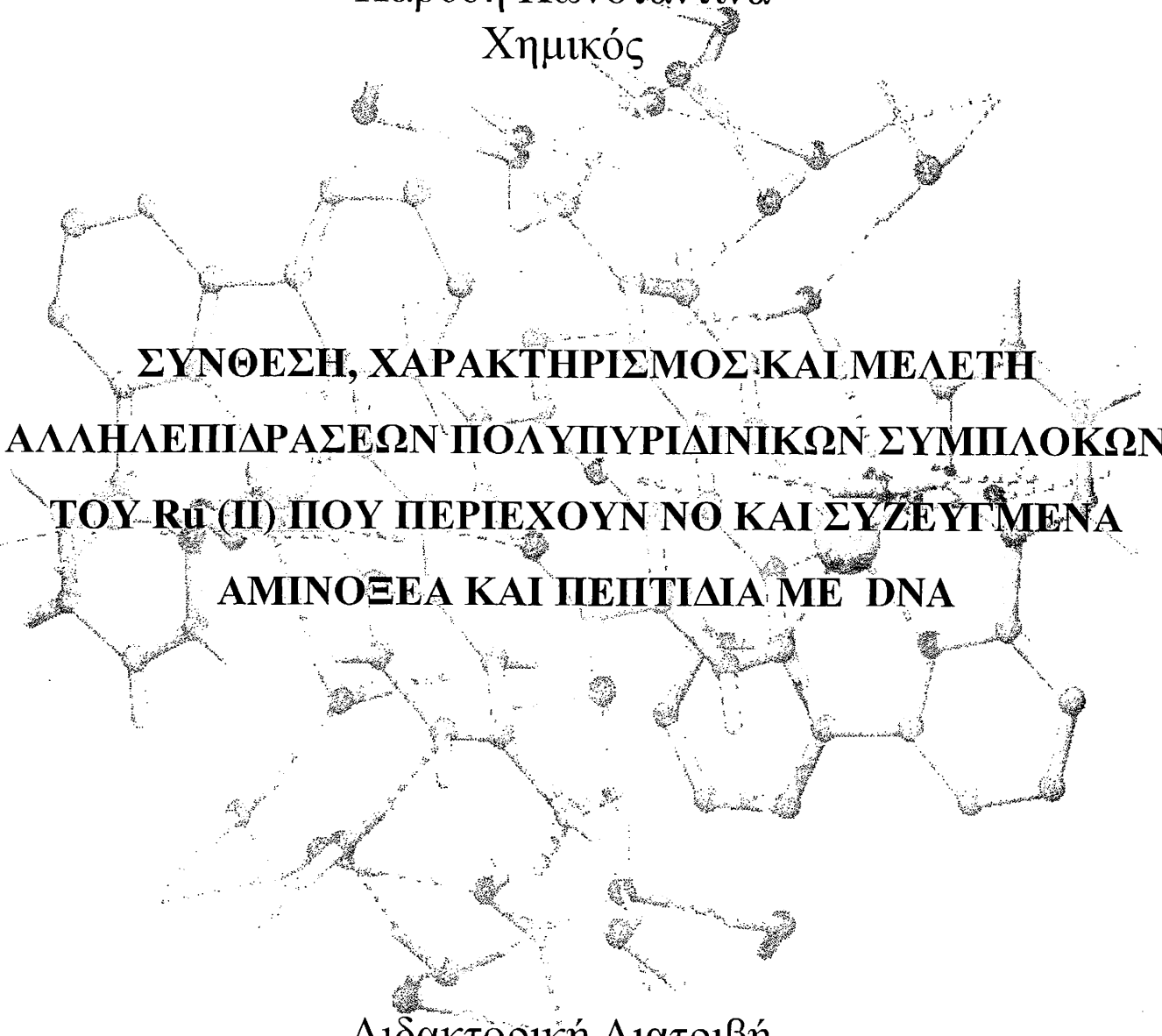


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Καρύδη Κωνσταντίνα  
Χημικός



**ΣΥΝΘΕΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ  
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΠΟΛΥΠΥΡΙΔΙΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ  
ΤΟΥ Ru(II) ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΝΟ ΚΑΙ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΑ  
ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΚΑΙ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ DNA**

Διδακτορική Διατριβή

Ιωάννινα 2005



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΧΑΤΖΗΛΙΑΔΗΣ

Επιστημονικός Υπεύθυνος του Μεταπτυχιακού  
Προγράμματος «Βιοανόργανη Χημεία»

Ιωάννινα, 14-11-2005  
Αριθμ. Πρωτ. 50

Δ/ΝΣΗ: Πανεπιστημιούπολη Ιωαννίνων  
45 110 Ιωάννινα

ΤΗΛ.: 26510-98420, 98421, 98429,

FAX: 26510-44831, 98419

E-MAIL: [nhadjis@cc.uoi.gr](mailto:nhadjis@cc.uoi.gr) Προς

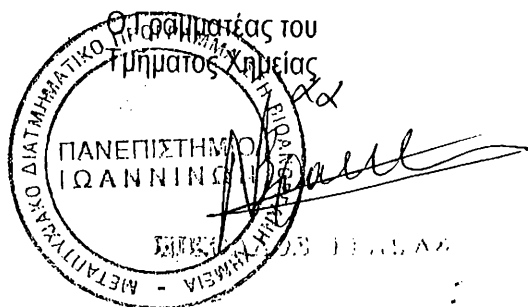
Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής

- Ο κ. Χατζηκακού Σωτήρης, Επίκ. Καθηγητής Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, ως επιβλέπων.
- Ο κ. Χατζηλιάδης Νικόλαος, Καθηγητής Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, ως μέλος.
- Η κ. Κόβαλα-Δεμερτζή Δ., Καθηγήτρια Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, ως μέλος.
- Ο κ. Χαραλαμπόπουλος Κω/νος, Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων, ως μέλος.
- Ο κ. Καρκαμπούνας Σ., Λέκτορας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων, ως μέλος.
- Η κ. Λουλούδη Μ., Επίκ. Καθηγήτρια Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, ως μέλος.
- Ο κ. Περλετές Σ., Καθηγητής Τμ. Χημείας Παν/μίου Πατρών, ως μέλος.

**ΘΕΜΑ: "Ορισμός επταμελούς εξεταστικής επιτροπής"**

Σας γνωρίζουμε ότι με απόφαση της ΕΔΕ του ΜΔΕ Βιοανόργανη Χημεία (συνεδρία υπ' αρ. 33/12-10-05), ορίζετε μέλος της 7/μελούς εξεταστικής επιτροπής της Διδακτορικής Διατριβής της υποψηφίας κ. Ξανθοπούλου Μ.

Η ημερομηνία εξέτασης της υποψηφίας θα οριστεί αργότερα.





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΧΑΤΖΗΛΙΑΔΗΣ  
Επιστημονικός Υπεύθυνος του Μεταπτυχιακού  
Προγράμματος «Βιοανόργανη Χημεία»

Ιωάννινα, 01-11-2005  
Αριθμ. Πρωτ. 25

Δ/ΝΣΗ: Πανεπιστημιούπολη Ιωαννίνων  
45 110 Ιωάννινα  
ΤΗΛ.: 26510-98420, 98421, 98429,  
FAX: 26510-44831, 98419  
E-MAIL: [nhadjis@cc.uoi.gr](mailto:nhadjis@cc.uoi.gr)

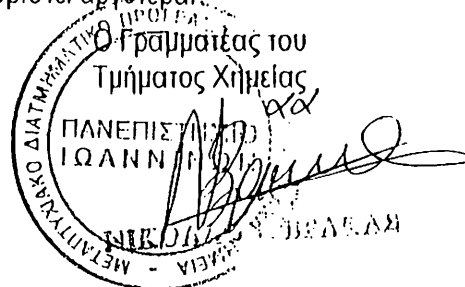
Προς  
Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής  
Χατζηλιάδης Ν. Καθ. Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, επιβλέπων.  
Τσίκαρης Β. Αν. Καθ. Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος.  
Κορδοπάτης Π. Καθ. Τμ. Φαρμακευτικής Παν/μίου Πατρών, μέλος.  
Κόβαλα-Δεμεριτζή Δ. Καθ. Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος.  
Σπυρούλιας Γ. Επίκ. Καθ. Τμ. Φαρμακευτικής Παν/μίου Πατρών, μέλος.  
Μαλανδρινός Γ. Λέκτορας Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος.  
Τσίπης Α. Λέκτορας Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος.

**ΘΕΜΑ: "Ορισμός επιταμελούς εξεταστικής επιτροπής"**

Σας γνωρίζουμε ότι με απόφαση της ΕΔΕ του ΜΔΕ Βιοανόργανη Χημεία (συνεδρία υπ' αρ. 33/12-10-05), ορίζεστε μέλος της 7/μελούς εξεταστικής επιτροπής της Διδακτορικής Διατριβής του υποψηφίου κ. Χ. Χασάπη.

Σας διαβιβάζουμε το Διδακτορικό του.

Η ημερομηνία εξέτασης του υποψηφίου θα οριστεί αργότερα.



Σημειώνεται ότι οι παρουσιάσεις των Διατριβών ΜΔΕ και Διδακτορικών θα γίνουν τη Δευτέρα 28-11-2005 από ώρα 15.00 έως 19.00 με την εξής σειρά:

**ΜΔΕ**

Κιοσέογλου Ευφροσύνη  
Ζάρτηλας Σωτήριος  
Τριανταφυλλίδη Κατελίτσα  
Σταμάτης Αγγελος  
Ζαβιτσάνος Κίμωνας

**Διδακτορικά**

Αντωνιάδης Κωνσταντίνος  
Χασάπης Χρήστος  
Καρύδη Κωνσταντίνα

Εαν δεν επαρκέσει ο χρόνος οι παρουσιάσεις θα συνεχιστούν την Τρίτη 29-11-2005 και ώρα 10.00 στην ίδια αίθουσα.

Συνημμένος Πίνακας Αποδεκτών

**Πίνακας Αποδεκτών**

Δ. Κόβαλα-Δεμερτζή, Καθηγήτρια  
Θ. Καμπανός, Καθηγητής  
Ι. Πλακατούρας, Επίκ. Καθηγητής  
Μ. Λουλούδη, Επίκ. Καθηγήτρια  
Σ. Χατζηκακού, Επίκ. Καθηγητής  
Α. Γαρούφης, Λέκτορας  
Γ. Μαλανδρίνος, Λέκτορας  
Α. Τσίπης, Λέκτορας  
Δ. Κεσίσσογλου, Καθηγητής  
Α. Σαλίφογλου, Αναπλ.Καθηγητής  
Σ. Περλεπές, Καθηγητής  
Ε. Μάνεση-Ζούπα, Αναπλ.Καθηγήτρια  
Μεταπτυχιακοί Φοιτητές  
Εκπρόσωπος Μεταπτυχιακών Φοιτητών



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΧΑΤΖΗΛΙΑΔΗΣ

Επιστημονικός Υπεύθυνος του Μεταπτυχιακού  
Προγράμματος «Βιοανόργανη Χημεία»

Ιωάννινα, 14-11-2005  
Αριθμ. Πρωτ. 51

Δ/ΝΣΗ: Πανεπιστημιούπολη Ιωαννίνων  
45 110 Ιωάννινα

ΤΗΛ.: 26510-98420, 98421, 98429,

FAX: 26510-44831, 98419

E-MAIL: [nhadjis@cc.uoi.gr](mailto:nhadjis@cc.uoi.gr)

Προς

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής

Χατζηλιάδης Ν. Καθ. Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, επιβλέπων

Γαρούφης Α. Επικ. Καθ. Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος.

Κόβαλα-Δεμερτζή Δ. Καθ. Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος.

Λουλούδη Μ. Επικ. Καθ. Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος.

Πλακατούρας Ι. Επ. Καθ. Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος.

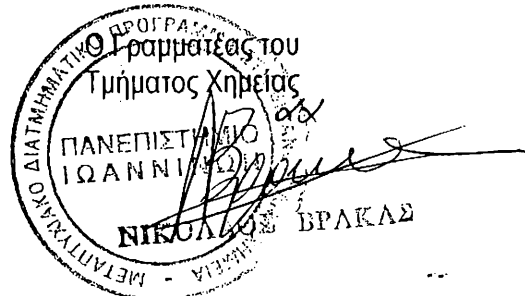
Περλεπές Σ. Καθ. Τμ. Χημείας Παν/μίου Πατρών, μέλος.

Μαλανδρίμος Γ. Λέκτορας Τμ. Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος.

**ΘΕΜΑ: "Ορισμός επταμελούς εξεταστικής επιτροπής"**

Σας γνωρίζουμε ότι με απόφαση της ΕΔΕ του ΜΔΕ Βιοανόργανη Χημεία (συνεδρία υπ' αρ. 33/12-10-05), ορίζετε μέλος της 7/μελούς εξεταστικής επιτροπής της Διδακτορικής Διατριβής της υποψηφίας κ. Κ Καρύδη.

Η ημερομηνία εξέτασης της υποψηφίας θα οριστεί αργότερα.



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Καρύδη Κωνσταντίνα  
Χημικός

**ΣΥΝΘΕΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ**  
**ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΠΟΛΥΠΥΡΙΔΙΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ**  
**ΤΟΥ Ru (II) ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΝΟ ΚΑΙ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΑ**  
**ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΚΑΙ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ DNA**

Διδακτορική Διατριβή

Ιωάννινα 2005

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Νικόλαος Χατζηλιάδης    Αχιλλέας Γαρούφης    Δήμητρα Κόβαλα

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καθηγητής Νικόλαος Χατζηλιάδης

Καθηγήτρια Δήμητρα Κόβαλα

Καθηγητής Σπύρος Περλεπές

Επίκουρος Καθηγητής Αχιλλέας Γαρούφης

Επίκουρος Καθηγήτρια Μαρία Λουλούδη

Επίκουρος Καθηγητής Ιωάννης Πλακατούρας

Λέκτορας Γεράσιμος Μαλανδρίνος

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο *Εργαστήριο Γενικής και Ανόργανης Χημείας* του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης «Βιοανόργανη Χημεία» με συντονιστή τον Καθηγητή Νικόλαο Χατζηλιάδη, τον οποίο ευχαριστώ για την δυνατότητα που μου έδωσε μέσω του προγράμματος αυτού, να συνεχίσω τις σπουδές μου μετά το μεταπτυχιακό μου δίπλωμα στη διδακτορική διατριβή. Η ανάθεση του θέματος της διατριβής έγινε από τους κ. Νικόλαο Χατζηλιάδη και κ. Αχιλλέα Γαρούφη, τους οποίους ευχαριστώ θερμά για την ενθάρρυνση, τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές, την συμπαράσταση και καθοδήγηση τους και την πολύτιμη συμβολή τους στον τομέα της ερευνητικής μου παιδείας. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον κ. Αχιλλέα Γαρούφη για την συνεισφορά του στην έρευνα μου, αλλά και για τη στήριξη και εμπύχωση που μου προσέφερε τα χρόνια αυτά. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν και η βοήθεια του στην ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων. Ευχαριστώ ακόμη, τα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τις υποδείξεις και τις παρατηρήσεις τους, οι οποίες βοήθησαν στη συγγραφή αυτής της διατριβής.

Ένα σημαντικό μέρος της διατριβής μου πραγματοποιήθηκε στο ευρωπαϊκά καταξιωμένο εργαστήριο του καθηγητή J. Reedijk, στο Ινστιτούτο Χημείας στο Leiden της Ολλανδίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή J. Reedijk για την φιλοξενία, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την καθοδήγηση του στην ερευνητική μου εργασία. Η παραμονή μου για περισσότερο από ένα χρόνο στο εργαστήριο του, μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπαιδευτώ σε διάφορες τεχνικές και να αποκτήσω σημαντικές γνώσεις, πρωτοβουλία και εμπειρία.

Τέλος, ευχαριστώ τις φίλες μου Κατελίτσα Τριανταφυλλίδη, Elena Pantoja-Lopez και Carmen De Cires για την στήριξη και τη συνεργασία μας κατά την διάρκεια της διατριβής μου, καθώς και όλους τους συναδέλφους μου που πραγματοποιούν τώρα Διατριβές στο Εργαστήριο Γενικής και Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Χημείας στο Leiden της Ολλανδίας. Οφείλω επίσης, το πιο μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, που με την αγάπη της με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια.

*Κωνσταντίνα Δ. Καρύδη*



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### *ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΡΟΥΘΗΝΙΟΥ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ*

1.1.	Εισαγωγή	2
1.2.	Ρουθίνιο	5
1.3.	Βιολογική δράση συμπλόκων του Ρουθηνίου	6
1.4.	Μηχανισμός δράσης συμπλόκων του Ρουθηνίου	15
1.5.	Αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων-συμπλόκων με πολυνουκλεοτίδια και νουκλεϊκά οξέα	16

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>

### *Η ΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ*

2.1.	Το μονοξείδιο του αζώτου: NO	20
2.2.	Ο βιολογικός ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου.	23
2.3.	Ενζυμικός σχηματισμός του NO	25
2.4.	Η δραστηριότητα του μονοξειδίου του αζώτου	27
2.5.	Η ένταξη του μονοξειδίου του αζώτου στα μέταλλα μετάπτωσης	30
2.5.1.	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός μεταλλικών νιτροσουλ-συμπλόκων	33
2.6.	Νιτροσουλ-σύμπλοκα μετάλλων	34
2.6.1.	Νιτροσουλ-σύμπλοκα του ρουθηνίου	34
2.6.2.	Νιτροσουλ-σύμπλοκα του ρουθηνίου με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες	39
2.7.	Φωτοχημεία και Φωτοθεραπεία	42
2.8.	Καταστροφή του DNA υπό την επίδραση του μονοξειδίου του αζώτου	43

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

### *ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΕΤΑΛΛΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ*

3.1.	Εισαγωγή	50
3.2.	Μεταλλοπεπτίδια.	52

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1.	Υλικά και φυσικές μετρήσεις	60
4.1.1.	Υλικά	60
4.1.2.	Φυσικές μετρήσεις	60
4.1.3.	Βασικές αρχές των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν	61
4.1.3.1.	Φασματοσκοπία Υπερύθρου	61
4.2.	Προετοιμασία των διαλυμάτων για λήψη φασμάτων υπεριώδους-ορατού, κυκλικού διχρωϊσμού και καμπυλών τήξης του DNA	62
4.3.	Προετοιμασία των διαλυμάτων των συμπλόκων με το DNA για τα πειράματα της ηλεκτροφόρησης	63
4.4.	Φωτοχημική μελέτη των συμπλόκων	64
4.4.1.	Φωτοχημική μελέτη των συμπλόκων με IR φασματοσκοπία	64
4.4.2.	Φωτοχημική μελέτη των συμπλόκων με φασματοσκοπία UV	65
4.5.	Κυτταροτοξικά πειράματα	65
4.6.	Σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων του ρουθηνίου	66
4.6.1.	Σύνθεση του υποκαταστάτη 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυλικό οξύ (4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)	66
4.6.2.	Σύνθεση του συμπλόκου Ru <sup>III</sup> (terpy)Cl <sub>3</sub>	67
4.6.3.	Σύνθεση του συμπλόκου <i>cis</i> -(Cl,Cl)-[RuCl <sub>2</sub> (NO)(terpy)]Cl ( <b>1</b> )	67
4.6.4.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)Cl](PF <sub>6</sub> )	68
4.6.5.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)NO](PF <sub>6</sub> ) ( <b>2</b> )	69
4.6.6.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)NO <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) ( <b>3</b> )	70
4.7.	Πεπτιδική σύνθεση	71
4.7.1.	Σύζευξη των αμινοξέος αλανίνη	73
4.7.2.	Σύνθεση των υποκαταστατών 4-COAlaCONH <sub>2</sub> -4'-Mebpy	73
4.7.3.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-COAlaCONH <sub>2</sub> -4'-Mebpy)Cl](PF <sub>6</sub> ) ( <b>4</b> )	74
4.7.4.	Σύνθεση του πεπτιδίου GHK	75
4.7.5.	Σύνθεση του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH <sub>2</sub> -4'-Mebpy	75
4.7.6.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-COGHKCONH <sub>2</sub> -4'-Mebpy)Cl](PF <sub>6</sub> ) ( <b>7</b> )	75

4.7.7. Σύνθεση των συμπλόκων $[Ru(terpy)(4-COXCONH_2-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$ και $[Ru(terpy)(4-COXCONH_2-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ όπου X= Αλανίνη (5) και (6), GHK (8) και (9)	76
---	----

## Κεφάλαιο 5<sup>0</sup>. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ *cis-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl (1)*

5.1.1. Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Φωτοχημεία του συμπλόκου <i>cis-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl (1)</i>	79
5.1.1. Σύνθεση	79
5.1.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου	80
5.1.3. Φασματοσκοπία <sup>1</sup> H NMR	82
5.1.4. Φασματομετρία μάζας	83
5.1.5. Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους	84
5.2. Κυτταροτοξικές ιδιότητες του συμπλόκου <i>cis-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl</i>	88
5.3.1. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου <i>cis-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl</i> με DNA	90
5.3.1. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και στροφικού διχρωϊσμού	91
5.3.2. Φασματοσκοπία <sup>23</sup> Na και <sup>31</sup> P NMR	94
5.3.3. Καμπύλη τήξης του DNA	97
5.3.4. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης	98
5.3.5. Χρήση των περιοριστικών ενζύμων DraI και SmaI	100
5.3.6. Υγρή χρωματογραφία	102

## Κεφάλαιο 6<sup>0</sup>

### ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ *[Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (2) ΚΑΙ*

### *[Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) (3)*

6.1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός των $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$ (2) και $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ (3)	105
6.1.1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy	105
6.1.2. Σύνθεση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$ , $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$ και $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$	108

6.1.3. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2]^+$	119
6.2. Φωτοχημεία των συμπλόκων (2) και (3)	123
6.3. Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου (3) με DNA	127
6.4. Μελέτη της ακτινοβόλησης του συστήματος $\text{DNA}-[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$	133

## Κεφάλαιο 7<sup>ο</sup>

### *ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΠΥΡΙΔΙΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΡΟΥΘΗΝΙΟΥ ΜΕ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΚΑΙ ΠΕΠΤΙΔΙΑ*

7.1. Μελέτη πολυπυριδινικών συμπλόκων του ρουθηνίου με συζευγμένο το αμινοξύ αλανίνη	138
7.1.1. Σύνθεση με τη μέθοδο της στερεάς φάσης και χαρακτηρισμός των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{X}]^{+n}$ $\text{X}=\text{Cl}, \text{NO}, \text{NO}_2$	138
7.1.2. Φωτοχημεία του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$	149
7.1.3. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ (4) και $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ (6) με DNA	151
7.2. Μελέτη πολυπυριдино-συμπλόκων του ρουθηνίου με συζευγμένο το πεπτίδιο GHK	163
7.2.1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{X}]^{+n}$ $\text{X}=\text{Cl}$ (7), $\text{NO}$ (8), $\text{NO}_2$ (9)	163
7.2.2. Φωτοχημεία του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}]^{3+}$ (8)	175
7.2.3. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ (7) και $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ (9) με DNA	176

## Κεφάλαιο 8<sup>ο</sup>. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Περίληψη 195

Abstract 196

Βιβλιογραφία 197

Παράρτημα Ι 207

**Παράρτημα II**

215

**Παράρτημα III**

227

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<p><b>Σχήμα 1.1.</b> Δομές των αντικαρκινικών συμπλόκων του Ru με αμμίνες: α. fac- [RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], β. cis-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl και γ. κατιόν “ruthenium red”.</p>	8
<p><b>Σχήμα 1.2.</b> Δομές των αντικαρκινικών συμπλόκων του Ru με ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες: α. H<sub>2</sub>im{trans-[RuCl<sub>4</sub>(Him)<sub>2</sub>]}, β. H<sub>2</sub>ind{trans-[RuCl<sub>4</sub>(Hind-κN<sup>2</sup>)<sub>2</sub>]}.  <b>Σχήμα 1.3.</b> Δομές των αντικαρκινικών συμπλόκων του Ru με διμεθυλ-σουλφοξείδιο α. cis-[RuCl<sub>2</sub>(dmsO)<sub>4</sub>] και β. trans-[RuCl<sub>2</sub>(dmsO)<sub>4</sub>].</p>	9 10
<p><b>Σχήμα 1.4.</b> Υδρόλυση των συμπλόκων α. cis-[RuCl<sub>2</sub>(dmsO)<sub>4</sub>] και β. trans-[RuCl<sub>2</sub>(dmsO)<sub>4</sub>].</p>	10
<p><b>Σχήμα 1.5.</b> Σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων trans-Na[RuCl<sub>4</sub>(dmsO-S)(Him)] (NAMI) και trans-H<sub>2</sub>Im[RuCl<sub>4</sub>(dmsO-S)(Him)] (NAMI-A), (Him= ιμιδαζόλιο).</p>	12
<p><b>Σχήμα 1.6.</b> Πολυπυριдино- Υποκαταστάτες.</p>	12
<p><b>Σχήμα 1.7.</b> Χλωροπολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου με βιολογικό ενδιαφέρον.</p>	13
<p><b>Σχήμα 1.8.</b> Σχηματική αναπαράσταση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ βάσεων στη δομή του DNA.</p>	17
<p><b>Σχήμα 2.1.</b> Διάγραμμα μοριακών τροχιακών MO του μονοξειδίου του αζώτου.</p>	20
<p><b>Σχήμα 2.2.</b> α. Δεσμός σθένους και απεικονίσεις του NO. β. Δομή των νιτροσο-αλογονιδίων που έχουν κυρτό δεσμό X-N-O.</p>	22
<p><b>Σχήμα 2.3.</b> Απεικόνιση του ενζυματικού σχηματισμού του NO από την NOS συνθετάση και περιγραφή της βιολογικής δραστηρότητας και βιοχημείας του NO.</p>	26
<p><b>Σχήμα 2.4.</b> Απεικόνιση της χημείας του NO και των οξειδιοαναγωγικών του αντιδράσεων.</p>	30
<p><b>Σχήμα 2.5.</b> Απεικόνιση του σθένους του δεσμού μετάλλου-NO α. NO<sup>+</sup> και β. NO<sup>-</sup>.</p>	31
<p><b>Σχήμα 2.6.</b> Απεικόνιση των μοριακών τροχιακών d<sub>π</sub>-π* που συμμετέχουν στο δεσμό μετάλλου-NO.</p>	32
<p><b>Σχήμα 2.7.</b> Αντίδραση απόσπασης του NO από το σύμπλοκο [Ru(salen)Cl(NO)] με ακτινοβολήση.</p>	36
<p><b>Σχήμα 2.8.</b> Κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων α. [Ru(TPP)(NO)(OH)] και β. [Ru(TPP)(NO)(ONO)].</p>	37
<p><b>Σχήμα 2.9.</b> Δομές των συμπλόκων [RuCl<sub>3</sub>(NO)(imH)<sub>2</sub>], [RuCl<sub>3</sub>(NO)(imH)(H<sub>2</sub>O)], και [RuCl<sub>2</sub>(NO)(imH)<sub>3</sub>] (imH=ιμιδαζόλιο).</p>	38
<p><b>Σχήμα 2.10.</b> Κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων α. trans-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]<sup>+</sup> β. [Ru(NO)(terpy)(OMe)Cl], γ. [Ru(NO)(terpy)(OH)(NO<sub>2</sub>)], και δ. trans-(Cl,Cl)-[RuBr<sub>2</sub>(NO)(terpy)]<sup>+</sup>.</p>	41
<p><b>Σχήμα 2.11.</b> Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου [Ru(terpy)(L)(X)]<sup>n+</sup>, L= 2,2'-διπυριδυλαμίνη.</p>	41

Σχήμα 2.12. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[Ru(\text{phry})(\text{trpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_2$ .	42
Σχήμα 2.13. Δομή και πιθανός μηχανισμός καταστροφής του DNA μέσω των σωματιδίων $\text{N}_2\text{O}_3$ και το σχηματισμό διασταυρούμενου δεσμού dGuo-dGuo μέσω νιτροσυλικής απαμίνωσης.	46
Σχήμα 3.1. Αρχή της μεθόδου σύνθεσης σε στερεή φάση. Σφαίρα= πολυμερές υλικό, A= πρώτη μονάδα δόμησης, B= δεύτερη μονάδα δόμησης, AB= προϊόν.	51
Σχήμα 3.2. Δομή συμπλόκου του λευκοχρύσου με συζευγμένο ένα πεπτίδιο στο μόριο της αιθυλενοδιαμίνης.	53
Σχήμα 3.3. Δομή διπυρηνικού συμπλόκου του λευκοχρύσου.	54
Σχήμα 3.4. Δομή του $\Delta$ - $[Ru(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})]^{2+}$ με το συζευγμένο πεπτίδιο GHK.	55
Σχήμα 3.5. Σύνθεση σε στερεά φάση του $[Rh(\text{phi})_2(\text{agphen})]^{3+}$ .	56
Σχήμα 3.6. Δομή του συμπλόκου $[Rh(\text{phi})_2(\text{agphen})]^{3+}$ .	56
Σχήμα 3.7. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου $[Rh(\text{phi})_2(\text{agphen})]^{3+}$ με το DNA.	57
Σχήμα 3.8. Δομή του συμπλόκου $[Rh(\text{phi})_2(\text{bpy}')]^{3+}$ με το συζευγμένο δωδεκαπεπτίδιο.	57
Σχήμα 5.1. Αντίδραση σύνθεσης του συμπλόκου $\text{cis}-(\text{Cl},\text{Cl})-[RuCl_2(\text{NO})(\text{terpy})]Cl$ (1).	79
Σχήμα 5.2. Νιτροσυλ-σύμπλοκα του ρουθηνίου με τερπυριδίνη βάσει των συχνοτήτων δόνησης τάσης του δεσμού N-O.	80
Σχήμα 5.3. Φάσμα IR του συμπλόκου (1) στο οποίο παρουσιάζεται η ταινία απορρόφησης που οφείλεται στην δόνηση τάσης του δεσμού N-O.	81
Σχήμα 5.4. ESI-MS φάσμα του συμπλόκου $\text{cis}-(\text{Cl},\text{Cl})-[RuCl_2(\text{NO})(\text{terpy})]Cl$ (1).	83
Σχήμα 5.5. Φάσμα υπεριώδους-ορατού του συμπλόκου $\text{cis}-(\text{Cl},\text{Cl})-[RuCl_2(\text{terpy})(\text{NO})]Cl$ (1) σε $\text{CH}_3\text{CN}$ κατά την ακτινοβόληση του με λάμπα υδραργύρου.	84
Σχήμα 5.6. ESI-MS φάσμα του κατιόντος $[RuCl_2(\text{terpy})]^+$ .	86
Σχήμα 5.7. Μηχανισμός απόσπασης του NO από το σύμπλοκο $\text{cis}-[RuCl(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$ κατά την ακτινοβόληση του.	87
Σχήμα 5.8. Χρωματογράφημα του DNA θυμοειδή αδένα.	90
Σχήμα 5.9. Φάσμα υπεριώδους-ορατού προσδιορισμού της συγκέντρωσης του DNA.	91
Σχήμα 5.10. Φάσμα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (1) σε αναλογία $r=[Ru]/[DNA]=0.1$ και σύγκριση με το θεωρητικό φάσμα.	92
Σχήμα 5.11. Φάσμα στροφικού διχρωϊσμού του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου $\text{cis}-(\text{Cl},\text{Cl})-[RuCl_2(\text{terpy})(\text{NO})]Cl$ (1).	93
Σχήμα 5.12. Φάσμα $^{31}\text{P}$ NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου $\text{cis}-(\text{Cl},\text{Cl})-[RuCl_2(\text{terpy})(\text{NO})]Cl$ (1) σε διάφορες αναλογίες r.	95
Σχήμα 5.13. Φάσμα $^{23}\text{Na}$ -NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου $\text{cis}-(\text{Cl},\text{Cl})-[RuCl_2(\text{terpy})(\text{NO})]Cl$ (1) σε διάφορες αναλογίες r.	96
Σχήμα 5.14. Καμπύλες τήξης του DNA απουσία και παρουσία του συμπλόκου $\text{cis}-(\text{Cl},\text{Cl})-[RuCl_2(\text{NO})(\text{terpy})]Cl$ (1).	98

