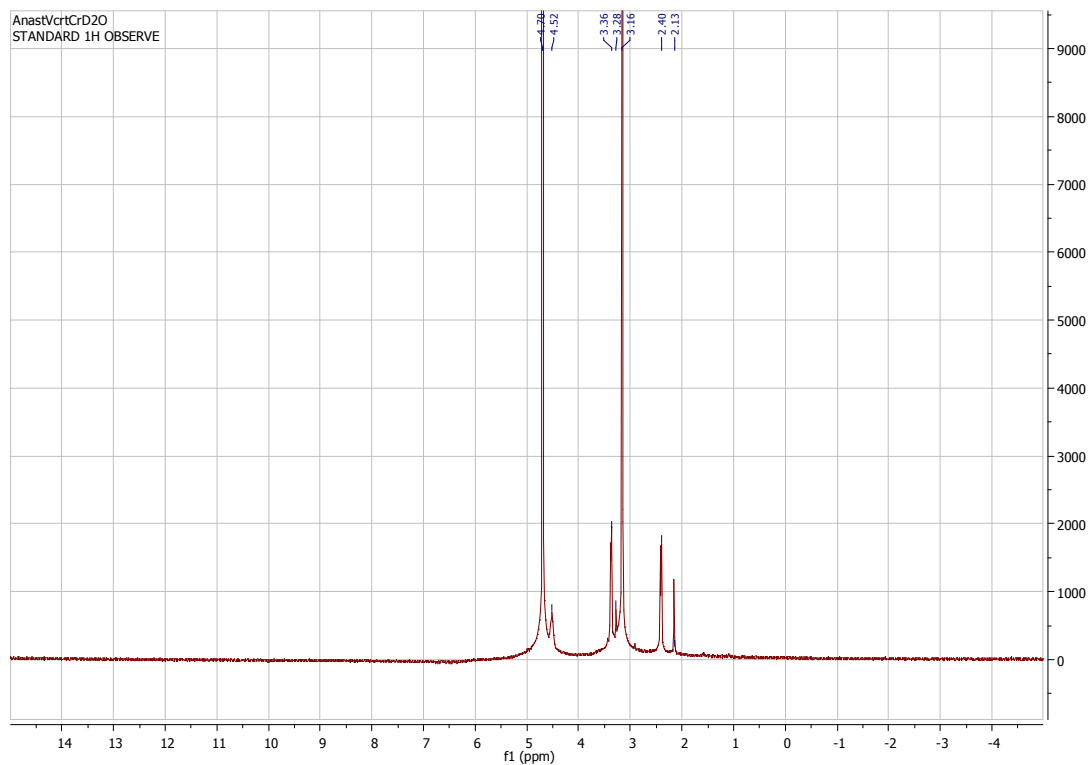
Σύγκριση του περόξο συμπλόκου της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο με τον ελεύθερο υποκαταστάτη έδειξε μια σημαντική μετατόπιση των πρωτονίων H2 και H3. Τα H2 και H3 πρωτόνια αναμενόταν να είναι τα περισσότερο επηρεασμένα μιας και βρίσκονται πλησιέστερα στο σημείο πρόσδεσης του υποκαταστάτη. Έτσι λοιπόν τα πρωτόνια H3 μετακινούνται σε τιμές χαμηλού πεδίου. Τα πρωτόνια H4 και H5 σαν περισσότερα απομακρυσμένα, επηρεάζονται λιγότερο.

Όσον αφορά τώρα, το δεκαβαναδικό άλας της καρνιτίνης δεν υπάρχει μετατόπιση, παρά μόνο μια ελάχιστη των πρωτονίων H2 και H3. Αυτό είναι άλλωστε και αναμενόμενο μιας και το μόριο της καρνιτίνης δεν συνδέεται στο μεταλλικό ιόν, παρά μόνο αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου με την καρνιτίνη. Στα σχήματα που ακολουθούν παρατίθενται τα φάσματα της

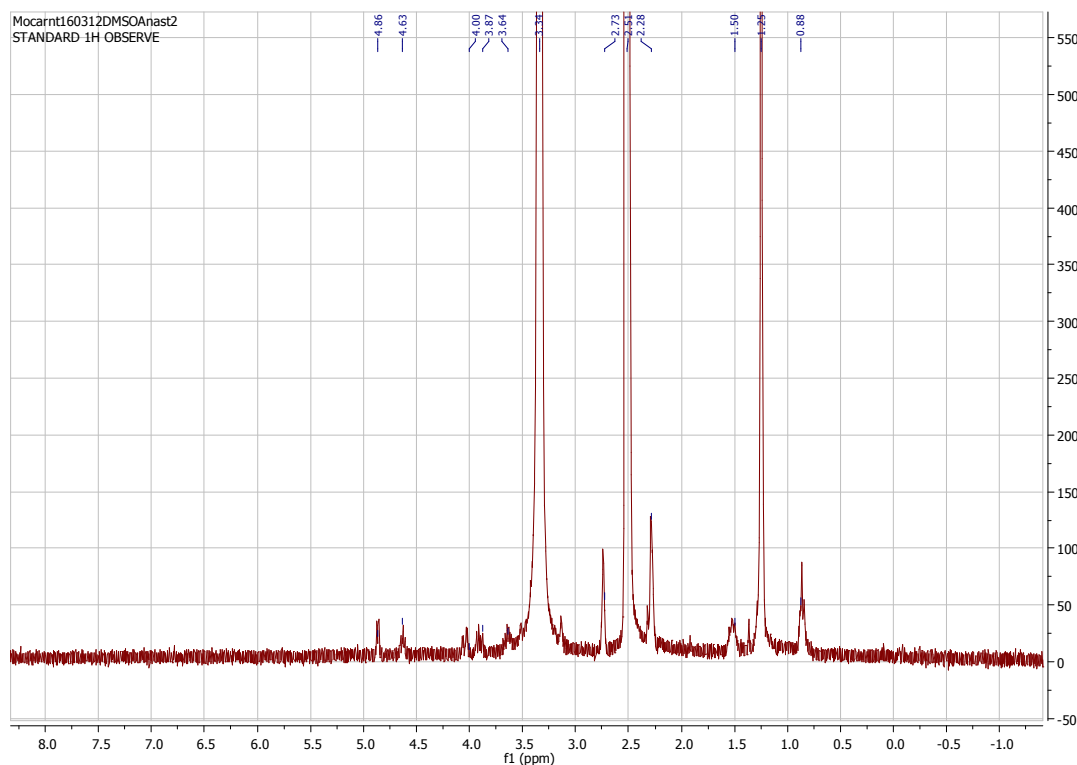
καρνιτίνης, του περόξο συμπλόκου της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο και του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης .



Σχήμα 11.11 H^1 -NMR φάσμα της καρνιτίνης σε δευτεριωμένο D_2O .



Σχήμα 11.12 H^1 -NMR φάσμα του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης σε δευτεριωμένο D_2O .



Σχήμα 11.13 ^1H -NMR φάσμα του περόξο συμπλόκου της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο σε DMSO.

11.3 Προσδιορισμός της δομής του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] (\text{Me}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{COOH})_2 (\text{Na})_4 (\text{H}_2\text{O})_{16}$.

Η ένωση (2) κρυσταλλώνεται στη κεντροσυμμετρική τρικλινή ΟΣΧ P-1 και στην μοναδιαία κυψελίδα βρίσκονται δύο κατιόντα καρνιτίνης, $(\text{Me}_3\text{N}^{(+)}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{COOH})$, τέσσερα κατιόντα νατρίου, ένα δεκαβαναδικό ανιόν, $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$, δεκαέξι μόρια νερού και ένα μόριο μεθανόλης. Το δεκαβαναδικό ανιόν έχει κέντρο συμμετρίας και η δομή του είναι παρόμοια με την δομή “κλουβιού” στην οποία τα δεκαβαναδικά ιόντα διευθετούνται στον χώρο σε τρία στρώματα (εικόνα 11.1). Στο επάνω στρώμα υπάρχουν δύο ιόντα (V^{V}), στο μεσαίο έξι ιόντα (V^{V}), τα οποία είναι διευθετημένα σε δύο παράλληλες και κεντροσυμμετρικές σειρές, που βρίσκονται στις δύο πλευρές του μορίου και η κάθε μια από αυτές περιέχει τρία ιόντα βαναδίου, ενώ στο κάτω τμήμα υπάρχουν δύο ιόντα (V^{V}) τα οποία είναι κεντροσυμμετρικά σε

σχέση με τα αντίστοιχα του πάνω στρώματος. Το κάθε ιον βαναδίου περιβάλλεται από έξι άτομα οξυγόνου τα οποία σχηματίζουν οκτάεδρα και τα δέκα οκτάεδρα VO_6 που απαρτίζουν το μόριο του δεκαβαναδίου μοιράζονται ανα δύο ακμές οκταέδρων και διευθετούνται σε διάταξη που προσομοιάζει αυτής της δομής του NaCl.

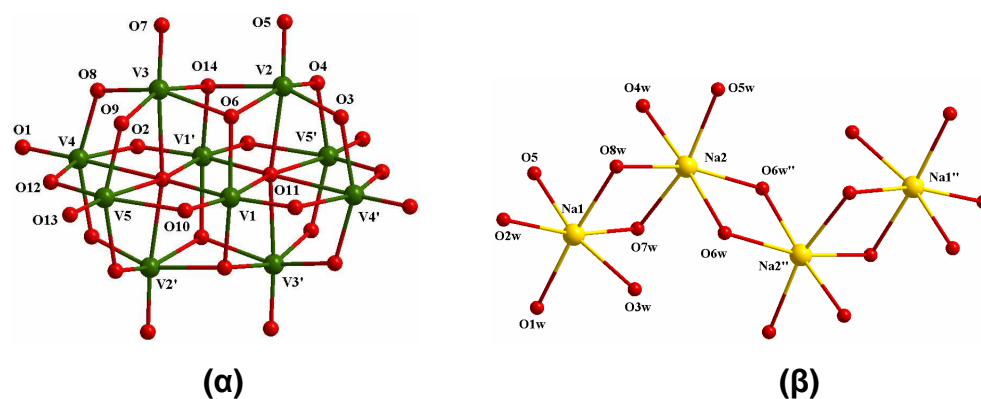
Τα άτομα οξυγόνου χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες σύμφωνα με τον αριθμό ένταξης, τον τύπο του δεσμού με το βανάδιο και την θέση τους σε σχέση με τα στρώματα. Υπάρχουν δυο οξυγόνα σε θέσεις (μ_6-O) γέφυρας στο μεσαίο στρώμα. Καθεμία από αυτές γεφυρώνει τέσσερα ιόντα (V^V) του μεσαίου στρώματος με ένα μεταλλικό ιόν από το επάνω και ένα από το κάτω στρώμα. Τέσσερα σε θέσεις (μ_3-O) γέφυρας, οι δύο από αυτές στο επάνω στρώμα και οι άλλες δυο στο κάτω στρώμα αντίστοιχα, με την καθεμία να γεφυρώνει δύο ιόντα (V^V) από το αντίστοιχο στρώμα (πάνω ή κάτω), με ένα από το μεσαίο στρώμα. Ακόμη υπάρχουν δεκατέσσερα σε θέσεις (μ_2-O) γέφυρας, έξι εκ των οποίων γεφυρώνουν τα ιόντα (V^V) του μεσαίου στρώματος και οκτώ εκ των οποίων συνδέουν κάθε ιόν (V^V) από το επάνω και κάτω τμήμα με ένα από το μεσαίο. Τέλος υπάρχουν οκτώ άτομα οξυγόνου σε τερματικές θέσεις τα οποία συνδέονται στα αντίστοιχα ιόντα (V^V).

Τα δέκα ιόντα (V^V) χωρίζονται σε τρεις ομάδες σύμφωνα με την θέση τους στο στρώμα και το περιβάλλον τους. Υπάρχουν τέσσερα μεταλλικά ιόντα στο πάνω και κάτω στρώμα καθένα εκ των οποίων συνδέεται με μια ($oxo-O$), μια (μ_6-O), δύο (μ_2-O) και δύο (μ_3-O) γέφυρες. Υπάρχουν ακόμη τέσσερα ιόντα (V^V) στον εξωτερικό χώρο του μεσαίου στρώματος καθένα εκ των οποίων συνδέεται σε μια ($oxo-O$), μια (μ_6-O), και τέσσερις (μ_2-O) γέφυρες. Τέλος τα εναπομείναντα δύο ιόντα (V^V) στο κέντρο του μεσαίου στρώματος συνδέονται σε δύο (μ_6-O), δυο (μ_2-O) και δύο (μ_3-O) γέφυρες. Οι αποστάσεις του δεσμού ($V=O$) είναι της τάξης 1.601(3)-1.608(3) Å και οι μέσες τιμές για τις (μ_2-O) γέφυρες είναι 1.855 Å, για τις (μ_3-O) είναι 1.973 Å και για τις (μ_6-O) είναι 2.226 Å (πίνακας 11.2).

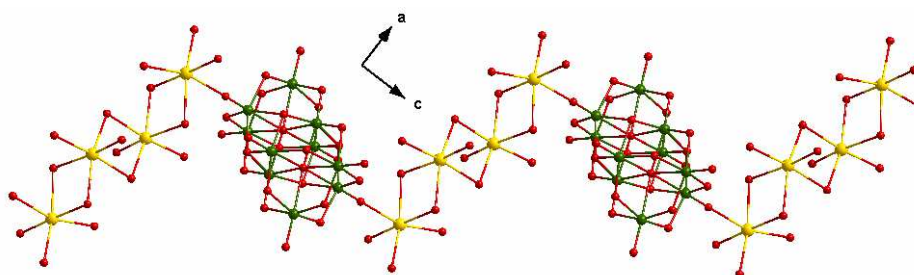
Τα τέσσερα κατιόντα νατρίου συνδέονται με τα δεκαέξι μόρια νερού, σχηματίζοντας τετραπυρρικά κατιόντα $[Na_4(H_2O)_{16}]^{4+}$ (εικόνα 11.1β). Καθένα από τα ιόντα νατρίου συνδέεται με έξι άτομα οξυγόνου, με παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία. Το Na(1) συνδέεται με πέντε νερά και μέσω του έκτου

ατόμου οξυγόνου, το O(5) (ένα οχο-O) συνδέεται στο V(2) του δεκαβαναδικού ανιόντος. Οι αποστάσεις των δεσμών (Na-O) για το Na(2) κυμαίνονται από 2.411(4) έως 2.453(4) Å. Για το Na(2), που συνδέεται με έξι νερά οι αποστάσεις των δεσμών κυμαίνονται από 2.368(4) έως 2.521(4) Å. Τα κεντρικά ιόντα νατρίου, Na(2) και Na(2''), συνδέονται δια μέσου ζευγών (μ -H₂O), O(6w)/O(6w''). Ομοίως κάθε ένα από τα τερματικά ιόντα νατρίου, Na(1) και Na(1''), συνδέεται με το κεντρικό γειτονικό ιόν διαμέσου ζευγών (μ -H₂O), O(7w)/O(8w). Το ολικό τετραπυρινικό κατιόν αποτελείται από τρεις ρομβικές μονάδες {Na₂(μ -H₂O)₂} σε (zig-zag) διευθέτηση. Τα τετραπυρινικά κατιόντα [Na₄(H₂O)₁₆]⁴⁺ συνδέουν τα δεκαβαναδικά ανιόντα [V₁₀O₂₈]⁶⁻, εξαιτίας του δεσμού Na(1)-O(5) που αναφέρθηκε παραπάνω, και σχηματίζουν μονοδιάστατες αλυσίδες που εκτείνονται παράλληλα στην διεύθυνση [1-11] (εικόνα 11.2). Η δομή του πλέγματος της ένωσης βασίζεται σε αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου. Η καρνιτίνη (εικόνα 11.3) και τα μόρια της μεθανόλης είναι μόρια πλέγματος και συνεισφέρουν στην αρχιτεκτονική της δομής, διαμέσου αλληλεπιδράσεων των δεσμών υδρογόνου. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με το τμήμα της δομής που γεφυρώνουν: αλληλεπιδράσεις εντός των αλυσίδων, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων που οδηγούν στο σχηματισμό στρώσεων αλυσίδων, και διαμοριακών αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια της καρνιτίνης και της μεθανόλης και των στρώσεων των (πίνακας 11.3). Στην εικόνα 11.4, απεικονίζεται ένα τμήμα της δομής πλέγματος. Σε αυτή την εικόνα τα άτομα και οι δεσμοί που σχηματίζουν τις αλυσίδες, τα άτομα και οι δεσμοί που σχηματίζουν την καρνιτίνη και τα μόρια μεθανόλης, απεικονίζονται με κόκκινες, μπλε και τρκουάζ συνεχόμενες γραμμές αντίστοιχα. Οι αλληλεπιδράσεις των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται εντός των αλυσίδων δεν παρουσιάζονται σε αυτή την εικόνα. Οι αλληλεπιδράσεις των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων, χωρίζονται περαιτέρω σε δύο άλλες κατηγορίες, τις ενδοστρωματικές και τις διαστρωματικές, το πρώτο είδος (φαίνονται σαν παχιές διακεκομμένες κίτρινες γραμμές στην εικόνα 11.4) συνεισφέρει στο σχηματισμό στρώσεων αλυσίδων παράλληλα στο (110) επίπεδο και το δεύτερο είδος (παχιές διακεκομμένες πορτοκαλί γραμμές στην εικόνα 11.4) συνεισφέρει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στρωμάτων. Η

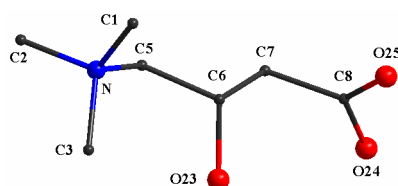
καρνιτίνη και τα μόρια μεθανόλης συνεισφέρουν επίσης στις μεταξύ των στρωμάτων αλληλεπιδράσεις, διαμέσου αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου οι οποίες παρουσιάζονται με παχιές διακεκομμένες μπλε και τικρούάζ γραμμές αντίστοιχα.



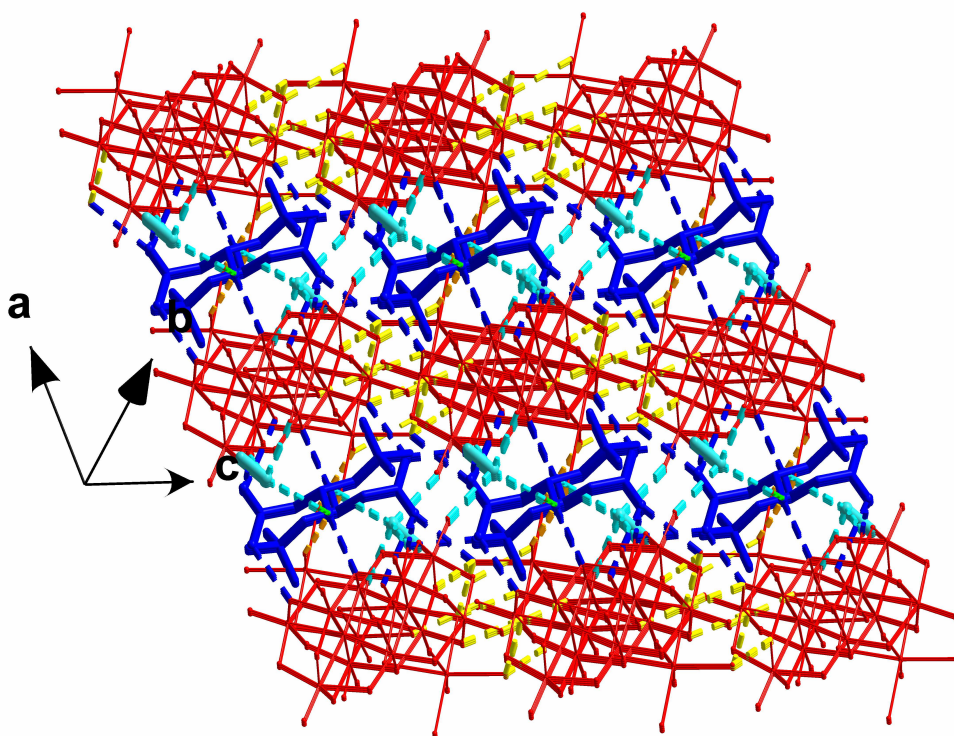
Εικόνα 11.1. Δομή των $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ ανιόντων (α) και των $[Na_4(H_2O)_{16}]^{4+}$ κατιόντων (β).
Διεργασίες συμμετρίας: (') $-x, 2-y, -z$; (") $1-x, 1-y, 1-z$.