<b>Σχήμα 5.15.</b> Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA (α) pUC9 και με τη προσθήκη του cis-(Cl,Cl)-[RuCl <sub>2</sub> (terpy)(NO)]Cl σε αναλογία (β) r = 0.1, (γ) r = 0.3, (δ) r = 0.5, (ε) r = 0.7, (ζ) r = 1 (r = [Ru]/[DNA]).	99
<b>Σχήμα 5.16.</b> Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA κατά την υδρόλυση του με τα ένζυμα DraI and SmaI. (α) DNA (β) r = 0.1, (γ) r = 0.3, (δ) φρέσκο διάλυμα DNA (r = [Ru]/[ξενος βάσης]). Οι αστερίσκοι αναφέρονται στις ασθενείς ταινίες που δεν αναγνωρίστηκαν από το ένζυμο.	101
<b>Σχήμα 5.17.</b> Χρωματογράφημα του DNA και του συστήματος DNA-[Ru].	102
<b>Σχήμα 6.1.</b> Αντίδραση σύνθεσης του υποκαταστάτη 4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy.	105
<b>Σχήμα 6.2.</b> Φάσμα υπερύθρου του υποκαταστάτη 4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy.	106
<b>Σχήμα 6.3.</b> <sup>1</sup> H-NMR του υποκαταστάτη 4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy.	107
<b>Σχήμα 6.4.</b> Φάσμα ESI-MS του υποκαταστάτη 4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy.	107
<b>Σχήμα 6.5.</b> Αντίδραση σύνθεσης του συμπλόκου [Ru(terpy)Cl <sub>3</sub> ].	108
<b>Σχήμα 6.6.</b> Αντίδραση σύνθεσης του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)Cl] <sup>+</sup> .	108
<b>Σχήμα 6.7.</b> Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)Cl](PF <sub>6</sub> ).	109
<b>Σχήμα 6.8.</b> Ισομερή θέσης cis και trans του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)Cl](PF <sub>6</sub> ).	109
<b>Σχήμα 6.9.</b> LC-MS των ισομερών θέσης cis και trans του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)Cl](PF <sub>6</sub> ).	110
<b>Σχήμα 6.10.</b> Αντιδράσεις σύνθεσης των συμπλόκων (2) και (3).	112
<b>Σχήμα 6.11.</b> Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)NO] <sup>+3</sup> .	113
<b>Σχήμα 6.12.</b> Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> .	114
<b>Σχήμα 6.13.</b> ESI-MS του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)NO <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ).	114
<b>Σχήμα 6.14.</b> Φάσματα υπεριώδους-ορατού των συμπλόκων (2) και (3).	115
<b>Σχήμα 6.15.</b> Φάσμα 2D-NMR του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy)NO](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> σε D <sub>2</sub> O pH 3.4.	118
<b>Σχήμα 6.16.</b> Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου (3).	119
<b>Σχήμα 6.17.</b> Δεσμοί υδρογόνου της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου (3).	120
<b>Σχήμα 6.18.</b> Μοναδιαία κυψελίδα του συμπλόκου (3).	120
<b>Σχήμα 6.19.</b> Φάσματα υπεριώδους-ορατού της ακτινοβόλησης του συμπλόκου (2) σε A. CH <sub>3</sub> CN, B. ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 3.	123
<b>Σχήμα 6.20.</b> Φάσμα υπεριώδους-ορατού της ακτινοβόλησης του συμπλόκου (3) σε CH <sub>3</sub> CN.	126
<b>Σχήμα 6.21.</b> LC-MS του φωτοπροϊόντος κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου (3).	126
<b>Σχήμα 6.22.</b> Φάσματα υπεριώδους-ορατού των συμπλόκων (2) και (3) σε pH=7.	127
<b>Σχήμα 6.23.</b> Φάσματα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (3) σε αναλογία r=[Ru]/[DNA]=0.1 και σύγκριση με το θεωρητικό φάσμα.	128
<b>Σχήμα 6.24.</b> Φάσμα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (3)	



σε διάφορες αναλογίες $r=[Ru]/[DNA]$ .	129
<b>Σχήμα 6.25.</b> Φάσματα $^{31}P$ και $^{23}Na$ NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (3) σε διάφορες αναλογίες $r$ .	130
<b>Σχήμα 6.26.</b> Καμπύλες τήξης του DNA απουσία και παρουσία του συμπλόκου (3).	132
<b>Σχήμα 6.27.</b> Χρωματογράφημα του DNA με και χωρίς ακτινοβολία.	133
<b>Σχήμα 6.28.</b> Χρωματογράφημα του DNA και του συστήματος $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$ (3)-DNA μετά την ακτινοβολία του με λάμπα υδραργύρου.	134
<b>Σχήμα 6.29.</b> Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (3) και την ακτινοβολία του με λάμπα υδραργύρου.	135
<b>Σχήμα 6.30.</b> Φάσματα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (3) με και χωρίς ακτινοβολία.	136
<b>Σχήμα 7.1.</b> Μη επιτυχής αντίδραση σύζευξης της αλανίνης στο σύμπλοκο του ρουθηνίου.	138
<b>Σχήμα 7.2.</b> Επιτυχής αντίδραση σύζευξης της αλανίνης στο σύμπλοκο του ρουθηνίου.	139
<b>Σχήμα 7.3.</b> Αντίδραση σύζευξης της αλανίνης στο σύμπλοκο του ρουθηνίου.	140
<b>Σχήμα 7.4.</b> Φάσμα ESI-MS του υποκαταστάτη $4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy$ .	141
<b>Σχήμα 7.5.</b> Αντίδραση σύνθεσης των συμπλόκων (5) και (6).	142
<b>Σχήμα 7.6.</b> Φάσμα ESI-MS του κατιονικού συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)Cl]^+$ .	143
<b>Σχήμα 7.7.</b> Φάσμα ESI-MS του κατιονικού συμπλόκου (6).	143
<b>Σχήμα 7.8.</b> Φάσματα υπεριώδους ορατού των συμπλόκων (4), (5) και (6).	144
<b>Σχήμα 7.9.</b> Φάσμα υπεριώδους ορατού του συμπλόκου (5) με τη χαρακτηριστική δόνηση τάσης του δεσμού N-O.	146
<b>Σχήμα 7.10.</b> Τμήμα του δισδιάστατου φάσματος του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$ .	148
<b>Σχήμα 7.11.</b> Τμήμα του δισδιάστατου φάσματος του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ .	149
<b>Σχήμα 7.12.</b> Φάσματα υπεριώδους-ορατού της ακτινοβολίας του συμπλόκου (5) σε $CH_3CN$ .	150
<b>Σχήμα 7.14.</b> Φάσματα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (4) σε διάφορες αναλογίες $r=[Ru]/[DNA]$ .	152
<b>Σχήμα 7.15.</b> Φάσματα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (6) σε διάφορες αναλογίες $r=[Ru]/[DNA]$ .	153
<b>Σχήμα 7.16.</b> Φάσμα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (4) σε διάφορες αναλογίες $r=[Ru]/[DNA]$ .	153
<b>Σχήμα 7.17.</b> Φάσμα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (6)	

σε διάφορες αναλογίες $r=[Ru]/[DNA]$ .	155
<b>Σχήμα 7.18.</b> Καμπύλες τήξης του DNA απουσία και παρουσία των συμπλόκων (4) και (6).	156
<b>Σχήμα 7.19.</b> Φάσματα $^{23}Na$ NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (4) σε διάφορες αναλογίες $r$ .	157
<b>Σχήμα 7.20.</b> Φάσματα $^{23}Na$ NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (6) σε διάφορες αναλογίες $r$ .	159
<b>Σχήμα 7.21.</b> Φάσματα $^{31}P$ του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (4) σε διάφορες αναλογίες $r$ .	160
<b>Σχήμα 7.22.</b> Φάσματα $^{31}P$ του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (6) σε διάφορες αναλογίες $r$ .	162
<b>Σχήμα 7.23.</b> Δομή του πεπτιδίου GHK.	163
<b>Σχήμα 7.24.</b> Φάσμα ESI-MS του πεπτιδίου GHK.	163
<b>Σχήμα 7.25.</b> Σύνθεση του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-COGHKCONH_2-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$ Με την τεχνική της στερεάς φάσης.	164
<b>Σχήμα 7.26.</b> Φάσμα ESI-MS του 4-COGHKCONH <sub>2</sub> -4'-Mebpy.	165
<b>Σχήμα 7.27.</b> MALDI-TOF MS του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-COGHKCONH_2-4'-Mebpy)Cl]$ (7). (α) Σύγκριση με το θεωρητικό φάσμα (β) Πειραματικό φάσμα.	166
<b>Σχήμα 7.28.</b> Δομή των ισομερών θέσης I και II του συμπλόκου (7).	167
<b>Σχήμα 7.29.</b> Τμήμα του δισδιάστατου φάσματος του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-COGHKCONH_2-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$ .	169
<b>Σχήμα 7.30.</b> Αντίδραση σύνθεσης των συμπλόκων (8) και (9).	171
<b>Σχήμα 7.31.</b> MALDI-TOF MS του συμπλόκου (9) στο οποίο φαίνεται η ισοτοπική κατανομή του ρουθηνίου.	172
<b>Σχήμα 7.32.</b> Φάσμα υπερίθρου του συμπλόκου (8) με τη χαρακτηριστική δόνηση τάσης του δεσμού N-O.	172
<b>Σχήμα 7.33.</b> Τμήμα του δισδιάστατου φάσματος του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-COGHKCONH_2-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ .	174
<b>Σχήμα 7.34.</b> Φάσματα υπεριώδους-ορατού της ακτινοβόλησης του συμπλόκου (8).	175
<b>Σχήμα 7.35.</b> Φάσματα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (7) σε διάφορες αναλογίες.	177
<b>Σχήμα 7.36.</b> Φάσματα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (9) σε διάφορες αναλογίες.	178
<b>Σχήμα 7.37.</b> Φάσμα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (7) σε διάφορες αναλογίες $r=[Ru]/[DNA]$ .	179
<b>Σχήμα 7.38.</b> Φάσμα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (9) σε διάφορες αναλογίες $r=[Ru]/[DNA]$ .	180

<b>Σχήμα 7.39.</b> Φάσματα $^{23}\text{Na}$ και $^{31}\text{P}$ NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (7) σε διάφορες αναλογίες r.	182
<b>Σχήμα 7.40.</b> $^{31}\text{P}$ NMR φάσμα του DNA κατά τη προσθήκη του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ σε διάφορες αναλογίες.	183
<b>Σχήμα 7.41.</b> $^{23}\text{Na}$ NMR φάσμα του DNA κατά τη προσθήκη του συμπλόκου (9) σε διάφορες αναλογίες.	185
<b>Σχήμα 7.42.</b> $^{31}\text{P}$ NMR φάσμα του DNA κατά τη προσθήκη του συμπλόκου(9) σε διάφορες αναλογίες.	186
<b>Σχήμα 7.43.</b> Καμπύλες τήξης του DNA απουσία και παρουσία των συμπλόκων (7) και (9).	187
<b>Σχήμα 7.44.</b> Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA (α) pUC9, και με τη προσθήκη του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ σε αναλογίες (β) $r = 0.1$ , (γ) $r = 0.3$ , (δ) $r = 0.5$ ( $r = [\text{Ru}]/[\text{DNA}]$ ).	189
<b>Σχήμα 7.45.</b> Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA κατά την υδρόλυση του με τα ένζυμα DraI and SmaI.	191

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 5.1.</b> Χαρακτηριστικές ταινίες του φάσματος υπερύθρου του συμπλόκου $\text{cis-(Cl,Cl)-[RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})\text{Cl}$ .	82
<b>Πίνακας 5.2.</b> Χημικές μετατοπίσεις (ppm) $^1\text{H}$ NMR των πρωτονίων του συμπλόκου $\text{cis-(Cl,Cl)-[RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})\text{Cl}$ σε $\text{DMSO-d}_6$ .	83
<b>Πίνακας 5.3.</b> Οι τιμές $\text{IC}_{50}$ του συμπλόκου $\text{cis-(Cl,Cl)-[RuCl}_2(\text{terpy})(\text{NO})\text{Cl}$ και άλλων ανάλογων συμπλόκων έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A2780 και A2780cisR.	89
<b>Πίνακας 6.1.</b> Χαρακτηριστικές ταινίες IR των προϊόντων της σύνθεσης του 4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy.	105
<b>Πίνακας 6.2.</b> Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων κατά τη σύνθεση του 4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy.	106
<b>Πίνακας 6.3.</b> Χημικές μετατοπίσεις των ισομερών του $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ .	111
<b>Πίνακας 6.4.</b> Χαρακτηριστικές ταινίες των φασμάτων υπεριώδους-ορατού των συμπλόκων (2) και (3) σε άνυδρο $\text{CH}_3\text{CN}$ .	116
<b>Πίνακας 6.5.</b> Χημικές μετατοπίσεις των ισομερών του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ .	117
<b>Πίνακας 6.6.</b> Χημικές μετατοπίσεις του II ισομερούς του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ .	119
<b>Πίνακας 6.7.</b> Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ .	121
<b>Πίνακας 6.8.</b> Σημαντικότερα μήκη δεσμών και γωνίες της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου (3).	122

<b>Πίνακας 7.1.</b> Χαρακτηριστικές ταινίες των φασμάτων υπεριώδους-ορατού των συμπλόκων (4), (5) και (6).	145
<b>Πίνακας 7.2.</b> $^1\text{H}$ NMR (300 MHz) χημικές μετατοπίσεις για τα δυο ισομερή του συμπλόκου (4).	147
<b>Πίνακας 7.3.</b> $^1\text{H}$ NMR (300 MHz) χημικές μετατοπίσεις για τα δυο ισομερή του συμπλόκου (6).	148
<b>Πίνακας 7.4.</b> $^1\text{H}$ NMR (300 MHz) χημικές μετατοπίσεις (δ ως προς το TMS) για τα δυο ισομερή σύμπλοκα (7).	168
<b>Πίνακας 7.5.</b> $^1\text{H}$ NMR (300 MHz) χημικές μετατοπίσεις (δ ως προς το TMS) για τα δυο ισομερή σύμπλοκα (9).	173

## Σκοπός

Μετά τη ανακάλυψη των αντικαρκινικών ιδιοτήτων των ενώσεων του λευκοχρύσου, πολλοί ερευνητές σε όλο τον κόσμο ασχολήθηκαν με την ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών ενώσεων, βασισμένων σε διάφορα μεταλλικά ιόντα. Σήμερα, υπάρχει διάχυτο ενδιαφέρον στο πεδίο της έρευνας νέων φαρμάκων και άλλων μετάλλων εκτός του λευκοχρύσου, ενώ έχει αποδειχτεί ότι αρκετά σύμπλοκα του ρουθηνίου επιδεικνύουν σημαντική δραστικότητα σε διάφορους τύπους όγκων.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη νέων συμπλόκων ενώσεων του ρουθηνίου, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν μια νέα τάξη φαρμάκων. Η νέα αυτή τάξη φαρμάκων μπορεί να περιλαμβάνει σύμπλοκες ενώσεις του ρουθηνίου με αντικαρκινική δραστικότητα αλλά και φωτοδραστικές ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην φωτοθεραπεία. Για το λόγο αυτό, συντέθηκαν σύμπλοκες ενώσεις του ρουθηνίου που περιέχουν νιτροσυλ- και νιτρο- υποκαταστάτες και εξετάστηκαν οι αλληλεπιδράσεις τους με το DNA. Επίσης, εξετάστηκε η δραστικότητα ορισμένων συμπλόκων έναντι κάποιων καρκινικών κυτταρικών σειρών με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα.

Τα μεταλλοπεπίδια, αποτελούν μια τάξη πολύ σημαντικών μορίων που μιμούνται βιολογικά μόρια (μεταλλοπρωτεΐνες, ενεργά κέντρα ενζύμων κ.λ.π.) και αποτελούν αντικείμενο σημαντικής έρευνας σήμερα από πολλά επιστημονικά πεδία. Το συνεχές ενδιαφέρον στο σχεδιασμό μικρών μορίων, τα οποία μπορούν να δεσμευτούν εκλεκτικά στο DNA και να επηρεάσουν την μεταγραφή και μετάφραση του αποτέλεσε ένα ακόμη κίνητρο για τη σύνθεση και τη μελέτη των συμπλόκων ενώσεων του ρουθηνίου που παρουσιάζονται στην διατριβή αυτή. Σκοπός, λοιπόν, τη διατριβής αυτής είναι η ανακάλυψη νέων δραστικών ενώσεων που φέρουν βιολογικά μόρια, όπως τα αμινοξέα ή τα πεπίδια, τα οποία αναγνωρίζουν ορισμένες αλληλουχίες του DNA και δεσμεύονται σε αυτές με διάφορου είδους αλληλεπιδράσεις.

*Το σύγγραμμα αυτό είναι  
αφιερωμένο στους γονείς μου*

# *A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ*

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

---

ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΡΟΥΘΗΝΙΟΥ  
ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ

---

## 1.1. Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες, η ανακάλυψη ότι πολλά μεταλλικά ιόντα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε διάφορα βιολογικά συστήματα οδήγησε στο ερώτημα αν τα μεταλλικά ιόντα και η χημεία ένταξης τους, μπορούν να συσχετιστούν και να συνεισφέρουν στο πεδίο της ιατρικής και φαρμακευτικής έρευνας. Η ιδέα ύπαρξης φαρμάκων που περιέχουν μεταλλικά ιόντα είχε θεωρηθεί μη ρεαλιστική λόγω των γνωστών τοξικών αποτελεσμάτων των μετάλλων και ιδιαίτερα των βαρέων μετάλλων. Η κατανόηση του ρόλου των μεταλλικών ιόντων στα βιολογικά συστήματα αποτελεί το γενικότερο πεδίο της Βιοανόργανης Χημείας. Τα σημερινά ερευνητικά αντικείμενα του πεδίου περιλαμβάνουν τη διευκρίνιση της λειτουργίας μεταλλοενζύμων, την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών και αντιϊκών μεταλλικών συμπλόκων, το ρόλο των συμπλόκων των λανθανιδίων κ.α. στη διαγνωστική, τα βιομημικά υλικά κ.α.

Ο όρος χημειοθεραπεία ορίστηκε από τον Paul Ehrlich και αναφέρεται στην χρήση φαρμάκων για την εξόντωση ενός εισβολέα χωρίς να προσβληθεί ο φιλοξενών οργανισμός. Στην χημειοθεραπεία συμβαίνουν μη αντιστρεπτές διαδικασίες π.χ ο θάνατος του κυττάρου. Η απαίτηση για μη αντιστρεπτές διαδικασίες διακρίνει τα χημειοθεραπευτικά από τα φάρμακα, τα οποία τροποποιούν τις βιολογικές αντιδράσεις ή μεταβάλλουν αντιστρεπτά την βιοχημεία στον οργανισμό, χωρίς την αναγκαιότητα του θανάτου του κυττάρου.

Πολλά μέταλλα και μεταλλικές ενώσεις (όπως χρυσός, σίδηρος, ψευδάργυρος, υδράργυρος ή βισμούθιο) έχουν χρησιμοποιηθεί ως φάρμακα από την αρχαιότητα περισσότερο λόγω των ασυνήθιστων ιδιοτήτων τους παρά από την γνώση των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Είναι αξιοσημείωτο, ότι πριν 100 χρόνια μεταξύ των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ήταν ενώσεις που περιέχουν μέταλλα, όπως η αρσεναμίνη (οργανοαρσένικη ένωση) ενάντια στην σύφιλη και ενώσεις του χρυσού ενάντια στην σύφιλη και την αρθρίτιδα. Από τότε που ανακαλύφθηκε η αντικαρκινική δράση του *cisplatin*<sup>1,2</sup> (*cis*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), έγινε γενικά αποδεκτό ότι κάποια στοιχεία παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε βιολογικές λειτουργίες. Ας σημειωθεί, ότι πολλές οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην ιατρική ως φάρμακα, όπως η μπλεομυκίνη και η ανθρακυκλίνη, έχουν ένα μηχανισμό δράσης που περιλαμβάνει και ανόργανα στοιχεία. Μερικές από αυτές ενεργοποιούνται από



μεταλλικά ιόντα ή μεταλλοένζυμα και άλλες έχουν άμεση ή έμμεση επίδραση στον μεταβολισμό μεταλλικών ιόντων.

Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης σε μοριακό επίπεδο των φαρμάκων που περιέχουν μέταλλα, αποτελεί το κλειδί για την ανάπτυξη νέων πιο αποτελεσματικών φαρμάκων. Έτσι, είναι αναγκαίο, να μελετηθεί η χημεία αυτών των φαρμάκων σε συνθήκες ανάλογες εκείνων που επικρατούν στον οργανισμό. Μετά τη ανακάλυψη των αντικαρκινικών ιδιοτήτων των ενώσεων του λευκοχρύσου, πολλοί ερευνητές σε όλο τον κόσμο ασχολήθηκαν με τους μηχανισμούς δράσης των συμπλόκων ενώσεων του λευκοχρύσου αλλά και άλλων μετάλλων από μια φαρμακολογική και βιολογική σκοπιά. Το *cisplatin* και άλλα ανάλογα του, όπως το *carboplatin*, είναι σήμερα τα γνωστότερα και περισσότερο χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα. Είναι τόσο καλά μελετημένο, ώστε μας παρέχει πολύτιμη βοήθεια για περαιτέρω ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών ενώσεων, βασισμένων σε διάφορα μεταλλικά ιόντα.

Οι μεταστάσεις των στερεών όγκων αποτελούν, ίσως, το σημαντικότερο λόγο για την αποτυχία θεραπείας του καρκίνου. Πράγματι, ενώ αντιμετωπίζονται μάλλον επιτυχώς χειρουργικά και με ακτινοθεραπεία σε αρχικά στάδια, πολλοί όγκοι αναπτύσσουν μεταστάσεις σε άλλα σημεία, οι οποίοι ανεξάρτητα από το αποτέλεσμα της αρχικής θεραπείας οδηγούν σε νέους όγκους. Εξαιτίας του διασπαρμένου εντοπισμού τους, η φαρμακευτική αγωγή μοιάζει να είναι η καλύτερη επιλογή για την αντιμετώπιση και θεραπεία τους. Θεωρητικά, τα φάρμακα μπορούν να κατανεμηθούν στον ανθρώπινο οργανισμό και να αντιμετωπίσουν τις μεταστάσεις σε κάθε δυνατό σημείο. Τα φάρμακα αυτά, που συνήθως αλληλεπιδρούν με την αναπαραγωγή των κυττάρων μέσω ενός κυτταροτοξικού μηχανισμού που τις περισσότερες φορές σχετίζεται με την αλληλεπίδραση με το DNA ή με σχετικούς μηχανισμούς της διαίρεσης των κυττάρων, είναι δυστυχώς πολύ λίγο εκλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα και για αυτό έχουν υψηλή τοξικότητα. Πράγματι, πρέπει να τονιστεί ότι τα φάρμακα αυτά έχουν κλινικά μελετηθεί χρησιμοποιώντας μοντέλα *in vitro* και *in vivo* με βασικό στόχο την παρεμπόδιση της ανάπτυξης αρχικών όγκων. Τις τελευταίες δυο δεκαετίες, οι έρευνες έχουν στραφεί στην μελέτη της ιδιαιτερότητας της μετάστασης των στερεών όγκων και στην διαφορετική χημική ευαισθησία που παρουσιάζουν στα κυτταροτοξικά αντιδραστήρια σε σχέση με τους αρχικούς. Έτσι λοιπόν, τα ειδικά αντιμεταστατικά φάρμακα αποτελούν σήμερα πρώτης προτεραιότητας φάρμακα.

Το επίπεδο τετραγωνικό σύμπλοκο του λευκοχρύσου  $cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$  *cisplatin* αποτελεί το σημαντικότερο αντικαρκινικό φάρμακο στην χημειοθεραπεία του καρκίνου <sup>1,2</sup>. Το σύμπλοκο αυτό παρουσιάζει υψηλή θεραπευτική ικανότητα έναντι του καρκίνου των γεννητικών οργάνων και αυξάνει σημαντικά την ζωή των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, του λαιμού, του εγκεφάλου, καρκίνων αίματος και οστεοσαρκώματος. Παρόλο αυτά, κάποιες περιπτώσεις καρκίνων παρουσιάζουν σημαντική αντίσταση στο *cisplatin*. Για παράδειγμα, το φάρμακο αυτό επιδεικνύει πολύ μικρή και όχι ικανοποιητική δραστηριότητα έναντι περιπτώσεων καρκίνου με σημαντικές επιπτώσεις, όπως σε καρκίνους πνευμόνων και αδενοκαρκινώματα τα οποία αποτελούν το 30 % των θανάτων από καρκίνο <sup>3</sup>.

Η αποτελεσματικότητα του *cisplatin* περιορίζεται από ισχυρές τοξικές παρενέργειες, ενώ η δεύτερη και τρίτη γενιά φαρμάκων λευκοχρύσου παρόλο που έχουν βελτιωμένες ιδιότητες, όπως η χαμηλότερη τοξικότητα, δεν φαίνονται να διευρύνουν και να βελτιώνουν σημαντικά το φάσμα δράσης του φαρμάκου. Όσο αφορά το μηχανισμό δράσης, είναι πλέον παραδεκτό ότι ο αρχικός στόχος των φαρμάκων του λευκοχρύσου είναι το DNA.

Η παραπάνω διαπίστωση έχει διεγείρει το ενδιαφέρον των ερευνητών εδώ και αρκετό καιρό για ανακαλύψεις φαρμάκων όχι μόνο του λευκοχρύσου <sup>4,5</sup>, αλλά και άλλων μετάλλων. Πολλές διαφορετικές σειρές συμπλόκων και οργανομεταλλικών παραγώγων έχουν μελετηθεί σε διάφορα μοντέλα καρκίνου και μερικά από αυτά έχουν βρεθεί πολλά υποσχόμενα, όπως κάποια παράγωγα του κασσίτερου <sup>6,7</sup>, χρυσού <sup>8</sup>, τιτανίου <sup>9</sup>, και ειδικά ρουθηνίου <sup>9</sup>. Δραστικά σύμπλοκα άλλων μετάλλων φαίνεται να έχουν μηχανισμό δράσης, βιοκατανομή και τοξικότητα διαφορετική από αυτή των φαρμάκων του λευκοχρύσου και έτσι μπορούν να αποτελέσουν δραστικά και αποτελεσματικά παράγωγα σε περιπτώσεις καρκίνων που παρουσιάζουν αντίσταση σε αυτά του λευκοχρύσου. Έχει αποδειχτεί ότι αρκετά σύμπλοκα του ρουθηνίου με υποκαταστάτες αζώτου όχι μόνο επιδεικνύουν σημαντική δραστηριότητα σε διάφορους τύπους όγκων, αλλά μερικά από αυτά εντοπίζονται και εκλεκτικά σε ιστούς όγκων <sup>9-11</sup>. Οι σημαντικές δομικές διαφορές μεταξύ των συμπλόκων ρουθηνίου και των αντικαρκινικών συμπλόκων του λευκοχρύσου υπόσχονται ικανοποιητικά αποτελέσματα για τον σχεδιασμό νέων εναλλακτικών φαρμάκων. Τα αντικαρκινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου είναι εξαιρουμένα με οκταεδρική γεωμετρία αντίθετα με την τετραγωνική επίπεδη διάταξη των υποκαταστατών του λευκοχρύσου. Επιπρόσθετα, οι δυο επιπλέον θέσεις ένταξης που υπάρχουν στα σύμπλοκα του

ρουθηνίου σε σύγκριση με αυτά του λευκοχρύσου, μπορούν να επιτρέψουν νέα είδη αλληλεπίδρασης με ενδοκυτταρικούς στόχους.

## 1.2. Ρουθίνιο

Στις αρχές του 1840 ο Carl Ernst Claus μελέτησε τα μεταλλεύματα από την ανάκτηση του λευκοχρύσου στην Αγία Πετρούπολη και από αυτά απομόνωσε ένα καινούργιο μέταλλο, το οποίο ονόμασε ρουθίνιο με σεβασμό στην μελέτη του Osann τιμώντας την προέλευση του από την Ρωσία. (Ruthenia είναι το μεσαιωνικό Λατινικό όνομα της Ρωσίας).

Από το μίγμα που προκύπτει μετά τον μηχανικό εμπλουτισμό του λευκοχρυσικού μεταλλεύματος, το οποίο περιέχει και *Pt*, *Ir*, *Rh*, *Os* και *Ru* αποχωρίζεται το ρουθίνιο μετά την τήξη του μίγματος με  $\text{Na}_2\text{O}_2$ , εκχύλιση, απόσταξη και συλλογή μέσα σε υδροχλωρικό οξύ, οπότε παρασκευάζεται μίγμα τетроξειδίου του οσμίου και του ρουθηνίου. Τα μίγμα αυτό, υφίσταται πάλι απόσταξη και τελικά το ρουθίνιο παραμένει στο διάλυμα σε μορφή  $\text{RuCl}_3$ . Το διάλυμα αυτό εξουδετερώνεται με αμμωνία και στην συνέχεια ανάγεται και προκύπτει το μεταλλικό ρουθίνιο κατά την αντίδραση:



Το στοιχείο είναι σκληρό και αργυρόλευκο μέταλλο με σημείο τήξης  $2210^\circ\text{C}$ , σημείο ζέσεως  $3900^\circ\text{C}$  και ειδικό βάρος  $12,4 \text{ gr/cm}^3$ . Μπορεί να ληφθεί σε κατάσταση λεπτού διαμερισμού ύστερα από αναγωγή των ενώσεών τους. Μπορεί να γίνει εύκολα σκόνη, ενώ σε μεταλλική κατάσταση είναι εύθραυστο. Οποιοδήποτε οξύ, πυκνό ή αραιό εν θερμώ ή εν ψυχρώ, δεν επιδρά στο ρουθίνιο. Είναι ακόμα αδιάλυτο στο βασιλικό ύδωρ. Όταν βρίσκεται σε κατάσταση σκόνης, μπορεί να διαλυθεί στα οξέα, εφόσον προστεθεί στο διάλυμα μικρή ποσότητα οξειδωτικού αντιδραστηρίου, όπως για παράδειγμα  $\text{KClO}_3$ . Το μέταλλο προσβάλλεται σε υψηλή θερμοκρασία από το  $\text{O}_2$  και δίνει  $\text{RuO}_2$ .

Το ρουθίνιο έχει την ακόλουθη ηλεκτρονιακή δομή στην εξωτερική του στοιβάδα:  $4d^7 5s^1$ . Οι πιο συνηθισμένες οξειδωτικές καταστάσεις είναι οι +2 και +3, οι οποίες είναι αρκετά σταθερές. Απαντάται επίσης, και η οξειδωτική κατάσταση +4,

η οποία είναι λιγότερο σταθερή, όπως για παράδειγμα στην οκταεδρική ένωση  $K_2RuCl_6$ . Η οξειδωτική κατάσταση +7 είναι άκρως οξειδωτική και το οξυανιόν που αντιστοιχεί σε αυτή, το υπερρουθηνιακό ανιόν  $RuO_4^-$ , συμπεριφέρεται όπως το  $MnO_4^-$  ως προς την οξειδωτικότητα. Η οξειδωτική κατάσταση +8 είναι ασταθής. Το ρουθίνιο με οξειδωτικές καταστάσεις +2, +3, +4 παρουσιάζει συνήθως αριθμό ένταξης 6, ενώ η γεωμετρία των συμπλόκων του είναι οκταεδρική.

### 1.3. Βιολογική δράση συμπλόκων του Ρουθηνίου

Σε υδατικά διαλύματα, τα σύμπλοκα του ρουθηνίου υπάρχουν συνήθως με την +2 και +3 οξειδωτική του κατάσταση. Και στις δυο οξειδωτικές καταστάσεις το μέταλλο είναι συνήθως εξανυποκατεστημένο με οκταεδρική γεωμετρία. Όπως και ο λευκόχρυσος, έτσι και το ρουθίνιο, ως μαλακά οξέα κατά Lewis, παρουσιάζουν μια υψηλή εκλεκτικότητα για δότες άτομα αζώτου και θείου. Σύμπλοκα με τέτοιους υποκαστάτες προσέφεραν, τα τελευταία χρόνια, πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε βιολογικό επίπεδο. Με χρονολογική σειρά αναφέρονται στη συνέχεια οι κυριότερες ανακαλύψεις βιολογικά δραστικών συμπλόκων του Ρουθηνίου.

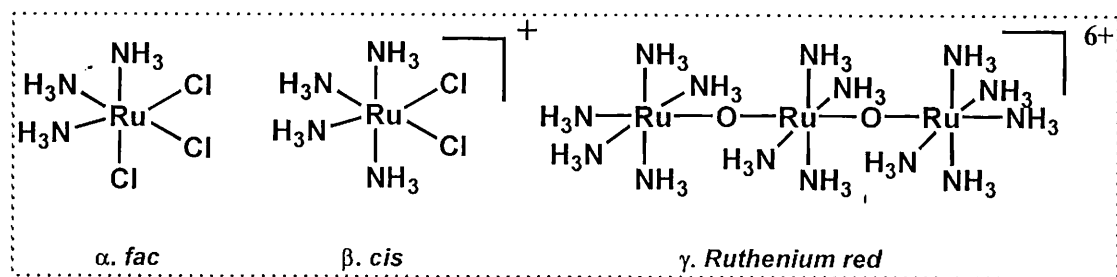
- 1980 Στα σύμπλοκα *fac*- $[RuCl_3(NH_3)_3]$  και *cis*- $[Ru(NH_3)_4Cl_2]Cl$  βρέθηκε *in vivo* αντικαρκινική δραστηριότητα σε ποντίκια <sup>12</sup>.
- 1984 Το σύμπλοκο *cis*- $[RuCl_2(Me_2SO)_4]$  βρέθηκε να εμφανίζει *in vivo* αντικαρκινική δραστηριότητα σε ποντίκια <sup>13</sup>.
- 1986 Τα σύμπλοκα  $[LH][trans-RuCl_4L_2]$  (L=ετεροκυκλικός υποκαταστάτης αζώτου) εμφανίζουν αντικαρκινική δραστηριότητα σε αρουραίους έναντι όγκων που παρουσίασαν αντίσταση σε θεραπεία με φάρμακα λευκοχρύσου <sup>14</sup>.
- 1988 Το σύμπλοκο *trans*- $[RuCl_2(Me_2SO)_4]$  εμφανίζει σημαντική αντιμεταστατική δραστηριότητα *in vivo* σε ποντίκια <sup>15</sup>.
- 1992 Το σύμπλοκο του τύπου  $Na[trans-RuCl_4(Me_2SO)(L)]$ , (L=μιδαζόλιο) εμφανίζει αντιμεταστατική δραστηριότητα έναντι επιθετικών μεταστάσεων του πνεύμονα σε ποντίκια <sup>16</sup>.
- 1995 Προτείνονται τα Ru(III)-πολυαμινοκαρβοξυλικά σύμπλοκα ως παγιδευτές του NO για την θεραπεία του σηπτικού σοκ <sup>17</sup>.

- 1995 Το σύμπλοκο *mer*-[Ru(terpy)Cl<sub>3</sub>] εμφανίζει σημαντική αντικαρκινική δραστικότητα σε ποντίκια και *in vitro* υψηλή κυτταροτοξικότητα <sup>18,19</sup>.
- 1995 Το σύμπλοκο [H][Ru<sup>III</sup>(H<sub>2</sub>pdta)Cl<sub>2</sub>] 4H<sub>2</sub>O (pdta= 1,2-προπυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) παρουσιάζει αντικαρκινική δραστικότητα σε ποντίκια και *in vitro* κυτταροτοξικότητα <sup>20</sup>.
- 1996 Σύμπλοκα του Ru(III) με ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες παρουσιάζουν ανοσοκατασταλτική δραστικότητα σε συγκεντρώσεις nmol <sup>21</sup>.

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί πολλές κλινικές δοκιμές, όπως για τα σύμπλοκα του ρουθηνίου με διμεθυλοσουλφοξείδιο και έχει παρατηρηθεί σημαντική πρόοδος στην χημειοθεραπεία του καρκίνου. Στην συνέχεια θα αναφερθούν τα πιο σημαντικά σύμπλοκα του ρουθηνίου με βιολογική δραστικότητα κατηγοριοποιώντας τα με βάση τους υποκαταστάτες τους.

- *Σύμπλοκα ρουθηνίου με αμίνες*

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των συμπλόκων του ρουθηνίου με αμίνες έχουν μελετηθεί διεξοδικά από τον Clarke και τους συνεργάτες του <sup>9</sup>. Τα αποτελέσματα αποτέλεσαν τη βάση για να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις συμπλόκων του ρουθηνίου με το DNA <sup>9</sup>. Το λεγόμενο « κόκκινο » ρουθίνιο (Σχήμα 1.1) παρουσιάζει μια σημαντική αντικαρκινική δραστικότητα, αλλά συγχρόνως αποτελεί και ένα δυναμικό παρεμποδιστή του μεταβολισμού του ασβεστίου, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε υψηλή νευροτοξικότητα και παράλυση. Η παρεμπόδιση αυτή έχει συνδεθεί με την καταστολή της ανάπτυξης του όγκου. Τα σύμπλοκα του Ru(III), [RuCl(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>]Cl<sub>2</sub>, *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl και *fac*-[RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] παρουσιάζουν αντικαρκινική δραστικότητα αυξανόμενη με την παραπάνω σειρά. Στην πραγματικότητα το τελευταίο σύμπλοκο προσεγγίζει την δραστικότητα του *cisplatin* στην κυτταρική σειρά λευχαιμίας P388<sup>12</sup>. Σε αναλογία με σύμπλοκα λευκοχρύσου με αμίνες το σύμπλοκο με τα τρία χλώρια *fac*-[RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] αποδείχτηκε, μεταξύ άλλων συμπλόκων Ru(III), ότι παρουσιάζει βακτηριακή επιμήκυνση σε ένα πρώτο στάδιο <sup>22</sup>.

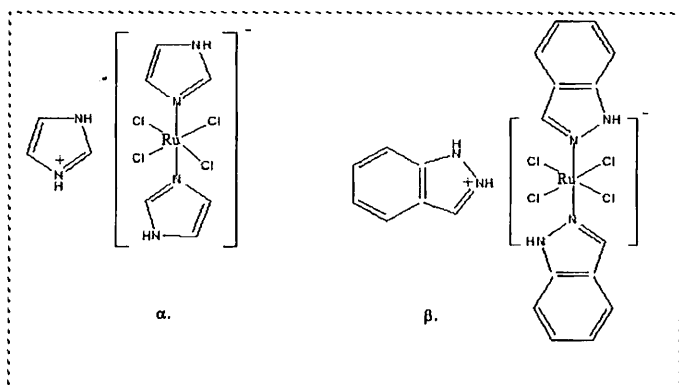


Σχήμα 1.1. Δομές των αντικαρκινικών συμπλόκων του Ru με αμίνες: α. *fac*-[RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], β. *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl και γ. κατιόν "ruthenium red".

Στην προσπάθεια να αναπτυχθεί μια τεχνική προσδιορισμού της αντικαρκινικής δραστηριότητας, ο Kelman και οι συνεργάτες του <sup>23</sup> μελέτησαν την επίδραση διαφόρων συμπλόκων του Ru(III) στην σύνθεση του DNA και βρήκαν ότι την μεγαλύτερη παρεμπόδιση προκάλεσαν τα σύμπλοκα *fac*-[RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] και *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl. Παρόλο που το σύμπλοκο *fac*-[RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] έδωσε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, εξαιτίας της μικρής διαλυτότητας του δεν αναπτύχθηκε ως αντικαρκινικό φάρμακο <sup>24, 9</sup>. Το σύμπλοκο *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl διαλύεται ικανοποιητικά στο νερό, αλλά ποτέ δεν πέρασε σε κλινικά στάδια και δεν μελετήθηκε λεπτομερώς.

- Σύμπλοκα ρουθηνίου με ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η καλή αντικαρκινική δραστηριότητα του *fac*-[RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] συνοδεύεται δυστυχώς, από μια φτωχή διαλυτότητα, η οποία το κάνει να υστερεί στην χρήση του ως φάρμακο. Αυτό το γεγονός, παρακίνησε τον Keppler και τους συνεργάτες του να συνθέσουν σύμπλοκα Ru(III) με λιγότερους υποκαταστάτες αζώτου και περισσότερους αλογονούχους υποκαταστάτες με αποτέλεσμα την ανακάλυψη ενώσεων με καλύτερη διαλυτότητα λόγω του ανιονικού τους φορτίου <sup>24</sup>. Οι γενικοί χημικοί τύποι είναι (HB)<sub>2</sub>[RuCl<sub>3</sub>B] και HB[*trans*-RuCl<sub>4</sub>B<sub>2</sub>], όπου το B αντιπροσωπεύει μια ετεροκυκλική βάση. Μια μεγάλη ποικιλία βάσεων έχει χρησιμοποιηθεί και αυτό οδήγησε σε ένα σύμπλοκο που παρουσίασε υψηλότερη δραστηριότητα από ότι το cisplatin εναντίον της λευχαιμίας P388. Αυτό είναι το ιμιδαζολικό σύμπλοκο, H<sub>2</sub>im[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(Him)<sub>2</sub>] (Him=ιμιδαζόλιο) μαζί με το ινδαζολικό παράγωγο του, τα οποία δείχνουν εξαιρετική δραστηριότητα *in vivo* σε όγκους ποντικών, που είναι ανεπηρέαστοι από το cisplatin.



Σχήμα 1. 2. Δομές των αντικαρκινικών συμπλόκων του Ru με ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες: α.  $H_2im\{trans-[RuCl_4(Him)_2]\}$ , β.  $H_2ind\{trans-[RuCl_4(Hind-\kappa N^2)_2]\}$ .

Και τα δύο σύμπλοκα (Σχήμα 1.2) βρίσκονται σε ένα προχωρημένο στάδιο κλινικών μελετών <sup>25</sup>. Το ινδαζολικό σύμπλοκο παρουσιάζει καλύτερη δραστηριότητα και μειωμένη τοξικότητα στην παραπάνω καρκινική κυτταρική σειρά από ότι το ιμιδαζολικό παράγωγο. Ο τρόπος δράσης τους φαίνεται να διαφέρει αν και ο μηχανισμός της βιολογικής δράσης τους δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Σε αντίθεση με το ινδαζολικό παράγωγο, το ιμιδαζολικό σύμπλοκο παραμένει σταθερό όταν διαλυθεί και επομένως οι περισσότερες μελέτες έχουν εφαρμοστεί κυρίως στο τελευταίο.

Η υδρόλυση του ιμιδαζολικού παραγώγου μελετήθηκε με φασματοσκοπία NMR <sup>26</sup> και βρέθηκε ότι οι δυο χλώρο υποκαταστάτες ανταλλάσσονται με μόρια νερού και αυτό οδηγεί σε *cis* και *trans* ισομερή σε μια αναλογία 1:1, ενώ οι ιμιδαζολικοί υποκαταστάτες διατηρούνται σε *trans* διαμόρφωση. Υδρολυμένα διαλύματα του ινδαζολικού παραγώγου παρεμποδίζουν την σύνθεση του DNA των κυττάρων, ενώ τα φρέσκα διαλύματα δεν έχουν καμία επίδραση <sup>27</sup>. Σε σύγκριση με το *cisplatin*, το ινδαζολικό σύμπλοκο δεσμεύεται πολύ γρήγορα (τάξη λεπτών) στην ανθρώπινη αποτρανσφερίνη και την αλβουμίνη του ορού του αίματος. Αντίθετα, το ιμιδαζολικό παράγωγο χρειάζεται ανάλογο χρόνο δέσμευσης με αυτό που χρειάζεται το *oisplatin* <sup>28</sup>. Οι διαφορές αυτές, μπορούν να εξηγήσουν την μεγαλύτερη τοξικότητα του ιμιδαζολικού από ότι του ινδαζολικού παραγώγου.

- Σύμπλοκα ρουθηνίου με διμεθυλοσουλφοξείδιο.

Πολύ νωρίς αναφέρθηκαν οι αντικαρκινικές ιδιότητες του συμπλόκου *cis*- $[RuCl_2(dms)_4]$  (*dms*= διμεθυλοσουλφοξείδιο) λόγω της ουδετερότητας του και της δομικής συσχέτισης του με το *cisplatin* <sup>29</sup>. Συγκρινόμενο με το *cisplatin*, το σύμπλοκο αυτό είναι λιγότερο τοξικό και έτσι μπορεί να χορηγηθεί σε μεγαλύτερη δόση. Σε μια



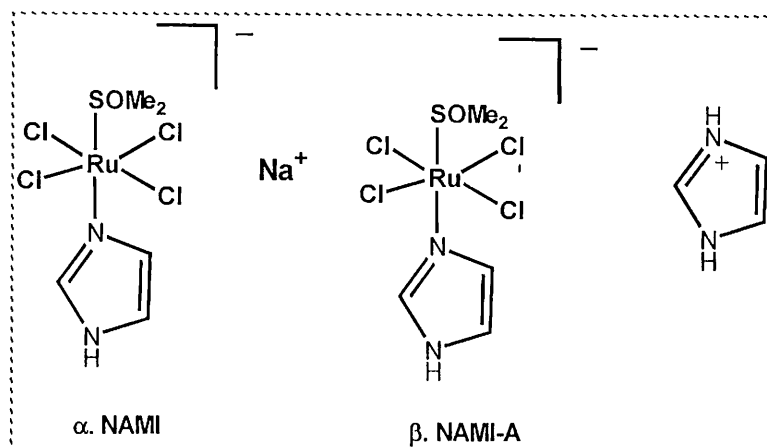


Από την άλλη μεριά, κατά την υδρόλυση του συμπλόκου *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(dmsο)<sub>4</sub>] προκύπτει το *fac* τριϋδρολυμένο ενδιάμεσο, το οποίο αντιδρά διαφορετικά από το *cis* ισομερές ακόμα και μετά την ένταξη ενός φωσφορικού ιόντος (Σχήμα 1.4). Έτσι, το *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(dmsο)<sub>4</sub>] είναι πιο ικανό να δεσμευτεί σε βιομόρια και έτσι να είναι πιο κυτταροτοξικό από το *cis* ισομερές.

Μια άλλη κατηγορία συμπλόκων του Ru με διμεθυλοσουλφοξείδιο είναι τα λεγόμενα σύμπλοκα NAMI και NAMI-A δηλαδή τα *trans*-Na[RuCl<sub>4</sub>(dmsο-S)(Him)] (Him= ιμιδαζόλιο) και *trans*-H<sub>2</sub>Im[RuCl<sub>4</sub>(dmsο-S)(Him)] (Σχήμα 1.5). Το NAMI (New Antitumor Metastasis Inhibitor) έδειξε μια αύξηση στην προσδοκούμενη διάρκεια ζωής μεγαλύτερη από το *cisplatin* σε καρκίνωμα Lewis των πνευμόνων, σε Mca καρκινώματα στήθους και μελάνωμα B16<sup>35</sup>. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στα καρκινικά αυτά μοντέλα, η διάρκεια επιβίωσης του ασθενούς βρίσκεται σε μια ισορροπία μεταξύ της αύξησης του αρχικού όγκου και της μετάστασης στον πνεύμονα, ήταν αρχικά αποδεκτό ότι το σύμπλοκο αυτό του ρουθηνίου ήταν αποτελεσματικό στο στάδιο της μετάστασης γεγονός που δεν ισχύει για το *cisplatin*<sup>35</sup>. Η αποτελεσματικότητα του NAMI στις μεταστάσεις πνευμόνων σε αρχικό και προηγμένο στάδιο όγκων βρίσκεται στην δραστική μείωση σχηματισμού μεταστάσεων. Η αστάθεια στην αποθήκευση του NAMI οδήγησε στην ανάπτυξη του NAMI-A, το οποίο βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές. Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τοξικότητα σε ασθενείς είναι ακόμα μικρότερη από αυτή που αναμενόταν από τις δοκιμές σε ζώα. Οι μεταστάσεις του καρκίνου είναι εξαιρετικά δύσκολο να αντιμετωπιστούν και για αυτό η αντιμεταστατική δραστικότητα των NAMI και NAMI-A αποτελεί μια πολύ σημαντική ανακάλυψη<sup>16, 35</sup>. Εντατική έρευνα έχει πραγματοποιηθεί για να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός δράσης της αντιμεταστατικής δραστικότητας τους<sup>16,35-40</sup>. Η αντιμεταστατική δραστικότητα του NAMI-A δεν προέρχεται από άμεσες κυτταροτοξικές επιδράσεις, ενώ προέκυψε ότι η αντιμεταστατική ικανότητα του NAMI δεν περιλαμβάνει ένταξη του στο DNA<sup>41</sup>.

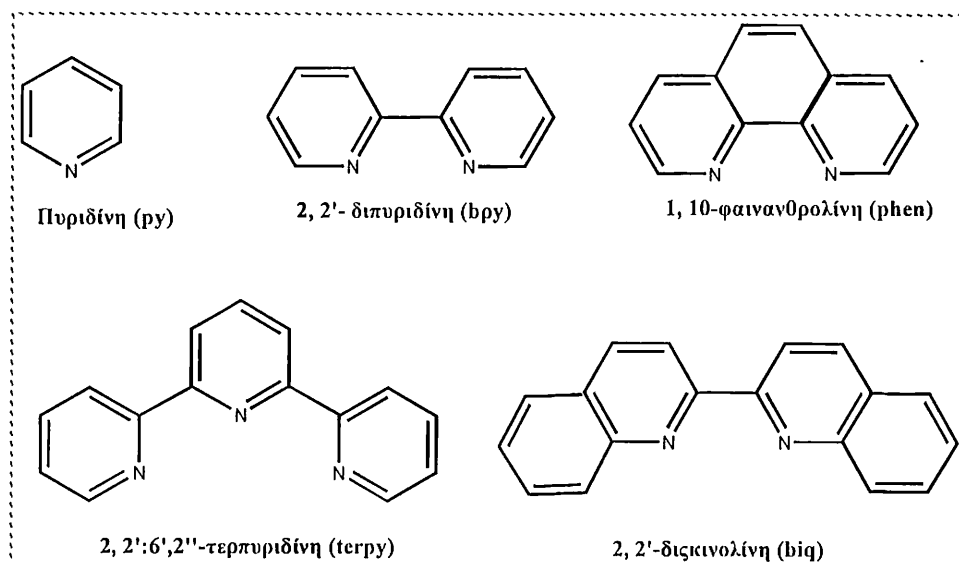
Η χημική συμπεριφορά του *trans*-[RuCl<sub>4</sub>(dmsο-S)(Him)]<sup>-</sup> έχει μελετηθεί σε υδατικά διαλύματα με φασματοσκοπία NMR και UV-Vis και αποδείχτηκε ότι σε φυσιολογικές συνθήκες πραγματοποιείται η υδρόλυση των δυο χλωρίων, ενώ ακολουθεί η απόσπαση του dmsο και των υποκαταστατών ιμιδαζολίου<sup>42</sup>. Πρόσφατα μελετήθηκε και η συμπεριφορά του NAMI-A καθώς οι πληροφορίες αυτές είναι σημαντικές για τον σχεδιασμό και μελέτη του φαρμάκου<sup>43</sup>. Οι δομές των NAMI και NAMI-A απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα.

Σχήμα 1.5. Σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων  $trans-Na[RuCl_4(dms\text{-}S)(Him)]$  (NAMI) και  $trans-H_2Im[RuCl_4(dms\text{-}S)(Him)]$  (NAMI-A), (Him= ιμιδαζόλιο).



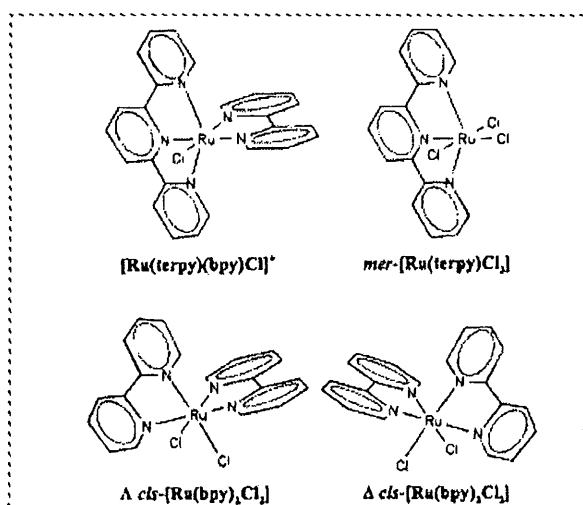
- Σύμπλοκα ρουθηνίου με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες.

Τα σύμπλοκα του ρουθηνίου με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες (Σχήμα 1.6) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της σημαντικής βιολογικής δραστηριότητάς τους. Οι πολυπυριδινικοί υποκαταστάτες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε σύμπλοκα ρουθηνίου με βιολογική δραστηριότητα είναι πάρα πολλοί, ενώ οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι φαίνονται στο σχήμα 1.6.



Σχήμα 1.6. Πολυπυριдино-Υποκαταστάτες.

Τα τρις-χηλικά σύμπλοκα του ρουθηνίου με πολυπυριδινικούς διδοντικούς υποκαταστάτες, όπως bpy, phen κ.α., είναι χειρόμορφα μόρια ( $\Lambda$  ή  $\Delta$ -), ικανά να δεσμεύονται εναντιοεκλεκτικά στο μόριο του DNA. Αυτή η δέσμευση αλλά και το φωτοπροκαλούμενο οξειδωτικό κόψιμο της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας από διάφορα πολυπυριδινικά σύμπλοκα έχουν μελετηθεί διεξοδικά από διάφορες επιστημονικές ομάδες<sup>44-51</sup>. Τόσο η δέσμευση, όσο και το κόψιμο των φωσφοδιεστερικών δεσμών της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA έχουν συσχετιστεί πολλές φορές με τη βιολογική δραστηριότητα αυτών των συμπλόκων. Άλλα σύμπλοκα του ρουθηνίου που περιέχουν εκτός από πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες και ύδατο- ή χλώρο- ομάδες έχουν επίσης μελετηθεί και βρέθηκε ότι δεσμεύονται στο DNA με απευθείας δεσμό<sup>46,48,52</sup>.



Σχήμα 1.7. Χλωροπολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου με βιολογικό ενδιαφέρον.

Το νερό και οι χλώρο ομάδες αποτελούν πιο ευκίνητους και εύκολα αντικαθιστάμενους υποκαταστάτες σε σύγκριση με τους σταθερούς πυριδυλ-υποκαταστάτες<sup>48,53</sup>, με αποτέλεσμα τέτοια σύμπλοκα να αντιδρούν με διάφορους βιολογικούς στόχους.

Η κυτταροτοξικότητα των χλωροπολυπυριδινικών συμπλόκων του ρουθηνίου  $[Ru(terpy)(bpy)Cl]Cl$ ,  $cis-[Ru(bpy)_2Cl_2]$  και  $mer-[Ru(terpy)Cl_3]$  έχει μελετηθεί σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές<sup>19</sup> (Σχήμα 1.7). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύμπλοκο  $mer-[Ru(terpy)Cl_3]$  παρουσιάζει μια σημαντικά υψηλότερη κυτταροτοξικότητα σε σύγκριση με τα άλλα σύμπλοκα.

Σε ένα μη κυτταρικό περιβάλλον βρέθηκε ότι τα χλωροπολυπυριδινικά αυτά σύμπλοκα του ρουθηνίου αντιδρούν με το DNA παρουσιάζοντας μια προτίμηση στη

βάση της γουανίνης <sup>19</sup>. Νωρίτερα, επιβεβαιώθηκε και η ένταξη του ανάλογου συμπλόκου *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>] στο N7 της γουανίνης <sup>54</sup>.

Ο Thorp και οι συνεργάτες του επέκτειναν τη μελέτη για την εναντιοεκλεκτικότητα στο B-DNA των συμπλόκων *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, *cis*-[Ru(L-L)<sub>2</sub>(py)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> και [Ru(terpy)(L-L)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (L-L = bpy, phen) <sup>55</sup>. Τα μονοδραστικά σύμπλοκα του τύπου [Ru(terpy)(L-L)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (L-L = bpy, phen) δεσμεύονται 'ομοιοπολικά' με το B-DNA <sup>46</sup>. Μελέτες θερμικής μετουσίωσης υποδεικνύουν το σχηματισμό μονοπαραγώγων για το [Ru(terpy)(L-L)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> και το *cis*-[Ru(L-L)<sub>2</sub>(py)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (L-L = bpy, phen) με το DNA <sup>48</sup>. Τα διδραστικά σύμπλοκα που έχουν *cis*-διαμόρφωση προκαλούν μια μεγαλύτερη αύξηση στη θερμοκρασία τήξης από αυτή των γνωστών διπαραγώγων που σχηματίζουν *trans*-σύμπλοκα του λευκόχρυσου. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η *trans*-γεωμετρία για τα σύμπλοκα αυτά του ρουθηνίου παραμένει, αφού δεν έχει παρατηρηθεί *cis-trans* ισομερισμός ή σχηματισμός οξο-γεφυρών <sup>48</sup>.