Εικόνα 11.2. Ενά μικρό τμήμα της μονοδιάστατης δομής της ένωσης (2).



Εικόνα 11.3. Αριθμημένη δομή του κατιόντος της καρνιτίνης.



Εικόνα 11.4. Τμήμα της τρισδιάστατης δομής της ένωσης (2).

Πίνακας 11.2: Επιλεγμένες αποστάσεις δεσμών (Å) και γωνιών (°) της ένωσης (2).

Αποστάσεις			
V(1)-O(10)	1.684(3)	V(3)-O(6)	1.971(3)
V(1)-O(2')	1.694(3)	V(3)-O(14)	2.004(3)
V(1)-O(14')	1.921(3)	V(3)-O(11')	2.262(3)
V(1)-O(6)	1.945(3)	V(4)-O(1)	1.607(3)
V(1)-O(11')	2.070(3)	V(4)-O(8)	1.815(3)
V(1)-O(11)	2.150(3)	V(4)-O(12)	1.864(3)
V(2)-O(5)	1.601(3)	V(4)-O(3')	1.926(3)
V(2)-O(3)	1.772(3)	V(4)-O(2)	2.004(3)
V(2)-O(4)	1.898(3)	V(4)-O(11')	2.326(3)
V(2)-O(6)	1.972(3)	V(5)-O(13)	1.608(3)
V(2)-O(14)	2.024(3)	V(5)-O(12)	1.811(3)
V(2)-O(11)	2.233(3)	V(5)-O(9)	1.842(3)
V(3)-O(7)	1.603(3)	V(5)-O(4')	1.926(3)

V(3)-O(9)	1.818(3)	V(5)-O(10)	2.065(3)
V(3)-O(8)	1.848(3)	V(5)-O(11')	2.313(3)

Γωνίες

O(10)-V(1)-O(2')	107.2(2)	O(8)-V(3)-O(14)	88.6(1)
O(10)-V(1)-O(14')	98.9(1)	O(6)-V(3)-O(14)	76.9(1)
O(2')-V(1)-O(14')	96.8(1)	O(7)-V(3)-O(11')	175.1(1)
O(10)-V(1)-O(6)	97.0(1)	O(9)-V(3)-O(11')	80.2(1)
O(2')-V(1)-O(6)	95.3(1)	O(8)-V(3)-O(11')	79.9(1)
O(14')-V(1)-O(6)	156.1(1)	O(6)-V(3)-O(11')	76.4(1)
O(10)-V(1)-O(11')	88.1(1)	O(14)-V(3)-O(11')	76.2(1)
O(2')-V(1)-O(11')	164.6(1)	O(1)-V(4)-O(8)	104.1(1)
O(14')-V(1)- O(11')	81.3(1)	O(1)-V(4)-O(12)	102.3(2)
O(6)-V(1)-O(11')	81.7(1)	O(8)-V(4)-O(12)	92.3(1)
O(10)-V(1)-O(11)	166.5(1)	O(1)-V(4)-O(3')	101.2(2)
O(2')-V(1)-O(11)	86.1(1)	O(8)-V(4)-O(3')	154.1(1)
O(14')-V(1)-O(11)	80.7(1)	O(12)-V(4)-O(3')	87.7(1)
O(6)-V(1)-O(11)	79.7(1)	O(1)-V(4)-O(2)	101.6(1)
O(11)-V(1)-O(11')	78.5(1)	O(8)-V(4)-O(2)	86.3(1)
O(5)-V(2)-O(3)	104.8(2)	O(12)-V(4)-O(2)	155.7(1)
O(5)-V(2)-O(4)	100.9(1)	O(3')-V(4)-O(2)	83.3(1)
O(3)-V(2)-O(4)	94.5(1)	O(1)-V(4)-O(11')	175.5(1)
O(5)-V(2)-O(6)	100.7(1)	O(8)-V(4)-O(11')	78.7(1)
O(3)-V(2)-O(6)	91.8(1)	O(12)-V(4)-O(11')	80.9(1)
O(4)-V(2)-O(6)	155.1(1)	O(3')-V(4)-O(11')	75.7(1)
O(5)-V(2)-O(14)	98.7(1)	O(2)-V(4)-O(11')	74.9(1)
O(3)-V(2)-O(14)	155.4(1)	O(13)-V(5)-O(12)	103.6(2)
O(4)-V(2)-O(14)	88.1(1)	O(13)-V(5)-O(9)	103.8(1)
O(6)-V(2)-O(14)	76.4(1)	O(12)-V(5)-O(9)	93.2(1)
O(5)-V(2)-O(11)	173.8(1)	O(13)-V(5)-O(4')	99.4(1)
O(3)-V(2)-O(11)	81.1(1)	O(12)-V(5)-O(4')	91.2(1)
O(4)-V(2)-O(11)	80.1(1)	O(9)-V(5)-O(4')	154.6(1)
O(6)-V(2)-O(11)	77.1(1)	O(13)-V(5)-O(10)	100.5(1)

O(14)-V(2)-O(11)	75.2(1)	O(12)-V(5)-O(10)	155.8(1)
O(7)-V(3)-O(9)	103.5(1)	O(9)-V(5)-O(10)	83.7(1)
O(7)-V(3)-O(8)	102.9(1)	O(4')-V(5)-O(10)	82.1(1)
O(9)-V(3)-O(8)	93.3(1)	O(13)-V(5)-O(11')	173.5(1)
O(7)-V(3)-O(6)	100.2(1)	O(12)-V(5)-O(11')	82.4(1)
O(9)-V(3)-O(6)	91.8(1)	O(9)-V(5)-O(11')	78.3(1)
O(8)-V(3)-O(6)	154.5(1)	O(4')-V(5)-O(11')	77.5(1)
O(7)-V(3)-O(14)	99.7(1)	O(10)-V(5)-O(11')	73.4(1)
O(9)-V(3)-O(14)	155.7(1)		

Διεργασίες συμμετρίας: (') $-x, 2-y, -z$.

Πίνακας 11.3: Δεσμοί υδρογόνου ένωσης (2).

Αλληλεπίδραση	D \cdots A (Å)	H \cdots A (Å)	D-H \cdots A ($^{\circ}$)	Διεργασίες Συμμετρίας
Αλληλεπιδράσεις εντός των αλυσίδων				
O(6w)-H(6wB) \cdots O(3w)	2.808	1.902	157.3	x, y, z
O(4w)-H(4wA) \cdots O(6)	2.871	1.676	157.3	x, y, z
O(7w)-H(7wA) \cdots O(7)	2.927	2.009	160.0	x, y, z
Ενδοστρωματικές(μεταξύ των αλυσίδων)				
O(2w)-H(2wA) \cdots O(3)	2.731	1.636	162.2	-x, 2-y, 1-z
O(3w)-H(3wB) \cdots O(12)	2.799	1.729	163.4	x, y, 1+z
O(6w)-H(6wA) \cdots O(13)	2.957	1.954	177.9	x, y, 1+z
O(8w)-H(8wA) \cdots O(4)	2.992	1.949	164.0	-x, 2-y, 1-z
O(8w)-H(8wB) \cdots O(2w)	2.901	1.969	160.1	-x, 2-y, 1-z
Διαστρωματικές (μεταξύ των αλυσίδων)				
O(3w)-H(3wA) \cdots O(1w)	2.827	1.982	150.4	-x, 1-y, 1-z
Διαστρωματικές (καρνιτίνης -αλυσίδων)				
O(24)-H(24o) \cdots O(4)	2.542	1.469	152.7	x, y, z
O(1w)-H(1wA) \cdots O(23)	2.747	1.999	150.3	x, y, z

O(5w)-H(5wA)···O(24)	2.769	1.664	174.7	-x, 2-y, 1-z
O(5w)-H(5wB)···O(25)	2.831	1.961	155.4	1+x, y, z
O(4w)-H(4wB)···O(25)	2.966	2.004	171.3	1+x, y, z
O(2w)···O(25)	2.944			-1-x, 2-y, 1-z
<hr/>				
Διαστρωματικές (Μεθανόλης-αλυσίδων)				
O(1w)-H(1wB)···O(1m)	2.652	2.141	121.7	-x, 1-y, 1-z
O(5w)···O(1m)	2.570			1-x, 1-y, 1-z
O(7w)···O(1m)	2.847			x, y, z
O(1m)···O(1)	2.855			-x, 1-y, -z

11.4 Αντικαρκινική δράση του περόξο συμπλόκου του μολυβδαινίου με την καρνιτίνη (1) και του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης [V₁₀O₂₈] (Me₃N-CH₂-CH (OH)-CH₂-COOH)₂ (Na)₄ (H₂O)₁₆ (2).

Σύμφωνα με τα παρακάτω αποτελέσματα της κυτταροτοξικής ανάλυσης, το περόξο σύμπλοκο του μολυβδαινίου με καρνιτίνη [Mo₂O₄(OH)₂(O₂)(Me₃N-CH₂-CH (OH)-CH₂-COO-)], βρέθηκε μη τοξικό σε όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αυτό, ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε ότι ακόμη και σε συγκέντρωση (200 μM) του συμπλόκου (1), το 35% των κυττάρων παραμένει ζωντανό και μεταβολικά ενεργό.

Επειδή ήταν δύσκολο να υπολογίσουμε με ακρίβεια τις καμπύλες IC₅₀ λόγω της χαμηλής τοξικότητας, επιλέξαμε να παρουσιάσουμε την μέση τιμή επιβίωσης τριων ανεξάρτητων πειραμάτων χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1.5, 10, 50, 100, 200 και 500 μM) (πίνακας 11.4). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι το σύμπλοκο (1) εκτός της χαμηλής τοξικότητας δεν επιδεικνύει και εξειδίκευση στις παρακάτω κυτταρικές σειρές.

Πίνακας 11.4: Μέση τιμή επιβίωσης (%) και τυπική απόκλιση της ένωσης (1) σε διαφορες καρκινικές σειρές και πρωταρχικά κύτταρα

Compound 2						
C(μM)	Survival (%)					
	Mouse embryonic fibroblasts	Mouse breast cell line	Mouse melanoma cell line	Human lung cancer cell line	Human breast cancer cell line	Human primary skin fibroblasts
0	99.23 ± 1.24	99.01 ± 0.95	99.96 ± 0.05	99.29 ± 1.13	98.67 ± 1.88	99.7 ± 0.41
0.5	82.99 ± 1.23	91.31 ± 1.12	94.48 ± 0.92	75.31 ± 1.48	73.56 ± 2.27	88.11 ± 1.04
1	78.86 ± 0.7	87.02 ± 1.19	78.11 ± 1.24	63.38 ± 1.44	60.86 ± 1.48	63.03 ± 1.77
5	65.89 ± 1.18	80.7 ± 0.57	64.4 ± 1.04	50.65 ± 2.65	57.79 ± 0.46	58.46 ± 1.29
10	59.04 ± 0.63	77.31 ± 0.34	45.35 ± 0.89	46.5 ± 1.65	54.25 ± 0.86	56.18 ± 1.4
50	54.56 ± 0.54	68.71 ± 0.69	40.97 ± 1.64	41.53 ± 0.86	50.83 ± 0.91	42.03 ± 0.76
100	49.79 ± 0.82	63.38 ± 0.89	32.99 ± 1.44	37.01 ± 1.51	45.51 ± 0.59	40.58 ± 1.3
200	36.34 ± 1.31	59.50 ± 1.93	24.14 ± 0.58	31.08 ± 1.48	37.63 ± 0.93	36.37 ± 0.35
500	30.56 ± 1.52	30.23 ± 1.48	17.52 ± 2.254	25.053 ± 1.39	25.35 ± 1.28	21.55 ± 1.44

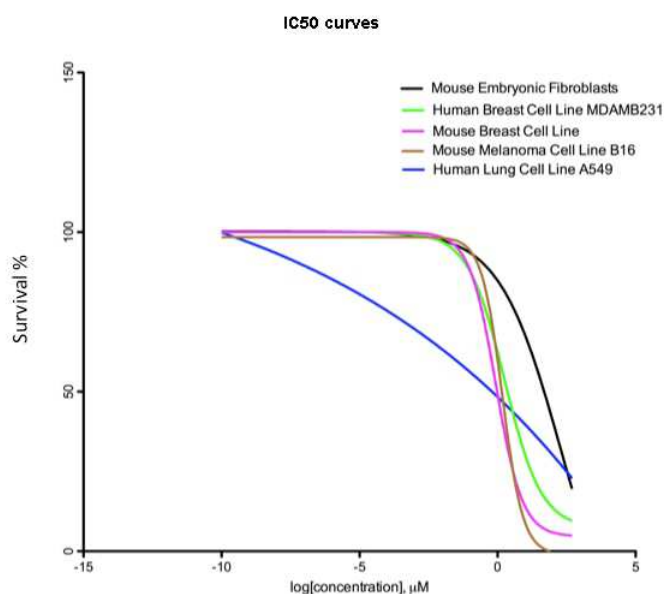
Σε αντίθεση τώρα με το περόξο σύμπλοκο της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο (1), το δεκαβαναδικό άλας της καρνιτίνης, $[V_{10}O_{28}] (Me_3N-CH_2-CH(OH)-CH_2-COOH)_2 (Na)_4 (H_2O)_{16}$ (2) παρουσίασε ένα τελείως διαφορετικό προφίλ. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 11.5, η μέση τιμή επιβίωσης έδειξε ξεκάθαρη σχέση μεταξύ τοξικότητας και δόσης.

Πίνακας 11.5: Μέση τιμή επιβίωσης (%) και τυπική απόκλιση της ένωσης (2) σε διαφορες καρκινικές σειρές και πρωταρχικά κύτταρα

Compound 1						
C(μM)	Survival (%)					
	Mouse embryonic fibroblasts	Mouse breast cell line	Mouse melanoma cell line	Human lung cancer cell line	Human breast cancer cell line	Human primary skin fibroblasts
0	99.99 ± 0.01	99.63 ± 0.63	99.26 ± 0.39	99.89 ± 0.11	99.98 ± 0.02	99.67 ± 0.58
0.5	90.0 ± 0.43	66.74 ± 0.49	72.58 ± 0.57	54.42 ± 0.19	75.45 ± 0.12	97.33 ± 0.47
1	83.10 ± 0.49	46.25 ± 0.23	63.39 ± 3.91	43.72 ± 0.62	55.71 ± 0.23	95.24 ± 0.98
5	76.82 ± 0.23	19.78 ± 0.28	19.99 ± 0.67	41.47 ± 0.53	50.28 ± 0.67	88.75 ± 0.17
10	61.85 ± 0.45	15.40 ± 0.51	4.63 ± 1.09	39.26 ± 0.36	20.99 ± 0.01	57.35 ± 0.49
50	57.97 ± 0.28	10.76 ± 0.38	0.82 ± 0.36	32.94 ± 0.5	16.04 ± 0.13	52.03 ± 0.16
100	33.87 ± 0.23	8.48 ± 0.4	0.31 ± 0.02	32.12 ± 0.63	14.50 ± 0.47	47.33 ± 0.31
200	32.90 ± 1.21	4.04 ± 0.15	0.12 ± 0.03	30.71 ± 0.87	12.38 ± 0.61	36.23 ± 1.18
500	19.74 ± 0.78	0.10 ± 0.001	0.005 ± 0.001	19.28 ± 1.11	9.36 ± 0.96	24.45 ± 0.90

Έτσι λοιπόν για πρώτη φορά υπολογίσθηκαν οι καμπύλες του IC₅₀, και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το δεκαβαναδικό άλας της καρνιτίνης επιδεικνύει όχι μόνο εξαρτώμενη από την συγκέντρωση τοξικότητα, αλλά επιπλέον παρουσιάζει εξειδίκευση έναντι συγκεκριμένων καρκινικών σειρών. Όπως φαίνεται στο (σχήμα 11.14), η τιμή του IC₅₀ για τα υγιή κύτταρα ήταν 187.30 μM ενώ η αντίστοιχη τιμή IC₅₀ για τις υπόλοιπες καρκινικές σειρές ήταν σημαντικά χαμηλότερες. Πιο συγκεκριμένα, τα IC₅₀s ήταν 0.72, 1.798, 0.8614, και 1.485μM για την κυτταρική σειρά αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα, για το ανθρώπινο αδenoκαρκίνωμα μαστού, για το αδenoκαρκίνωμα του μαστού

ποντικού και για το μελάνωμα ποντικού, αντιστοίχως. Οι $p=0.09$, 0.03 , 0.05 , και 0.04 για τον καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού, μελάνωμα και την καρκινική σειρά μαστού σε ποντίκια.

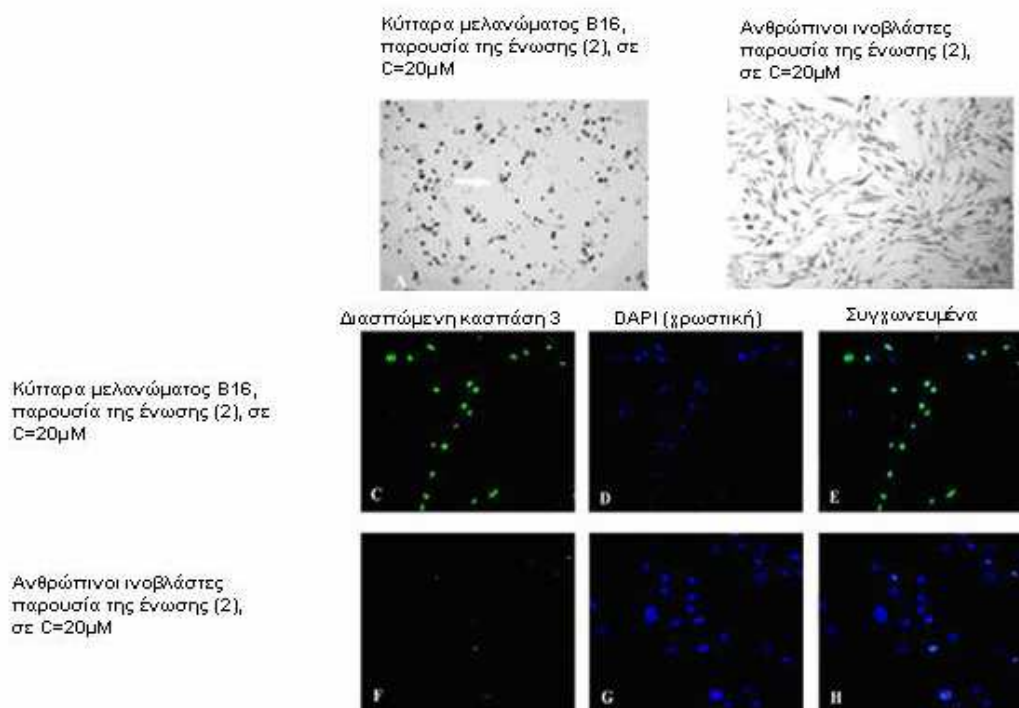


Σχήμα 11.14: Στο σχήμα απεικονίζεται η % επιβίωση ποικίλων καρκινικών σειρών συναρτήσει της συγκέντρωσης του δεκαβαναδικού άλατος, $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] (\text{Me}_3\text{N-CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{-COOH})_2 (\text{Na})_4 (\text{H}_2\text{O})_{16}$ σαν IC_{50} καμπύλη.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα και προκειμένου να εκτιμήσουμε περαιτέρω την εξειδικευμένη τοξικότητα της ένωσης (2), καλλιεργήσαμε κύτταρα του μελανώματος ως θετικό σημείο αναφοράς και ανθρώπινους ινοβλάστες ως αρνητικό σημείο αναφοράς, παρουσία της ένωσης (2) σε συγκέντρωση $20\mu\text{M}$ για 48 ώρες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 11.5 α) και β) η ένωση (2) επιδρά στα κύτταρα του μελανώματος τα οποία καθίστανται αποπτωτικά πολύ γρήγορα. Εν αντιθέση οι ανθρώπινοι ινοβλάστες είναι ανεκτικοί στην ασκούμενη τοξικότητα.