Έχει βρεθεί πως τα σύμπλοκα [RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>]ClO<sub>4</sub> (phen=1,10-φαινανθρολίνη) και [Ru(bpy)<sub>2</sub>(ox)] (bpy = 2,2'-διπυριδίνη, ox = οξαλικό διανιόν) δεν παρουσιάζουν αντικαρκινική δραστηριότητα <sup>12</sup>. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις των πολυπυριδινικών συμπλόκων ρουθηνίου με το DNA, που περιέχουν ευκίνητους υποκαταστάτες (όπως π.χ. χλωροανιόντα), απέκτησαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν οι Barton και Lolis ανέφεραν το 1985 μια εναντιομερή εκλεκτική δέσμευση του Λ-ισομερούς του *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>] με DNA Β-τύπου <sup>52</sup>. Στην περίπτωση του συμπλόκου [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> εκτός από τις αλληλεπιδράσεις τύπου παρεμβολής της φαινανθρολίνης, είναι πιθανό να λαμβάνει χώρα και 'ομοιοπολική' σύνδεση του *cis*-[RuCl(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup> ή του *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> με τη σπείρα του B-DNA <sup>55</sup>. Η αντικαρκινική δραστηριότητα των τρις-χηλικών συμπλόκων του Ru(II) που περιέχουν υποκαταστάτες, όπως 1,10-φαινανθρολίνη έχει ήδη αναφερθεί από τον Dwyer και τους συνεργάτες τους από το 1965 <sup>56</sup>, οι οποίοι μπορούν να θεωρηθούν ως οι πρωτοπόροι στην αντικαρκινική φαρμακολογία του ρουθηνίου. Αργότερα, αποδείχτηκε ότι παρόλο την ισχυρή νευρομυϊκή τοξικότητά τους, τα τρις-χηλικά αυτά σύμπλοκα του Ru(II) θεωρήθηκαν ως αδρανή σε πιο επιθετικά καρκινικά μοντέλα <sup>57</sup>. Η δραστηριότητα των τρις-χηλικών συμπλόκων Ru(L-L)<sub>3</sub> μπορεί να εξηγηθεί με την παραμόρφωση που προκαλούν στην διπλή έλικα του DNA, λόγω της δέσμευσής τους με τρεις βασικά τρόπους (παρεμβολή, δέσμευση στην κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα ή ηλεκτροστατικά στις φωσφορικές ομάδες). Αυτό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από

το ολικό φορτίο του συμπλόκου, το σχήμα και την διαμόρφωση των υποκαταστατών. Παρόλα αυτά, πολλές φασματοσκοπικές μελέτες δέσμησης των τρις-χηλικών συμπλόκων  $Ru(L-L)_3$  στο DNA, έχουν οδηγήσει σε συζητήσεις σχετικά με τη φύση των γεωμετριών αυτών δέσμησης και βρέθηκε ότι ο βαθμός της εκλεκτικότητας είναι πολύ μεγαλύτερος για τα δις(*phen*) παράγωγα απ' ό,τι για τὰ αντίστοιχα δις(*bpy*) παράγωγα <sup>58</sup>.

#### 1.4. Μηχανισμός δράσης συμπλόκων του Ρουθηνίου

Οι συνήθεις οξειδωτικές καταστάσεις του ρουθηνίου είναι η  $Ru^{2+}$  και η  $Ru^{3+}$ , όπου και για τις δυο το ρουθίνιο είναι συνήθως εξα-ενταγμένο με οκταεδρική γεωμετρία χαμηλού σπιν. Το  $Ru^{3+}$  με ηλεκτρονιακή διαμόρφωση  $d^5$ , συνήθως δέχεται ηλεκτρονιακή πυκνότητα στα  $dp$  τροχιακά του και για τον λόγο αυτό παρουσιάζει προτίμηση για υποκαταστάτες αλογόνα και ανιονικά οξυγόνα, ενώ το  $Ru^{2+}$  με ηλεκτρονιακή διαμόρφωση  $d^6$  παρουσιάζει προτίμηση για υποκαταστάτες που είναι π-αποδέκτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας από τα  $dp$  τροχιακά του.

Επειδή τα σύμπλοκα του  $Ru^{3+}$  είναι κινητικά πιο αδρανή από αυτά του  $Ru^{2+}$  έχει προταθεί μια «ενεργοποίηση με αναγωγή» για να εξηγήσει την αντικαρκινική δραστηριότητα των χλώρο-αμινο συμπλόκων του ρουθηνίου, όπως των *fac*- $[RuCl_3(NH_3)_3]$  και *cis*- $[Ru(NH_3)_4Cl_2]Cl$ , τα οποία είναι αρκετά αδρανή όταν οι χλωρο ή αμινο υποκαταστάτες παύουν να είναι ενταγμένοι και ελευθερώνονται θέσεις ένταξης <sup>9,12</sup>. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, τα αδρανή σύμπλοκα του  $Ru^{3+}$  θεωρούνται ως πρόδρομες ενώσεις, οι οποίες μπορούν να ενεργοποιηθούν από ένα μηχανισμό *in situ* αναγωγής και να προκύψουν τα λιγότερο αδρανή  $Ru^{2+}$  παράγωγα. Τα τελευταία είναι δυνατό να σχηματίσουν ομοιοπολικούς δεσμούς με βιολογικούς στόχους μετά από την απελευθέρωση των υποκαταστατών και την δημιουργία νέων θέσεων ένταξης. Ανιονικοί υποκαταστάτες, όπως τα ενταγμένα χλώρια μπορούν να είναι αποχωρούσες ομάδες. Η απομάκρυνση τους και αντικατάσταση με μόρια  $H_2O$  αυξάνουν το φορτίο του συμπλόκου ώστε να διευκολύνεται η μεταφορά του μέσω των κυτταρικών μεμβρανών.

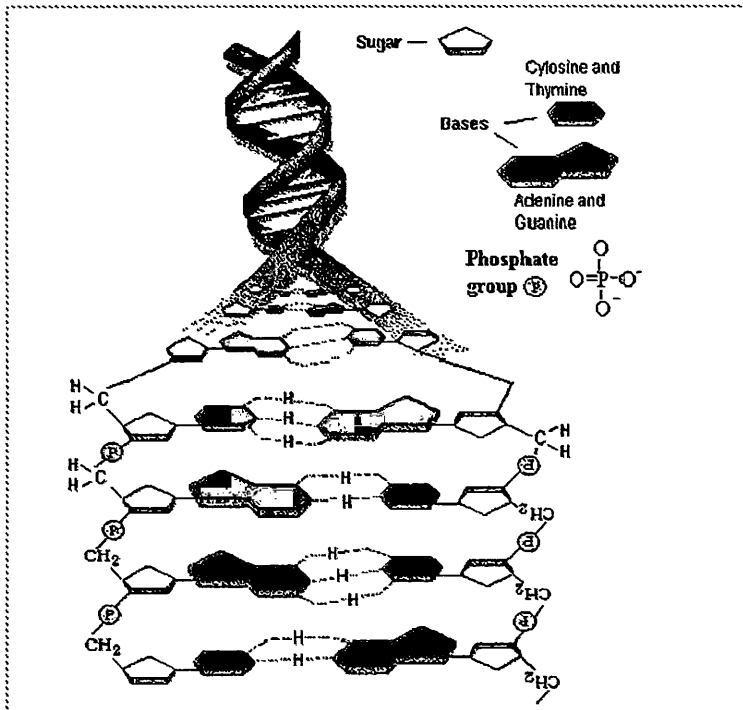
Θα περίμενε κανείς, το  $Ru^{3+}$  να ανάγεται πιο εύκολα σε καρκινικούς ιστούς, οι οποίοι θεωρούνται ως αναγωγικό περιβάλλον συγκρινόμενοι με τους περιβάλλοντες οξυγονωμένους ιστούς. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η εκλεκτική

κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων του ρουθηνίου αναμένεται να εξαρτάται από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως το καθαρό φορτίο, η λιποφιλικότητα, το δυναμικό οξειδοαναγωγής του ζεύγους  $\text{Ru}^{3+}$  σε  $\text{Ru}^{2+}$  καθώς και η ταχύτητα της μεταφοράς του ηλεκτρονίου. Στα καρκινικά κύτταρα υπάρχει μικρότερη περιεκτικότητα σε  $\text{O}_2$ , εξαιτίας του γεγονότος ότι τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την ανάπτυξη νέων αγγείων αίματος (αγγειογένεση). Έτσι, η ενέργεια που χρειάζονται παρέχεται περισσότερο από την γλυκόλυση, παράγοντας μια περίσσεια γαλακτικού οξέος, το οποίο μειώνει σημαντικά το pH στους καρκινικούς ιστούς. Εξαιτίας λοιπόν, των διαφορετικών μεταβολικών διαδικασιών στα καρκινικά κύτταρα, το ηλεκτροχημικό δυναμικό για  $\text{Ru}^{3+}$  σε  $\text{Ru}^{2+}$  είναι γενικά χαμηλότερο από ότι στους περιβάλλοντες φυσιολογικούς ιστούς, γεγονός που ευνοεί την παραγωγή ενώσεων του  $\text{Ru}^{2+}$  στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα υγιή. Έτσι, μεγαλύτερα ποσά δραστικών ενώσεων του  $\text{Ru}^{2+}$  μπορούν να παραχθούν σε καρκινικούς ιστούς, συγκρινόμενοι με τους υγιείς, προκαλώντας έτσι συσσώρευση του συμπλόκου που τελικά οδηγεί σε μια εκλεκτική κυτταροτοξικότητα.

Ο βιολογικός στόχος των συμπλόκων του  $\text{Ru}^{2+}$  φαίνεται να είναι το DNA, ανάλογα με τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου. Αντίθετα όμως με αυτά, η δραστικότητα εμφανίζεται λόγω της οξειδωτικής διάσπασης της αλυσίδας του DNA.

### **1.5. Σημασία των μεταλλικών ιόντων στη βιολογική λειτουργία νουκλεϊκών οξέων**

Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία πολυνουκλεοτιδίων ή νουκλεϊκών οξέων που απαντώνται στη φύση και εμπλέκονται με κάποιο τρόπο στην μεταφορά της γενετικής πληροφορίας. Τα νουκλεϊκά οξέα κατατάσσονται συμβατικά σε δυο κυρίως τύπους: το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) και το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) ανάλογα με την παρουσία ή απουσία μιας 2'-υδροξυλ-ομάδας ή διαφορετικά ανάλογα με την σύσταση των μακρομορίων από ριβονουκλεοτίδια ή δεσοξυριβονουκλεοτίδια αντίστοιχα. Τόσο το DNA όσο και το RNA δομούνται από μονομερή, τα οποία συνδέονται με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ της 3'-υδροξυλ-ομάδας του ενός με την 5'-υδροξυλ-ομάδα του προσκείμενου νουκλεοτιδίου, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 1.8. Σχηματική αναπαράσταση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ βάσεων στη δομή του DNA.

Στο DNA απουσιάζει η 2'-υδροξυλ-ομάδα και η ουρακίλη έχει αντικατασταθεί από θυμίνη. Η αλληλουχία των βάσεων κατά μήκος της αλυσίδας του DNA ονομάζεται γενετικός κώδικας. Το μόριο του DNA αποτελείται από δυο ελικοειδείς αλυσίδες ώστε κάθε ετεροκυκλική βάση της μιας αλυσίδας να συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με μια συμπληρωματική βάση της άλλης, έτσι ώστε κάθε γουανίνη να συνδέεται σε μια κυτοσίνη και κάθε αδενίνη σε μια θυμίνη, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.8.

Κάθε κλώνος της διπλής έλικας περιέχει την δομή του γενετικού κώδικα και το ξεδίπλωμα σε χωριστούς κλώνους με τον επακόλουθο σχηματισμό συμπληρωματικών κλώνων για κάθε έναν από τους αρχικούς θα οδηγήσει στην δημιουργία δυο νέων διπλών ελίκων DNA, κάθε μια από τις οποίες είναι αντίγραφο της αρχικής. Η διαδικασία της αντιγραφής απαιτεί την παρουσία ιόντων μετάλλου, όπως  $\text{Zn}^{2+}$ , και μπορεί επίσης, να ανασταλεί από μεταλλικά ιόντα ή σύμπλοκα. Αυτό αποδεικνύει την σημασία των μεταλλικών συμπλόκων στην βιοχημεία των νουκλεϊκών οξέων.

Κάθε βήμα στην εφαρμογή του γενετικού κώδικα για την τελική παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών καθοδηγείται κατά κάποιο τρόπο από την παρουσία ιόντων μετάλλου. Η μεταγραφή του DNA σε mRNA επηρεάζεται, επίσης, από μεταλλικά ιόντα. Ο γενετικός κώδικας στο mRNA περιέχεται σε αλληλουχίες

τρινουκλεοτιδίων που καλούνται κωδικόνια. Η δέσμευση των tRNA αντικωδικονίων στα mRNA κωδικόνια συμβαίνει στην επιφάνεια των ριβοσωμάτων, των οποίων η δομή καθορίζεται από την περιεκτικότητά τους σε μεταλλικά ιόντα. Βλέπουμε λοιπόν, ότι οι τρεις στοιχειώδεις διαδικασίες, αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση επηρεάζονται από μεταλλικά ιόντα.

Η επίδραση των μεταλλικών ιόντων στη διαμόρφωση του DNA έγινε αντιληπτή όταν αποδείχθηκε ότι ιόντα διαφόρων μετάλλων εμπλέκονται στη σταθεροποίηση της διπλής έλικας των Watson-Crick <sup>59</sup>, ενώ είναι γνωστό ότι αντιδρούν σε μια ποικιλία θέσεων δοτών-ηλεκτρονίων πάνω στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Πιο συγκεκριμένα υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι αλληλεπίδρασης:

- στις φωσφορικές ομάδες της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας και
- στις ομάδες των ατόμων δοτών-ηλεκτρονίων των νουκλεϊκών βάσεων.

Οι δύο τρόποι αλληλεπίδρασης έχουν διαφορετικές επιδράσεις πάνω στη δομή της έλικας των νουκλεϊκών οξέων. Αλληλεπιδράσεις μεταλλικών ιόντων ή συμπλόκων με τις φωσφορικές ομάδες συνεπάγεται σταθεροποίηση των διατεταγμένων δομών αλλά και διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών σε υψηλή θερμοκρασία. Εάν η αλληλεπίδραση είναι μη-ειδική, δηλαδή χαρακτηρίζεται πλήρως βάσει της ηλεκτρολυτικής θεωρίας, ή αν δημιουργούνται συγκεκριμένοι δεσμοί στις φωσφορικές ομάδες, το αποτέλεσμα είναι να εξουδετερώνονται όλα τα αρνητικά φορτία στη διπλή έλικα με αποτέλεσμα να σταθεροποιείται η δομή. Αυτή η σταθεροποίηση συνοδεύεται από μια αύξηση στο 'σημείο τήξεως'  $T_m$  του DNA <sup>60</sup>.

Αλληλεπίδραση με τις νουκλεϊκές βάσεις σημαίνει αποσταθεροποίηση των διατεταγμένων δομών, αφού τα μεταλλικά ιόντα μπορούν να επηρεάσουν τους δεσμούς υδρογόνου ή την συσσώρευση που συγκρατούν και τους δύο κλώνους του DNA στην μορφή της διπλής έλικας. Η αποσταθεροποίηση συνοδεύεται από μείωση στο 'σημείο τήξεως'  $T_m$  του DNA. Οι διαφορές στη συμπεριφορά των διάφορων μεταλλικών ιόντων με πολυνουκλεοτίδια έδειξαν ότι μερικά μεταλλικά ιόντα προτιμούν τις φωσφορικές ομάδες και άλλα μεταλλικά ιόντα προτιμούν τις βάσεις.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

---

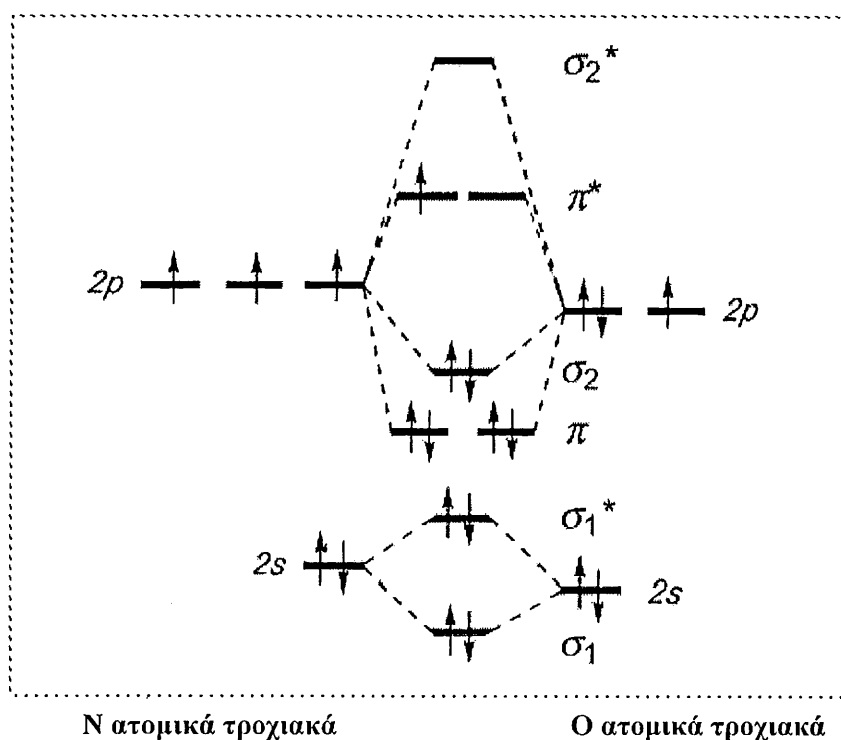
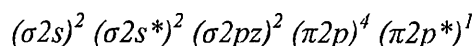
### Η ΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

---

Το μονοξείδιο του αζώτου ήταν ανάμεσα στα πρώτα αέρια που ανακαλύφθηκαν. Ο Priestley ευθύνεται για την ανακάλυψη του το 1772, ο οποίος συνέλεξε το αέριο αυτό από την αντίδραση του νιτρικού οξέος με διάφορα μέταλλα, όπως σίδηρο, χαλκό, κασσίτερο, άργυρο, υδράργυρο, βισμούθιο και νικέλιο. Το μονοξείδιο του αζώτου σχηματίζει βαθυκόκκινους ατμούς  $\text{NO}_2$  με τον αέρα. Αν το  $\text{NO}$  αναμιχθεί με αέρα σε νερό σχηματίζεται  $\text{NO}_2$  που απορροφάται από το νερό με μια μείωση του όγκου του αέρα στο ένα πέμπτο. Η μείωση του όγκου είναι ανάλογη του ποσού του οξυγόνου στον αέρα.

### 2.1. Το μονοξείδιο του αζώτου: $\text{NO}$

Το μονοξείδιο του αζώτου είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα, το διάγραμμα μοριακών τροχιακών του οποίου δείχνει ότι το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε αυτό το μόριο βρίσκεται σε ένα  $\pi^*$  μοριακό τροχιακό (Σχήμα 2.1.). Η ηλεκτρονιακή διαμόρφωση του  $\text{NO}$  είναι:



Σχήμα 2.1. Διάγραμμα μοριακών τροχιακών  $\text{MO}$  του μονοξειδίου του αζώτου.

Η ηλεκτρονιακή αυτή διαμόρφωση εξηγεί την υψηλή του δραστηριότητα και ιδιαίτερα την ευκολία οξείδωσης του στο κατιόν  $\text{NO}^+$ , την δυνατότητα αναγωγής του στο ιόν νιτροξειδίου ( $\text{NO}^-$ ), την εύκολη προσθήκη του οξυγόνου που οδηγεί στον σχηματισμό του  $\text{NO}_2$ , την αντίδραση με αλογόνα ( $\text{X}_2$ ) που παρέχει  $\text{XNO}$  κ.λ.π. Το  $\text{NO}$  είναι ισοηλεκτρονιακό με το μονοκατιόν μοριακού οξυγόνου ( $\text{O}_2^+$ ), το  $\text{NO}^+$  είναι ισοηλεκτρονιακό με το  $\text{CO}$  και το  $\text{CN}^-$ , ενώ το  $\text{NO}^-$  είναι ισοηλεκτρονιακό με το  $\text{O}_2$ , που έχει τριπλή θεμελιώδη κατάσταση.

Το μονοξειδίο του αζώτου είναι ένα άχρωμο αέριο με σημείο βρασμού (1 atm) 121 K και σημείο τήξης 110 K. Ο διμερισμός του  $\text{NO}$  είναι σημαντικός σε χαμηλή θερμοκρασία ή υψηλή πίεση<sup>61,62</sup>. Η γεωμετρία στην αέρια φάση του διμερούς  $\text{N}_2\text{O}_2$  είναι σχεδόν επίπεδη με δεσμό  $\text{O}=\text{N}-\text{N}$  γωνίας  $97^\circ$ <sup>63</sup>. Στην φασματοσκοπία υπερύθρου για το  $\text{N}_2\text{O}_2$  εμφανίζονται ισχυρές οξείες ταινίες δόνησης στα 1860 (συμμετρική  $\nu(\text{NO})$ ) και 1788  $\text{cm}^{-1}$  (αντισυμμετρική  $\nu(\text{NO})$ )<sup>64</sup>. Το μονοξειδίο του αζώτου απορροφά στην UV περιοχή δίνοντας ισχυρές ταινίες στα 224, 213 και 203 nm, ενώ το διμερές του εμφανίζει μια διευρυμένη ταινία στα 205 nm περίπου<sup>65</sup>. Η διαλυτότητα και η μεταφορά του μονοξειδίου του αζώτου είναι παρόμοια με αυτή του  $\text{O}_2$ <sup>66</sup>. Η διαλυτότητα του  $\text{NO}$  σε υδατικά διαλύματα είναι 1.9 mM atm<sup>-1</sup> στους 298 K και 1.4 mM atm<sup>-1</sup> στους 310 K<sup>67</sup>. Σε οργανικούς διαλύτες η διαλυτότητα είναι υψηλότερη από ~3 mM atm<sup>-1</sup> στο DMSO έως 15 mM atm<sup>-1</sup> στο κυκλοεξάνιο στους 298 K. Το  $\text{NO}$  διαχέεται εύκολα και έχει μια σταθερά διάχυσης 3300  $\mu\text{m}^2 \text{sec}^{-1}$  σε φυσιολογικές συνθήκες<sup>68</sup> ενώ σε βιολογικά συστήματα εμφανίζει ένα ρυθμό διάχυσης 50  $\mu \text{sec}^{-1}$ <sup>66</sup>.

Το μονοξειδίο του αζώτου έχει ένα δυναμικό ιονισμού 9,26 eV και μια ηλεκτρονιακή συγγένεια 0,024 eV<sup>69</sup>. Το κατιόν  $\text{NO}^+$  έχει απομονωθεί ως μια σειρά σταθερών αλάτων και είναι ένα χρήσιμο συνθετικό και οξειδωτικό αντιδραστήριο. Εντούτοις, το  $\text{NO}^+$  κατά πάσα πιθανότητα έχει μια εξαιρετικά μικρή ζωή στα βιολογικά μέσα, αν και τα σύμπλοκα μετάλλου μπορούν να λειτουργήσουν ως μέσα μεταφοράς. Η χημεία του ανηγμένου οξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}^-$ ) δεν είναι σήμερα πολύ ανεπτυγμένη, αν και το ανιόν τυπικά διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση με στοιχεία μετάπτωσης,

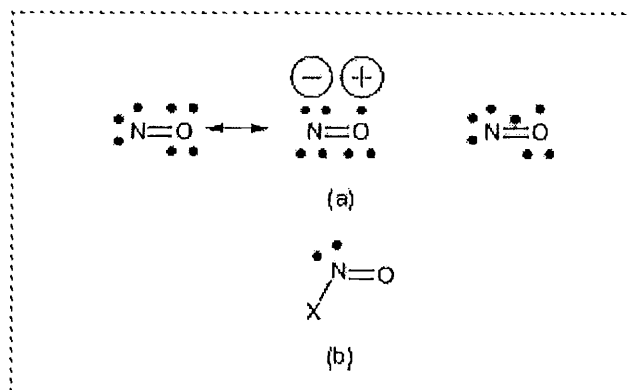
Το μόριο του μονοξειδίου του αζώτου είναι ενεργά οξειδοαναγωγικό σε διάλυμα, μια σημαντική ιδιότητα που έχει σημαντική επίδραση στη χημεία των συμπλόκων του με μέταλλα μετάπτωσης. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής για την αντιστρεπτή διεργασία  $\text{NO} \rightarrow \text{NO}^+ + \text{e}^-$  είναι εξαρτάται πολύ από τον διαλύτη και

στο νερό εξαρτάται επίσης και από το pH <sup>70</sup>. Κάτω από ισχυρά βασικές συνθήκες, το NO ανάγεται, δηλ.  $\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + e^- \rightarrow \text{NO} + 2 \text{OH}^-$ ,  $E^0 = -0,46 \text{ V vs NHE}$ . Το πρότυπο δυναμικό για την αναγωγή του  $\text{NO}^+$  σε NO έχει υπολογιστεί ότι είναι περίπου +1,12V vs NHE <sup>71</sup>. Η αναγωγή του NO σε  $\text{NO}^-$  έχει αναφερθεί ότι βρίσκεται μεταξύ +0,39 και -0,35 V <sup>72</sup>. Το μήκος δεσμού του ελεύθερου NO είναι 1,154 Å, μεταξύ ενός διπλού (1,18 Å) και ενός τριπλού (1,06 Å) δεσμού. Αυτό το μήκος δεσμού αντιστοιχεί σε τάξη δεσμού 2.5, σύμφωνα με το διάγραμμα MO στο σχήμα 2.1. και 2.2 <sup>73</sup>. Η οξειδωση σε  $\text{NO}^+$  προκαλεί μείωση στην απόσταση δεσμού σε 1,06 Å, ισοδύναμη προς την τάξη δεσμού 3. Η αναγωγή του NO σε  $\text{NO}^-$ , οδηγεί, ταυτόχρονα, σε μια αύξηση του μήκους δεσμού (1,26 Å) λόγω του περαιτέρω πληθυσμού στο  $\pi^*$  τροχιακό <sup>74</sup>.

Οι αλλαγές στο μήκος δεσμού που συζητήθηκαν προηγουμένως απεικονίζονται σε δονήσεις τάσης IR αυτών των απλών διατομικών σωματιδίων. Η  $\nu_{\text{NO}}$  μειώνεται με την αύξηση του φορτίου από 2377 ( $\text{NO}^+$ ) σε 1875 (NO) και σε 1470  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{NO}^-$ ) <sup>75</sup>. Μελέτες συντονισμού των spin των ηλεκτρονίων δείχνουν ότι περίπου το 60% της πυκνότητας περιστροφής συγκεντρώνεται στο άτομο του N του ουδέτερου μονοξειδίου του αζώτου <sup>73</sup>.

Τα αλογονίδια, τα αλκάνια και τα αρένια του μονοξειδίου του αζώτου, είναι κυρτά μόρια και η απόσταση N=O ποικίλλει από 1,13 σε 1,22 Å, ενώ η γωνία του δεσμού X-N=O εμπίπτει στην περιοχή από 101° σε 134°, εξαρτημένες και οι δύο διαστάσεις από τον υποκαταστάτη <sup>76</sup>. Αυτά τα μήκη δεσμού εξαρτώνται έντονα από την ηλεκτραρνητικότητα των υποκαταστατών. Οι επιδράσεις του υποκαταστάτη επηρεάζουν επίσης την  $\nu_{\text{NO}}$ , που εμφανίζεται μεταξύ 1621 και 1363  $\text{cm}^{-1}$ , ευρέως ισοδύναμη με την τάξη δεσμού 2, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2.

Σχήμα 2.2. α. Δεσμός σθένους και ηλεκτρονιακές δομές του NO. β. Δομή των νιτροσο-αλογονιδίων που έχουν κυρτό δεσμό X-N-O.



## 2.2. Ο βιολογικός ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου

Το μονοξείδιο του αζώτου θεωρούνταν επί μακράν ένα δηλητηριάδες, με έντονη οσμή αέριο, ένα δυσάρεστο και επικίνδυνο προϊόν της οξείδωσης της αμμωνίας και της ελλιπούς καύσης της βενζίνης στις εξατμίσεις μηχανοκίνητων οχημάτων. Εντούτοις, στη δεκαετία του '80 το NO ανακαλύφθηκε ότι είναι ένας από τους σημαντικότερους φυσιολογικούς ρυθμιστές <sup>77</sup>, διαδραματίζοντας έναν βασικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων στους νευρώνες αλλά και στην κυτταροτοξικότητα. Ίσως μια από τις μεγαλύτερες εκπλήξεις στη βιολογική χημεία πρόσφατα και βεβαίως ένα από τα σημαντικότερα μόρια στη χημεία συντονισμού σε εκείνη την δεκαετία.

Το 1992 το NO κυριάρχησε στον επιστημονικό κόσμο και οδήγησε εκατοντάδες επιστήμονες στο πεδίο αυτό έρευνας. Την ίδια χρονιά, επιστήμονες ερεύνησαν συστηματικά και διεξοδικά τις δραστηριότητες του NO στο μυαλό, στις αρτηρίες, στο ανοσοποιητικό σύστημα, στο συκώτι, στο πάγκρεας, στη μήτρα και στον πνεύμονα. Βρέθηκε ότι το μόριο είναι απαραίτητο σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες, με ακτίνα δράσης από την πέψη και την πίεση του αίματος ως την αντιμικροβιακή άμυνα <sup>78-83</sup>.

Στα αγγεία του αίματος το NO απελευθερώνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα στο εσωτερικό του τοιχώματος των αγγείων, μεταναστεύει σε μυϊκά κύτταρα και τα χαλαρώνει. Αυτό διαστέλλει τα αγγεία και μειώνει την πίεση του αίματος. Σφάλματα στο σύστημα του NO ίσως να είναι τα ένοχα σημεία σε διάφορες καρδιαγγειακές ασθένειες, πιθανόν ακόμα και στην υπέρταση και αρθροσκλήρυνση. Σε κάποιες πολύ ειδικές περιπτώσεις, επιστήμονες χρησιμοποίησαν αναστολείς του NO για να σώσουν ζωές. Το σηπτικό σοκ, μια αρκετά συνηθισμένη αιτία θανάτου, σχετίζεται κατά κάποιο τρόπο με την υπερβολική παραγωγή του NO. Η χαμηλή πίεση του αίματος απειλεί τη ζωή και αυτό συμβαίνει όταν το σώμα απελευθερώνει νιτρικό οξύ για να αντιμετωπίσει την βακτηριακή μόλυνση. Διάφοροι αναστολείς του μονοξειδίου του αζώτου κατάφεραν να ρυθμίσουν πέρα από την επικίνδυνη ζώνη την πίεση του αίματος ορισμένων ασθενών μέσα σε λίγα λεπτά. Ξεκίνησαν επίσης, κλινικές δοκιμές της φάσης I για διάφορους αναστολείς του NO όπως της ιντερλευκίνης-2 (I1-2) για την θεραπεία επίμονων καρκίνων του δέρματος και των νεφρών. Η ιντερλευκίνη-2 διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα και παράγει μια επικίνδυνη ποσότητα μονοξειδίου του αζώτου. Οι επιστήμονες ελπίζουν ότι οι αναστολείς του NO θα

κρατήσουν την πίεση του αίματος σε υψηλά επίπεδα, ενώ η ιντερλευκίνη-2 θα βοηθήσει στην θεραπεία του καρκίνου.

Το NO εμφανίζεται να δουλεύει αμυντικά με τουλάχιστον δύο τρόπους: α. καταστέλλοντας σημαντικά μεταβολικές διαδικασίες που εμποδίζουν την ανάπτυξη και β. σκοτώνοντας κατευθείαν τα κύτταρα. Στην πρώτη περίπτωση το NO επιτίθεται σε ευάλωτες ομάδες σιδήρου ορισμένων ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που συνθέτουν το DNA και βοηθούν τα κύτταρα να αναπαραχθούν. Όταν αυτά τα ένζυμα παρεμποδιστούν, τα κύτταρα δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν. Αυτό είναι το σημαντικό σημείο της αντικαρκινικής δράσης του NO.

Το NO μπορεί, επίσης, να ενωθεί με το οξυγόνο και να παράγει σωματίδια κυτταρικούς δολοφόνους, όπως τη ρίζα του υδροξυλίου,  $\cdot\text{OH}$  και το διοξείδιο του αζώτου. Τέτοια σωματίδια μπορεί να ευθύνονται για την αντιβακτηριακές ιδιότητες του NO, αφού εδώ και αιώνες νιτρικά άλατα χρησιμοποιούνται για την θεραπεία ασθενειών του δέρματος. Οι επιστήμονες μελέτησαν την πιθανότητα ότι το NO αποτελεί μία αρχική άμυνα εναντίον μιας ολόκληρης τάξης μικροβίων και προσπάθησαν να καταλάβουν πως τα περισσότερα κύτταρα αμύνονται εναντίον τους.

Στη νευρολογία, από αρχικές ανακαλύψεις οι πολλαπλοί ρόλοι του NO προκύπτουν με γρήγορο ρυθμό. Το 1992, το NO βρέθηκε ότι συμμετέχει σε ένα πλήθος λειτουργιών που σχετίζονται με την λειτουργία της νευροδιαβίβασης. Το NO μερικές φορές λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής. Όταν ένας νευρώνας ερεθιστεί, απελευθερώνει το νευροδιαβιβαστή από τις ειδικές κύστες αποθήκευσης. Το κύτταρο παίρνει το νευροδιαβιβαστή και ενεργοποιείται. Το NO δεν έχει καμία ειδική εγκατάσταση αποθήκευσης και κανένα από τους ειδικούς μηχανισμούς απελευθέρωσης. Το NO συντίθεται όταν και όπου απαιτείται. Φαίνεται απλά να διασκορπίζεται από το παραγόμενο κύτταρο. Οι περισσότεροι νευροδιαβιβαστές αποτελούνται από τα αμινοξέα ή μια σειρά πεπτιδίων, τα οποία δεσμεύονται από ειδικούς δέκτες στην επιφάνεια των κυττάρων. Το NO αντίθετα δεν χρειάζεται κανένα δέκτη για να περάσει μέσω των μεμβρανών. Οι ειδικοί στόχοι του είναι κάποια ένζυμα μέσα στα κύτταρα, ενώ μεταφέρει το μήνυμά του σε οποιαδήποτε και σε κάθε κύτταρο που του είναι προσιτό.

Μια σειρά πειραμάτων, που έγιναν το 1991 και καθ' όλη τη διάρκεια του 1992 προτείνουν ότι το μονοξείδιο του αζώτου μπορεί να βοηθήσει τα κύτταρα στο να αποθηκεύσουν και να ανακτήσουν πληροφορίες, τα οποία είναι κλειδιά στην εκμάθηση και στη μνήμη. Η κυτταρική λειτουργία για την εκμάθηση και τη μνήμη,

θεωρείται ότι βασίζεται στην ενίσχυση της σύνδεσης μεταξύ της αποστολής και της λήψης των νευρώνων, των προσυναπτικών και μετασυναπτικών κυττάρων. Ένας τρόπος για να γίνει αυτό, είναι μια διαδικασία αποκαλούμενη μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση (LTP), όπου τα επαναλαμβανόμενα μετασυναπτικά κύτταρα, για να αποκριθούν εντονότερα λαμβάνουν ένα σήμα. Το μονοξείδιο του αζώτου μπορεί να αποτελέσει το μόριο εκείνο που θα ταξίδευε και θα ενίσχυε την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή στο προσυναπτικό κύτταρο, περνώντας από κύτταρο σε κύτταρο χωρίς τη μεσολάβηση υποδοχέων.

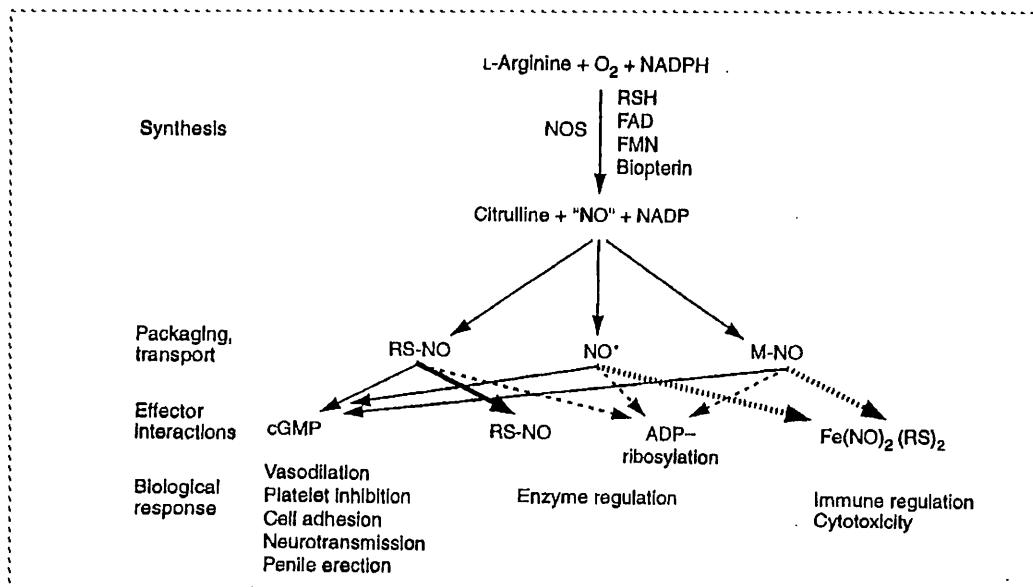
Είναι αξιοσημείωτη η βιολογική δραστηριότητα που παρουσιάζει το σύμπλοκο του σιδήρου  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της πίεσης του αίματος ειδικά ως φάρμακο ανάγκης στις περιπτώσεις υπερτασικής κρίσης. Αυτό αποτελεί ένα παράδειγμα συμπλόκου που φέρει τη νιτροσουλ-ομάδα ως υποκαταστάτη <sup>84</sup>. Το σύμπλοκο  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2]^{3-}$  έχει, επίσης, επιλεγεί για να επεξηγήσει μερικές πτυχές της επίδρασης του φωτός και των αλληλεπιδράσεων του μεταλλικού συμπλόκου στην ιατρική.

Συνεπώς, το μονοξείδιο του αζώτου συμμετέχει σε πολλές βιολογικές διαδικασίες και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε φυσιολογικές ρυθμίσεις του ανθρώπινου οργανισμού. Ο σημαντικός αυτός ρόλος, αποτέλεσε αντικείμενο εντατικής έρευνας για τους επιστήμονες και οδήγησε δίκαια το περιοδικό *Science* στην υπόδειξη του NO ως του μορίου της χρονιάς 1992 <sup>77</sup>.

### 2.3. Ενζυμικός σχηματισμός του NO

Το μονοξείδιο του αζώτου γεννάται ενζυμικά από την τάξη των ενζύμων που καλούνται NO συνθετάσες, τα οποία είναι ομόλογα με την κυτοχρωμική ρεδουκτάση P450 <sup>85</sup>. Όπως και το κυτόχρωμα P450 μόνο του, το ένζυμο περιέχει μια σίδηρο-πρωτοπορφυρίνη IX, πιθανόν με μια κυστεΐνη ως αξονικό υποκαταστάτη του  $\text{Fe}^{3+}$  <sup>86</sup>. Στην οξείδωση πέντε ηλεκτρονίων του τελικού γουανιδινο-αζώτου της αργινίνης συνεισφέρουν το ανηγμένο φωσφορικό δινουκλεοτιδικό νικοτιναμίδιο της αδενίνης (NADPH) και οι φλαβόνες. Η τετραυδροβιοπτερίνη και η θειόλη αποτελούν πρόσθετους ενζυμικούς συμπαραγόντες <sup>87</sup>. Θεωρώντας ένα μηχανισμό ανάλογο με αυτό του κυτοχρώματος P450 <sup>88</sup>, η αναγωγή του  $\text{Fe}(\text{III})$  είναι αναγκαία πριν τη δέσμευση του οξυγόνου. Κάποιες έγκυρες μελέτες προτείνουν ότι συμβαίνει

διαδοχική ενεργοποίηση δυο μορίων οξυγόνου  $O_2$  ως μέσου μεταφοράς δυο ατόμων οξυγόνου στο υπόστρωμα της αργινίνης και έτσι παράγεται  $NO^{\cdot}$  και κιτροουλίνη. Η *N*-υδροξυ-αργινίνη θεωρείται ως ένα αρχικό ενδιάμεσο στην βιοσύνθεση του  $NO^{\cdot}$ .<sup>87</sup>



Σχήμα 2.3. Απεικόνιση του ενζυματικού σχηματισμού του  $NO$  από την  $NOS$  συνθετάση και περιγραφή της βιολογικής δραστηριότητας και βιοχημείας του  $NO$ .

Οι *N*-υδροξυ-γουανιδίνες μπορούν, επίσης, να συνθέσουν  $NO^{\cdot}$  ( $HNO$ )<sup>89</sup>. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την οξείδωση τεσσάρων ηλεκτρονίων του γουανιδινικού αζώτου. Η επιλεκτική σύνθεση  $NO^{\cdot}$  ή  $NO^-$  από το ενδιάμεσο προϊόν *N*-*OH*-αργινίνη καθορίζεται από τις οξειδωτικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται<sup>89</sup>. Το  $NO^-$  μπορεί διαδοχικά να οξειδωθεί σε  $NO^{\cdot}$  με οξειδοαναγωγικές διαδικασίες<sup>90</sup>. Η μετατροπή του  $NO^{\cdot}$  σε  $NO^-$  πραγματοποιείται μέσω της βακτηριακής  $NO^{\cdot}$  ρεδοκτάσης<sup>91</sup>.

$NO^+$  ιόντα μπορούν, επίσης, να συντεθούν μέσω της δράσης της  $NO$  συνθετάσης<sup>92</sup>. Η  $NO$  συνθετάση επηρεάζει την νιτροσυλίωση των θειολών και των αμινών<sup>92</sup>. Η νιτροσυλίωση μέσω  $N_2O_3$  και  $N_2O_4$ , που σχηματίζονται στο ενζυμικό περιβάλλον, αποτελεί ένα πιθανό μηχανισμό, με τον οποίο εξηγείται η παρατήρηση αυτή<sup>93</sup>. Ένας εναλλακτικός μηχανισμός, περιλαμβάνει την οξειδωτική ενεργοποίηση του  $NO^{\cdot}$  μέσω δέσμευσης στην πλευρά της  $Fe(III)$ -αίμης, με διαδοχική εισβολή από βιολογικά νουκλεόφιλα και το σχηματισμό νιτροσο-παραγώγων<sup>94</sup>. Η χημεία αυτή,



συναντάται και σε άλλες αιμικές πρωτεΐνες που περιέχουν το κυτόχρωμα P450<sup>95</sup>, και μη αιμικές μεταλλοπρωτεΐνες όπως οι βακτηριακές NO<sub>x</sub> ρεδουκτάσες<sup>94</sup>.

Για την NO συνθετάση, η οξειδοαναγωγική ενεργοποίηση του NO<sup>•</sup> μπορεί α. να αποτελεί ένα μέσο δέσμευσης μοριακού οξυγόνου στην αίμη μέσω αναγωγής του σιδήρου σε Fe(II), β. να διαδραματίζει ένα λειτουργικό ρόλο στην αναγωγή θειολών<sup>87</sup>, οι οποίες αντιδρούν με το οξειδοαναγωγικά ενεργοποιημένο NO σύμπλοκο και σχηματίζεται μια S-νιτροσθειόλη<sup>95</sup>, γ. να διευκολύνει την αποδέσμευση του NO μέσω της πλευράς που είναι προσιτή σε O<sub>2</sub> και περιέχει αίμη, και δ. να παρέχει μια αυτοπροστασία από την τοξικότητα του NO<sup>•</sup> στο κύτταρο που γίνεται η σύνθεση, η οποία προέρχεται από τις οξειδωτικές αντιδράσεις με O<sub>2</sub> και O<sub>2</sub><sup>•-</sup> σχηματίζοντας NO<sub>2</sub><sup>•</sup> και OONO<sup>•</sup> αντίστοιχα. Επίσης, κάτω από συνθήκες μείωσης της αργινίνης, η NO συνθετάση μειώνει το O<sub>2</sub> με εκλεκτική σύνθεση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>96</sup>. Οι οξειδωτικές συνθήκες λόγω του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, συνεισφέρουν στην οξείδωση του NO<sup>•</sup> σε NO<sup>+</sup>, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να αντιδράσει με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και να δώσει OONO<sup>•</sup>. Η παρουσία θειολών μπορεί αποτελεσματικά να περιορίσει την ανεπιθύμητη αυτή αντίδραση<sup>97</sup>.

## 2.4. Η δραστηριότητα του μονοξειδίου του αζώτου

### α. NO<sup>•</sup>

Από βιολογική πλευρά, οι πιο σημαντικές αντιδράσεις του NO<sup>•</sup> είναι αυτές με το οξυγόνο O<sub>2</sub> σε διάφορες οξειδοαναγωγικές μορφές και με τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης (Σχήμα 2.4.). Το NO<sup>•</sup> μπορεί επίσης να συμμετέχει σε αντιδράσεις με άλλες ελεύθερες ρίζες<sup>98</sup>. Η αντίδραση του NO<sup>•</sup> με το O<sub>2</sub> και σε αέρια φάση αλλά και σε υδατικά διαλύματα είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Η βιολογική ημιζωή του NO<sup>•</sup> θεωρείται γενικά της τάξης των δευτερολέπτων και εξαρτάται από την αρχική του συγκέντρωση. Το NO<sup>•</sup> αντιδρά, επίσης, πολύ γρήγορα με O<sub>2</sub><sup>•-</sup> σε υδατικά διαλύματα ( $k \sim 3.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) δίνοντας υπεροξνιτρώδες ιόν ONOO<sup>-</sup><sup>99</sup>.

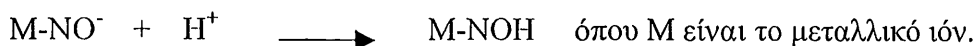
Όσον αφορά στις σύμπλοκες ενώσεις που σχηματίζει το NO<sup>•</sup> με κάποια ιόντα μετάλλων μετάπτωσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αντιδράσεις με αίμη που περιέχει πρωτεΐνες και έχουν μελετηθεί διεξοδικά, ειδικά στην περίπτωση της αιμογλοβίνης<sup>100</sup>. Ο ρυθμός της δέσμευσης και αποδέσμευσης του NO<sup>•</sup> για την Fe<sup>2+</sup>-αιμογλοβίνη είναι πέντε με έξι τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από αυτή του O<sub>2</sub><sup>100</sup>. Το NO<sup>•</sup>, αντίθετα με το CO και το O<sub>2</sub> δεσμεύεται στις Fe<sup>3+</sup>-πορφυρίνες<sup>101</sup>. Το σύμπλοκο

$\text{Fe}^{3+}\text{NO}^-$ -αίμης φαίνεται να συμμετέχει σε μια αντίδραση μεταφοράς φορτίου και τελικά να προκύπτει το  $\text{Fe}^{2+}\text{NO}^+$  <sup>95</sup>. Διαδοχική απόσπαση του  $\text{NO}^+$  μπορεί να συμβεί αμέσως μετά την προσβολή από πυρηνόφιλα <sup>95</sup>. Το βασικό σημείο είναι ότι το σύμπλοκο  $\text{Fe}^{3+}$ -αίμης εμποδίζει την ακαριαία αποβολή του  $\text{NO}$  <sup>101</sup>.

Το  $\text{NO}$  σχηματίζει και μη αιμικά σύμπλοκα με μέταλλα μετάπτωσης. Στη βιβλιογραφία, το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στις αντιδράσεις του με κέντρα σιδήρου-θείου σε πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν πολλές πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων και ένζυμα, όπως η ακοτινάση <sup>84</sup>. Οι κυτταροτοξικές επιδράσεις των μακροφάγων που ενεργοποιούνται από την κυτοκίνη συνοδεύονται από τον σχηματισμό σιδηρο-δινιτροσουλ-διθειολατο συμπλόκων, που έχουν παρόμοια EPR φάσματα <sup>102</sup> με τα πρότυπα σύμπλοκα των Vanin και Commoner <sup>103, 104</sup>.

Σε πολλά από τα νιτροσουλ-σύμπλοκα των μετάλλων μετάπτωσης το  $\text{NO}$  εντάσσεται ως  $\text{NO}^+$  <sup>105-107</sup>. Τέτοια σύμπλοκα παρουσιάζουν συχνότητες δόνησης τάσης του δεσμού N-O  $\nu(\text{NO})$  μεταξύ 1700 και 2000  $\text{cm}^{-1}$  <sup>105-107</sup>. Ο Bottomly πρότεινε ότι μόρια που παρουσιάζουν συχνότητα δόνησης τάσης του δεσμού N-O μεγαλύτερη του 1886  $\text{cm}^{-1}$  ή σταθερά δύναμης για το N-O μεγαλύτερη του 13.8  $\text{mdyn\AA}^{-1}$  μπορεί να δρουν ως ηλεκτρονιόφιλα μεταφέροντας το  $\text{NO}^+$  σε υποστρώματα πλούσια σε ηλεκτρονιακή πυκνότητα <sup>108</sup>.

Το  $\text{NO}$  μπορεί επίσης να συμπεριφερθεί και ως  $\text{NO}^-$  <sup>105-107</sup>. Οι συχνότητες δόνησης των συμπλόκων που περιέχουν το  $\text{NO}$  με αυτή τη μορφή βρίσκονται στην περιοχή 1500- 1700  $\text{cm}^{-1}$  <sup>105-107</sup>. Στην περίπτωση αυτή τα σύμπλοκα είναι εύκολος στόχος από ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια <sup>106,107</sup> όπως για παράδειγμα :



## β. $\text{NO}^+$ .

Η χημεία του  $\text{NO}^+$  χαρακτηρίζεται από αντιδράσεις προσθήκης και υποκατάστασης από πυρηνόφιλα αντιδραστήρια, όπως βάσεις πλούσιες σε ηλεκτρονιακή πυκνότητα και αρωματικά συστήματα. Νιτροσουλίωση σε υδατικά διαλύματα μπορεί να συμβεί σε κέντρα -S, -N, -O και -C σε οργανικά μόρια και περιλαμβάνει την μορφή  $\text{NO}^+$  <sup>109</sup> (Σχήμα 2.4.). Υπάρχει χημική απόδειξη για την ύπαρξη των σωματιδίων  $\text{NO}^+$  σε υδατικά διαλύματα κάτω από όξινες συνθήκες. Η οξίνιση ενός διαλύματος νιτρώδους ανιόντος  $\text{NO}_2^-$ , ενός ενδιάμεσου που χρησιμοποιείται για την παραγωγή  $\text{NO}$ , έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία του

κατιόντος  $\text{NO}^+$ , μέσω απόσπασης υδρογόνου. Η βιολογική δραστηριότητα του  $\text{NO}^+$  κάτω από ασθενώς όξινο ή ουδέτερο περιβάλλον έχει συζητηθεί διεξοδικά <sup>109</sup>. Για παράδειγμα, πολλές νιτροσυλοενώσεις που σχηματίζονται σε ουδέτερες συνθήκες μπορούν να θεωρηθούν ως αποτελεσματικοί μεταφορείς  $\text{NO}$  <sup>84,92</sup>. Άλλα χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι τα μεταλλικά νιτροσυλ-σύμπλοκα, τα θειονιτρώδη ( $\text{RS-NO}$ ), οι νιτροσαμίνες ( $\text{RNH-NO}$ ), οι αλκυλ- και αρυλ- νιτροσοενώσεις ( $\text{RO-NO}$ ), και οι δινιτρο, τρι- και τετρα-οξο ενώσεις ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ) <sup>84,92,105,109</sup>. Οι μη μεταλλικές ενώσεις του τύπου  $\text{X-NO}$  παρουσιάζουν μια διαφοροποίηση στην συχνότητα δόνησης τάσης του δεσμού  $\text{N-O}$   $\nu(\text{NO})$ , που αντανακλά τον χαρακτήρα του  $\text{NO}$  και συνδέεται με την δραστηριότητα του <sup>70,110</sup>.

Στα βιολογικά συστήματα υπάρχει ένα πλήθος πυρηνόφιλων κέντρων, των οποίων η δυνατότητα νιτροσυλίωσης αποτελεί αντικείμενο *in vitro* μελετών. Έχει πραγματοποιηθεί διεξοδική έρευνα για τη απαμίνωση αμινών (πρωτοταγών) και *N*-νιτροσυλίωση (δευτεροταγών και τριτοταγών) στα πλαίσια της καρκινογένεσης <sup>111</sup>. Βρέθηκε ότι το μονοξειδίο του αζώτου μπορεί να προκαλέσει γονιδιακές μεταλλάξεις καθώς μπορεί να απαμινώσει *in vitro* δεοξυνουκλεοζίτες και δεοξυνουκλεοτίδια και να προκαλέσει καταστροφή του DNA. Η τάση για νιτροσυλίωση των θειολών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες <sup>92</sup> και σε βιολογικά συστήματα <sup>112</sup> έχει μελετηθεί εκτεταμένα και ειδικότερα εξετάστηκε η επίδραση του μονοξειδίου του αζώτου σε κάποιες πρωτεΐνες, διαφορετικής φύσης και λειτουργικότητας, που περιέχουν σουλφυδρλικές ομάδες. Οι αντιδράσεις νιτροσυλίωσης μελετήθηκαν και με άλλα πυρηνόφιλα κέντρα με βιολογική σημασία, όπως αμίδια, καρβοξυλ- και υδροξυλ-ενώσεις <sup>109</sup>. Η νιτροσυλίωση αρωματικών δακτυλίων έχει μελετηθεί και έχει προταθεί ο σχηματισμός ενώσεων μεταφοράς φορτίου μεταξύ του  $\text{NO}^+$  και των αρωματικών δοτών ηλεκτρονίων ( $\text{Ar-NO}^+ \rightarrow \text{Ar}^+ - \text{NO}$ ), ενώ βρέθηκε χρησιμοποιώντας την κυκλική βολταμετρία ότι το δυναμικό  $E_c^0$  εξαρτάται γραμμικά από το δυναμικό οξειδωσης του αρωματικού υποκαταστάτη <sup>70</sup>.

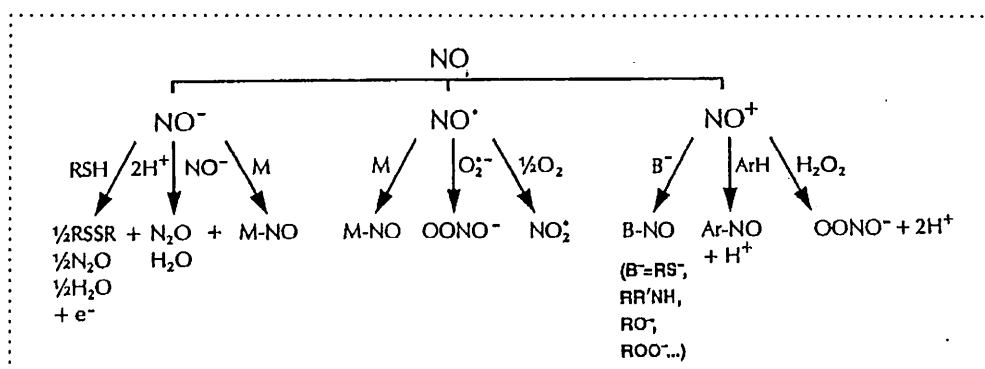
Μολονότι οι αμίνες και οι θειόλες είναι αρκετά δραστικές για νιτροσυλίωση, σε φυσιολογικές συνθήκες ευνοείται ο σχηματισμός των νιτροσυλο-παραγώγων των θειολών εξαιτίας της τάσης των αμινών να βρίσκονται με την πρωτονιωμένη τους μορφή που είναι αδρανής.

### γ. $\text{NO}^-$ .

Λιγότερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στην χημεία του  $\text{NO}^-$  και ειδικότερα σε υδατικά διαλύματα. Οι βασικές του αντιδράσεις κάτω από φυσιολογικές συνθήκες

φαίνονται στο Σχήμα 2.4. Το  $\text{NO}^-$  μετατρέπεται γρήγορα σε  $\text{N}_2\text{O}$  μέσω διμερισμού και αποπρωτονίωσης ( $k \sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>113</sup> και αντιδρά με την  $\text{Fe}^{3+}$ -αίμη<sup>101,114</sup>. Το  $\text{NO}^-$ , επίσης, συμμετέχει σε αντιδράσεις με χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες και θειόλες οδηγώντας σε σουλφιδρική οξείδωση με τον ενδιάμεσο σχηματισμό  $\text{RSNOH}$ <sup>114,115</sup>. Η χημεία του  $\text{NO}^-$  στην αέρια φάση είναι πλούσια και πολύ ενδιαφέρουσα. Μεταφορά ηλεκτρονίων και αντιδράσεις απόσπασης είναι συνηθισμένες και γενικά αποδίδουν ως κύριο προϊόν την ρίζα  $\text{NO}^\bullet$ <sup>90</sup>. Οι S-νιτροσθειόλες θεωρούνται ότι είναι ένα προϊόν της αντίδρασης του  $\text{NO}^-$  με τα δισουλφίδια<sup>90</sup>.

Βλέπουμε, λοιπόν, ότι το μονοξείδιο του αζώτου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μπορεί να βρίσκεται με διάφορες μορφές που η χημεία τους διαφέρει. Οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες του προσδίδουν στο μόριο αυτό ενδιαφέρουσες ιδιότητες στην βιοχημεία.



Σχήμα 2.4. Απεικόνιση της χημείας του  $\text{NO}$  και των οξειδοαναγωγικών του αντιδράσεων.

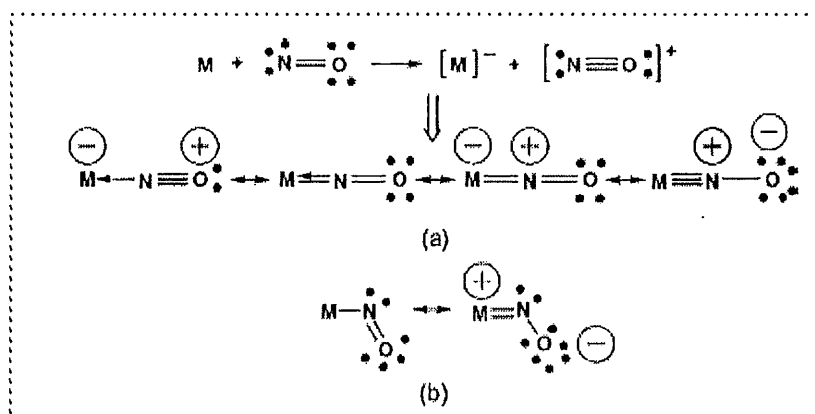
## 2.5. Η ένταξη του μονοξειδίου του αζώτου στα μέταλλα μετάπτωσης

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ένταξη του  $\text{NO}$  στα μέταλλα μετάπτωσης περιλαμβάνει την σύνδεση του ατόμου του N στο μέταλλο, δηλαδή δεσμό  $\text{M-N-O}$ . Άλλοι τύποι ένταξης εμφανίζονται κάτω από ειδικές συνθήκες. Οι τρόποι ένταξης του νιτροσουλ-υποκαταστάτη στα μέταλλα είναι τρεις: α. γραμμική ένταξη  $\text{M-N-O}$ , β. Κυρτή ένταξη  $\text{M-N-O}$ , γ. ένταξη με γεφυρωμένες  $\text{NO}$  ομάδες. Στην πρώτη περίπτωση, ο νιτροσουλ-υποκαταστάτης εντάσσεται στο μέταλλο ως " $\text{NO}^+$ "<sup>116</sup>. Στην δεύτερη περίπτωση, η γωνία του δεσμού είναι περίπου  $120^\circ$  και ο υποκαταστάτης εντάσσεται ως " $\text{NO}^-$ "<sup>117</sup>. Υπάρχουν νιτροσουλ-σύμπλοκα που φέρουν την κυρτή ένταξη αν και δεν είναι εύκολο να υποθέσει κανείς τότε συμβαίνει η περίπτωση αυτή.

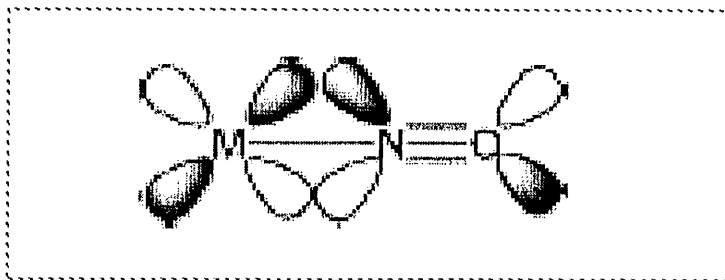
Έχουν εφαρμοστεί απλές θεωρίες μοριακών τροχιακών για την διαπίστωση της μη γραμμικής ένταξης, ενώ οι Ibers, Hoffmann και οι συνεργάτες τους <sup>118</sup> έχουν προτείνει κανόνες, με τους οποίους μπορεί να προβλεφτεί ο τρόπος ένταξης.