Περαιτέρω, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκυτταροχημείας προκειμένου να προσδιοριστεί η διάσπαση της κασπάσης 3, ενός μοριακού δείκτη επαγόμενης απόπτωσης. Όπως βλέπουμε στην (εικόνα 11.5), η χρωματισμένη διασπώμενη κασπάση είναι άφθονη στα κύτταρα μελανώματος και σχεδόν ανύπαρκτη στους ανθρώπινους ινοβλάστες. Και τα δύο πειράματα

έδειξαν πως η ένωση (2) επιδεικνύει εξειδικευμένη αντικαρκινική δράση, η οποία πυροδοτεί απόπτωση, με την διάσπαση της κασπάσης 3.

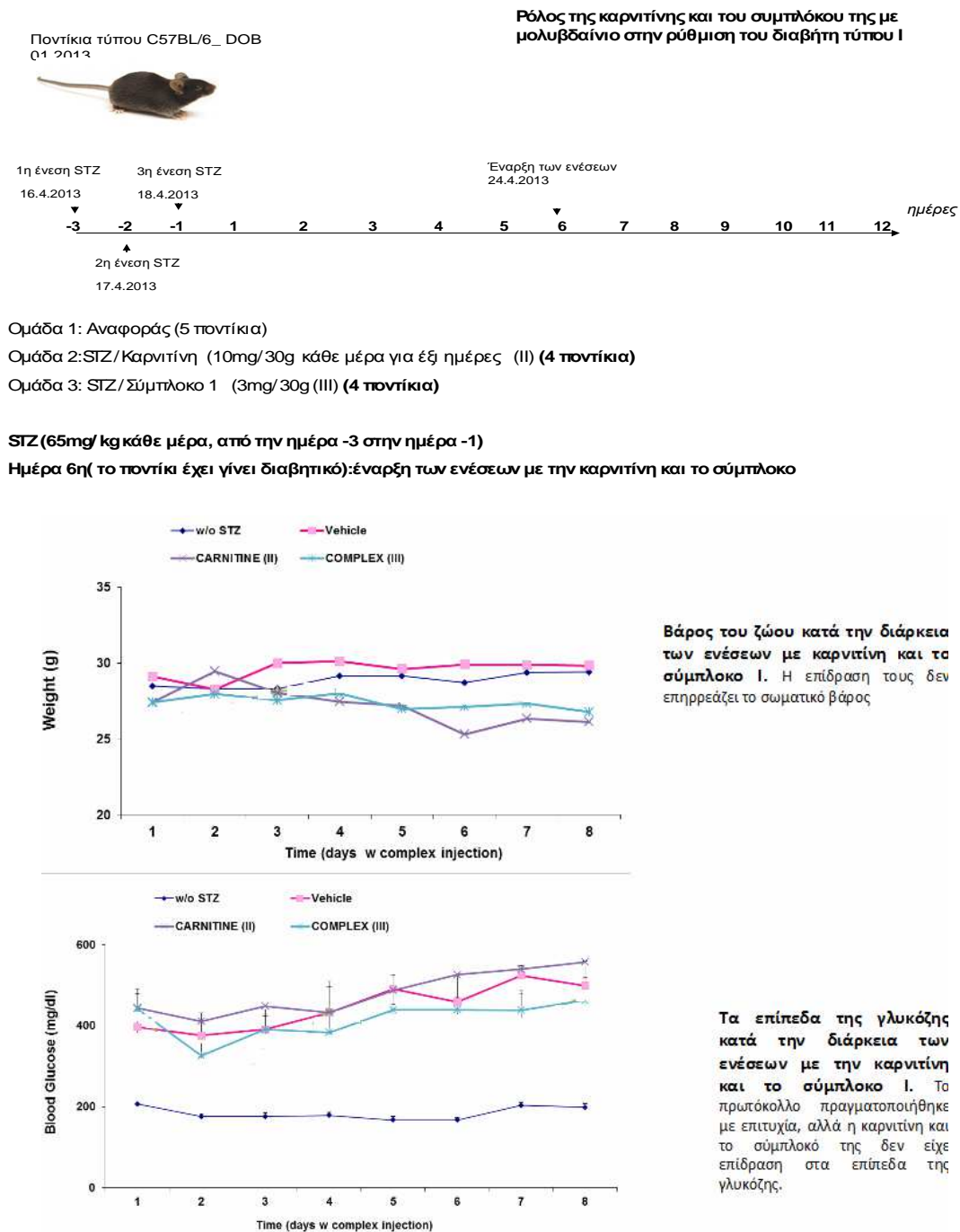


Εικόνα 11.5 Κύτταρα μελανώματος (α) και ανθρώπινοι ινοβλάστες (β) οι οποίοι καλλιεργήθηκαν παρουσία του συμπλόκου του βαναδίου. Το βέλος στο (α) δείχνει αποπτωτικά κύτταρα τα οποία βρισκόταν σε αφθονία έπειτα από την κατεργασία τους με τη ένωση (2) για 48 ώρες. Επιπλέον στην (γ) η αφθονία της διάσπασης της κασπάσης (caspase) 3 σε σύγκριση με την εικόνα (ζ) όπου είναι σπάνια (κατεργασία με ανθρώπινους ινοβλάστες) δείχνει ότι η ένωση παρουσιάζει συγκεκριμένη τοξικότητα. Στις εικόνες (δ) και (η) βρίσκονται οι πυρήνες κυττάρων που χρωματίστηκαν με (DAPI) ενώ στις εικόνες (ε) και (θ) φαίνονται τα συγχωνευμένα κανάλια.

11.5 Μελέτη της αντιδιαβητικής δράσης της καρνιτίνης

Προκειμένου να μελετηθεί η αντιδιαβητική δράση τόσο της καρνιτίνης όσο και των συμπλόκων αυτής, χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια τύπου C57BL/6 τα οποία παρέμειναν σε εργαστηριακά κλουβιά, θερμοκρασίας 25°C, για ένα χρονικό διάστημα 12 ημερών. Τα ποντίκια, μέσου βάρους 25-26 g τα καταστήσαμε διαβητικά με ενδοπεριτονιακές ένεσεις στρεπτοζωτοκίνης των 65 mg/kg, που έγιναν για τρεις συνεχόμενες ημέρες. Έπειτα από ένα διάστημα έξι ημερών και εφόσον πλέον τα ποντίκια ήταν διαβητικά, ξεκίνησαν οι ενέσεις τόσο της καρνιτίνης όσο και του περόξο μολυβδαινικού συμπλόκου

της για ένα διάστημα έξι ημερών, στις συγκεντώσεις του σχήματος (σχήμα 11.15). Ενώ σε μια άλλη ομάδα, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς δεν πραγματοποιήθηκε ένεση με την καρνιτίνη και το σύμπλοκο της. Κάθε βράδυ λαμβάνοταν αίμα από την ουρά των ποντικών και τα δείγματα μετρήθηκαν με ένα χειροκίνητο μετρητή γλυκόζης, (ACCU-CHEK AVIVA). Με βάση τις τιμές αυτές δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα του σχήματος 11.15.



Σχήμα 11.15: Αποτελέσματα αντιδιαβητικής δράσης της καρνιτίνης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ενώ το πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, γεγονός το οποίο φαίνεται από το ότι τα ποντίκια αναφοράς στα οποία είχε γίνει μόνο ένεση στρεπτοζωτοκίνης καθίσταντο διαβητικά, C=200mg/dl (μπλέ γραμμή σχήματος 11.15), τόσο η καρνιτίνη όσο και το περόξο μολυβδαινικό σύμπλοκό της δεν παρουσίασαν αντιδιαβητική δράση C=200mg/dl στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις.

Επιπρόσθετα καθόλη την διάρκεια των πειραμάτων, πραγματοποιούταν ζύγιση των ποντικιών. Όπως βλέπουμε από το διάγραμμα του βάρους τους συναρτήσει των ημερών, δεν παρατηρείται καμία επίδραση στο σωματικό βάρος των ποντικιών.

11.6 Συμπεράσματα

Σε αυτή την ενότητα μελετήθηκε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η βιολογική δράση δύο ενώσεων της καρνιτίνης: ενός περόξο μολυβδαινικού συμπλόκου της καρνιτίνης (1) και του δεκαβαναδικού άλατος της καρνιτίνης (2). Βάση της φασματοσκοπικής μελέτης που πραγματοποιήθηκε για τα σύμπλοκα αυτά, στο σύμπλοκο (1) η καρνιτίνη συμπλέκεται στο μεταλλικό κέντρο γεφυρωτικά από το καρβοξύλιο ενώ τα δύο άτομα μολυβδαινίου ενώνονται επίσης μέσω περόξο γέφυρας. Ενώ όσον αφορά το δεκαβαναδικό άλας της καρνιτίνης, η καρνιτίνη δεν συνδέεται άμεσα με το δεκαβαναδικό αλλά αλληλεπιδρά με το δεκαβαναδικό ιόν μέσω δεσμών υδρογόνου, όπως δείχνει και η κρυσταλλογραφική ανάλυση.

Επιπρόσθετα μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση των ενώσεων αυτών έναντι τεσσάρων καρκινικών σειρών και διαπιστώθηκε ότι το δεκαβαναδικό άλας της καρνιτίνης παρουσιάζει εξειδικευμένη κυτταροτοξικότητα σε αντίθεση με το περόξο μολυβδαινικό σύμπλοκο της καρνιτίνης το οποίο δεν είναι καθόλου τοξικό.

Τέλος, μελετήθηκε η αντιδιαβητική δράση του μη τοξικού περόξο συμπλόκου της καρνιτίνης με μολυβδαίνιο έναντι ποντικών τύπου (C57BL/6) τα οποία εμφανίζουν διαβήτη τύπου I έπειτα από ενδοπεριτονιακές ενώσεις στρεπτοζωτοκίνης των 65mg/Kg. Παρατηρήθηκε πως στις συγκεντρώσεις του σχήματος 11.15 τόσο η καρνιτίνη όσο και το σύμπλοκο (2) δεν παρουσίασαν αντιδιαβητική δράση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕ ΜΑΛΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

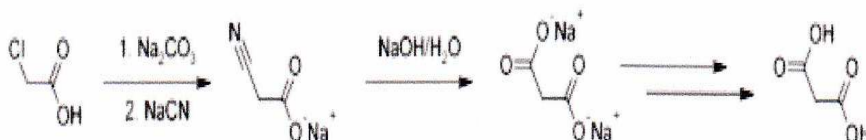
12.1 Μαλονικό οξύ-Εισαγωγή

Το μαλονικό οξύ είναι ένα δικαρβοξυλικό οξύ με μοριακό τύπο $\text{CH}_2(\text{COOH})_2$. Η ιοντισμένη μορφή του μαλονικού οξέος, όπως επίσης οι ιοντισμένοι εστέρες και τα άλατα του, είναι γνωστοί σαν μηλονικά. Το όνομα προέρχεται από την ελληνική λέξη “μήλον” που σημαίνει μήλο.

Το άλας του μαλονικού οξέος εμφανίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στις ρίζες των τεύτλων. Υπάρχει στην φυσική του κατάσταση με την μορφή λευκών κρυστάλλων. Το μαλονικό οξύ είναι το κλασσικό παράδειγμα ανταγωνιστικού αναστολέα. Ενεργεί έναντι της ηλεκτρικής δεϋδρογόνωσης, στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο αναπνευστικό σύστημα.

Η παραγωγή του μαλονικού οξέος ξεκινά από το χλωροξικό οξύ (chloroacetic acid). Σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση (σχήμα 12.1) το ανθρακικό άλας του νατρίου δημιουργεί το αντίστοιχο άλας του, το οποίο αντιδρά με το κυανίδιο του νατρίου και παράγει το άλας του κυανοοξικού οξέος δια μέσου μιας νουκλεόφιλης υποκατάστασης. Εν συνεχεία η ομάδα νιτριλίου μπορεί να υδρολυθεί με υδροξείδιο του νατρίου στο μαλονικό νάτριο και έπειτα από οξίνιση δημιουργείται το μαλονικό [117].

Σχήμα 12.1: Η αντίδραση σύνθεσης του μαλονικού οξέος [76 117].



12.2 Μαλονικό οξύ, σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα και βιολογική δράση τους.

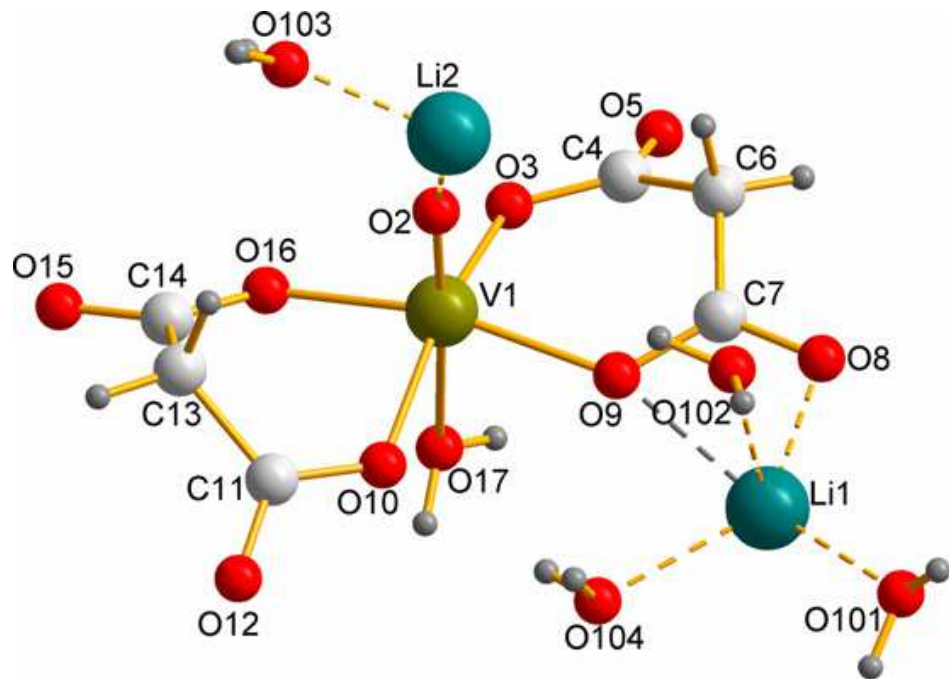
Τις τελευταίες δεκαετίες, το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει στραφεί στα μικτά σύμπλοκα των διβασικών οξέων και των αμινών τους, θεωρώντας την πλειονότητα αυτών ως βιολογικά μόρια. Οι συντιθέμενες χημικές ενώσεις χρησιμοποιούνται στην θεραπεία μολυσματικών ασθενειών, καθώς επίσης και ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Κάθε χρόνο χιλιάδες ενώσεις συντίθενται προκειμένου να βρεθεί η χημειοθεραπευτική δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Εν προκειμένω, οι ετεροκυκλικές βάσεις παρουσιάζουν τεράστιο βιολογικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Είναι γνωστό ότι οι περισσότερες από αυτές, χρησιμοποιούνται σαν αναστολείς και τα σύμπλοκά τους με λευκόχρυσο και χαλκό δοκιμάζονται για τις αντικαρκινικές και αντιβακτηριακές τους ιδιότητες. Έτσι λοιπόν, μικτά σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων που περιέχουν διβασικά οξέα όπως το μαλονικό οξύ, το μαλεϊκό και το φθαλικό, με ετεροκυκλικές βάσεις αναφέρονται στην βιβλιογραφία για τις αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές τους ιδιότητες [118].

Επιπρόσθετα, σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι τα σύμπλοκα $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{mal})]2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Mn}(\text{phen})_2(\text{mal})]2\text{H}_2\text{O}$ και $[\text{Ag}_2(\text{phen})_3(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, όπου mal=το μαλονικό οξύ, αναστέλλουν την ανάπτυξη του μύκητα του γένους (*Candida albicans*) γύρω στο 95% σε μια συγκέντρωση 1.25-5.0 μg/ml. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι τα παραπάνω σύμπλοκα προξένησαν εκτεταμένες αλλαγές στην εσωτερική δομή των κυττάρων, περιλαμβάνοντας τη συστολή του κυτταροπλάσματος, τον κατακερματισμό του πυρήνα και διαταραχή των μιτοχονδρίων. Βάση μηχανιστικών μελετών απεδείχθη ότι τα σύμπλοκα αυτά επηρεάζουν την λειτουργία των μιτοχονδρίων, καθυστερούν την σύνθεση των κυτοχρωμάτων b και c και εμποδίζουν την κυτταρική αναπνοή [119].

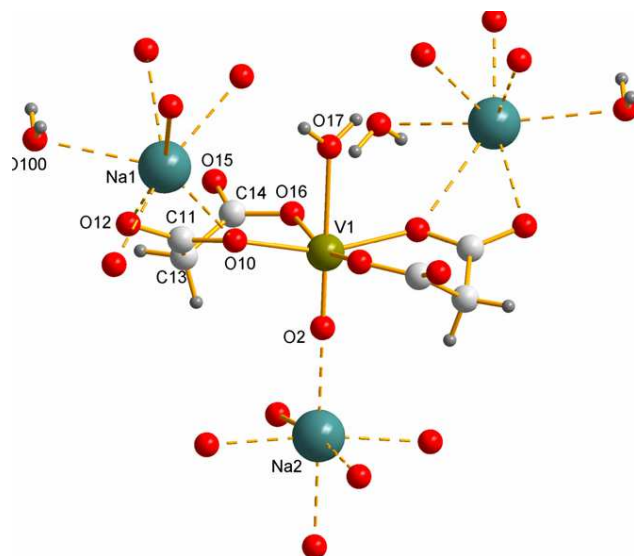
Παράγωγα του μαλονικού οξέος όπως είναι η διυδραζίνη του μαλονικού οξέος και τα σύμπλοκά της έδειξαν βιολογικές δραστηριότητες. Πιο συγκεκριμένα, επέδειξαν καλύτερη κυτταροτοξική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών HeLa (ανθρώπινα κύτταρα του καρκίνου της μήτρας) και B16 (μελανώματος ποντικίου). Για παράδειγμα το επταϋποκατεστημένο διπυρηνικό σύμπλοκο του καδμίου επέδειξε πολύ καλή κυτταροτοξική δράση,

στην μικρογραμμομοριακή ακόμα περιοχή. Η δράση αυτή ήταν συνέπεια της ισχυρής σύνδεσης του με το DNA [120]. Μόλις το 1990, οι Hiromu Sakurai, Yoshitane Kojima κ.α πρότειναν ότι τα σύμπλοκα δισ(μεθυλκυστεϊνινο)[VO(cysm)₂]⁻, δισ(οξαλάτο) [VO(ox)₂]⁻, δισ (μαλονάτο) [VO(mal)₂]⁻, δισ (σαλικυλαλδευδη) [VO(sal)₂]⁻ και δισ (κιτράτο) [VO(tar)₂]⁻ που πρόκειται για οξοβαναδικά σύμπλοκα με τρόπο ένταξης VO(S₂N₂) και VO(O₄), επέδειξαν υπογλυκαιμική επίδραση σε διαβητικά ποντίκια με διαβήτη τύπου 1 και μάλιστα η σειρά της δράσης ήταν η ακόλουθη. VO(mal)₂>VO(cysm)₂>VO(tar)₂>VO(sal)₂> VO(ox)₂ [121].