Πολύ νωρίς έγιναν προσπάθειες για να εξηγηθεί η ένταξη του NO στα σύμπλοκα των μετάλλων μετάπτωσης βάσει της δόνησης τάσης του NO με την φασματοσκοπία υπερέυθρου, δίνοντας περιορισμένες όμως δομικές πληροφορίες. Ο αποκαλούμενος κανόνας των 18 ηλεκτρονίων αποτελεί μια εξαιρετικά χρήσιμη μέθοδο για την αιτιολόγηση της δομής και της στοιχειομετρίας. Έτσι λοιπόν, μονονιτροσυλοενώσεις που περιέχουν τις γραμμικές ομάδες M-N-O θεωρήθηκε ότι περιέχουν ενταγμένο το NO ως NO<sup>+</sup>, ενώ εκείνες που έχουν κυρτές M-N-O διευθετήσεις θεωρήθηκε ότι η ένταξη γίνεται με τη μορφή NO<sup>-</sup>. Κατά την προσέγγιση του δεσμού σθένους σε μια γραμμική M-N-O διευθέτηση είναι βολικό να θεωρήσουμε τα άτομα N και O στην ομάδα NO<sup>+</sup> είναι sp υβριδοποιημένα. Οι μορφές συντονισμού που συμβάλλουν στη γραμμική σύνδεση των νιτροσυλικών μετάλλων φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 2.5.

Σχήμα 2.5. Ηλεκτρονιακή δομή του σθένους του δεσμού μετάλλου-NO α. ως NO<sup>+</sup> και β. ως NO<sup>-</sup>.



Η χρήση της τιμής της συχνότητας δόνησης τάσης του δεσμού N-O  $\nu(\text{NO})$  για τη διάγνωση της γωνίας του δεσμού M-N-O αποδείχτηκε ως μέθοδος σχετικά αναξιόπιστη. Σε προσέγγιση μοριακών τροχιακών, η σύνδεση του NO σ' ένα μέταλλο θεωρείται ότι έχει δύο συνιστώσες. Η πρώτη περιλαμβάνει την συνεισφορά της ηλεκτρονιακής πυκνότητας από το NO στο μέταλλο από ένα σ τροχιακό του ατόμου N ( $\sigma_2$  στο σχήμα MO, Σχήμα 2.1.) και η δεύτερη την επαναφορά από τα  $d_\pi$  τροχιακά του μετάλλου στα  $\pi^*$  τροχιακά του NO. Η αλληλεπίδραση  $d_\pi-\pi^*$  παρουσιάζεται στο σχήμα 2.6.



Σχήμα 2.6. Απεικόνιση των μοριακών τροχιακών  $d_{\pi}-\pi^*$  που συμμετέχουν στο δεσμό μετάλλου-NO.

Αυτή η περιγραφή της σύνδεσης είναι παρόμοια με αυτήν των μεταλλοκαρβονυλίων. Εντούτοις, επειδή το NO είναι περισσότερο ηλεκτραρνητικό από το CO, είναι καλύτερος αποδέκτης ηλεκτρονίων από αυτό. Επιπλέον, στην M-N-O ομάδα ο δεσμός μετάλλου-αζώτου είναι συνήθως ισχυρός, ενώ ο N-O δεσμός είναι σχετικά ασθενής. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την ένταξη του CO στα μεταλλοκαρβονύλια, όπου ο δεσμός M-C είναι σχετικά ασθενής ενώ ο δεσμός C-O είναι ισχυρός.

Η επιβεβαίωση της ομοιοπολικής φύσης του δεσμού M-N-O και η απόδοση των οξειδωτικών καταστάσεων στο μέταλλο και στο NO στα νιτροσυλοσύμπλοκα, επέτρεψε στους Enemark και Feltham, να προτείνουν ένα μοντέλο, το οποίο μεταχειρίζεται τη νιτροσυλο μεταλλική ένωση ως ενιαία οντότητα <sup>107</sup>. Αυτό αποδόθηκε με τον γενικό τύπο  $\{M(NO)_x\}^n$ , στο οποίο το n είναι ο συνολικός αριθμός των ηλεκτρονίων που υπάρχουν στα τροχιακά d του μετάλλου και στα  $\pi^*$  του NO. Ο αριθμός των d ηλεκτρονίων καθορίζεται από την τυπική οξειδωτική κατάσταση του μετάλλου, χωρίς καμία συνεισφορά στην ομάδα NO. Μερικά παραδείγματα δίνονται παρακάτω:

$[Mn(CN)_5(NO)]^{3-}$	Mn <sup>II</sup>	d <sup>5</sup>	1 $\pi^0$ NO e <sup>-</sup>	$\{Mn(NO)\}^6$
$[Fe(NO)(oep)]$	Fe <sup>II</sup>	d <sup>6</sup>	1 $\pi^0$ NO e <sup>-</sup>	$\{Fe(NO)\}^7$
$[Fe(NO)_2(SR)_2]^-$	Fe <sup>I</sup>	d <sup>7</sup>	2 x 1 $\pi^0$ NO e <sup>-</sup>	$\{Fe(NO)_2\}^9$
$[Co(NO)(NH_3)_5]^{2+}$	Co <sup>II</sup>	d <sup>7</sup>	1 $\pi^0$ NO e <sup>-</sup>	$\{Co(NO)\}^8$
$[Ru(NO)(NH_3)_5]^{2+}$	Ru <sup>II</sup>	d <sup>6</sup>	1 $\pi^0$ NO e <sup>-</sup>	$\{Ru(NO)\}^7$
$[Ru(bpy)_2(NO)_2]^{2+}$	Ru <sup>II</sup>	d <sup>6</sup>	2 x 1 $\pi^0$ NO e <sup>-</sup>	$\{Ru(NO)\}^8$

Παρά αυτό το πραγματικό σχήμα, είναι απαραίτητο για καλύτερη κατανόηση να απεικονίζουμε ξεχωριστά την κατανομή φορτίου μεταξύ μετάλλου και NO, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για την ηλεκτρονιακή και μαγνητική συμπεριφορά των συμπλόκων. Για παράδειγμα είναι δυνατή η ύπαρξη νιτροσυλ-συμπλόκων με τής εξής

απεικονίσεις:  $\{M^{z-1}-(NO^+)\}$ ,  $\{M^z-(NO^0)\}$ , ή  $\{M^{z+1}-(NO^-)\}$ , οι οποίες όμως αντιστοιχούν στον ίδιο τύπο  $\{M(NO)\}^z$ .

### 2.5.1. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός μεταλλικών νιτροσουλ-συμπλόκων

Οι φασματοσκοπίες υπεράυθρου (IR) και παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) είναι οι κυρίαρχες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν τη φύση του δεσμού M-N-O. Η πρώτη είναι απλή στην εφαρμογή της εξετάζοντας την τιμή της συχνότητας δόνησης του δεσμού NO, αν και μερικές φορές είναι παραπλανητική, ενώ η δεύτερη απαιτεί ειδική ερμηνεία αλλά είναι εξαιρετικά πολύτιμη για τον έλεγχο της ηλεκτρονιακής διαμόρφωσης του μετάλλου και μάλιστα μπορεί να δώσει πληροφορίες σε περιπτώσεις με χαμηλή συγκέντρωση του δείγματος ( $10^{-4}M$ ). Άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές που μπορούν να παρέχουν πληροφορίες είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR, που είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τα διαμαγνητικά σύμπλοκα. Παρακάτω παρουσιάζονται πιο αναλυτικά οι πιο σημαντικές τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη συμπλόκων ενώσεων του μονοξειδίου του αζώτου.

- **Φασματοσκοπία IR**

Η τιμή της δόνησης τάσης του δεσμού NO στο μη ενταγμένο NO βρίσκεται στα  $1870\text{ cm}^{-1}$ , ενώ κατά τη σύνδεση με ένα μέταλλο η  $\nu(NO)$  μπορεί να αυξάνεται ή να μειώνεται, ανάλογα με την φύση των υπολοίπων υποκαταστατών στο σύμπλοκο, την ηλεκτρονιακή διαμόρφωση και το φορτίο<sup>119</sup>. Γενικά, η τιμή της συχνότητας δόνησης τάσης του NO για τα σύμπλοκα με γραμμικό δεσμό M-N-O εμφανίζεται στην περιοχή  $1950-1450\text{ cm}^{-1}$ , ενώ για τα σύμπλοκα που περιλαμβάνουν κυρτούς δεσμούς M-N-O εμφανίζεται στην περιοχή  $1720-1400\text{ cm}^{-1}$ . Όταν το NO γεφυρώνει δύο ή περισσότερα άτομα μετάλλου η τιμή αυτή μπορεί να εμφανίζεται μεταξύ  $1650$  και  $1300\text{ cm}^{-1}$ . Αυτές οι περιοχές συνήθως επικαλύπτονται σημαντικά από άλλες ταινίες των συμπλόκων και έτσι η φασματοσκοπία αυτή δεν αποτελεί πάντα ένα απόλυτα αξιόπιστο εργαλείο για το συσχετισμό ανάμεσα στην τιμή της  $\nu(NO)$  και της φύσης του δεσμού M-N-O.

- **Φασματοσκοπία NMR**

Αυτή η τεχνική στηρίζεται στον συντονισμό των πυρήνων  $^{14}\text{N}$  ή  $^{15}\text{N}$  διαμαγνητικών συμπλόκων και έτσι είναι κάπως περιορισμένη η χρήση της. Ο πυρήνας  $^{14}\text{N}$  είναι τετραπολικός ( $I=1$ ) και αν και έχει μια υψηλή φυσική αφθονία, έχει μικρούς χρόνους αποδιέγερσης και η χρήση του είναι περιορισμένη. Σε αντίθεση, το  $^{15}\text{N}$  ( $I=1/2$ ) έχει μια πολύ χαμηλή φυσική αφθονία αλλά έχει πολύ μεγαλύτερους χρόνους αποδιέγερσης. Έτσι, και οι δύο πυρήνες έχουν τις χρήσεις τους στη φασματοσκοπία NMR, αλλά είναι πιο συνηθισμένο να μελετάμε τον πυρήνα  $^{15}\text{N}$  <sup>120</sup>. Έτσι, οι χημικές μετατοπίσεις του  $^{15}\text{N}$  ποικίλλουν, με ένα ευρύ φάσμα για ομάδες που περιέχουν γραμμικό M-N-O ενώ το  $\delta_{\text{N}}$  τείνει να αυξηθεί κατά μήκος της σειράς των μετάλλων μετάπτωσης στον περιοδικό πίνακα. Γενικά, οι χημικές μετατοπίσεις  $^{15}\text{N}$  για κυρτές νιτροσυλικές ομάδες είναι περισσότερο μετατοπισμένες (με πρότυπο το  $\text{MeNO}_2$ ) από εκείνες σε γραμμικά νιτροσυλικά συστήματα. Το  $\delta_{\text{N}}$  για κυρτά M-N-O συστήματα κυμαίνεται από ~950 έως 350 ppm ενώ για γραμμικά M-N-O και *cis*- $\text{M}(\text{NO})_2$  συστήματα από ~200 έως -110 ppm.

- **Φασματοσκοπία ESR**

Με τη φασματοσκοπία ESR είναι δυνατή η απόκτηση πληροφοριών σχετικά με τη ηλεκτρονιακή δομή παραμαγνητικών σωματιδίων και νιτροσυλ-συμπλόκων. Για παράδειγμα, το σύμπλοκο του μαγγανίου (III)  $\text{Mn}(\text{TPP})\text{-(CN)}$  ( $S=2$ ) αντιδρά με το NO δίνοντας  $\text{Mn}(\text{TPP})\text{-(CN)-(NO)}$ , στο οποίο το φάσμα ESR υποδεικνύει κβαντικό αριθμό spin  $S=1/2$ . Όμοια, το προϊόν της αντίδρασης του NO με το  $\text{Cr}^{\text{II}}(\text{TPP})$  ( $S=2$ ) παρουσιάζει ένα φάσμα ESR με αριθμό spin  $S=1/2$ , ενώ η αντίδραση του NO με το  $\text{Mn}^{\text{II}}(\text{TPP})$  ( $S=5/2$ ) δίνει ένα προϊόν με  $S=0$  <sup>51,52</sup>. Έτσι, η ένταξη του NO σε τέτοια μεταλλικά κέντρα δίνει συνήθως υψηλού πεδίου και χαμηλού spin σύμπλοκα.

## 2.6. Νιτροσυλ-σύμπλοκα μετάλλων

### 2.6.1. Νιτροσυλ-σύμπλοκα του ρουθηνίου

Η χρήση των νιτροσυλο μεταλλικών συμπλόκων ως αντιδραστηρίων που απελευθερώνουν NO *in vivo* αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πεδίο έρευνας.



Ειδικότερα, σύμπλοκα που μπορούν να απελευθερώσουν το NO κατά την ακτινοβόληση τους με ορατό φώς παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον <sup>121</sup>.

Μεταξύ των πιο σημαντικών νιτροσυλο συμπλόκων είναι και τα σύμπλοκα του ρουθηνίου (II), που έχει ηλεκτρονιακή διαμόρφωση  $d^6$ . Στα σύμπλοκα αυτά, η νιτροσυλ-ομάδα είναι τις περισσότερες φορές ενταγμένη ως  $\text{NO}^+$ . Το νιτροσυλ-κατιόν  $\text{NO}^+$  θεωρείται ως ισχυρό οξειδωτικό <sup>122</sup>. Πολλά σύμπλοκα του ρουθηνίου έχουν προταθεί ως θεραπευτικά αντιδραστήρια, ενώ άλλα <sup>123,124</sup> για την φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου (PDT) <sup>125-127</sup>. Έχει συντεθεί ένας μεγάλος αριθμός νιτροσυλ-συμπλόκων του ρουθηνίου του τύπου  $\{\text{RuNO}\}^6$  μέχρι σήμερα, και έχουν μελετηθεί οι φωτοχημικές και ηλεκτροχημικές τους ιδιότητες <sup>128</sup>. Η δραστηριότητα του νιτροσυλο-υποκαταστάτη μελετήθηκε ακόμη και σε συνάρτηση της ηλεκτρονιακής διαμόρφωσης του συστήματος Ru-NO, αλλά και σε συνάρτηση με την παρουσία άλλων υποκαταστατών <sup>129</sup>. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε σύμπλοκα του τύπου  $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{L}^1)(\text{L}^2)_4]^{n+}$  ( $\text{L}^1=\text{Cl}, \text{NO}_2$  ή  $\text{ONO}$ ,  $\text{L}^2$ =πυριδίνη, 2,2'-διπυριδίνη) έδειξαν ότι η νιτροσυλ-ομάδα στα σύμπλοκα αυτά παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα των συμπλόκων κατά την δομική αναδιευθέτηση των υποκαταστατών ( $\text{L}^1$ ). Η αναδιευθέτηση αυτή, συνοδεύεται από την αναγωγή του νιτροσυλο υποκαταστάτη <sup>130</sup>. Στα σύμπλοκα του τύπου  $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{L}^1)(\text{L}^2)_4]^{n+}$  ο υποκαταστάτης  $\text{L}^1$  λειτουργεί ως ευκίνητη ομάδα και κανονίζει την δραστηριότητα του νιτροσυλο υποκαταστάτη, ενώ οι πυριδυλ-υποκαταστάτες ( $\text{L}^2$ ) σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς με το κέντρο του μετάλλου και είναι αδρανείς.

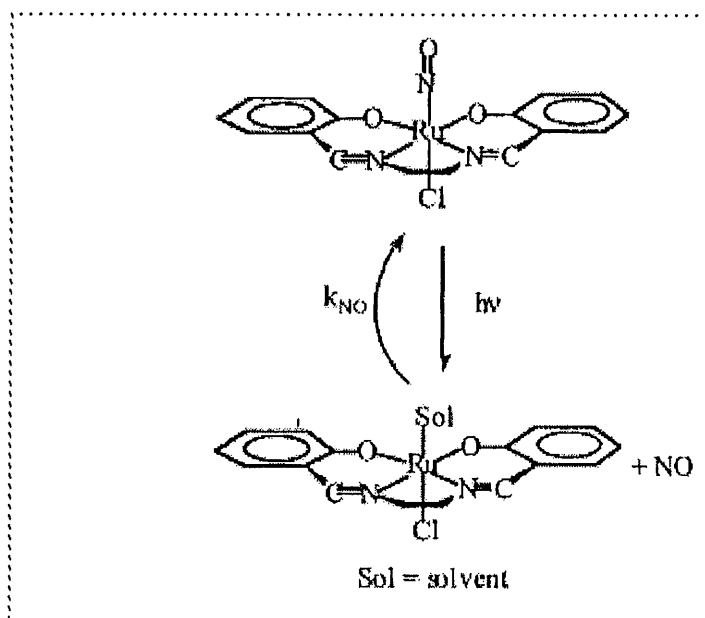
Το σύμπλοκο  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{H}_2\text{O})_2]$  έχει χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή καταλυτών στην βιομηχανία για τον ισομερισμό των ολεφινών και για την αποσουλφούρωση καταλυτών. Το σύμπλοκο αυτό αποτελεί την πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση των συμπλόκων  $[\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}_3(\text{NO})]$  <sup>131</sup>  $[\text{Ru}(\text{salen})\text{Cl}(\text{NO})]^+$  <sup>132</sup>  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{L})_2]$  ( $\text{L}=\frac{1}{2}[\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2]$ ,  $\text{SR}_2$ ,  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{AsPPh}_3$ ) <sup>133,134,135</sup> και  $[\text{Ru}(\text{Et}_2\text{NCS})_3(\text{NO})]$  <sup>136</sup>. Είναι γνωστό ότι το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}_3(\text{NO})]$  υφίσταται με την μορφή των ισομερών *fac* και *mer*. Στο ισομερές *mer*, *cis* η αιθυλενοδιαμίνη βρίσκεται σε *trans* θέση ως προς το  $\text{NO}^+$ , ενώ τα τρία χλώρια  $\text{Cl}^-$  είναι σε θέση *-cis*.

Τα σύμπλοκα του τύπου  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{Cl}(\text{NO})]^{2+}$ , όπου  $\text{L}$ =αιθυλενοδιαμίνη <sup>137</sup> διθειοακετυλακετονικό <sup>138</sup> διθειοκαρβαμίδια <sup>139</sup> και διπυριδυλαμίνη <sup>127</sup> έχουν *trans* γεωμετρία, με το χλώριο  $\text{Cl}^-$  σε *trans* θέση ως προς το  $\text{NO}^+$ . Τα σύμπλοκα με τον μακροκυκλικό υποκαταστάτη cyclam *trans*- $[\text{Ru}(\text{cyclam})\text{Cl}(\text{NO})]$  και *meso*- $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dioxocyclam})]$ , (dioxocyclam=1,4,8,11-τετρααζα-κυκλο-τετραδεκανιο-

5,7-διόνη) έχουν μελετηθεί και χαρακτηρισθεί πλήρως με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους, ενώ και στα δυο σύμπλοκα βρέθηκε ότι το  $\text{Cl}^-$  βρίσκεται σε *trans* θέση ως προς το  $\text{NO}^+$  <sup>123</sup>.

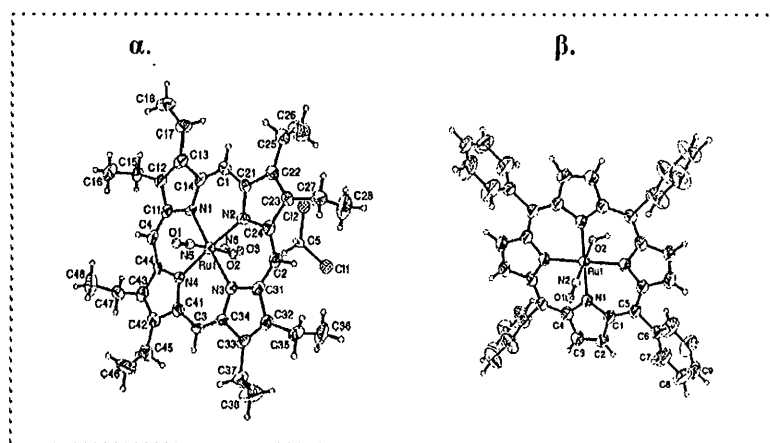
Οι υποκαταστάτες τεταρτοταγούς φωσφόρου είναι πολύ αποτελεσματικοί στην σταθεροποίηση της οξειδωτικής κατάστασης του  $\text{Ru(II)}$  και στην κινητικότητα των υποκαταστατών που έχουν ενταχθεί σε *trans* θέση ως προς αυτόν, όπως για παράδειγμα στο σύμπλοκο  $\text{trans}-[(\text{NO})(\text{P}(\text{OEt})_3)_3(\text{NH}_3)_4\text{Ru}]^{3+}$  <sup>140,141</sup>, όπου εξαιτίας του *trans*-φαινομένου το σύμπλοκο απελευθερώνει μονοξείδιο του αζώτου με ταυτόχρονη αναγωγή. Δυστυχώς, η φύση του ισχυρού π-αποδέκτη υποκαταστάτη διευκολύνει την προσβολή από  $\text{OH}^-$  στο ενταγμένο  $\text{NO}$  σε  $\text{NO}_2^-$ . Μελετήθηκε *in vitro* η βιολογική δραστηριότητα του συμπλόκου  $\text{trans}-[(\text{NO})\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NH}_3)_4\text{Ru}]^{3+}$  σε ποντίκια με ικανοποιητικά αποτελέσματα <sup>142</sup>. Η δραστηριότητα του, είναι πιθανόν να εξαρτάται από την απόσπαση του  $\text{NO}$  με ταυτόχρονη αναγωγή αλλά και του υποκαταστάτη φωσφόρου, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στο δυναμικό αναγωγής και στην ευκινησία του ενταγμένου  $\text{NO}$ .

Έχει επίσης μελετηθεί η φωτοχημεία πολλών συμπλόκων του  $\text{Ru(III)}$  με υποκαταστάτη το *salen* (*salen*= διανιόν της  $\text{N}$ ,  $\text{N}'$ -δισ(σαλικυλιδινο)-αιθυλενοδιαμίνης) τύπου  $[\text{Ru}(\text{salen})(\text{X})(\text{NO})]$  ( $\text{X} = \text{Cl}^-$ ,  $\text{ONO}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) σαν πιθανών φωτοχημικών μεταφορέων του  $\text{NO}$  <sup>143</sup>. Η ακτινοβόληση των συμπλόκων αυτών με ορατό φως οδηγεί σε απελευθέρωση του  $\text{NO}$  από το σύμπλοκο και σε σχηματισμό επιδιαλυτωμένων προϊόντων ( $[\text{Ru}(\text{salen})(\text{X})(\text{Sol})]$ ) (Σχήμα 2.7.).



Σχήμα 2.7. Αντίδραση απόσπασης του  $\text{NO}$  από το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{salen})\text{Cl}(\text{NO})]$  με ακτινοβόληση.

Η σύνθεση, οι κρυσταλλικές δομές και οι χημικές ιδιότητες των συμπλόκων  $[\text{Ru}(\text{TPP})(\text{NO})(\text{ONO})]$ ,  $[\text{Ru}(\text{TPP})(\text{NO})(\text{OH})]$ ,  $[\text{Ru}(\text{OEP})(\text{NO})(\text{ONO})]$  και  $[\text{Ru}(\text{OEP})(\text{NO})(\text{OH})]$  όπου TPP=τετραφαινυλπορφυρινατο διανιόν και OEP=οκτααιθυλπορφυρινατοδιανιόν μελετήθηκαν από τους Miranda και Ford <sup>144,145</sup> και βρέθηκε ότι σχηματίζεται ως προϊόν και το  $\text{N}_2\text{O}_3$  μέσω της αντίδρασης σχηματισμού δινιτροσυλ-συμπλόκου του  $\text{Ru}^{2+}$ , το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται από το οξυγόνο και προκύπτει  $\text{N}_2\text{O}_3$  ελεύθερο ή ενταγμένο στο  $\text{Ru}^{2+}$ . Η σύνθεση των συμπλόκων αυτών ξεκινά από τα ανάλογα καρβονυλικά σύμπλοκα, όπου οι καρβονυλομάδες αντικαθίστανται από τη νιτροσυλ-ομάδα. Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 2.8.) δίνονται οι κρυσταλλικές δομές του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{TPP})(\text{NO})(\text{OH})]$  και  $[\text{Ru}(\text{TPP})(\text{NO})(\text{ONO})]$ , οι οποίες συμφωνούν με τα φασματοσκοπικά δεδομένα, ενώ βρέθηκε ότι η κατασκευή (πακετάρισμα) των κρυστάλλων εξαρτάται από την φύση των μικρών υποκαταστατών που είναι ενταγμένοι στο ρουθίνιο.

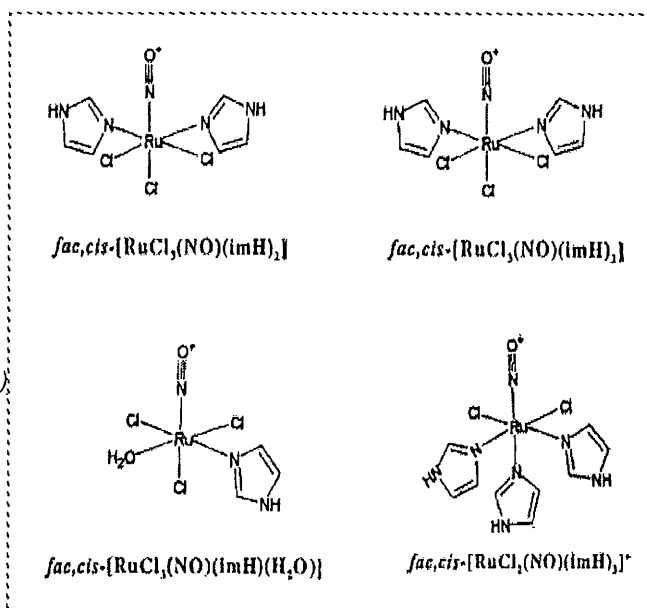


Σχήμα 2.8. Κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων α.  $[\text{Ru}(\text{TPP})(\text{NO})(\text{OH})]$  και β.  $[\text{Ru}(\text{TPP})(\text{NO})(\text{ONO})]$ .

Ο Shepherd και οι συνεργάτες του μελέτησαν σύμπλοκες ενώσεις του τύπου  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{hedta})\text{X}]$  όπου  $\text{X}=\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}^\cdot$ ,  $\text{NO}^-$  χρησιμοποιώντας  $^{15}\text{N}$ -NMR, ηλεκτροχημικές τεχνικές και φασματοσκοπία υπερύθρου IR <sup>146</sup>. Στην μελέτη αυτή αποδείχτηκε ότι υπάρχει διαφορά στην τάξη δεσμού N-O της ενταγμένης ομάδας για το  $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NO}^+)$  και το  $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NO}^\cdot)$ , εξαιτίας της αντιστάθμισης της π-συνεισφοράς και της σ-απόσπασης από το μεταλλικό κέντρο. Η ίδια ομάδα ερευνητών <sup>147</sup> μελέτησε με φασματοσκοπίες NMR και IR τα προϊόντα των αντιδράσεων του συμπλόκου  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{H}_2\text{O})_2]$  με ιμιδαζόλιο, ιστιδίνη, ισταμίνη και N-μεθυλιμινοδιακετοξικό εστέρα. Τα σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους, ενώ βρέθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$ -NMR στα σύμπλοκα 1:1, 1:2 και 1:3 με τους ιμιδαζολικούς υποκαταστάτες ότι το ιμιδαζόλιο ανταλλάσσεται πολύ γρήγορα σε διάλυμα. Τα

σύμπλοκα με ιστιδίνη και ισταμίνη είναι κινητικά πιο σταθερά σε διάλυμα. Από την μελέτη, αυτή προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση που έχει η προσθήκη ενός υποκαταστάτη, σε *cis*- ή *trans*- θέση ως προς το NO, στη συχνότητα δόνησης τάσης  $\nu(\text{NO})$ .

Αρκετά ωρίς υπήρξαν μελέτες από τους Armor και Taube<sup>148,149</sup> σχετικά με την κινητική της νιτροσυλίσωσης του συμπλόκου του Ru (III)  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  σε υδατικά διαλύματα. Οι Armor, Scheidegger και Taube<sup>148</sup> βρήκαν ότι η ταχύτητα της αντίδρασης στην περίπτωση της νιτροσυλίσωσης είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από ότι η αντικατάσταση της  $\text{NH}_3$  από άλλους υποκαταστάτες.



Σχήμα 2.9. Δομές των συμπλόκων

$[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{imH})_2]$ ,  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{imH})(\text{H}_2\text{O})]$   
και  $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{imH})_3]$  (*imH*=ιμιδαζόλιο)

Κατέληξαν ότι η αντίδραση προχωρά με ένα βοηθητικό μηχανισμό, όπου το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο του  $\text{Ru}^{3+}$  συζευγνύεται με το μονό ηλεκτρόνιο του NO και δίνει ένα επταύποκατεστημένο ενδιάμεσο σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6(\text{NO})]^{3+}$ . Αντίθετα, οι Pell και Armor<sup>149</sup> βρήκαν τελείως διαφορετικά προϊόντα σε αλκαλικό περιβάλλον. Πάνω από pH 8.3 η αντίδραση του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  με το NO οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{N}_2)]^{2+}$ . Ένας πιθανός μηχανισμός περιλαμβάνει την αντίδραση του  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  με το  $\text{OH}^-$ , δίνοντας το ενδιάμεσο προϊόν  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{NH}_2)]^{2+}$ , το οποίο στη συνέχεια προσβάλλεται από το NO και προκύπτει το  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{N}_2)]^{2+}$ .