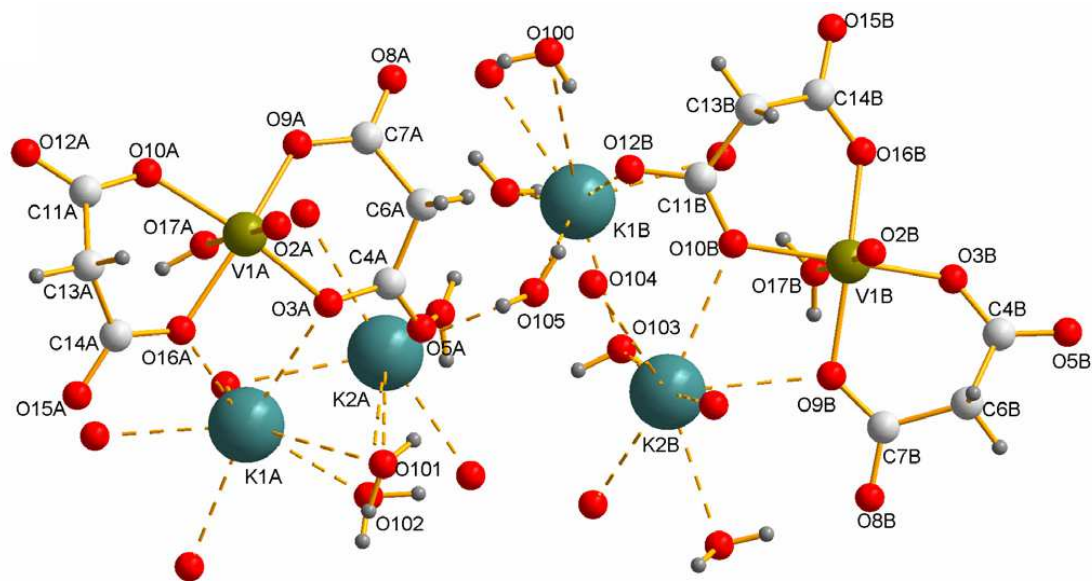
Ένα ακόμη κρίσιμο βήμα στην σύνθεση ενώσεων του βαναδίου για την θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη, ήταν η τροποποίηση έπειτα από σύμπλεξη με κατάλληλο οργανικό υποκαταστάτη, ο οποίος μπορούσε να βελτιώσει την βιοδιαθεσιμότητα και ανεκτικότητα των απλών οργανικών ενώσεων των συμπλόκων του βαναδίου στους διαβητικούς ασθενείς. Μέχρι και σήμερα το πιο αποτελεσματικό αντιδιαβητικό με βανάδιο φάρμακο είναι το bis-maltolatooxivanadium (IV) σύμπλοκο. Τα ευρήματα αυτά τόνισαν την σημαντικότητα του οξυγόνου-δότη και παράλληλα ώθησαν την επιστημονική κοινότητα να μελετήσει τα οξοβαναδικά συμπλόκα του μαλονικού οξέος. Έτσι συντέθηκαν σύμπλοκα του τύπου [M₂(H₂O)_n][VO(mal)₂(H₂O)_n], τα οποία μελετήθηκαν (in vivo) σε διαβητικά ποντίκια τα οποία ανέπτυξαν διαβήτη με ένεση στρεπτοζωτοκίνης. Η κρυσταλλογραφική δομή των συμπλόκων αυτών καθώς και τα αποτελέσματα της δράσης τους παρατίθενται στις (εικόνα 12.1, 12.2, 12.3) και (σχήμα 12.2) αντίστοιχα.



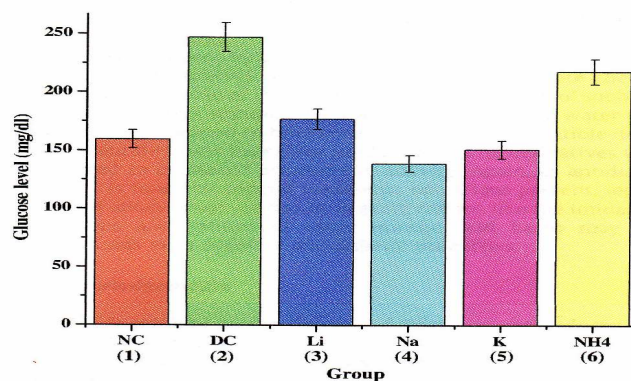
Εικόνα 12.1: Το σύμπλοκο [Li₂(H₂O)_{3.5}][VO(mal)₂(H₂O)].



Εικόνα 12.2: Το σύμπλοκο [Na₂(H₂O)][VO(mal)₂(H₂O)].



Εικόνα 12.3: Το σύμπλοκο $[K_2(H_2O)_3][VO(mal)_2(H_2O)]$.



Σχήμα 12.2: Αποτελέσματα της αντιδιαβητικής δράσης των συμπλόκων (1, 2 και 3).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι ξεκάθαρο ότι τα σύμπλοκα (1, 2 και 3) παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης σε διαβητικά ποντίκια στα οποία προκλήθηκε διαβήτης έπειτα από ένεση με στρεπτοζωτοκίνη. Η σειρά σύμφωνα με την οποία ελαττώνεται η γλυκόζη είναι η ακόλουθη: $[Na_2(H_2O)][VO(mal)_2(H_2O)] > [K_2(H_2O)_3][VO(mal)_2(H_2O)] > [Li_2(H_2O)_{3.5}][VO(mal)_2(H_2O)]$ [122].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΑΛΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΜΟΛΥΒΔΑΙΝΙΟ ΠΑΡΟΥΣΙΑ H_2O_2

13.1 Σύνθεση

13.1.1 Σύνθεση του περόξο-συμπλόκου $(gu)_4[Mo_4O_{12}(O_2)_2]$ (1)

Διαλύονται (0.4 g ή 4.2 mmol) μεταλλικού μολυβδαινίου σε 16 ml H_2O και 9 ml H_2O_2 και το μίγμα αναδεύεται έως ότου μετατραπεί σε κίτρινο διαυγές διάλυμα. Εν συνεχεία προστίθενται (0.825 g ή 8.0 mmol) μαλονικού οξέος. Το διάλυμα παραμένει μια νύχτα στο ψυγείο και την επόμενη ημέρα προστίθενται (0.901 g ή 5.0 mmol) ανθρακικής γουανιδίνης. Έπειτα από προσθήκη εξανίου (layering) και αργή εξάτμιση σε θερμοκρασία δωματίου, απομονώθηκαν κίτρινοι κρύσταλλοι μετά από περίπου μια εβδομάδα, κατάλληλοι για ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. **Στοιχειακή ανάλυση: $Mo_4O_{14}H_{24}N_{12}C_4$. (M.B=884.001) Θεωρητική: C: 9.51 H: 2.73 N: 19.01 Πειραματική: C: 9.48, H: 2.81, N: 19.15**

13.1.2 Σύνθεση του περόξο-συμπλόκου του μολυβδαινίου με οξαλικό ανιόν που προέκυψε από την αντίδραση μαλονικού οξέος-ανθρακική γουανιδίνης παρουσία H_2O_2 (2)

Διαλύονται (0.4 g ή 4.2 mmol) μεταλλικού μολυβδαινίου σε 16 ml H_2O και 9 ml H_2O_2 και το μίγμα αναδεύεται έως ότου μετατραπεί σε κίτρινο διαυγές διάλυμα. Εν συνεχεία προστίθενται (0.825 g ή 8.0 mmol) μαλονικού οξέος. Το διάλυμα παραμένει μια νύχτα στο ψυγείο και την επόμενη ημέρα προστίθενται (0.901 g ή 4.0 mmol) ανθρακικής γουανιδίνης. Ένα κίτρινο άμορφο προϊόν λαμβάνεται αμέσως, το οποίο εκπλύνεται με απεσταγμένο νερό. **Στοιχειακή ανάλυση: $Mo_2O_{11}H_7N_3C_3$. (M.B=420.928) Θεωρητική: C: 7.96 H: 1.56 N:9.28 Πειραματική: C: 8.11, H: 1.66, N: 9.08**

13.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

Μελετήθηκε η αντίδραση του μαλονικού οξέος σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία H_2O_2 με στόχο τον σχηματισμό περόξο συμπλόκων με μαλονικό, για να μελετηθεί η αντικαρκινική και αντιδιαβητική τους δράση.

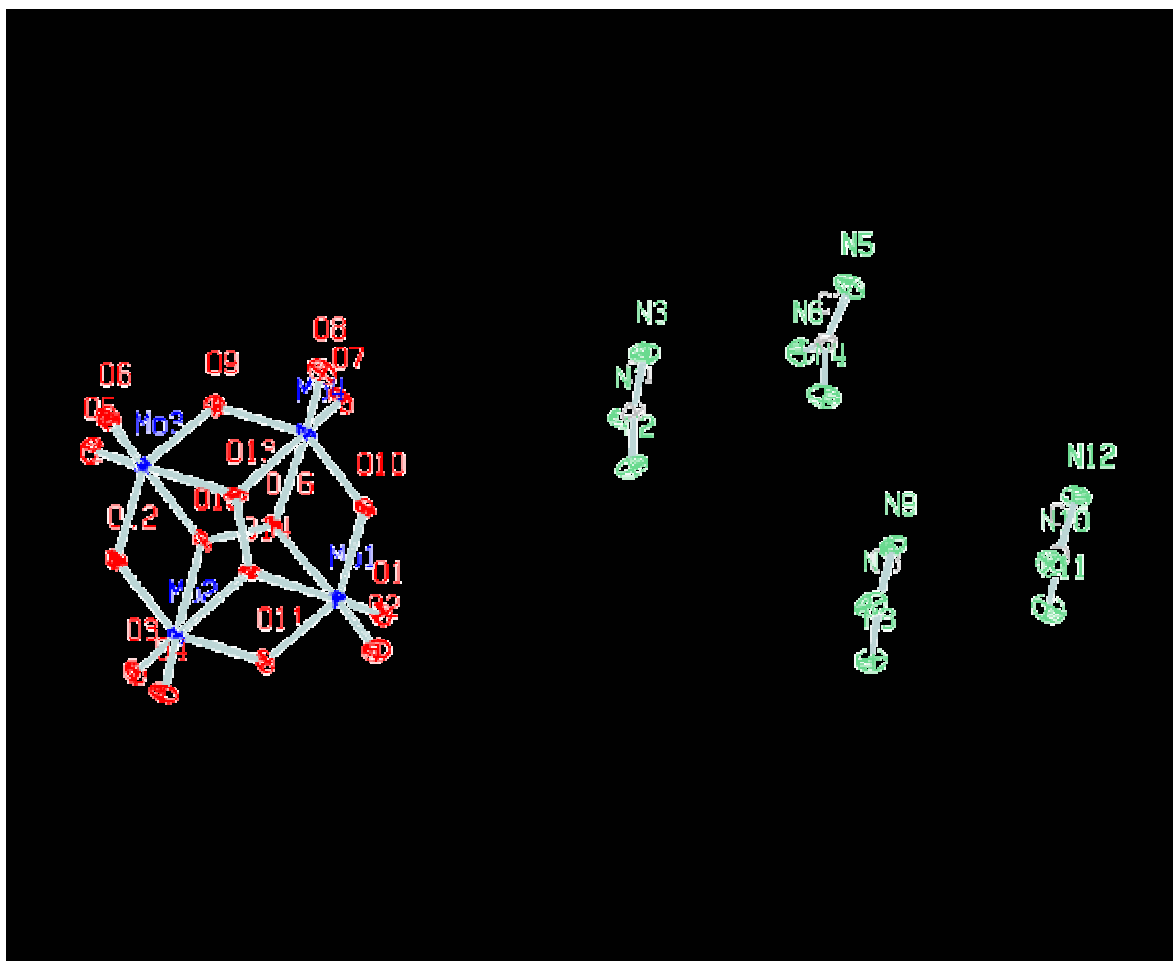
Από την ερευνητική μας ομάδα στα πλαίσια της μελέτης της βιολογικής δράσης ανάλογων χηλικών συμπλόκων του μολυβδαινίου (Mo) έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός τέτοιων συμπλόκων.

Το τετραμερές περόξο-σύμπλοκο του μολυβδαινίου (1) παρασκευάστηκε αναμειγνύοντας υδατικό διάλυμα μαλονικού οξέος, υδατικό διάλυμα ανθρακικής γουανιδίνης παρουσία μεταλλικού μολυβδαινίου σε διάλυμα H_2O_2 και μοριακή αναλογία (8:5:4), το σύμπλοκο (2) παρασκευάστηκε αναμειγνύοντας υδατικό διάλυμα μαλονικού οξέος, υδατικό διάλυμα ανθρακικής γουανιδίνης παρουσία μεταλλικού μολυβδαινίου σε διάλυμα H_2O_2 σε μοριακή αναλογία (8:4:4), αντίστοιχα.

Οι προκύπτοντες κρύσταλλοι του τετραμερούς περόξο συμπλόκου του μολυβδαινίου (1) προέκυψαν έπειτα από προσθήκη εξανίου (layering) στο αρχικό διάλυμα, και έπειτα από αργή εξάτμιση σε θερμοκρασία δωματίου.

Η κρυσταλλική δομή του διπερόξοτετραμολυβδαινικού συμπλόκου (1) παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα (σχήμα 13.1), ενώ επιλεγμένα μήκη δεσμών παρουσιάζονται στον πίνακα 13.1.

Το διπερόξοτετραμολυβδαινικό σύμπλοκο (1) αποτελείται από τέσσερα Mo(VI). Το κάθε μολυβδαίνιο περιβάλλεται από έξι άτομα οξυγόνου, οδηγώντας σε παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία. Επιπρόσθετα η κρυσταλλική δομή του διπερόξομολυβδαινικού συμπλόκου αποτελείται από δύο περόξο ομάδες. Αυτές οι περόξο ομάδες συνδέονται και στα τέσσερα άτομα μολυβδαινίου, ενώ οκτώ τερματικά και τέσσερα γεφυρωτικά οξυγόνα συμπληρώνουν την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου.



Σχήμα 13.1: Κρυσταλλική δομή του περόξο συμπλόκου (1).

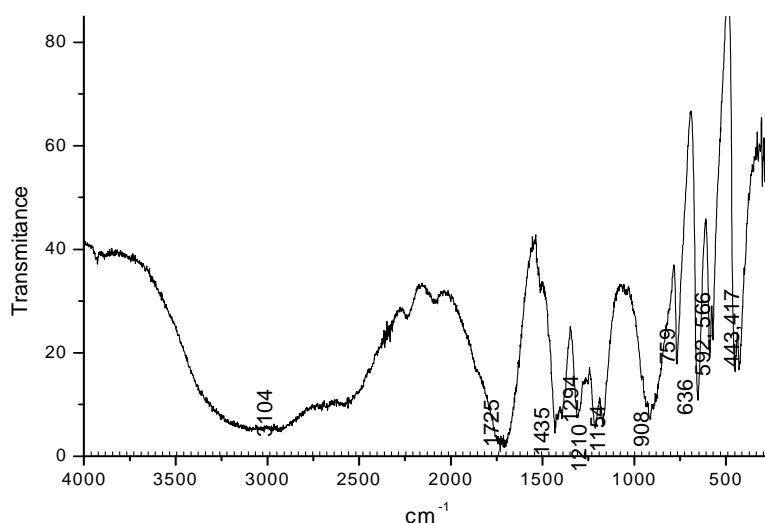
Πίνακας 13.1: Πίνακας με επιλεγμένα μήκη δεσμών του περόξο συμπλόκου (1).

Αριθ.	Άτομ1	Άτομ2	Μήκος
1	Mo1	O1	1.723 Å
2	Mo1	O2	1.731 Å
3	Mo1	O10	1.904 Å
4	Mo1	O11	1.933 Å
5	Mo1	O14	2.242 Å
6	Mo1	O16	2.245 Å
7	Mo2	O3	1.716 Å
8	Mo2	O4	1.726 Å
9	Mo2	O11	1.931 Å

10	Mo2	O12	1.930 Å
11	Mo2	O14	2.244 Å
12	Mo2	O15	2.226 Å
13	Mo3	O5	1.729 Å
14	Mo3	O6	1.717 Å
15	Mo3	O9	1.925 Å
16	Mo3	O12	1.925 Å
17	Mo3	O13	2.251 Å
18	Mo3	O15	2.205 Å
19	Mo4	O7	1.727 Å
20	Mo4	O8	1.716 Å
21	Mo4	O9	1.952 Å
22	Mo4	O10	1.912 Å
23	Mo4	O13	2.220 Å
24	Mo4	O16	2.249 Å
25	O13	O14	1.473 Å
26	O15	O16	1.485 Å
27	C1	N1	1.348 Å
28	C1	N2	1.334 Å
29	C1	N3	1.317 Å
30	C2	N4	1.325 Å
31	C2	N5	1.312 Å
32	C2	N6	1.347 Å
33	N4	H4B	1.018 Å
34	N4	H4A	0.816 Å
35	C3	N7	1.345 Å
36	C3	N8	1.326 Å
37	C3	N9	1.319 Å
38	N7	H7B	0.851 Å
39	N7	H7A	0.992 Å
40	C4	N10	1.341 Å
41	C4	N11	1.317 Å
42	C4	N12	1.334 Å
43	N11	H11A	0.910 Å

13.2.1 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων με φασματοσκοπία υπερέυθρου (IR).

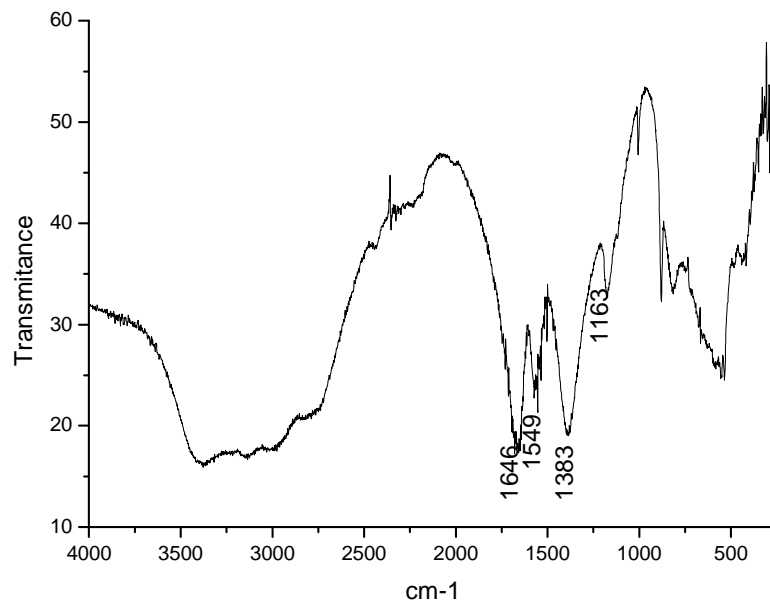
Στο φάσμα (IR) του μαλονικού οξέος (σχήμα 13.2), η πιο χαρακτηριστική συχνότητα είναι η ασύμμετρη δόνηση της ομάδας του καρβοξυλίου $\nu(\text{COOH})$, η οποία βρίσκεται περίπου στα 1725 cm^{-1} [122].



Σχήμα 13.2: Φάσμα υπερέυθρου (IR) του μαλονικού οξέος.

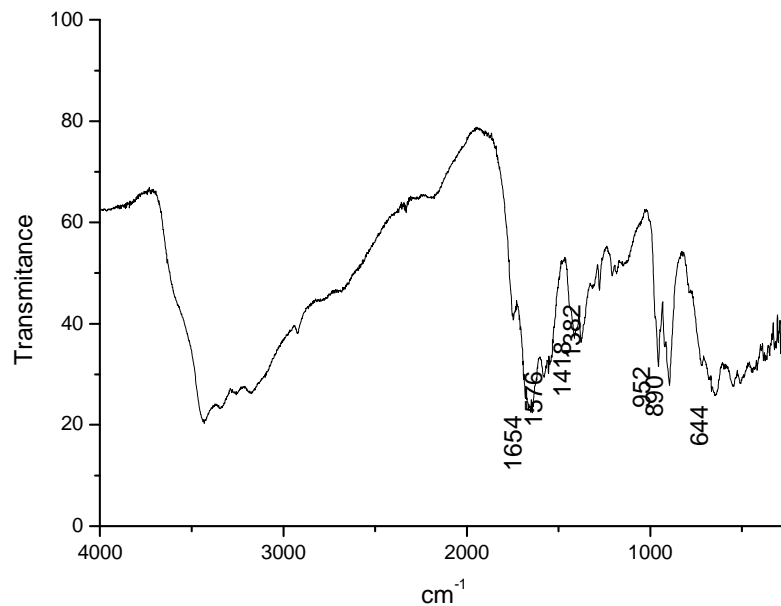
Στο φάσμα υπερέυθρου του τετραμερούς περόξο συμπλόκου του μολυβδαινίου, η ταινία στα 1639 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση της ανθρακικής γουανιδίνης, ενώ η ταινία στα 890 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση $\nu(\text{O-O})$ της περόξο ομάδας. Οι ταινίες στα 678 και 528 cm^{-1} αποδίδονται στις $\nu_{\text{ασυμ}}$ και $\nu_{\text{συμ}}$ της $\text{Mo-O}(\text{O}_2)$. Οι ταινίες τώρα που οφείλονται στο $\nu(\text{Mo=O})$ πιθανόν να επικαλύπτονται από την ταινία των περόξο ομάδων $\nu(\text{O-O})$.

Όσον αφορά τώρα το φάσμα υπερέυθρου (IR) του συμπλόκου που προέκυψε από την επίδραση μαλονικού οξέος σε μεταλλικό μολυβδαίνιο (σχήμα 13.4), οι ταινίες στα 1746 , 1654 , 1576 και 1561 cm^{-1} αντιστοιχούν στις δονήσεις του CO [123].



Σχήμα 13.3: Φάσμα υπέρυθρου (IR) της καρβοξυλικής γουανιδίνης.

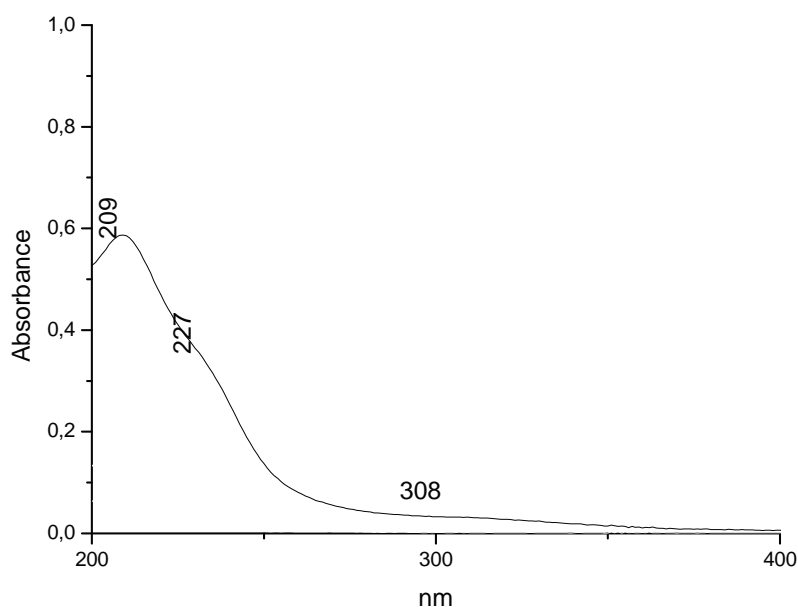
Ενώ οι χαρακτηριστικές ταινίες της δόνησης $\nu(\text{Mo}=\text{O})$ εμφανίζονται στα 952 και 922 cm^{-1} . Τέλος η ταινία στο σύμπλοκο (2) στα 890 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση της χαρακτηριστική ομάδα $\nu(\text{O}-\text{O})$.



Σχήμα 13.4: Φάσμα υπέρυθρου (IR) του συμπλόκου του μολυβδαινίου που προέκυψε από την επίδραση μαλονικού οξέος σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία H_2O_2 (2).

13.2.2 Χαρακτηρισμός της συμπλόκου ένωσης (2) του μολυβδαινίου που προέκυψε από την επίδραση του μαλονικού οξέος σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία H_2O_2 , με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού (Uv-Vis).

Στο φάσμα εμφανίζονται τρεις χαρακτηριστικές ταινίες, μια στα 209 nm, μια στα 227nm και τέλος μια στα 308 nm. Αυτές οι απορροφήσεις είναι υπεύθυνες για το τυπικό κίτρινο ή ανοικτό πορτοκαλί χρώμα των υπερόξο συμπλόκων του μολυβδαινίου σε υδατικό διάλυμα.



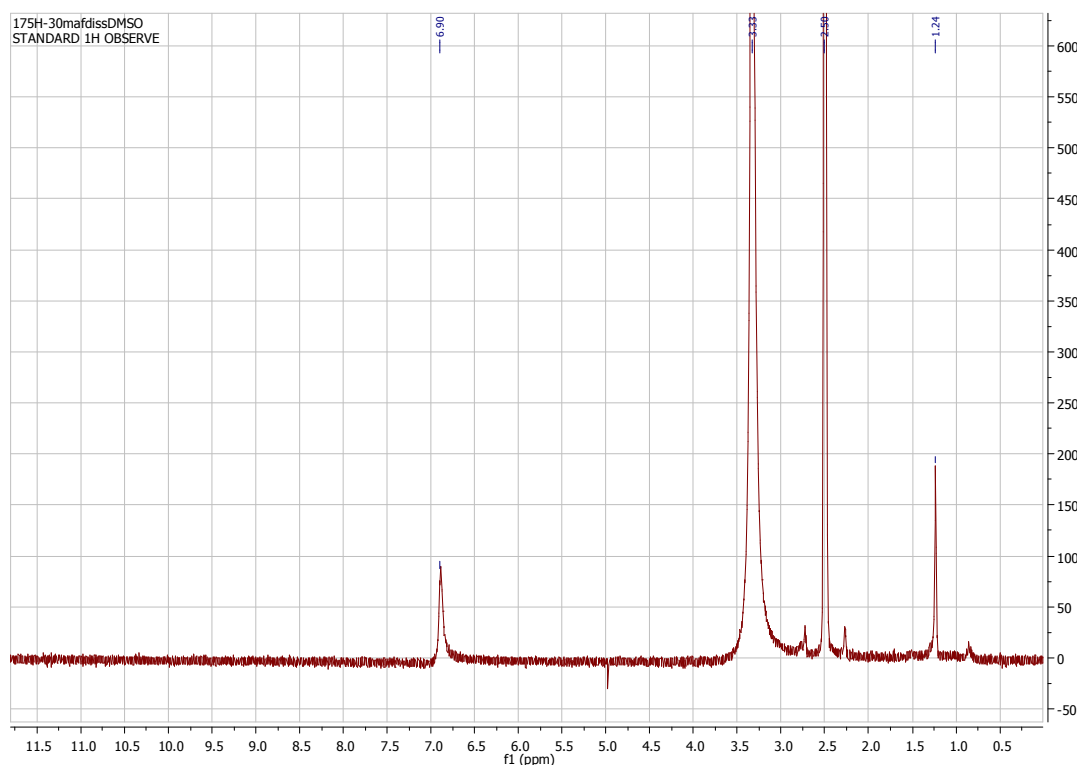
Σχήμα 13.5 Το ηλεκτρονικό φάσμα του αρχικού διαλύματος που προέκυψε από την επίδραση μαλονικού οξέος σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία H_2O_2 (2).

13.2.3 Χαρακτηρισμός της συμπλόκου ένωσης (2) του μολυβδαινίου που προέκυψε από την επίδραση του μαλονικού οξέος σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία H_2O_2 , με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (1H -NMR).

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (1H -NMR) επιβεβαίωσαν τον τρόπο σύμπλεξης του υποκαταστάτη και ακολούθως την

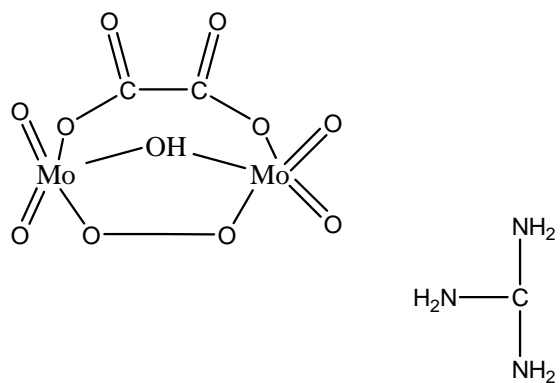
προτεινόμενη δομή όσον αφορά το σύμπλοκο (2). Και τα δύο φάσματα ελήφθησαν σε διευτεριωμένο διάλυμα DMSO.

Η αποτίμηση του φάσματος διεξήχθη έπειτα από σύγκριση των φασμάτων ($^1\text{H-NMR}$) του ελεύθερου μαλονικού οξέος με το αντίστοιχό του συμπλόκου (2).



Σχήμα 13.6 Το $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου του μολυβδαινίου με οξαλικό οξύ (σύμπλοκο 2), το οποίο προέκυψε από την επίδραση μαλονικού οξέος σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία H_2O_2 .

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω σχήμα το σύμπλοκο (2) του μαλονικού οξέος με το μολυβδαίνιο δεν περιέχει την χαρακτηριστική ταινία των πρωτονίων της μεθυλενομάδας στα 3.1 ppm. Αυτό επιβεβαιώνει την στοιχειακή ανάλυση και το γεγονός ότι το μαλονικό μετατρέπεται σε οξαλικό σύμφωνα με την δημοσίευση στο περιοδικό [123], ότι δηλαδή το μαλονικό μετατρέπεται σε οξαλικό μέσω καταλυτικής δράσης του μολυβδαινίου. Επιπλέον η ταινία στα 1.2 ppm πιθανολογείται ότι βασίζεται σε προϊόν της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης του DMSO, εξαιτίας της ύπαρξης της περόξο ομάδας.



Σχήμα 13.7 Προτεινόμενη πιθανή δομή του συμπλόκου του μολυβδαινίου με οξαλικό οξύ, σύμπλοκο (2), το οποίο προέκυψε από την επίδραση μαλονικού οξέος σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία H₂O₂.

13.3 Συμπεράσματα

Στην παρούσα ενότητα μελετήθηκε η επίδραση του μαλονικού οξέος σε μεταλλικό μολυβδαίνιο παρουσία H_2O_2 . Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι αναλόγως των συνθηκών λαμβάνονται:

1. τετραμερές περόξο σύμπλοκο του $Mo(VI)$ με αντισταθμιστικό γουανιδίνη
2. σύμπλοκο σύμπλοκο του $Mo(VI)$ με οξαλικό οξύ από την μετατροπή του μαλονικού σε οξαλικό, παρουσία H_2O_2 και με την καταλυτική δράση του $Mo(VI)$.

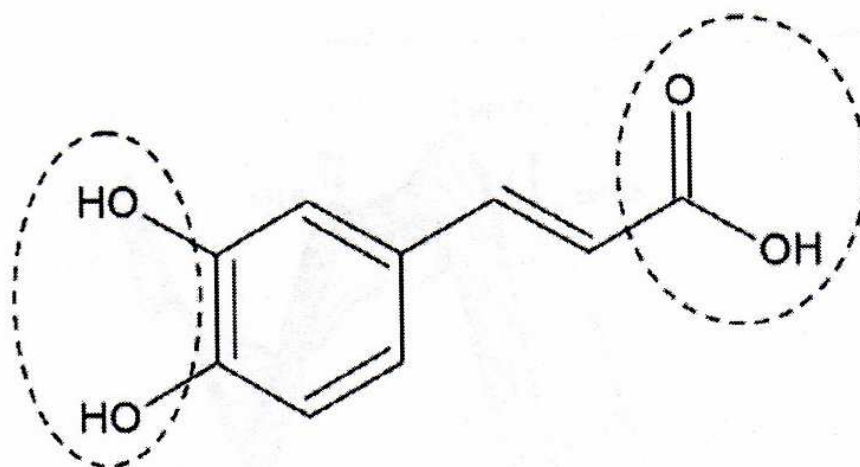
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΚΑΦΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΙΟΝΤΑ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

14.1 Εισαγωγή

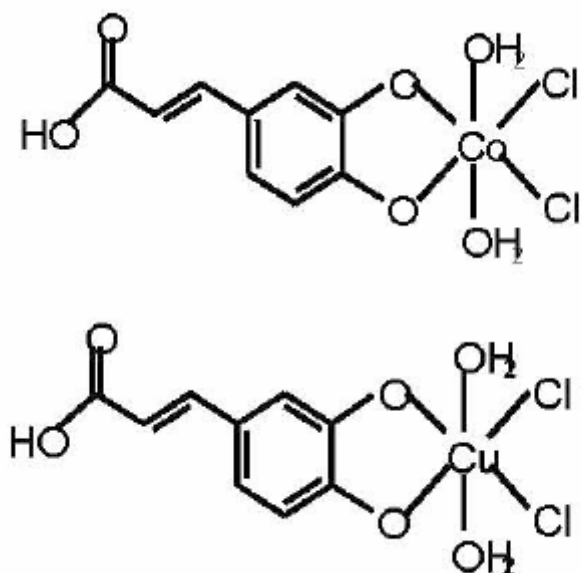
Το καφεϊκό οξύ, ή τρανς-3,(3,4-διυδροξυφαινυλ-) προπενοϊκό οξύ, απαντάται στην φύση σε πολλά φυτά μαζί με άλλους φαινολικούς υποκαταστάτες. Εκκρίνεται από τις ρίζες των φυτών, ενώ συμμετέχει στις διαδικασίες μεταφοράς των μεταλλικών ιόντων, που υπάρχουν στο χώμα. Οι εστέρες του με κινικό οξύ, το οποίο είναι γνωστό και ως χλωρογονικό οξύ, υπάρχουν όχι μόνο για να βελτιώνουν τα τραύματα των φυτών αλλά και για να εμποδίζουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς να εισβάλλουν στα φυτά. Επίσης δρουν στην ανάπτυξη κατεστραμμένων ιστών των φυτών. Το καφεϊκό οξύ αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας των φρούτων έναντι στην επιδρομή των μυκήτων [124].

Από την άποψη της χημικής συμπεριφοράς του το μόριο αυτό, κατέχει δύο ανταγωνιστικές θέσεις δέσμευσης στον σχηματισμό συμπλόκων με μεταλλικά ιόντα, όπως φαίνεται και στο ακόλουθο σχήμα, μία την κατεχόλη και μία την καρβοξυλική ομάδα (σχήμα 14.1) [125].

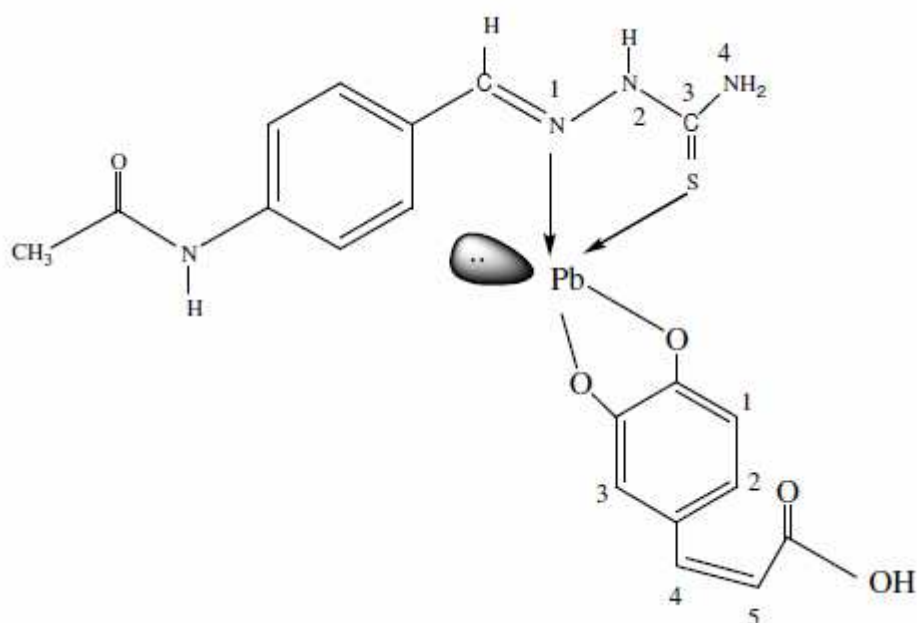


Σχήμα 14.1: Δομή του καφεϊκού οξέος με τις δυο ανταγωνιστικές θέσεις δέσμευσης.

Αυτές οι δύο ομάδες είναι οι καλύτεροι υποκαταστάτες των οργανικών ενώσεων, ικανές να συνδεθούν με μεταλλικά ιόντα. Ορισμένα χαρακτηριστικά σύμπλοκα του καφεϊκού οξέος με τα μεταλλικά ιόντα του χαλκού, του κοβαλτίου και του μολύβδου φαίνονται στα ακόλουθα σχήματα:



Σχήμα 14.2: Σύμπλοκα του καφεϊκού οξέος με τα μεταλλικά ιόντα του κοβαλτίου και του χαλκού [127].



Σχήμα 14.3: Σύμπλοκο του καφεϊκού οξέος με το μεταλλικά ιόν μολύβδου και θειοσεμικαρβαζόνη [Pb (Thz) (Caf)] [127].

14.2 Βιολογική δράση του καφεϊκού οξέος

Από άποψη βιολογικής δράσης, το καφεϊκό οξύ ανήκει στην κατηγορία των φυσικών ενώσεων, η οποία έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας την τελευταία δεκαετία, εξαιτίας των βιολογικών του ιδιοτήτων. Τα παράγωγα του, κατέχουν τόσο αντικαρκινικές, αντιϊικές, αντιφλεγμονώδεις όσο και αντιοξειδωτικές ιδιότητες [126].