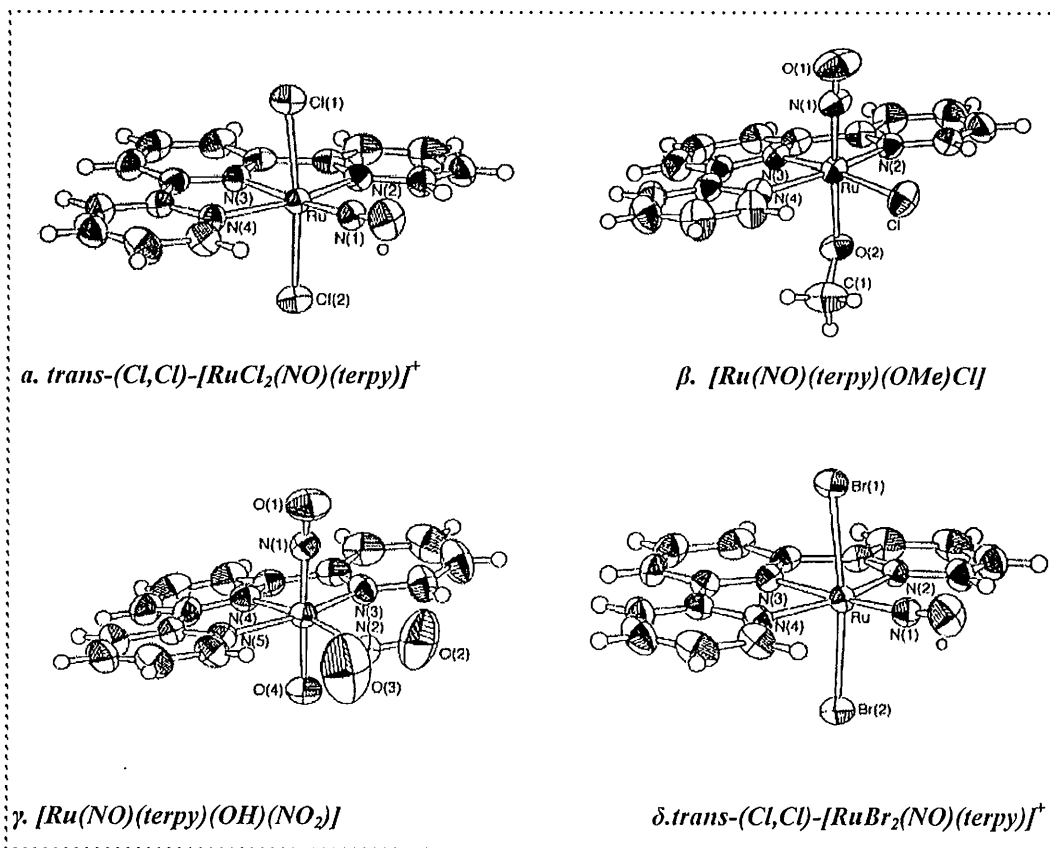
### 2.6.2. Νιτροσυλ-σύμπλοκα του ρουθηνίου με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες

Έχουν συντεθεί και μελετηθεί σε βάθος πολλά σύμπλοκα του ρουθηνίου που περιέχουν πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες, όπως η 2,2'-διπυριδίνη (bpy) ή η 2,2':6', 2''-τερπυριδίνη (terpy) <sup>129,150-166</sup>. Ο Meyer και οι συνεργάτες του <sup>129,164-166</sup> συνέθεσαν και χαρακτήρισαν ένα μεγάλο αριθμό νιτροσυλο-συμπλόκων του ρουθηνίου, όπως τα σύμπλοκα  $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{terpy})(\text{bpy})]^{3+}$  <sup>166</sup>  $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{terpy})(\text{acac})]^{3+}$  <sup>165</sup> και  $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\text{X}]^{n+}$  ( $\text{X} = \text{N}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  ( $n=2$ );  $\text{X} = \text{NH}_3$ , πυριδίνη,  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $n=3$ )) <sup>129,164</sup>. Η φωτόλυση του συμπλόκου  $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{bpy})_2]^{2+}$  σε  $\text{CH}_3\text{CN}$ , υπό ατμόσφαιρα αργού, είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του NO και το σχηματισμό των φωτοπροϊόντων  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_2(\text{CH}_3\text{CN})\text{Cl}]^+$  και  $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bpy})_2(\text{CH}_3\text{CN})\text{Cl}]^{2+}$ , όπως διαπιστώθηκε από τα ηλεκτρονιακά φάσματα των συμπλόκων <sup>129</sup>. Για να μελετηθεί η ισορροπία νιτροσυλ ( $\text{NO}^+$ )-νιτρο ( $\text{NO}_2^-$ ) έγινε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η ηλεκτροχημική μελέτη συμπλόκων του Ru με τύπο  $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\text{X}]^{n+}$  ( $\text{X} = \text{ONO}_2^-$ ,  $\text{OCHO}^-$ ,  $\text{MeOCO}^-$  ( $n=1$ );  $\text{X} = \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $n=2$ )) <sup>160,162,163</sup>. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη ισομερισμού μεταξύ της νιτροσυλ- και νιτρο- μορφής που εξαρτάται σημαντικά από τους υπάρχοντες υποκαταστάτες. Επίσης, το διπυρηνικό σύμπλοκο  $[[\text{Ru}(\mu\text{-NO})]_2(\text{bpy})_4]^{2+}$  έχει συντεθεί και χαρακτηριστεί με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους <sup>159,161</sup>. Στο σύμπλοκο αυτό, οι δυο νιτροσυλομάδες γεφυρώνουν τα δυο κέντρα Ru, με την νιτροσυλ-ομάδα να είναι αρνητικά φορτισμένη. Έχουν λυθεί οι κρυσταλλικές δομές πολλών νιτροσυλ αλλά και νιτρο συμπλόκων, όπως των συμπλόκων *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2(\text{NO}_2)](\text{PF}_6)_2$ , *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})(\text{py})_2(\text{NO}_2)](\text{PF}_6)_2$ , *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2(\text{ONO})](\text{PF}_6)_2$  και *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})(\text{py})_2(\text{ONO})](\text{PF}_6)_2$  <sup>153</sup>. Σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει η οκταεδρική συμμετρία, ενώ το NO εντάσσεται με ένα μήκος δεσμών Ru-N που κυμαίνεται από 1.74-1.77 Å.

Η σύνθεση των συμπλόκων *fac*-(Cl)- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{bpy})]$  και *mer*-(Cl)- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{bpy})]$  ξεκινά από τα αντίστοιχα καρβονυλικά σύμπλοκα  $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})(\text{CO})_2]$  σε άκρως όξινες συνθήκες, ενώ χαρακτηρίστηκαν πλήρως και δομικά <sup>150</sup>. Ακολουθώντας μια παρόμοια συνθετική πορεία πραγματοποιήθηκε και η σύνθεση των συμπλόκων  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dcbpy})]$  (dcbpy = 4,4'-δικαρβοξυ-2,2'-διπυριδίνη),  $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^+$  και  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dmbpy})]$  (dmbpy = 4,4'-διμεθυλ-2,2'-διπυριδίνη), τα οποία χαρακτηρίστηκαν και κρυσταλλογραφικά <sup>151</sup>.

Άλλα παραδείγματα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον αποτελούν τα σύμπλοκα του τύπου  $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})(\text{py})_2\text{X}]^{n+}$  ( $\text{X} = \text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NCS}^-$  ( $n=2$ );  $\text{py}$  ( $n=3$ )), τα οποία χαρακτηρίστηκαν και μελετήθηκαν εκτεταμένα με διάφορες ηλεκτροχημικές μεθόδους <sup>153,157</sup>. Ακόμη, συντέθηκαν, χαρακτηρίστηκαν και μελετήθηκε η φωτοχημεία μικτών συμπλόκων του ρουθηνίου με υποκαταστάτες μονοξειδίου του αζώτου,  $\text{bpy}$  και 4,4'-διπυριδύλιο του γενικού τύπου  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bipy})\text{X}]^{n+}$  ( $\text{bpy} = 2,2'$ -διπυριδύλιο,  $\text{bipy} = 4,4'$ -διπυριδύλιο και  $\text{X} = \text{Br}^-$ ,  $\text{ONO}^-$ ,  $\text{CN}^-$  ( $n=1$ ),  $\text{MeCN}^-$ ,  $\text{PPh}_3$  ( $n=2$ ) και  $\text{NO}^+$  ( $n=3$ )) <sup>154,156</sup>. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι η ακτινοβόληση των διαλυμάτων ακετονιτριλίου των συμπλόκων με  $\text{X} = \text{Br}^-$ ,  $\text{ONO}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{PPh}_3$  με ορατό φως είχε ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του 4,4'-διπυριδυλίου με διαλύτη. Η απόσπαση του  $\text{NO}$  λόγω ακτινοβόλησης στα 355 nm του συμπλόκου  $\text{cis}-[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{bpy})_2](\text{PF}_6)_2$  μελετήθηκε σε υδατικά διαλύματα με τεχνικές παλμικής φωτόλυσης <sup>155</sup>. Επίσης, η ανάλογη παλμική φωτόλυση με τη χρήση laser στα 355 nm πραγματοποιήθηκε σε μια σειρά συμπλόκων του γενικού τύπου  $\text{cis}-[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\text{L}]^{3+}$  ( $\text{L} = \text{py}$ , 4-πικολίνη, 4-ακετυλπυριδίνη) για να μελετηθεί η απελευθέρωση του  $\text{NO}$  <sup>152</sup>. Το κύριο προϊόν της ακτινοβόλησης του συμπλόκου  $\text{cis}-[\text{RuL}(\text{bpy})_2(\text{NO})]^{3+}$  προτάθηκε ότι είναι το ενδιάμεσο σύμπλοκο  $\text{cis}-[\text{Ru}^{\text{III}}\text{L}(\text{bpy})_2(\text{NO}^\cdot)]^{3+}$ , από το οποίο στη συνέχεια απελευθερώνεται  $\text{NO}$  και προκύπτει το σύμπλοκο  $\text{cis}-[\text{RuL}(\text{bpy})_2(\text{OH})]^{2+}$ .

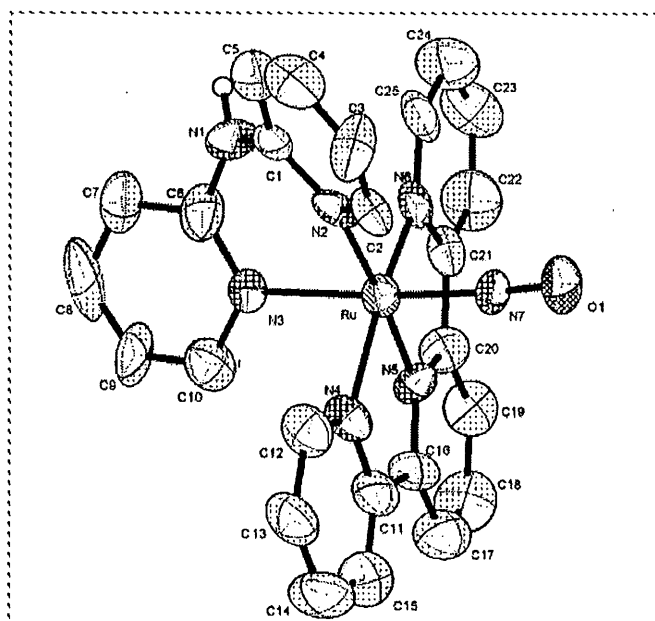
Η κρυσταλλική δομή του κατιόντος  $\text{trans}-(\text{Cl},\text{Cl})-[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]^+$  έδειξε ότι τα δυο χλώρια βρίσκονται σε αξονικές θέσεις σε  $\text{trans}$ -θέση το ένα ως προς το άλλο, ενώ το  $\text{NO}$  βρίσκεται στο επίπεδο του υποκαταστάτη  $\text{terpy}$  (Σχήμα 2.10). Επίσης, μελετήθηκαν οι αντιδράσεις του συμπλόκου αυτού με μονοανιονικούς υποκαταστάτες όπως οι  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$  και  $\text{N}_3^-$  σε  $\text{H}_2\text{O}$  ή  $\text{MeOH}$  <sup>158</sup>. Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα  $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{terpy})(\text{OH})(\text{NO}_2)]$ ,  $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{terpy})(\text{OMe})\text{Cl}]$ ,  $\text{trans}-(\text{Cl},\text{Cl})-[\text{RuBr}_2(\text{NO})(\text{terpy})]^+$  χαρακτηρίστηκαν με κρυσταλλογραφικές και φασματοσκοπικές μεθόδους <sup>158</sup>. Η αντικατάσταση του χλωρο-υποκαταστάτη στο σύμπλοκο  $\text{trans}-(\text{Cl},\text{Cl})-[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]^+$  με  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$  και  $\text{N}_3^-$  έδειξε ότι επιφέρει αλλαγές στην γεωμετρία των συμπλόκων.



Σχήμα 2.10. Κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων α.  $trans-(Cl,Cl)-[RuCl_2(NO)(terpy)]^+$  β.  $[Ru(NO)(terpy)(OMe)Cl]$ , γ.  $[Ru(NO)(terpy)(OH)(NO_2)]$  και δ.  $trans-(Cl,Cl)-[RuBr_2(NO)(terpy)]^+$ .

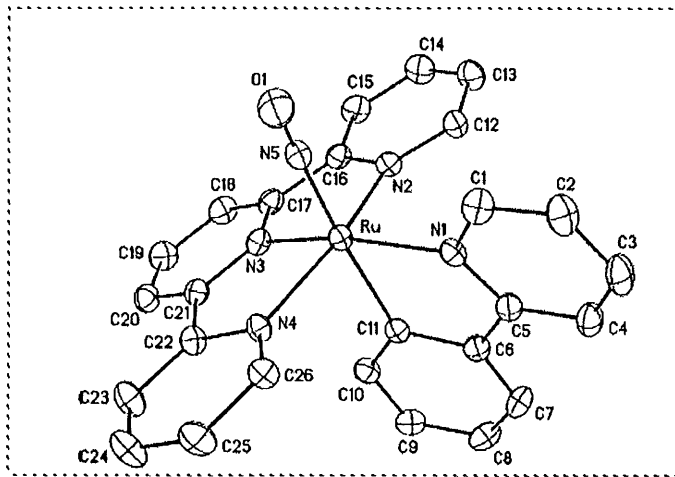
Μελετήθηκε ακόμη, η επίδραση του υποκαταστάτη X σε φαινόμενα μεταφοράς ηλεκτρονίων των συμπλόκων του τύπου  $[Ru(terpy)(L)(X)]^{n+}$ ,  $L= 2,2'$ -διπυριδουλαμίνη και  $X= Cl^-, H_2O, NO_2^-, NO^+, O^{2-}$ ,  $n=1,2,3$ , των οποίων η σύνθεση ξεκινά από το σύμπλοκο  $[Ru(terpy)Cl_3]$ , όπως επίσης και οι ηλεκτροχημικές και

φωτοφυσικές ιδιότητες τους <sup>167</sup>. Η κρυσταλλική δομή του νιτροσουλ συμπλόκου φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 2.11. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(L)(X)]^{n+}$ ,  $L= 2,2'$ -διπυριδουλαμίνη.

Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{phry})(\text{trpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_2$  όπου  $\text{phry} = 2$ -φαινυλπυριδίνη, το οποίο συντέθηκε και χαρακτηρίστηκε με πληθώρα φασματοσκοπικών και ηλεκτροχημικών τεχνικών<sup>168</sup>. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου (Σχήμα 2.12.) έδειξε ότι ο υποκαταστάτης NO βρίσκεται σε *trans* θέση ως προς τη φαινυλ-ομάδα του υποκαταστάτη  $\text{phry}$ . Η σημαντική παρέκκλιση από τη γραμμικότητα του δεσμού Ru-NO (με γωνία δεσμού  $167^\circ$ ) μπορεί να αποδοθεί στις ισχυρές ιδιότητες του  $\sigma$ -δότη υποκαταστάτη, δηλαδή της φαινυλ-ομάδας.



Σχήμα 2.12. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{phry})(\text{trpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_2$ .

## 2.7. Φωτοχημεία και Φωτοθεραπεία

Το φως είναι χρήσιμο εργαλείο για τη θεραπεία και τη διάγνωση στην ιατρική<sup>169-179</sup>. Η «θεραπευτική φωτοχημεία» ασχολείται με τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα όταν φάρμακα ή διαγνωστικά αντιδραστήρια εκτίθενται σε υπεριώδη ή ορατή ακτινοβολία. Πολλές φορές, φαρμακευτικές ουσίες όταν φωτοενεργοποιούνται *in vivo* προκαλούν θεραπευτικά αποτελέσματα. Ο στόχος της «θεραπευτικής φωτοχημείας» είναι να αποκτηθεί η γνώση: (α). της συσχέτισης μεταξύ της φωτοδραστικότητας ενός φαρμάκου *in vitro* και της βιολογικής δραστηρότητας του *in vivo* και (β). της συσχέτισης μεταξύ της μοριακής δομής του και της φωτοδραστικότητας του *in vivo*. Οι παραπάνω παράγοντες είναι πολύ σημαντικοί για τον σχεδιασμό φαρμάκων, αφού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιωθεί το φωτοθεραπευτικό αποτέλεσμα.

Η χρήση της υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας ως θεραπευτικού μέσου στην κλινική ιατρική καλείται φωτοθεραπεία και εμπίπτει σε δύο κατηγορίες: (α) την άμεση, όταν βιολογικά μόρια όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα ή και μικρότερα μόρια



απορροφούν φως και υποβάλλονται σε μια αλλαγή και (β) στην έμμεση, όταν το αποτέλεσμα επιτυγχάνεται μέσω ενός φωτοευαίσθητου φαρμάκου, το οποίο απορροφά την ακτινοβολία. Η ακολουθία των αντιδράσεων που οδηγεί στη θεραπευτική επίδραση στην έμμεση φωτοθεραπεία ξεκινά με την απορρόφηση της υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας από ένα φάρμακο. Στην συνέχεια, το φωτοενεργοποιημένο φάρμακο υποβάλλεται σε μια σειρά διαδικασιών, όπως φωτοχημική αντίδραση του ίδιου του φαρμάκου, φωτοαντίδραση με ενδογενή μόρια, ή μεταφορά ενέργειας σε ενδογενή σωματίδια. Ένας από τους πιο ενεργούς ερευνητικούς τομείς της έμμεσης φωτοθεραπείας αποτελεί σήμερα η φωτοθεραπεία όγκων αποκαλούμενη και φωτοδυναμική θεραπεία (PDT, PhotoDynamic Therapy)<sup>169-179</sup>. Η βασική ιδέα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι η εισαγωγή μιας φωτοευαίσθητης ένωσης που παρουσιάζει εκλεκτικότητα στον καρκινικό ιστό. Στην συνέχεια και αφού επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή συγκέντρωσή της στον καρκινικό ιστό, ο όγκος ακτινοβολείται με ορατή ή υπεριώδη ακτινοβολία. Τα δραστικά πλέον σωματίδια του φωτοθεραπευτικού αντιδραστήριου υποβάλλονται σε διάφορες αντιδράσεις, όπως αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου και ενέργειας που είναι πολύ σημαντικές για την επίτευξη του στόχου. Ρίζες οξυγόνου που παράγονται κατά την διαδικασία αυτή είναι υπεύθυνες για την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων<sup>170</sup>. Με τη χρήση διαφόρων οπτικών διατάξεων είναι δυνατό να ακτινοβοληθούν εσωτερικοί όγκοι κάνοντας έτσι την φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεσματική για όγκους που δεν βρίσκονται πολύ κοντά στην επιφάνεια του δέρματος. Γενικά, η φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου παρουσιάζει σημαντική εκλεκτικότητα αφού η ακτινοβολία μπορεί εύκολα να κατευθυνθεί στον επιθυμητό στόχο.

## **2.8. Καταστροφή του DNA υπό την επίδραση του μονοξειδίου του αζώτου**

Η μεγάλη δραστικότητα του μονοξειδίου του αζώτου, αν και συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, το καθιστά ικανό να προκαλέσει ζημιές σε κύτταρα και ιστούς<sup>180</sup>. Το  $\dot{\text{N}}\text{O}$  μπορεί να αντιδράσει με μεγάλη ποικιλία βιομορίων αλλά και με το DNA των κυττάρων με πολλαπλούς τρόπους. Για παράδειγμα, η μετατροπή του σε νιτρικό ανυδρίτη  $\text{N}_2\text{O}_3$  ή υπεροξυνιτρώδες ιόν  $\text{ONOO}^-$  μέσα στον οργανισμό, μπορεί να οδηγήσει σε νιτροσυλική απαμίνωση των βάσεων του DNA, όπως της

γουανίνης και κυτοσίνης, αλλά και σε οξειδωτικές τροποποιήσεις των βάσεων του DNA και του σακχάρου <sup>180</sup>.

Το μονοξειδίο του αζώτου είναι ένα ασταθές μόριο, εξαιτίας της υψηλής δραστηριότητας του ασύζευκτου ηλεκτρονίου του. Παρουσιάζει βιολογική σημασία εξαιτίας της παραγωγής του από ένα μεγάλο αριθμό και ποικίλου τύπου κυττάρων και της συμμετοχής του σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες <sup>181</sup>. Στην πραγματικότητα κάθε κύτταρο θηλαστικού βρίσκεται κάτω από την επίδραση του NO<sup>•</sup>. Το NO<sup>•</sup> παράγεται από τους μακροφάγους ως ένα κυτταροτοξικό μόριο έναντι εισβολών στο ανοσοποιητικό σύστημα <sup>181,182,183,184</sup>. Το NO<sup>•</sup> απελευθερώνεται από την NO συνθετάση σε συνδυασμό και με άλλα δραστικά σωματίδια όπως οι ρίζες σουπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τον παράγοντα νέκρωσης όγκων και τις αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες <sup>184,185</sup>. Σε περιοχές φλεγμονής και ειδικά σε χρόνιες φλεγμονές, η τοπική παραγωγή του NO<sup>•</sup> μπορεί να οδηγήσει σε αντιδράσεις με ρίζες οξυγόνου ή υπεροξειδίου και να σχηματιστούν πολύ δραστικά προϊόντα. Έτσι, χρόνιες μολύνσεις και φλεγμονές στους ιστούς από γαστρίτιδα, ηπατίτιδα κ.α. μπορούν να θεωρηθούν παράγοντες κινδύνου για καρκίνο. Έχει προταθεί, ότι τα δραστικά σωματίδια οξυγόνου που παράγονται κατά την αντιφλεγμονώδη άμυνα του οργανισμού μπορούν να προκαλέσουν καταστροφή στο DNA των κυττάρων <sup>186</sup>.

Το μονοξειδίο του αζώτου μπορεί να σχετίζεται με την καρκινογένεση που οφείλεται σε χρόνιες φλεγμονές, προκαλώντας ενεργοποίηση των μακροφάγων για μεγάλο χρονικό διάστημα <sup>186</sup>. Η υπερπαραγωγή του NO μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις και κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Το μονοξειδίο του αζώτου βρέθηκε να είναι μεταλλαξιογόνο σε διάφορα συστήματα όπως βακτήρια <sup>187</sup> αλλά και κύτταρα θηλαστικών <sup>188</sup>. Η τοξικότητα που προκαλείται από το NO έχει εξεταστεί σε διάφορες κυτταρικές σειρές και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι προκαλείται παρεμπόδιση στην σύνθεση του DNA, καταστροφή στα μιτοχόνδρια, χάσιμο της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο και διάσπαση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας των κλώνων του DNA <sup>180</sup>. Το μονοξειδίο του αζώτου μπορεί ακόμη να συμμετέχει και σε διάφορους άλλους κυτταρικούς μηχανισμούς τοξικότητας, όπως για παράδειγμα στη περίπτωση ενεργοποίησης του ενζύμου πολυ-(αδενοσινο-5'-διφωσφοριβοζο)-συνθετάση <sup>189</sup>. Η πολυ-(αδενοσινο-5'-διφωσφοριβοζο)-συνθετάση είναι ένα ένζυμο, το οποίο ενεργοποιείται όταν προκαλείται διάσπαση στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα του DNA και προσθέτει 100 αδενοσινο-5'-διφωσφοριβοζο-μονάδες (ADP-ριβόζη) σε νουκλεϊκές πρωτεΐνες, όπως

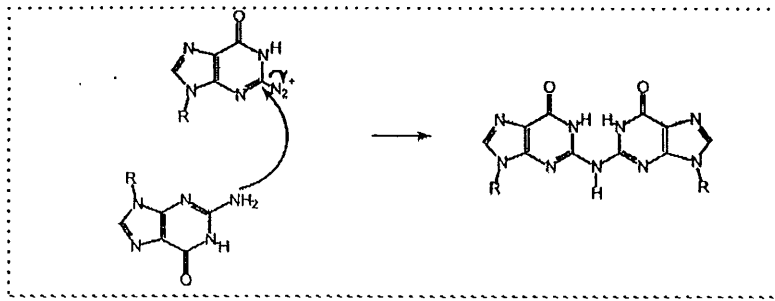
ιστόνες. Το NO παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της ADP-ριβόζης και η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο.

Η επίδραση του NO στα κύτταρα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το ρυθμό παραγωγής και διάχυσης του, τη συγκέντρωση των δραστικών σωματιδίων, ρίζες σουπεροξειδίου και οξυγόνου, τα επίπεδα των ενζύμων της καταλάσης και της σουπεροξειδικής δισμουτάσης, τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών όπως της γλουταθειόνης καθώς και τις αποστάσεις μεταξύ του κυττάρου παραγωγής και των κυττάρων στόχων<sup>190</sup>. Η καταστροφή που μπορεί να προκληθεί στο DNA από το NO προέρχεται από τα δραστικά σωματίδια ONOO<sup>-</sup> και N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> που δημιουργούνται κατά την αντίδραση του NO με άλλα δραστικά σωματίδια, όπως ρίζες σουπεροξειδίου, οξυγόνου κ.α. Το ONOO<sup>-</sup> μπορεί να οξειδώσει και να νιτροσυλιώσει το DNA, ενώ μπορεί ακόμα να προκαλέσει κόψιμο της αλυσίδας του DNA μέσω προσβολής των φωσφοδιεστερικών δεσμών<sup>180</sup>. Το N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> μπορεί να νιτροσυλιώσει αμίνες σχηματίζοντας *N*-νιτροσαμίνες, οι οποίες μετά από μεταβολική ενεργοποίηση μπορούν να αλκυλιώσουν το DNA μέσω έμμεσων μηχανισμών<sup>180</sup>. Η νιτροσυλίωση των πρωτοταγών αμινών, όπως οι εξωκυκλικές αμινοομάδες των βάσεων του DNA, οδηγεί στο σχηματισμό διαζωνοϊόντων και στην απαμίνωση τους, καταστρέφοντας έτσι τη δυνατότητα συμμετοχής των βάσεων αυτών σε δεσμούς υδρογόνου με τις συμπληρωματικές βάσεις του απέναντι κλώνου<sup>180</sup>.

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά οι επιδράσεις των δραστικών σωματιδίων ONOO<sup>-</sup> και N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> στο DNA.

#### ***α. Καταστροφή του DNA από το μονοξείδιο του αζώτου μέσω του N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>***

Ο σχηματισμός των σωματιδίων N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> μπορεί να οδηγήσει σε άμεση ή έμμεση καταστροφή του DNA (Σχήμα 2.13.). Η άμεση καταστροφή προέρχεται από την νιτροσυλίωση των πρωτοταγών αμινών των βάσεων του DNA που οδηγεί σε απαμίνωση. Η νιτροσυλική απαμίνωση αποτελεί επίσης, το αποτέλεσμα της αντίδρασης των πρωτοταγών αμινών με το νιτρώδες οξύ. Η ταχύτητα της αντίδρασης των αμινών με το N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> είναι υψηλότερη σε ουδέτερο ή βασικό pH από ότι σε όξινο pH εξαιτίας της αυξανόμενης συγκέντρωσης της ελεύθερης αμίνης κάτω από αυτές τις συνθήκες. Σε φυσιολογικά pH, ο σχηματισμός των σωματιδίων N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> από το μονοξείδιο του αζώτου έχει θεωρηθεί ιδιαίτερα σημαντικός<sup>191</sup>.



Σχήμα 2.13. Δομή και πιθανός μηχανισμός καταστροφής του DNA μέσω των σωματιδίων  $N_2O_3$  και το σχηματισμό διασταυρούμενου δεσμού dGuo-dGuo μέσω νιτροσυλικής απαμίνωσης.

Η απευθείας προσβολή του DNA από το  $N_2O_3$  οδηγεί σε απαμίνωση του DNA μέσω σχηματισμού διαζονοϊόντος. Η υδρόλυση του διαζωνιακού αυτού ιόντος ολοκληρώνει την διαδικασία της απαμίνωσης.

Κάθε βάση του DNA που περιέχει μια εξωκυκλική αμινομάδα μπορεί να υποστεί απαμίνωση μέσω αντίδρασης με το  $N_2O_3$ . Έτσι, η αδενίνη, η κυτοσίνη και η γουανίνη μπορούν να απαμινωθούν και να σχηματίσουν υποξανθίνη, ουρακίλη και ξανθίνη αντίστοιχα. Με τον τρόπο αυτό, μπορούν να προκληθούν διάφορες μεταλλάξεις <sup>192</sup>.

Η έκθεση σε νιτροξείδιο του αζώτου μπορεί, επίσης, να οδηγήσει σε κόψιμο της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA, γεγονός που έχει μελετηθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ο Nguyen και οι συνεργάτες του επιβεβαίωσαν ότι το  $NO^{\cdot}$  προκαλεί κόψιμο στο DNA σε κύτταρα TK6 <sup>193</sup>. Η αντίδραση, όμως, του  $NO^{\cdot}$  με πλασμιδιακό DNA *in vitro* δεν οδηγεί σε διάσπαση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας <sup>194</sup>, ενώ όταν το ίδιο πλασμιδιακό DNA μεταφέρεται σε κύτταρα, παρατηρήθηκε με έκπληξη διάσπαση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Η πιο πιθανή εξήγηση για την παρατήρηση αυτή είναι ότι η αντίδραση με το  $NO^{\cdot}$  έχει ως αποτέλεσμα την απαμίνωση της γουανίνης σε ξανθίνη, η οποία στη συνέχεια μπορεί να αποπουρινωθεί και να σχηματιστεί μια κενή θέση στην αλυσίδα του DNA. Τέτοιες κενές θέσεις μπορούν εύκολα να κοπούν από τις ενδονουκλεάσες, διασπώντας την αλυσίδα του DNA. Η υπόθεση αυτή υποστηρίχτηκε και από πειράματα, όπου οι κενές θέσεις συγκρίθηκαν και μελετήθηκαν σε συνάρτηση με το χρόνο <sup>194</sup>. Έτσι, κύτταρα CHO εκτέθηκαν σε  $NO^{\cdot}$  για 1 h και αμέσως μετά παρατηρήθηκαν κενές θέσεις. Μετά την πάροδο 12 h, οι κενές θέσεις μειώθηκαν, ενώ παρατηρήθηκαν μονόκλινα θραύσματα του DNA προερχόμενα από τη δράση των ενδονουκλεασών. Δίκλινα θραύσματα του DNA παρατηρήθηκαν μετά από 24 h, δείχνοντας ότι τα μονόκλινα

τμήματα δεν μπορούν να επισκευαστούν αλλά μετατρέπονται σε δίκλιωνα, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις.