Έτσι λοιπόν, οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι διαδεδομένες στα βρώσιμα φυτά και λειτουργούν σαν αντιοξειδωτικά, είναι πολύ χρήσιμες για την βελτίωση ή ακόμη και την παρεμπόδιση ενός μεγάλου αριθμού χρόνιων παθήσεων. Πέρα όμως από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον και γενικότερα για τις βιολογικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων. Έτσι, ανάμεσα στις ποικίλες φαινολικές ενώσεις, το καφεϊκό, έχει δείξει αξιοσημείωτη φαρμακολογική δράση και ως αντικαρκινικό και αντιμεταλλαξογόνο.

Πιο συγκεκριμένα, σε πρόσφατη έρευνα από τον Afsoon Jarrah και των συνεργατών του, βρέθηκε ότι σύμπλοκα του καφεϊκού οξέος με τα μεταλλικά ιόντα του χαλκού και του κοβαλτίου, εμφανίζουν αξιοσημείωτη αντικαρκινική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών MCF-7 και AGS, συγκρινόμενα με τον ελεύθερο υποκαταστάτη [127].

14.3 Αντιδιαβητική δράση του καφεϊκού οξέος

Το καφεϊκό οξύ επιδεικνύει αντιδιαβητική δράση σε διαβητικά ποντίκια τα οποία ανέπτυξαν διαβήτη έπειτα από ένεση με στρεπτοζωτοκίνη. Σημαντικό είναι επίσης στο σημείο αυτό να αναφέρουμε την έρευνα του Un Ju Jung ο οποίος έδειξε ότι το καφεϊκό επιδεικνύει αξιοσημείωτη δράση ως αντιδιαβητικός παράγοντας καταστέλλοντας τον διαβήτη τύπου 2 [126].

Ο διαβήτης τύπου 2, χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία των β-παγκρεατικών κυττάρων, η οποία συνοδεύεται από αντίσταση στην ινσουλίνη. Τα κανονικά παγκρεατικά β-κύτταρα αντισταθμίζουν την αντίσταση στην ινσουλίνη, αυξάνοντας την έκκριση ινσουλίνης. Ωστόσο εκτεταμένη έκθεση των β-κυττάρων του παγκρέατος σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης προκαλεί δυσλειτουργία των β-κυττάρων που σχετίζεται με διαταραχή της έκκρισης και της βιοσύνθεσης της ινσουλίνης.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη συμβάλλει στην αύξηση της παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ και μείωση της πρόσληψης γλυκόζης στο λιπώδη ιστό. Συγκεκριμένα, το ήπαρ είναι ένας ιστός ευαίσθητος στην ινσουλίνη και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης ρυθμίζοντας την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην χρησιμοποίηση της γλυκόζης και την γλυκονεογένεση. Πράγματι, η αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία διεγείρει την μεταφορά γλυκόζης στον λιπώδη ιστό, είναι μια από τις παρενέργειες σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, όπως η παχυσαρκία και ο τύπου 2 διαβήτης. Έτσι, ένας κατάλληλος αντιδιαβητικός παράγοντας θα πρέπει να βελτιώσει την υποκινούμενη από την γλυκόζη έκκριση ινσουλίνης, τον ηπατικό μεταβολισμό της γλυκόζης και την περιφερειακή ευαισθησία στην ινσουλίνη. Αρκετές είναι οι αναφορές οι οποίες ισχυρίζονται ότι το οξειδωτικό στρες που παράγεται από την υπεργλυκαιμία μπορεί να προκαλέσει ή να οδηγήσει σε αντίσταση στην ινσουλίνη καθώς και σε επιπλοκές του διαβήτη. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντιοξειδωτικά, βελτιώνουν έναν αριθμό εναλλασσόμενων φυσιολογικών και μεταβολικών παραμέτρων οι οποίες εμφανίζονται ως αποτέλεσμα του διαβήτη τύπου 2 [126].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15

ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΤΟ ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ

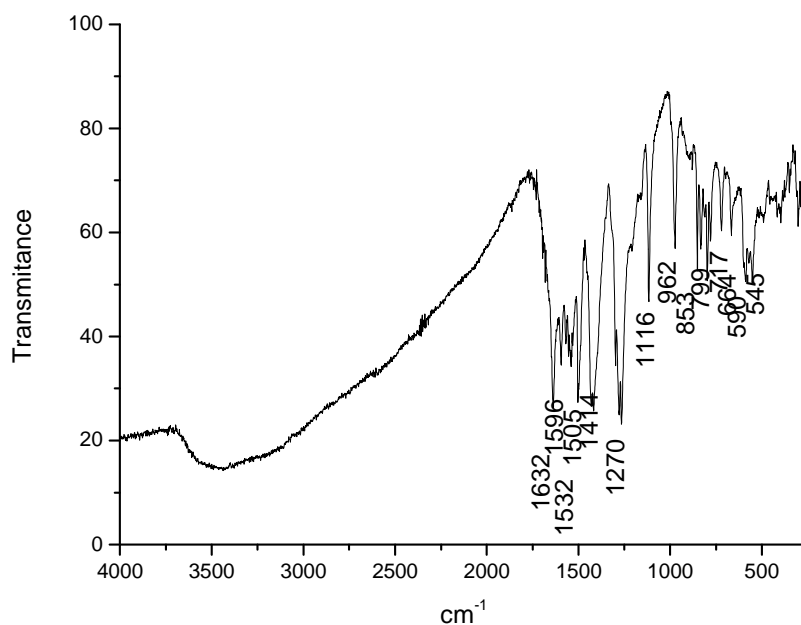
15.1 Σύνθεση συμπλόκου του ψευδαργύρου με το καφεϊκό οξύ.

Στο κεφάλαιο αυτό μελετάται η αντίδραση του Zn(II) με τον υποκαταστάτη καφεϊκό οξύ, ένα σημαντικό βιολογικό μόριο, όπως αναφέραμε. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα από όπου απομονώθηκε ένα σύμπλοκο του ψευδαργύρου με πιθανή δομή η οποία δίνεται στο (σχήμα 15.7). Το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε σε στερεή κατάσταση με στοιχειακή ανάλυση, θερμική ανάλυση (TGA), φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) καθώς και σε διάλυμα με φασματοσκοπία: πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$). Η σύνθεση της συμπλόκου ένωσης του καφεϊκού οξέος με ψευδάργυρο πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Σε υδατικό διάλυμα (10 ml) διαλύονται (0.180 g, 1.0 mmol) καφεϊκού οξέος και το pH=6 ρυθμίζεται με NH_3 2M, στην συνέχεια προστίθενται (0.136 g, 1.0 mmol) χλωριούχου ψευδαργύρου, οπότε προκύπτει κίτρινο άμορφο προϊόν, το οποίο εκπλένεται με ψυχρό ύδωρ. **Στοιχειακή ανάλυση:** $\text{ZnC}_9\text{H}_{11}\text{O}_6$ (M.B=280.520) Θεωρητική: C:38.54 H:3.95 Πειραματική: C: 39.20, H: 3.29

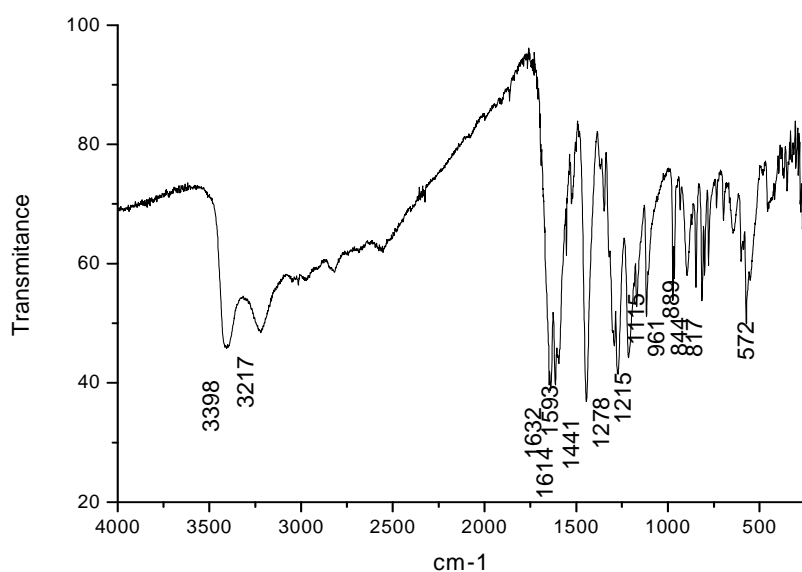
15.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

15.2.1 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου του ψευδαργύρου με καφεϊκό, με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).



Σχήμα 15.1: Φάσμα υπερύθρου (IR) του συμπλόκου του ψευδαργύρου με καφεϊκό οξύ.

Ο δομικός χαρακτηρισμός της συμπλόκου ένωσης του ψευδαργύρου με καφεϊκό οξύ, πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR). Το φάσμα υπερύθρου του καφεϊκού οξέος (σχήμα 15.2) δείχνει μια ισχυρή ταινία στους 1632 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στην ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα $\nu(\text{COOH})$. Η ταινία αυτή δεν μετατοπίζεται στο φάσμα IR του συμπλόκου (σχήμα 15.1). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η συμπλοκοποίηση δεν πραγματοποιείται από την καρβοξυλική ομάδα.



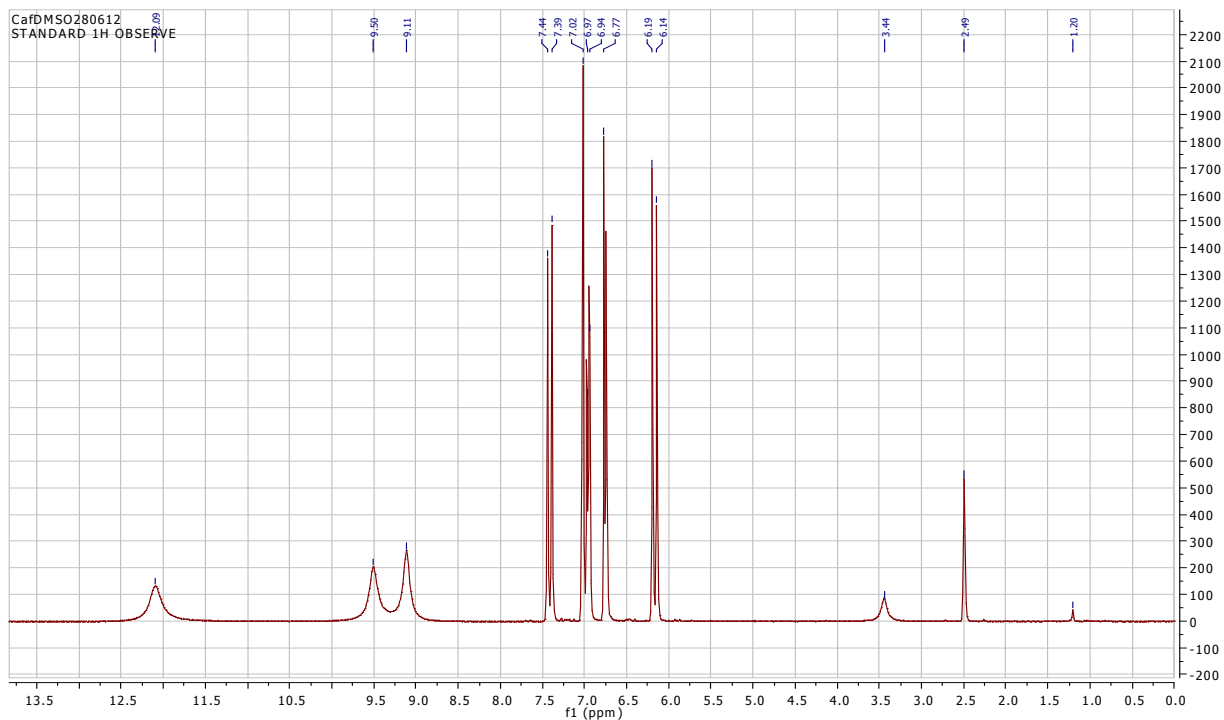
Σχήμα 15.2: Φάσμα υπερύθρου (IR) του καφεϊκού οξέος.

Επιπρόσθετα, στο φάσμα υπερύθρου του καφεϊκού οξέος υπάρχουν δύο ισχυρές ταινίες στους 3398 και 3217 cm^{-1} , που αποδίδονται στα φαινολικά υδροξύλια $\nu(\text{OH})$. Οι ταινίες αυτές εξαφανίζονται όπως βλέπουμε στο φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ένταξη του υποκαταστάση στο μεταλλικό ιόν πραγματοποιείται από τα φαινολικά υδροξύλια. Αυτό υποστηρίζεται ακόμη, από την ύπαρξη ταινίας στα 1215 cm^{-1} στο φάσμα του καφεϊκού οξέος, η οποία αποδίδεται στην δόνηση του δεσμού $\nu(\text{C-O})$ των κατεχολικών υδροξυλίων και η οποία μετακινείται στους 1116 cm^{-1} στο φάσμα του συμπλόκου. Τέλος στο φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με ψευδάργυρο είναι εμφανής ασθενής ταινία στα 545 cm^{-1} που μπορεί να αποδοθεί στον δεσμό $\nu(\text{Zn-O})$ [127].

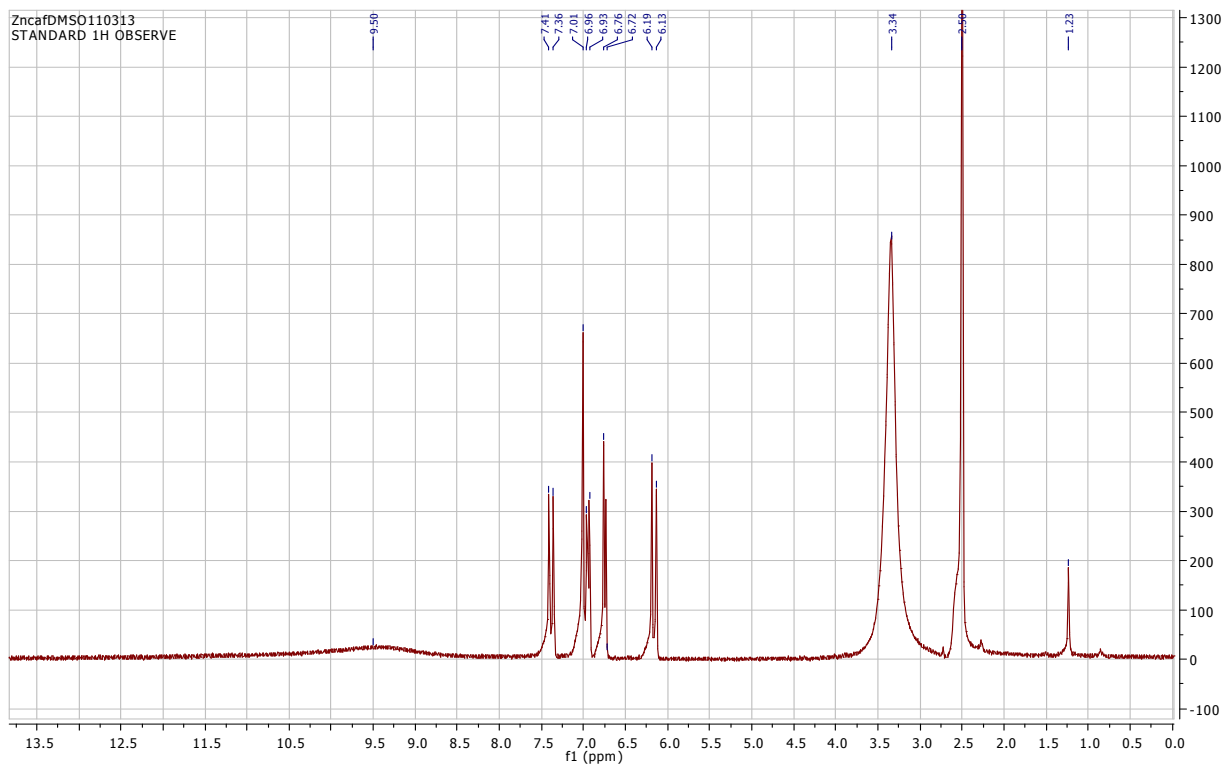
15.2.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου του ψευδαργύρου με καφεϊκό με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$).

Ο υποκαταστάτης καφεϊκό οξύ καθώς και το σύμπλοκό του χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$, σε διάλυμα

δευτεριωμένου DMSO. Τα φάσματα δίνονται στα ακόλουθα σχήματα (σχήμα 15.3 και 15.4).



Σχήμα 15.3 Το $^1\text{H-NMR}$ του καφεϊκού οξέος.



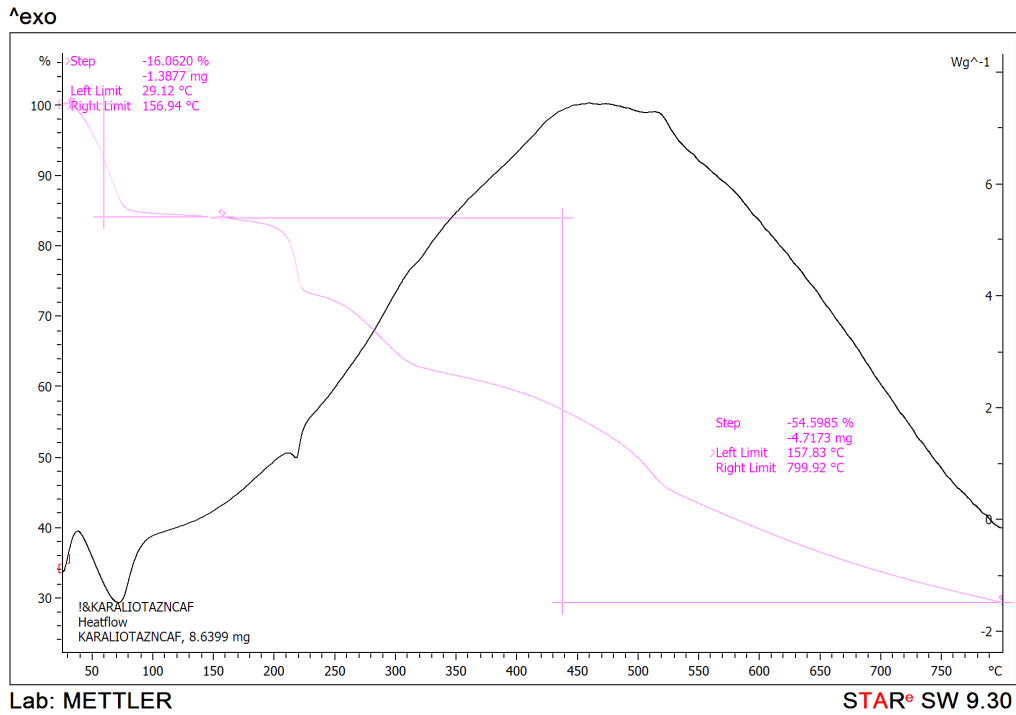
Σχήμα 15.4 Το $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου καφεϊκού οξέος με ψευδάργυρο.

Η αποτίμηση του φάσματος πραγματοποιήθηκε μετά από σύγκριση του ελεύθερου υποκαταστάτη με το σύμπλοκο. Έτσι, συγκρίνοντας το φάσμα του συμπλόκου με αυτό του ελεύθερου καφεϊκού οξέος, φαίνεται ότι οι ταινίες στα 9.1 και 9.5 ppm, που εμφανίζονται στο φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του ελεύθερου καφεϊκού οξέος και αποδίδονται στα δύο φαινορικά υδροξύλια, δεν υπάρχουν στο φάσμα του συμπλόκου. Αυτό υποστηρίζει επιπλέον ότι το καφεϊκό συνδέεται με το μεταλλικό ιόν του ψευδαργύρου δια μέσω των φαινολικών υδροξυλομάδων [128].

15.2.3 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου του ψευδαργύρου με καφεϊκό μέσω θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA).

Παρακάτω παρατίθενται το διάγραμμα θερμικής ανάλυσης του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με ψευδάργυρο.

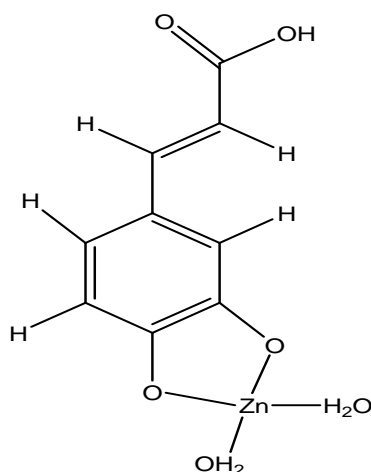
Το ακόλουθο θερμογράφημα ελήφθη σε συσκευή διαφορικής θερμικής ανάλυσης Mettler Star^e SW9.30, με ρυθμό θέρμανσης 10°C ανά λεπτό από τους $(25-800^\circ\text{C})$ σε ατμόσφαιρα αζώτου, με σκοπό να καθορίσουμε τα στάδια αποσύνθεσης του συμπλόκου του καφεϊκού. Σύμφωνα λοιπόν, με την ακόλουθη καμπύλη, η απώλεια βάρους για το σύμπλοκο του καφεϊκού με ψευδάργυρο, (σχήμα 15.5) που συμβαίνει στην περιοχή $(25-156^\circ\text{C})$, προέρχεται από την απώλεια δύο μορίων νερού ενώ η απώλεια μεταξύ $(157-800^\circ\text{C})$ (πειραματική: **54.6 %**, θεωρητική: **52.3 %**) οφείλεται στην απώλεια ενός μορίου $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$. Το τελικό υπόλειμμα αποτελείται από ZnO (πειραματική: **22.5 %**, θεωρητική: **23.3 %**).



Σχήμα 15.5 Διάγραμμα (TGA) του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με ψευδάργυρο.

15. 3 Συμπεράσματα

Σε αυτή την ενότητα μελετήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός ενός συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με το μεταλλικό ιόν του ψευδαργύρου. Βάση όλων των πειραματικών αποτελεσμάτων, στοιχειακής ανάλυσης, θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA) αλλά και φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$) και φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR) που πραγματοποιήθηκαν στο σύμπλοκο αυτό, ο υποκαταστάτης καφεϊκό οξύ συνδέεται με το μεταλλικό ιόν του ψευδαργύρου μέσω των φαινολικών υδροξυλίων σύμφωνα με την προτεινόμενη δομή:



Σχήμα 15.6 Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου του καφεϊκού οξέος με ψευδάργυρο.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 16.1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

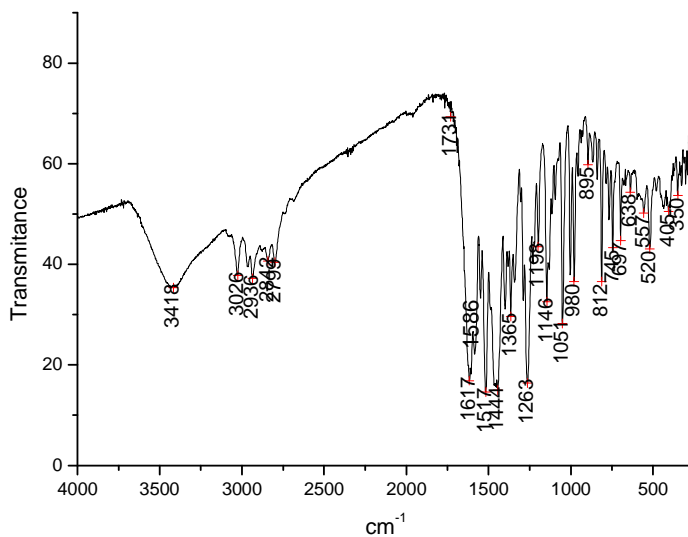
Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Ciprofloxacin	Σιπροφλοξασίνη
levofloxacin	Λεβοφλοξασίνη
Moxifloxacin	Μοξιφλοξασίνη
Amoxicillin	Αμοξισιλίνη
Salmonella	Σαλμονέλλα
Streptococcus	Στρεπτόκοκκος
Lag Phase	Φάση Προσαρμογής
Exponential Growth Phase	Φάση Εκθετικής Ανάπτυξης
Stationary Phase	Φάση Στασιμότητας
Death Phase	Φάση Θανάτου
Human Research Center	Κέντρο Ανθρώπινης Έρευνας
Gatifloxacin	Γκατιφλοξασίνη

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

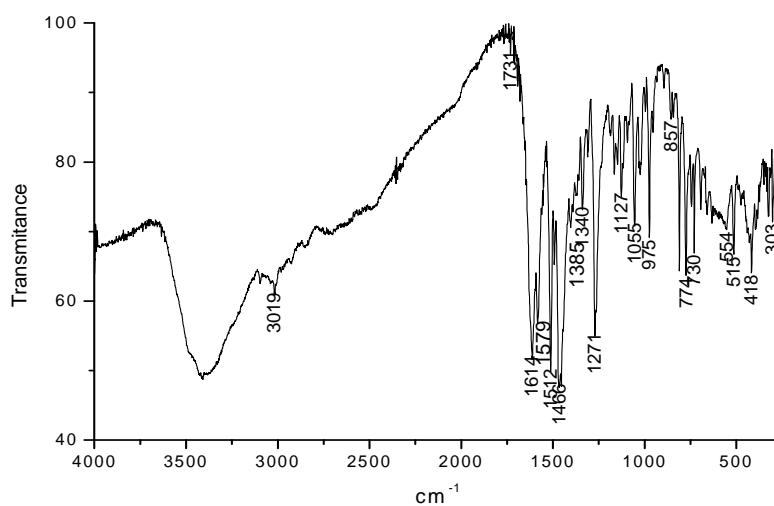
Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

Levo	levofloxacin
Phen	phenanthroline
Bipy	bipyridine
CT-DNA	Calf-thymus DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
IR	Infra-Red
TGA	Thermogravimetric analysis
¹ H-NMR	Nuclear magnetic Resonance
EDTA	Ethylenodiaminotetraacetic acid
FBS	Fetal Bovine serum
PBS	Phosphate Buffer Saline
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMF	Dimethyl Formamide
RPMI media	Media which developed at Roswell Park Memorial Institute
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
ESR	Electron spin resonance
MIC	Minimum Inhibitory Concentration

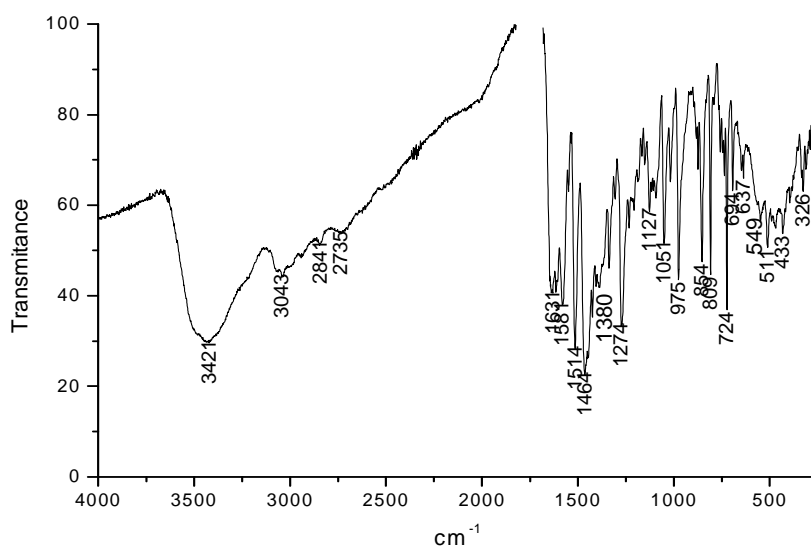
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



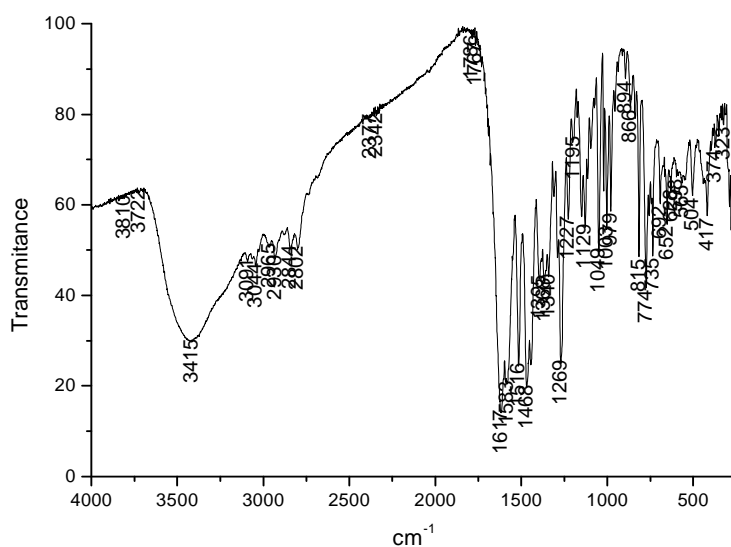
ΠΙ.1: Φάσμα υπερέυθρου (IR) του απλού συμπλόκου (1)



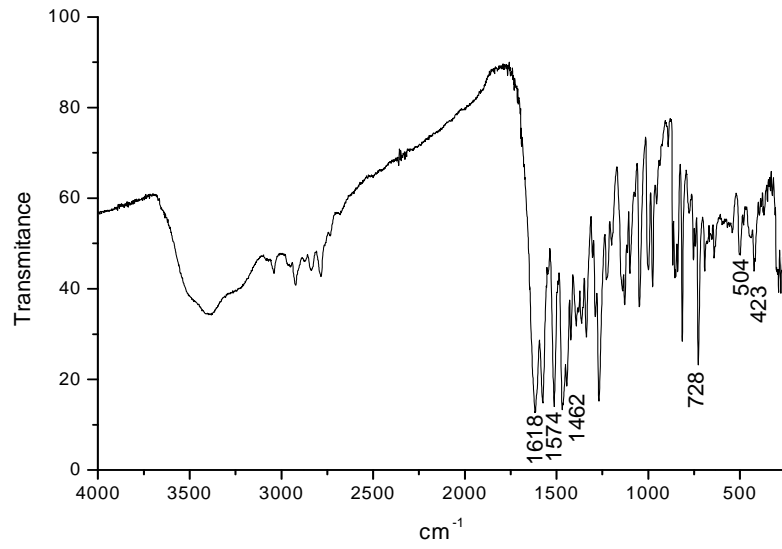
ΠΙ.2: Φάσμα υπερέυθρου (IR) του μικτού συμπλόκου της λεβοφλοξασίνης με χαλκό, σύμπλοκο (2)



ΠΙ.3: Φάσμα υπεράυθρου (IR) του μικτού συμπλόκου της λεβοφλοξασίνης με χαλκό και φαινανθρολίνη, σύμπλοκο (3)



ΠΙ.4: Φάσμα υπεράυθρου (IR) του μικτού συμπλόκου της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο και φαινανθρολίνη, σύμπλοκο (2)

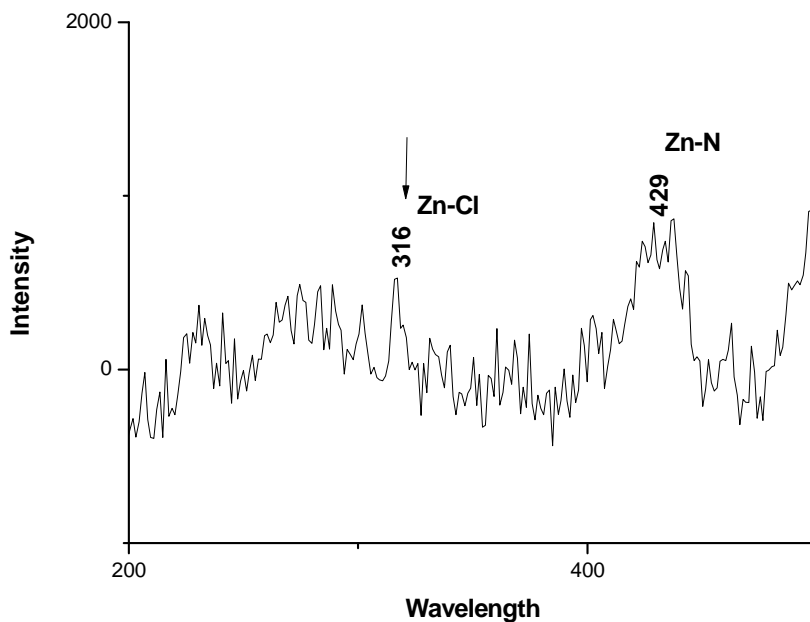


ΠΙ.5: Φάσμα υπεράθρου (IR) του μικτού συμπλόκου της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο και διπυριδίνη, σύμπλοκο (1)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

	IL ^a bands			CT ^b band s	d-d bands
Λεβοφλοξασίνη	291 (0.56)	320 (0.42)	365 (0.28)		
Σύμπλοκο 1	299 (0.54)	340 (0.397)	355(sh) (0.5)	420(sh) (0.15)	680 (0.17)
Σύμπλοκο 2	290 (0.27)	340 (0.29)	358(sh) (0.5)	420(sh) (0.12)	680 (0.043)
Σύμπλοκο 3	286 (0.10)	320 (0.32)	355(sh) (0.262)	410(sh) (0.15)	683 (0.17)

ΠΙΙ.1 Πίνακας με χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης του ηλεκτρονικού φασματος σε ηυjol.



ΠΙΙ.2 Φάσμα Raman του μικτού συμπλόκου της λεβοφλοξασίνης με ψευδάργυρο και ετερουποκαταστάτη φαινανθρολίνη, σύμπλοκο (2).

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Joseph M. Blondeau, Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance, Survey of ophthalmology, vol 49, supplement 2, Mar 2004.
2. American Family Physician, vol.49, 3, feb 2002.
3. Oana Cramariuc, Tomasz Rog, Matti Javanainen, Luca Monticelli, Anna V. Polishchuk, Lipo Vattulainen, Mechanism for translocation of fluoroquinolones across lipid membranes, Biochimica and biophysica acta 1818 (2012) 2563-2571.
4. Sergio Madurga, Javier Sanchez-Cespedes, Ignasi Belda, Jordi Vila, and Ernest Giralt, Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone resistance determining region of DNA gyrase: Towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance. ChemBioChem 9 (2008) 2081-2086.
5. Steven M. Wimer, PharmD, Lori Schoonover, PharmD and Mark W. Garrison, PharmD, Levofloxacin: A therapeutic Review. Clinical therapeutics, 20 (1998) 2,
6. Siddhesh D. Patil, David G. Rhodes, and Diane J. Burgess, DNA-based Therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review, the AAPS journal, 7, 9, 2005.
7. Rahul Palchauhuri and Paul J. Hergenrother, DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action, Current Opinion in Biotechnology, 18:497-503, 2007.
8. Lucija Coga, Interactions of metal ions with DNA, sep2012, University of Ljubljana.
9. <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch3B3.htm>
10. Molecular biology of the cell, 4th edition Alberts B, Johnson A, Lewis J, et.al, New York, Garland Science, 2002.
11. Med-Chem.com, Gram Stain Protocol

12. Clemens H. Posten, Federal republic of Germany and Charles L. Cooney, Cambridge, MA02139, USA.
- 13 . Διδακτορική Διατριβή Ελένης Ευθυμιάδου, Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκων ενώσεων με ιατροφαρμακευτικές εφαρμογές, 2008.
14. Isidoros Iakovidis, ioannis Delimaris, and Stylianos M. Piperakis, Copper and its complexes in Medicine: A Biochemical Approach, Molecular biology International Vol 2011, Article Id 594529, 13 pages.
- 15 .<http://www.copper.org/publications/newsletters/innovations/2000/06/medicine>.
16. Eleni K. Efthimiadou, Maria E. Katsarou, Alexandra Karaliota, George Psomas, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 910-920.
17. Rinky Singh, Ravirajsinh N. Jadeja, Menaka C. Thounaojam, Tushar Patel, Ranjitsinh V. Devkar, Debjani Chakraborty, Synthesis, DNA binding and antiproliferative activity of ternary copper complexes of moxifloxacin and gatifloxacin against lung cancer cells. Inorganic Chemistry Communications 23 (2012) 78-84.
- 18 Eleni K .Efthimiadou, Yiannis Sanakis, Catherina P. Raptopoulou, Alexandra Karaliota, Nikos Katsaros, George Psomas, Bioorganic Med. Chem. 16 (2006) 3864-3867.
19. George Psomas, Alketa Tarushi, Eleni K Efthimiadou, Yiannis Sanakis, Catherina P. Raptopoulou, Nikos Katsaros, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1764-1773.
20. Eleni K. Efthimiadou, Yiannis Sanakis, Maria Katsarou, Catherina Raptopoulou, Alexandra Karaliota, Nikos Katsaros, George Psomas, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1378-1388.
21. Paula C. Huber, Gabriella P. Reis, Maria C. K. Amstalden, Marcelo Lancelloti, Wanda P. Almeida, Polyedron 57 (2013) 14-19.
22. George Vardatsikos, Nihar R. Pandey, Ashok K. Srivastava, Insulin mimetic and anti diabetic effects of zinc, Journal of Inorganic Biochemistry 120 (2013) 8-17.
23. Rosalind s Gibson 361 (2012) 291-299.
24. Eleni K. Efthimiadou, George Psomas, Yiannis Sanakis, Nikos Katsaros, Alexandra Karaliota, Journal of Inorganic Biochemistry 101 (2007) 525-535.

25. a) Alketa Tarushi, George Psomas, Catherine P. Raptopoulou, Dimitris P. Kessissoglou, *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (2009) 898-903 b) Alketa Tarushi, Catherine P. Raptopoulou, Vassilis Psycharis, Aris Terzis, George Psomas, Dimitris P. Kessissoglou, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 (2010) 2678-2685.
26. M.N. Patel, M. R. Chhasatia, P. A. Dosi, A. S. Banya, V. R. Thakkar, *Polyedron* 29 (2010) 1918-1924 27 Mohan Patel, Mehul Chhasatia, Pradhuman Parmar, *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2010) 439-446.
28. Alketa Tarushi, Kostas Lafazanis, Jakob Kljun, Iztok Turel, Anastasia A. Pantazaki, George Psomas, Dimitris P. Kessissoglou, *Journal of Inorganic Biochemistry* 121 (2013) 53-65.
29. Chang Yun Chen, Quan Zhan Chen, Xiao Feng Wang, Min Sheng Liu, Yun Feng Chen, *Transition met chem.* 34 (2009) 757.
30. M. N. Patel, D. S. Gandhi, Pradhuman A. Parmar, SOD mimic activity, DNA binding and in vitro antibacterial studies of drug based copper (II) complexes, *Inorg. Chem. Communications* 13 (2010) 618-621.
31. Chang Yun Chen, Quan Zhan Chen, Xiao Feng Wang, Min Sheng Liu, Yun Feng Chen, *Transition Met Chem* 34 (2009) 757.
32. Peisach, J; Blumberg, W. E. *Arch. Biochem. Biophys.* 165 (1974) 691.
33. T. D. Smith, J. R. Pilbrow *Coord. Chem. Rev.* 13 (1974) 173.
34. B. Bennett, William E. Antholine, V. M. D' Souza, G. Chen, L. Ustinyuk, R. C. Holz *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 13025.
35. A. Bencini and D. Gatteschi, *EPR of Exchange Coupled Systems*, 1990, Springer Verlag, Heidelberg.
36. Allen, F. H. *Acta Cryst.* B58 (2002) 380-388.
37. D.K.Saha, S.Padhye, C.E.Anson, A.K.Powell, Antimycobacterial activity of mixed ligand copper quinolone complexes, *Transition Met. Chem.* 28 (2003) 579.
38. Lin-Ming Xie, Guo-Ping Wang, Hong-Yin He, Long-Guanu Zhu, *Z.Kristallogr.-New Cryst. Struct.* (2003) 218 245.
39. S.P.S.Rao, H. Manohar, K.Aoki, H.Yamazaki, R.Bau, *Chem. Commun.* (1986) 4.

40. E. K. Efthimiadou, H. Thomadaki, Y. Sanakis, C. P. Raptopoulou, N. Katsaros, A. Scorilas, A. Karaliota, G. Psomas, Structure and biological properties of the copper (II) complex with the quinolone antibacterial drug N-propyl-norfloxacin and 2,2 bipyridine, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 64-73.
41. P. Drevensek, I. Leban, I. Turel, G. Giester, E. Tillmanns, *Acta Crystallogr. C* 59 (2003) m376.
42. D. Kumar Saha, U. Sandbhor, K. Shirisha, S. Padhye, D. Deobagkar, C. E. Anson, A. K. Powell, A novel mixed-ligand antimycobacterial dimeric copper complex of ciprofloxacin and phenanthroline, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 3027.
43. D.K.Saha, S. Patitungkho, S. Padhye, D.N. Deobagkar, A. Ozarkar, M.M. Bhadbhade, R.G. Gonnade, *Transition Met. Chem.* 30 (2005) 334.
44. G. Psomas, A. Tarushi, E. K. Efthimiadou, Y. Sanakis, C. P. Raptopoulou, N. Katsaros, Synthesis, structure and biological activity of copper (II) complexes with oxolinic acid, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1764-1773.
45. E. K. Efthimiadou, Y. Sanakis, M. Katsarou, C. P. Raptopoulou, A. Karaliota, N. Katsaros, G. Psomas, Neutral and cationic mononuclear copper (II) complexes with enrofloxacin: Structure and biological activity. *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1378-1388.
46. P. Zivec, F. Perdih, I. Turel, G. Giester, G. Psomas, Different types of copper complexes with the quinolone antimicrobial drugs ofloxacin and norfloxacin : Structure, DNA- and albumin-binding, *J. Inorg. Biochem.* 117 (2012) 35.
47. Min. Xu, Zhao-Rong Ma, Liang Huang, Feng Juan Chen, Zheng-zhi Zeng, Spectroscopic studies on the interaction between Pr(III) complex of an ofloxacin derivative and bovine serum albumin or DNA. *Spectrochimica Acta Part A* 78 (2011) 503.
48. L. Ronconi, C. Marzano, P. Zanella, M. Corsini, G. Miolo, C. Macca, A. Trevisan, And D. Fregona, Gold (III) Dithiocarbamate for the treatment of cancer : solution chemistry, DNA binding and hemolytic properties, *J. of Med. Chem.* 49 (2006) 1648.
49. Eleni K. Efthimiadou, Maria E. Katsarou, Alexandra Karaliota, George Psomas, Copper (II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor

heterocyclic ligands : Structure-activity relationship. *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 910-920.

50. M. E. Katsarou, E. K. Efthimiadou, G. Psomas, A. Karaliota, and D. Vourloumis, Novel copper (II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10 phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities *J. Medicinal Chemistry* 51 (2008) 470.

51. Jason A. Wiles, Quiping Wang, Edlaine Lucein, Akihiro Hashimoto, Yongsheng Song, Jijun Cheng, Christopher w. marior, Yangsi Qu, Steven D. Podos, Jane A. Thanassi, Christy L. Thoma, Milind Deshpande, Michael J. Pucci, Barton J. Bradbury, *Bioorg.Med.Chem.Lett* 16, 5 (2006) 1272-1976.

52. Mohan N. Patel □, Deepen S. Gandhi, Pradhuman A. Parmar, SOD mimic activity, DNA binding and in-vitro antibacterial studies of drug based copper(II) complexes *Inorganic chemistry communications* 13 (2010) 618-621.

53. Y. Prashanthi,¹ 2 K. Kiranmai,¹ Ira,³ Sathish kumar K,¹ Vijay kumar Chityala,¹ and Shivaraj¹ *Bioinorganic Chemistry and Applications.* (2012) Article ID 948534, 8 pages.

54. Benigno Macias, Maria V. Villa, Maria Sastre, Alfonso Castin Eiras, Joaquin Borrás, Complexes of Co(II) and Zn(II) with Ofloxacin. Crystal Structure of [Co(oflo)₂(MeOH)₂]₄MeOH. *Journal of pharmaceutical sciences*, 91 (2002) 11.

55. Mohan Patel, Mehul Chhasatia, Pradhuman Parmar. Antibacterial and DNA interaction studies of zinc(II) complexes with quinolone family member, ciprofloxacin. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 45 (2010) 439-446.

56. Jarak I., Kralj M., Piantamida I., Suman L., Zimic M., Pavelic K., Karminski-Zamola G., Novel cyano- amidino substituted derivatives of thieno [2,3-b-] and thieno [3,2,-b-] thiophene-2- carboxanilides and thieno [3,3:4,5] thieno and thieno [2',3':4,5] thieno [2,3-c]quinolones. Synthesis, photochemical synthesis, DNA binding, and antitumor evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 2859-2868.

57. *J. Nanopart Res*, E. K. efthimiadou, C. Tapeinos, P. Bilalis, G. Kordas, septeber 2011.

58. Pandey R, Kumar P, Singh AK, Shahid M, Li PZ, Singh SK, Xu Q, Misra A, Pandey DS. *Inorg Chem.* (2011) Apr 18;50(8):3189-97. doi:

- 10.1021/ic1018086. Epub 2011 Mar 11. Fluorescent zinc(II) complex exhibiting "on-off-on" switching toward Cu²⁺ and Ag⁺ ions.
59. Zengming Man and Feng Guo, Coordination polymers constructed from an asymmetric biphenyl-dicarboxylate and N-donor ligands: structures and photoluminescent properties.
60. † Basab Roy, Alla Sreenivasa Rao and Kyo Han Ahn*, Mononuclear Zn(II)- and Cu(II)-complexes of a hydroxynaphthalene-derived dipicolylamine: fluorescent sensing behaviours toward pyrophosphate ions. *Org. Biomol. Chem.* 9 (2011) 7774.
61. Hanshaw RG, Lakshmi C, Lambert TN, Johnson JR, Fluorescent detection of apoptotic cells by using zinc coordination complexes with a selective affinity for membrane surfaces enriched with phosphatidylserine. *Chembiochem.* (2005) Dec;6(12):2214-20.
62. Nasir MS, Fahrni CJ, Suhy DA, Kolodsick KJ, Singer CP, O'Halloran TV. The chemical cell biology of zinc: structure and intracellular fluorescence of a zinc-quinolinesulfonamide complex. *J Biol Inorg Chem.* (1999) Dec; 4(6):775-83.
63. Dayal D, Palanimuthu D, Shinde SV, Somasundaram K, Samuelson AG. A novel zinc bis(thiosemicarbazone) complex for live cell imaging. *J Biol Inorg Chem.* (2011) Apr;16(4):621-32. doi: 10.1007/s00775-011-0764-0. Epub 2011 Mar 8.
64. Pascu SI, Waghorn PA, Conry TD, Lin B, Betts HM, Dilworth JR, Sim RB, Churchill GC, Aigbirhio FI, Warren JE. Cellular confocal fluorescence studies and cytotoxic activity of new Zn(II) bis(thiosemicarbazonato) complexes. *Dalton Trans.* (2008) Apr 28;(16):2107-10. doi: 10.1039/b802806k. Epub 2008 Mar 18.
65. Διδακτορική Διατριβή Χαράλαμπου Λίτου, Μελέτη συμπλόκων των στοιχείων χαλκού, μολυβδαινίου και κοβαλτίου με χηλικούς υποκαταστάτες. Εφαρμογή στην θεραπεία και την διάγνωση, (2007) 25. 65α) Harpaz, S., *Aquaculture*, 3 (2005) 249.
66. Siebrecht, S., 44 *Ann. Nutrit. Metabol.*, 44 (2000) 79.
67. Seven, M., Cengiz, M., Tuzgen, S., and Yasar-Iscan, M., *Am. J. Hum. Biol.*, 13 (2001) 721.
68. Selimoglu, M.A., and Yagci, R.V., *J. Clin. Gastroenterol.*, 38 (2004) 130.

69. Benvenga, S., Ruggeri, R.M., Russo, A., Lapa, D., Campenni, A., Trimarchi, F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86 (2001) 3579.
70. Costa, M., Canale, D., Filicori, M., D'Iddio, S., and Lenzi, A., *Andrologia*, 26 (1994) 155.
71. Vitali, G., Parente, R., and melotti, C., *Drugs Exp. Clin. Res.*, 21 (1995) 157.
72. Gunal, A.I., Celiker, H., Donder, E., and Gunal, S.Y., *J. Nephrol.*, 12 (1999) 38.
73. Jogl, G., Hsiao, Y.S., and Tong, L., *Ann. N.Y. Acad. Science*, 1033 (2004) 17.
74. Ramsay, R.R., Gandoour, R.D., and van der Leij, F.R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1546 (2001) 21.
75. Peluso, G., Nicolai, R., Reda, E., Benatti, P., Barbarisi, A., and calvani, m., *J.Cell. Psysiol.*, 182 (2000) 339.
76. Arenas, J., Rubio, J.C., martin, M.A., and campos, Y., *early Hum. Devel.*, 53 (1998) S43.
77. Mokhova, E., Arrigoni-Martell, E., Bellei, M., Dedukhova, V., Muscatello, U., Starkov, A., and Bobyleva, V., *FeBS Lett.*, 289 (1991) 187.
78. Duran, J.M., Peral, M.J., Calogne, M.L., and Ilundain, A.A., *J. Membrane Biol.*, 185 (2002) 65.
79. Reznick, a., Kagan, V.E., Ramsey, R., Tsuchiya, M., Khwaja, S., Serbinova, E.A., and Packer, L., *Arch.Biochem Biophys.*, 296 (1992) 394.
80. Packer, I., valenza, M., Serbinova, E., Starke-Reed, P.,Frost, K., and Kagan, V., *Arch. Biochem. Biophys.*, 288 (1991) 533.
81. Yoshikawa, Y., Ueda, E., Sakurai, H., and Kojima, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 51 (2003) 230.
82. Charalambos Litos, S. Parsons, A. Karaliota *Polyedron.*, 26 (2007) 1397-1403.
83. Swedo, K. b., and Enemark, J.*Inorg. Biochem.*, 56 (1979) 70
84. Hille, R., Retey, J., Bartlewski-Hof, U., Reichenbecher, W., and Schink, B., *FeMS Microbiol. Rev.*, 22 (1999) 489.
85. Fenton, D.E., in *Bioinorganic Chemistry*, Oxford University press, Oxford, 1995, pp.1
86. Hay, R.W., *Bioinorganic Chemistry*, ed Papazisis, D., 1992.

87. Lippard, S., and Berg, J., in *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, 1994.
88. Sigel, A., and Sigel, H., in *Metal Ions in Biological systems: Molybdenum and Tungsten. Their roles in Biological Processes*, Marcel Dekker Inc., New York, 39 (2002).
89. Hille, R., *Coord. Chem. Rev.*, 96 (1996) 2757.
90. Peng, G., Nicholli, J., McCullough, E., and Spence, J., *Inorg. Chem.*, 33 (1994) 2857.
91. Williams, J.P., and Da Silva, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292 (2002) 293.
92. Xiao, Z., Bruck, M., and Enemark, J., *Inorg. Chem.*, 35 (1996) 7508.
93. Ochiai, E.-I., in *General Principles of Biochemistry of the Elements*, Plenum Press, (1983) 65-81.
94. Morris, M.J., *coord. Chem. rev.*, 172 (1998) 181.
95. Khan, M.I., and Zubieta, J., *Prog. Inorg. Chem.*, 43 (1995) 1.
96. Thapper, a., Deeth, R.J., and Nordlander, E., *Inorg. Chem.*, 38 (1999) 1015.
97. Lu, X., Liu, S., Mao, X., and Bu, X., *J. Mol. Struct.*, 562 (2001) 89.
98. Bridgeman, A.J., and Cavigliasso, G., *Inorg. Chem.*, 41 (2002) 1761.
99. Yamase, T., Fujita, H., and Fukushima, K., *Inorg. Chim. Acta*, 151 (1988) 15.
100. Rhule, J., Hill, C., and Judd, D., *Chem. Rev.*, 98 (1998) 327.
101. Ch. Litos, V. Aletras, D. Hatzipanayioti, M. Kamariotaki, Al. Lymberopoulou-Karaliota, *Inor. Chim. Acta*, 360 (2007) 2321-2330.
102. Ch. Litos, A. Terzis, Cather. Raptopoulou, A. Rontoyianni, Al. Karaliota, *Polyedron*, 25 (2006) 1337-1347.
103. Al. Lymberopoulou-Karaliota, D. Hatzipanayioti, M. Kamariotaki, M. Potamianou, Ch. Litos, V. Aletras, *Inor. Chim. Acta*, 358 (2005) 2975-2995.
104. A. Karaliota, M. Kamaritaki, D. Hatzipanagioti, V. Aletras, *J. Of Bioc.* 69 (1998) 79-90.
105. Gouzerch, P., and Proust, A., *Chem. Rev.*, 98 (1998) 77.
106. Greenwood, N., and Earnshaw, a., in *Chemistry of Elements*, Pergamon Press, 1984.

107. E. Kioseoglou, A. Salifoglou, Hybrid links between decavanadates and betaines of potential pharmacological relevance, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 17(3), (2011) 239-241.
108. Hitomi Imura, Akinori Shimada, Misaki Naota, Takehito Morita, Masako Togawa, Tatsuya Hasegawa, and Yoshiyuki Seko, Vanadium toxicity in mice: Possible Impairment of Lipid Metabolism and Mucosal Epithelial Cell Necrosis in the Small Intestine, *Toxicology Pathology*, 00 (2012)1-15.
109. Efrosini Kioseoglou, Catherine Gabriel, Savvas Petanidis, Vassilis Psycharis, Catherine P. Raptopoulou, Aris Terzis, and Athanasios Salifoglou, Binary Decavanadate-Betaine Composite Materials of Potential Anticarcinogenic Activity, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 2013, 639, (8-9), 1407–1416 .
110. Yan-Tuan Li, Chun-Yuan Zhu, Zhi-Yong Wu, Man Jiang, Cui-Wei Yan, Synthesis, crystal structures and anticancer activities of two decavanadate compounds, *Transition Met Chem* 35 (2010) 597-603.
111. Manuel Aureliano, Recent perspectives into biochemistry of decavanadate, *World J. Biol. Chem.*, 2011, 2 (10) 215-225.
112. Jose L. Domingo, Vanadium and tungsten Derivatives as antidiabetic Agents-A review of their toxic effects. *Biological Trace Element Research*, vol88 (2002).
113. Kazuo Nakamoto, Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in Coordination, Organometallic and Bioinorganic Chemistry, page 60.
114. Mohd Saleem, mohita Sharma, H N Sheikh, B L Kalsotra, Synthesis and characterization of dinuclear molybdenum(VI) peroxy complexes with aroyl hydrazones, *Indian Journal of Chemistry* 46 (2007) 1423-1426.
115. Sumita P Purkayastha, Paritosh K Chaudhury and Chira R Bhattacharjee, Synthesis and characterization of newer mixed ligand dioxomolybdenum (VI) vanillin complexes incorporating peroxy and nitro group as coligand, *Assian University Journal of Science and Technology*, 5 (2010) 196-203.
116. Manuel Aureliano, Recent perspectives into biochemistry of decavanadate, *World J. Biol. Chem* 2011 October 26, 2 (10):215-225.
117. pKa Data Compiled by R. Williams], [Nathan Weiner, Malonic acid, *Org. Synth. Coll. Vol.* 2:376.

118. Md. Belayet Hossain, Md. Nazmul Hassan, M. A. Yousuf and M.A. Salam, Antimicrobial activity studies of mixed ligand metal complexes of some dibasic acid and heterocyclic bases, *Dhaka Univ. j. Pharm. Sci.* 2008, 7(2), 145-148.
119. Carol Deegan, Malachy McCann, Michael Devereux, Barry Coyle, Denise A. Egan, In vitro cancer chemotherapeutic activity of 1,10 phenanthroline (phen), $[Ag_2(phen)_3(mal)2H_2O]$, $[Cu(phen)_2(mal)]2H_2O$ and $[Mn(phen)_2(mal)]2H_2O$ (malH₂=malonic acid) using human cancer cells, *Cancer Letters* 2007, 24, 224-233.
120. Rabia Eshkourfu, Bozidar Cobeljic, Miroslava Vujcic, Iztok Turel, Andrej Pevec, Kristina Sepcic, Manja Zec, Sinisa Radulovic, Tatjana Srdic Radic, Dragana Mitic, Katarina Andjelkovic, Dusan Sladic, Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding properties of the novel dinuclear cobalt (III) complex with the condensation product of 2-acetylpyridine and malonic acid dihydrazide, *Journal of inorganic Biochemistry*, 105 (2011), 1196-1203.
121. Hiromu Sakurai, Yoshitane Kojima, Yutaka Yoshikawa, Kenji Kawabe, Hiroyuki Yasui, Antidiabetic vanadium (IV) and zinc (II) complexes, *Coordination Chemistry Reviews*, 226 (2002) 187-198.
122. Manas Sutradhar, Tannistha Roy Barman, Gurunath Mukherjee, Manoj Kar, Sourya Sekhar Saha, Michael G.B Drew, Saktiprosad Ghosh, malonato complexes of oxidovanadium (IV): Synthesis, structural characterization and exploration of their insulin mimetic properties, *Inorganica chimica acta*, 368,(2011), 13-20.
123. C. Djordjevic, K .J. Covert, Conversion of Malonate and Malate to oxalate in aqueous peroxo molybdate (VI) solutions. Synthesis and structure of potassium oxodiperoxooxalatomolybdate (VI) *Inorganica Chimica Acta*, 101. (1985) L37-L39.
124. Patricia A.M. Williams, A.C. Gonzalez Baro, Evelina G. Ferrer, Study of the interaction of oxovanadium (IV) with a plant component (caffeic acid). Synthesis and characterization of a solid compound, *Polyedron*, 21 (2002), 1979-1984].
125. Jean-Paul Cornard, Alexandra Caudron, Jean-Claude Merlin, UV-visible and synchronous fluorescence spectroscopic investigations of the

complexation of Al(III) with caffeic acid, in aqueous low acidic medium, *Polyedron* 25 (2006) 2215-2222.

126. Renata Swislocka, Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV absorption, ^1H and ^{13}C NMR) and theoretical (in B3LYP/6-311++G level) studies on alkali metal salts of caffeic acid, *Spectrochimica Acta Part A* 100 (2013) 21-30.

127. Afsoon Jarrah, Ali Shafaghat, Masoomeh Dadkhah, *World Applied Sciences Journal* 13 (6) (2011) 1498-1501.

128. Shayma A. Shaker, Synthesis, Spectral and Magnetic Studies of Newly Mixed Ligand Complexes of 4-Formyl-Acetanilide Thiosemicarbozone and 3,4- Dihydrocinnamic Acid with some metal ions, *E- J. of Chemistry* 7(S1) (2010) S594-S600.