### ***β. Καταστροφή του DNA από το μονοξειδίο του αζώτου μέσω του ONOO<sup>-</sup>***

Σε αντίθεση με το μονοξειδίο του αζώτου, το οποίο συμμετέχει αρχικά στην απαμίνωση του DNA, το υπεροξυνιτρώδες ιόν προκαλεί οξειδωτική καταστροφή στο DNA και μάλιστα μεγαλύτερη από αυτή που προκαλεί ανάλογη συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου. Το υπεροξυνιτρώδες ιόν είναι πολύ πιο δραστικό από το μονοξειδίο του αζώτου.

Ο Lewis και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν μια κινητική μελέτη για την τύχη του NO<sup>•</sup> που συντίθεται στους μακροφάγους, αναλύοντας τα τελικά προϊόντα νιτρώδες και νιτρικό <sup>195</sup>. Η μελέτη τους έδειξε ότι το μισό από το μονοξειδίο του αζώτου που απελευθερώνεται σχηματίζει N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ενώ αυτό που απομένει αντιδρά με το O<sub>2</sub> και σχηματίζει ONOO<sup>-</sup>. Στη μελέτη αυτή, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο σχηματισμός του ONOO<sup>-</sup> γίνεται εξωκυτταρικά και όχι απαραίτητα μέσα στο μακροφάγο. Αυτό το συμπέρασμα προέκυψε από την παρατήρηση της παρεμπόδισης σχηματισμού του ONOO<sup>-</sup> κατά την προσθήκη στο μέσο σουπεροξειδικής δισμουτάσης SOD. Αν το ONOO<sup>-</sup> σχηματιζόταν μόνο μέσα στο κύτταρο δεν θα επηρεαζόταν από την προσθήκη της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Ο deRojas-Walker και οι συνεργάτες του επιβεβαίωσαν την απαμίνωση του DNA (ξανθίνη) και την οξείδωση των βάσεων του DNA από τους ενεργοποιημένους μακροφάγους <sup>196</sup>. Ο σχηματισμός οξειδωμένων προϊόντων παρεμποδίζεται από την *N*-μεθυλ-L-αργινίνη, τον παρεμποδιστή της σύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου. Έτσι, ο σχηματισμός οξειδωμένων παραγώγων και παραγώγων απαμίνωσης οφείλονται στο NO<sup>•</sup> που παράγεται στους μακροφάγους και στη μετατροπή του σε N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> και σε ONOO<sup>-</sup>.

Ένα σημαντικό ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί αφορά στον τρόπο που τα ιόντα ONOO<sup>-</sup> προκαλούν τη διάσπαση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA. Προέρχονται απευθείας από την καταστροφή του σακχάρου ή έμμεσα από την καταστροφή της βάσης στο DNA; Παρόλο που υπάρχουν πολλά σημεία αδιευκρίνιστα, η απάντηση στο ερώτημα αυτό φαίνεται να περιλαμβάνει και τους δυο μηχανισμούς. Το ONOO<sup>-</sup> μπορεί να αντιδράσει απευθείας με το σάκχαρο του DNA οδηγώντας σε σπάσιμο του σακχάρου και τελικά σε κόψιμο του κλώνου. Ο

μηχανισμός της καταστροφής του σακχάρου είναι πιθανό να περιλαμβάνει απόσπαση υδρογόνου οδηγώντας έτσι στη δημιουργία ρίζας, η οποία στη συνέχεια δίνει περαιτέρω αντιδράσεις. Ο Rubio και οι συνεργάτες του μελέτησαν την υπόθεση καταστροφής του σακχάρου από τα ιόντα  $\text{ONOO}^-$  και διαπίστωσαν ότι η αντίδραση των δεοξυνουκλεοζιτών με  $\text{ONOO}^-$  οδηγεί στο σχηματισμό δραστικών σωματιδίων 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος <sup>197</sup>.

Η επίδραση των ιόντων  $\text{ONOO}^-$  στις βάσεις του DNA μελετήθηκε από τον Burney όσο αφορά στη διάσπαση του πλασμιδιακού DNA pUC19 και την δημιουργία κενών θέσεων στην αλυσίδα του DNA <sup>180</sup>. Αντίθετα με το  $\text{N}_2\text{O}_3$  που αντιδρά με τις βάσεις αδενίνη, γουανίνη και κυτοσίνη, το  $\text{ONOO}^-$  φαίνεται να αντιδρά σημαντικά μόνο με την γουανίνη <sup>198</sup>. Υπάρχουν δυο τύποι αντιδράσεων που μπορούν να συμβούν στις βάσεις του DNA με τα ιόντα  $\text{ONOO}^-$ , οι οξειδώσεις και οι νιτροσυλιώσεις <sup>199</sup>. Τα δυο κύρια προϊόντα που απομονώθηκαν κατά την αντίδραση της δεοξυγουανোসίνης με το  $\text{ONOO}^-$  είναι η 8-οξο-δεοξυγουανোসίνη <sup>200</sup> και η 8-νιτρο-δεοξυγουανোসίνη <sup>201</sup>. Ο ρόλος της 8-οξο-δεοξυγουανোসίνης στην μεταλλαξιογένεση και καρκινογένεση έχει μελετηθεί διεξοδικά και πολλές μελέτες έδειξαν συσχέτισμό μεταξύ του σχηματισμού της 8-οξο-δεοξυγουανোসίνης και της καρκινογένεσης. Ενώ για την 8-οξο-δεοξυγουανোসίνη είναι γνωστές οι μεταλλάξεις τύπου γουανίνη-κυτοσίνη σε αδενίνη-θυμίνη, για την 8-νιτρο-δεοξυγουανোসίνη δεν υπάρχουν δεδομένα για την πιθανή μεταλλαξιογόνο δράση της.

Δυο άλλες τροποποιήσεις των βάσεων και ειδικότερα της δεοξυγουανোসίνης λόγω αντίδρασης με το  $\text{ONOO}^-$  είναι η οξαζολόνη <sup>202</sup> και η 4,5-διυδρο-5-υδροξυ-4-νιτροσοξυ-2'-δεοξυγουανোসίνη <sup>203</sup>. Ο σχηματισμός της οξαζολόνης έχει παρατηρηθεί και κατά την αντίδραση  $\text{ONOO}^-$  με DNA θυμοειδή αδένα <sup>202</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

---

### ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΕΤΑΛΛΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

---

### 3.1. Εισαγωγή

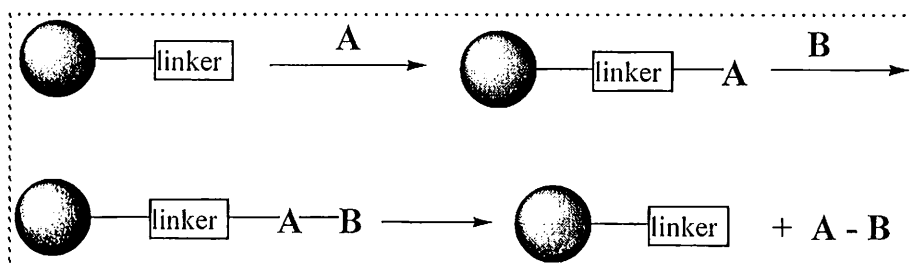
Στατιστικά, μόνο ένα περίπου από 10000 υποψήφια φάρμακα είναι κλινικά αποδεκτά<sup>204</sup>. Έτσι, κάποιος θα περίμενε ότι πολύ περισσότερα σύμπλοκα μετάλλων θα πρέπει να συντεθούν και να μελετηθούν πριν ανακαλυφτεί ένα αξιόλογο φάρμακο. Μια εναλλακτική μέθοδος στην παραδοσιακή ανάπτυξη φαρμάκων είναι η διαδοχική σύνθεση και εξέταση με συστηματικό τρόπο νέων ουσιών, δηλαδή η ονομαζόμενη συνδυαστική Χημεία<sup>205,206</sup>. Συνδυαστικές μέθοδοι, που για πρώτη φορά αναφέρθηκαν το 1991<sup>207-209</sup>, αποτελούν σήμερα εργαλεία με τα οποία μπορούν να δημιουργηθούν μεγάλες βιβλιοθήκες νέων ενώσεων μέσω συνδυασμού μόνο μερικών δομικών μονάδων και διαδοχικά να εξεταστούν για την επιθυμητή ιδιότητα πιο γρήγορα και αποτελεσματικά. Η μεθοδολογία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί χρησιμοποιώντας πεπτίδια που αποτελούν την αρχή της συνδυαστικής Χημείας. Συνδυάζοντας τα 20 αμινοξέα που υπάρχουν σε όλους τους δυνατούς τύπους εξαπεπτιδίων προκύπτει ο αστρονομικός αριθμός  $20^6=64000000$  παράγωγα, αριθμός που θα ήταν αδύνατο να επιτευχθεί με την κλασική σύνθεση. Με την συνδυαστική Χημεία μπορούν να μελετηθούν με τη χρήση μοριακής δυναμικής (docking) και να συντεθούν τελικά μόνο οι καταλληλότερες. Έτσι, η συνδυαστική τεχνική αφομοιώθηκε γρήγορα από φαρμακευτικές βιομηχανίες ως ταχύτερη και πιο οικονομική μέθοδος ανακάλυψης και βελτιστοποίησης φαρμάκων.

Πρόσφατες μελέτες από τον S.Lippard, σχετικά με την συνδυαστική και παράλληλη σύνθεση βιβλιοθηκών φαρμάκων λευκοχρύσου σε υγρή φάση και την εξέταση του μηχανισμού δράσης τους, απέδειξαν ότι η διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων λευκοχρύσου μπορεί να επιταχυνθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική της σύνθεσης σε στερεά φάση<sup>204,210-212</sup>. Σε μερικούς μήνες πάνω από 3600 αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και εξετάστηκε η ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την μεταγραφή της β-λακταμάσης σε κύτταρα HeLa. Από την βιβλιοθήκη αυτή προέκυψαν 14 υποσχόμενα νέα σύμπλοκα, στα οποία διαδοχικά εξετάστηκε η κυτταροτοξικότητά τους. Τέσσερα σύμπλοκα παρουσίασαν σημαντική δραστηριότητα, τρία από τα οποία είχαν ήδη αναφερθεί ως σημαντικά φαρμακευτικά παράγωγα.

Γενικά, συνδυαστικές βιβλιοθήκες έχουν δημιουργηθεί με την τεχνική σύνθεσης σε στερεά φάση, που πρωτοαναφέρθηκε από τον Merrifield για την πεπτιδική σύνθεση το 1963<sup>213</sup> και για την οποία πήρε το βραβείο Nobel το 1984. Η



βασική ιδέα της τεχνικής σε στερεά φάση είναι η απευθείας σύνδεση της σχηματιζόμενης πεπτιδικής αλυσίδας πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερές υλικό-ρητίνη (Σχήμα 3.1.).<sup>214</sup>. Η διαδικασία αυτή έχει πολλά πλεονεκτήματα από αυτή της χημείας σε διάλυμα, περισσότερο γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί περίσσεια αντιδραστηρίων και να ολοκληρωθεί γρήγορα η αντίδραση ενώ τα παραπροϊόντα και η περίσσεια των αντιδραστηρίων μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν με μια απλή διήθηση. Η αδιάλυτη ρητίνη-πεπτίδιο επιμηκύνεται με μια σειρά προσθηκών. Εξαιτίας της ταχύτητας και της απλότητας των επαναλαμβανόμενων σταδίων η όλη διαδικασία είναι εύκολο να αυτοματοποιηθεί. Όταν η επεξεργασία της αλυσίδας έχει ολοκληρωθεί, το πεπτίδιο κόβεται από τη ρητίνη και το προϊόν απελευθερώνεται. Σήμερα, πλήθος πεπτιδίων και ολιγονουκλεοτιδίων συντίθενται με την αυτοματοποιημένη αυτή μέθοδο ρουτίνας.



Σχήμα 3.1. Αρχή της μεθόδου σύνθεσης σε στερεή φάση. Σφαίρα= πολυμερές υλικό, A= πρώτη μονάδα δόμησης, B= δεύτερη μονάδα δόμησης, AB= προϊόν

Στην Οργανική σύνθεση σε στερεά φάση αρκετά μέταλλα έχουν χρησιμοποιηθεί στην κατάλυση διαφόρων οργανικών αντιδράσεων<sup>215</sup>. Επίσης, σύμπλοκα μετάλλων έχουν βρει εφαρμογές ως στερεά υποστρώματα-linkers<sup>216-218</sup>, ως αντιδραστήρια<sup>219-221</sup>, ως ακινητοποιημένοι καταλύτες και βιολογικοί μιμητές<sup>222-228</sup>.

Ένα καλά μελετημένο πεδίο έρευνας είναι αυτό των μετάλλων-ολιγονουκλεοτιδίων που βρίσκει διαγνωστικές, θεραπευτικές και μηχανιστικές εφαρμογές<sup>229</sup> μέσω της σύνθεσης σε στερεά φάση. Έχουν συντεθεί σύμπλοκα λευκοχρύσου-ολιγονουκλεοτιδίων με σκοπό την εύρεση της πιθανής εκλεκτικότητας πλατινίωσης των ολιγονουκλεοτιδίων<sup>230,231</sup>.

### 3.2. Μεταλλοπεπτίδια

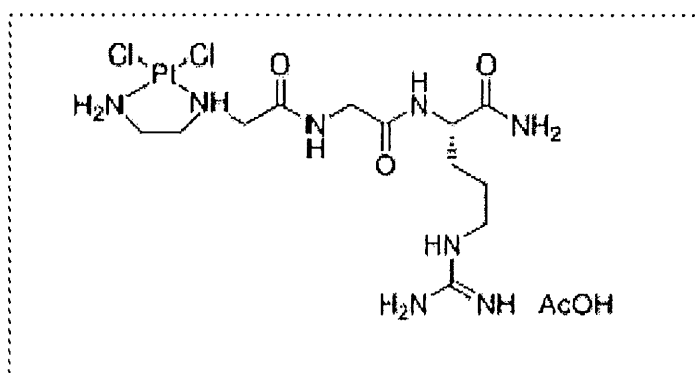
Ο όρος μεταλλοπεπτίδια αναφέρεται σε εκείνη την τάξη μορίων που μιμούνται βιολογικά μόρια (μεταλλοπρωτεΐνες, ενεργά κέντρα ενζύμων κ.λ.π.) και αποτελούν αντικείμενο σημαντικής έρευνας σήμερα από πολλά επιστημονικά πεδία. Πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο DNA μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μεταγραφής και μετάφρασης του γενετικού υλικού. Υπάρχει ένα συνεχές ενδιαφέρον στο χημικό σχεδιασμό μικρών μιμητικών μορίων τέτοιων πρωτεϊνών, τα οποία μπορούν να δεσμευτούν εκλεκτικά στο DNA και να επηρεάσουν την μεταγραφή και μετάφραση του. Τα μόρια αυτά περιέχουν κάποιες περιοχές συγκεκριμένης δομής και έχουν ως στόχο την αναγνώριση ορισμένων αλληλουχιών του DNA και δέσμευση σε αυτές με διαφόρου είδους αλληλεπιδράσεις<sup>232,233</sup>.

Υπάρχουν μόρια που παρουσιάζουν αντιϊκή δραστηριότητα και αντινεοπλασματικές ιδιότητες ή ακόμα καταλύουν την υδρόλυση φωσφοδιεστερικών δεσμών στο DNA<sup>234</sup> (χημικές νουκλεάσες). Οι τρόποι που μπορούν αυτά τα μόρια να αλληλεπιδράσουν με το DNA περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις με απευθείας δεσμό ή όχι. Κάποια από αυτά, δεσμεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές, στην κύρια ή ελάσσονα αύλακα του DNA ανάλογα με την εκλεκτικότητα του υποκαταστάτη σε αλληλουχίες της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA. Συνεπώς, τα δομικά χαρακτηριστικά των μορίων αυτών παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα και στην αλληλεπίδραση τους με τις βάσεις του DNA.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των ιδιοτήτων δέσμευσης μεταλλικών συμπλόκων στο DNA με τέτοιους υποκαταστάτες, οι οποίοι μπορούν να συνδυάσουν τις ιδιότητες του μετάλλου αλλά και των υποκαταστατών. Για παράδειγμα το σύμπλοκο του χαλκού  $\text{Cu}^{2+}$  με το πεπτίδιο GGKGGG συζευγμένο στην νετροψίνη (αντιβιοτικό), δεσμεύεται στο DNA με τον ίδιο τρόπο όπως και το αντιβιοτικό μόνο του, δηλαδή στην μικρή αύλακα ενώ η παρουσία του μετάλλου-πεπτιδίου ενισχύει την αλληλεπίδραση μέσω ηλεκτροστατικών και van der Waals αλληλεπιδράσεων<sup>234,235</sup>. Το σύμπλοκο αυτό, γεννά δραστικά σωματίδια οξυγόνου, κάτω από ασθενείς οξειδωτικές συνθήκες, και προκαλεί κόψιμο του DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες<sup>234,235</sup>.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει συντεθεί μια πληθώρα συμπλόκων του λευκοχρύσου για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων με βελτιωμένες ιδιότητες σε σύγκριση με τα γνωστά cisplatin και carboplatin<sup>3</sup>.

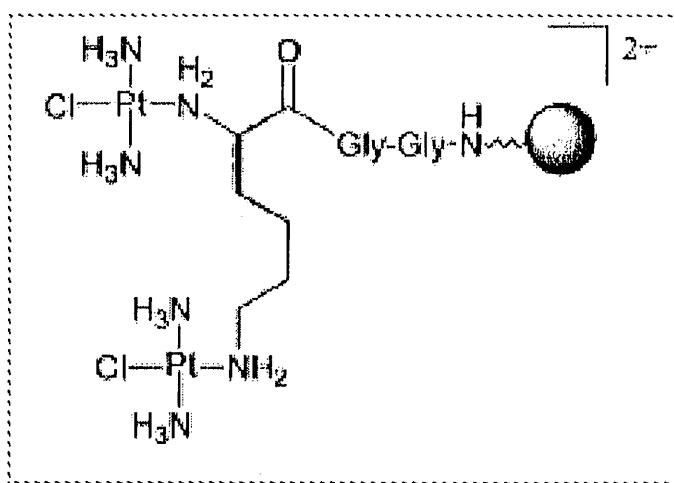
Η σύνθεση σε στερεά φάση αποδείχτηκε σημαντική για το σχεδιασμό βιβλιοθηκών θεραπευτικών φαρμάκων του λευκοχρύσου<sup>236-238</sup>. Πρόσφατα, χρησιμοποιώντας την σύνθεση σε στερεά φάση συντέθηκε ένα αρκετά δραστικό σύμπλοκο του λευκοχρύσου που περιέχει ένα διπεπτιδίο αργινίνης-γλυκίνης<sup>239</sup>. Το πεπτιδίο αυτό συζεύχθηκε με αιθυλενοδιαμίνη, η οποία εντάσσεται σε διχλωρο-λευκόχρυσο. Το σύμπλοκο μελετήθηκε με διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές μεθόδους και αποτέλεσε την αρχή για την δημιουργία συνδυαστικών βιβλιοθηκών φαρμάκων λευκοχρύσου και την ανακάλυψη νέων αποτελεσματικών φαρμάκων. Η μελέτη αυτή προχώρησε από τους ίδιους ερευνητές και αργότερα δημιουργήθηκαν συνδυαστικές βιβλιοθήκες συμπλόκων του λευκοχρύσου χρησιμοποιώντας μια σειρά πεπτιδίων συζευγμένων στο μόριο της αιθυλενοδιαμίνης<sup>237,239</sup>. Κατασκευάστηκε μια συνδυαστική βιβλιοθήκη 36 συμπλόκων του λευκοχρύσου με διάφορους πιθανούς συνδυασμούς αμινοξέων και εκτελέστηκαν πειράματα κυτταροτοξικότητας σε καρκινικές κυτταρικές σειρές A2780. Ορισμένα από αυτά παρουσίασαν σημαντική δραστηριότητα<sup>237</sup>. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η δομή ενός συμπλόκου του λευκοχρύσου με συζευγμένο ένα πεπτιδίο στο μόριο της αιθυλενοδιαμίνης.



Σχήμα 3.2. Δομή συμπλόκου του λευκοχρύσου με συζευγμένο ένα πεπτιδίο στο μόριο της αιθυλενοδιαμίνης.

Η συνέχεια της μελέτης αυτής ήταν η σύνθεση διπυρηνικών συμπλόκων του λευκοχρύσου με γεφυρωμένη λυσίνη ή πεπτιδίο που περιέχει λυσίνη και αντίδραση αυτών με το σύμπλοκο  $trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ <sup>238</sup> (Σχήμα 3.3.). Τα σύμπλοκα μελετήθηκαν με διάφορες τεχνικές όπως <sup>195</sup>Pt NMR και εξετάστηκε η κυτταροτοξική δραστηριότητα τους σε καρκινικές κυτταρικές σειρές A2780<sup>238</sup>. Το σύμπλοκο του

σχήματος 3.3. αποδείχτηκε 60 φορές λιγότερο δραστικό από το cisplatin και δεν ξεπέρασε την αντίσταση που παρουσιάζει το φάρμακο στην καρκινική αυτή κυτταρική σειρά. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η δομή ενός διπυρηνικού συμπλόκου του λευκοχρύσου που συντέθηκε με την τεχνική της στερεάς φάσης και φέρει ένα τριπεπτιδίο όπου μια λυσίνη γεφυρώνει δυο κέντρα λευκοχρύσου.



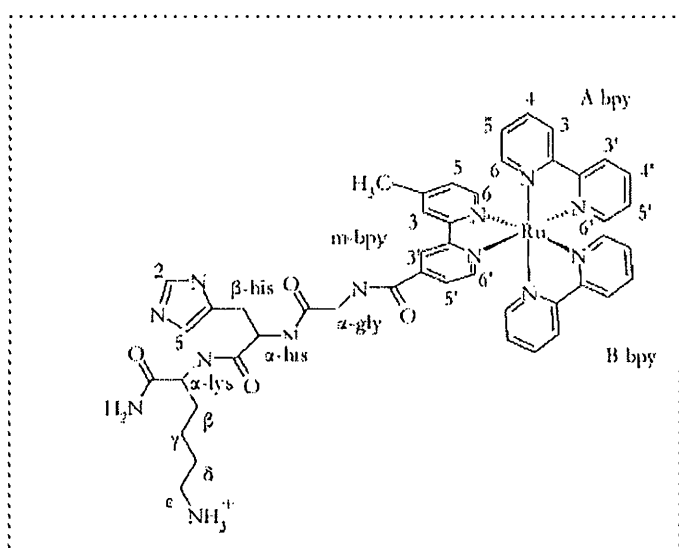
Σχήμα 3.3. Δομή διπυρηνικού συμπλόκου του λευκοχρύσου.

Τα σύμπλοκα του ρουθηνίου με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες αποτελούν αναμφίβολα μια τάξη μορίων που μπορούν να δεσμευτούν στο DNA με διάφορους τρόπους και να προκαλέσουν διάσπαση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του <sup>240</sup>. Από την άλλη πλευρά, μικρά πεπτιδία που μιμούνται ενεργά κέντρα πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο DNA μπορούν ανάλογα με τις δομικές τους μονάδες να αλληλεπιδρούν εκλεκτικά, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου και να συγκρατούνται με van der Waals δυνάμεις στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Συνεπώς, πολυπυριдино-σύμπλοκα του ρουθηνίου με συζευγμένα πεπτιδία αποτελούν αναμφίβολα μια νέα τάξη ενώσεων που μπορούν πιθανόν να συνδυάσουν την εκλεκτικότητα που προσδίδουν τα συζευγμένα πεπτιδία αλλά και τις αλληλεπιδράσεις των υποκαταστατών και του μετάλλου κατά τη δέσμευση τους στο DNA. Παρόλο που η εκλεκτικότητα πολυπυριδινικών συμπλόκων έχει μελετηθεί με τεχνικές NMR με ολιγονουκλεοτίδια δεν προέκυψαν κάποιοι συγκεκριμένοι κανόνες για την εκλεκτικότητα των μορίων αυτών <sup>241-244</sup>.

Μια πρώτη μελέτη σχετικά με την εισαγωγή πεπτιδίων ή αμινοξέων σε σύμπλοκα του ρουθηνίου πραγματοποιήθηκε από τον Peck και τους συνεργάτες του <sup>245</sup>, όπου αμινοξέα και πεπτιδία ακινητοποιήθηκαν πάνω σε ρητίνη με την τεχνική της στερεάς φάσης και πραγματοποιήθηκε η σύζευξη αυτών με το σύμπλοκο  $rac-[Ru(bpy)_2(4-CO_2H-4'-Meby)]^{2+}$  ( $4-CO_2H-4'-Meby = 4'$ -μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-

καρβοξυλικό οξύ) μετά την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy<sup>245</sup>.

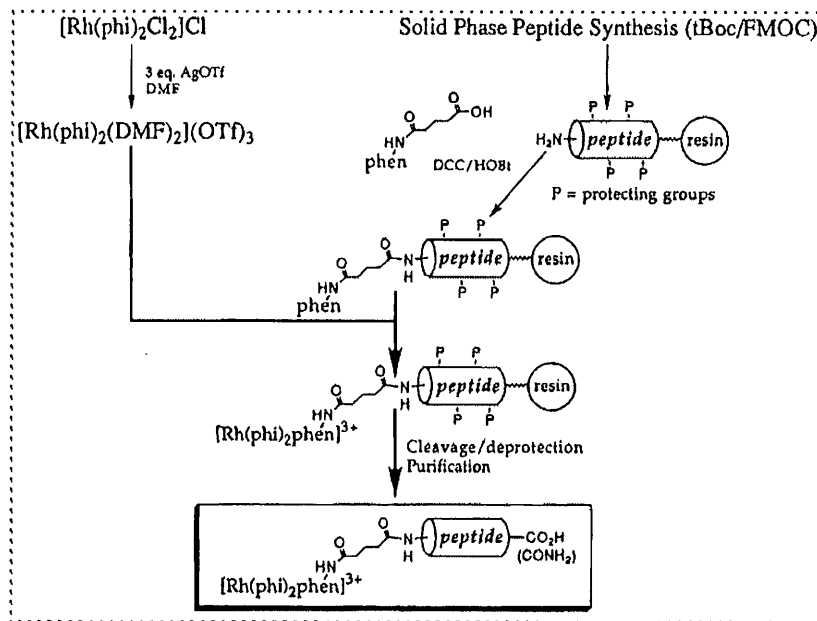
Μια παρόμοια στρατηγική έχει χρησιμοποιηθεί και στην περίπτωση του συμπλόκου του Ru(II) *rac*-[Ru(phen)(bpy')(dppz)] (bpy' = 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-βουτυρικό οξύ και dppz = διπυριδο[3, 2-a: 2', 3'-c]φαιναζίνη)<sup>246,247</sup>, αλλά και για την σύζευξη διαφόρων πεπτιδίων στα σύμπλοκα Λ- και Δ-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)]<sup>2+</sup><sup>248</sup>. Το σύμπλοκο *rac*-[Ru(phen)(bpy')(dppz)] βρέθηκε να αλληλεπιδρά με το DNA και μάλιστα η φύση του πεπτιδίου να επηρεάζει τον τρόπο δέσμευσης<sup>246</sup>. Στην περίπτωση των συμπλόκων Λ-, Δ- Ru(bpy)<sub>2</sub>(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)]<sup>2+</sup> το πεπτίδιο GHK συζεύχθηκε στον υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy και μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των δυο διαστερομερών συμπλόκων με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTTCGCG-3') με διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές τεχνικές. Από την μελέτη αυτή αποδείχτηκε ότι τα δυο ισομερή αλληλεπιδρούν διαφορετικά με το ολιγονουκλεοτίδιο. Στο παρακάτω σχήμα δίνεται η δομή του Δ-ισομερούς :



Σχήμα 3.4. Δομή του Δ-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)]<sup>2+</sup> με το συζευγμένο πεπτίδιο GHK.

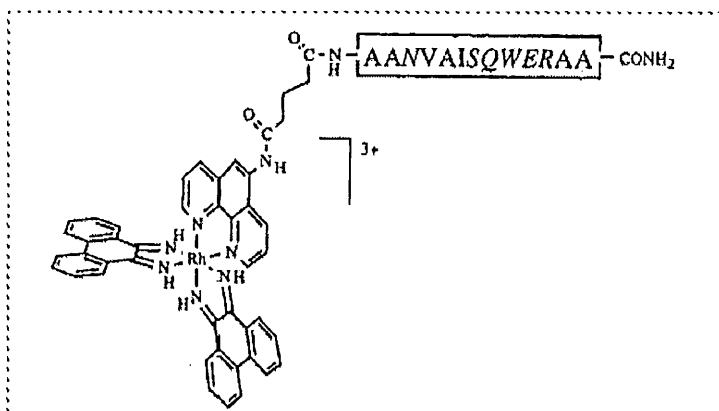
Το Δ-ισομερές δεσμεύεται στην μεγάλη αύλακα κοντά στην κεντρική περιοχή της αλληλουχίας (-AATT-) του ολιγονουκλεοτιδίου, ενώ το Λ-ισομερές δεσμεύεται πιθανόν όχι εκλεκτικά, προσεγγίζοντας την έλικα από την πλευρά της ελλάσσονος αύλακας<sup>248</sup>. Το πεπτίδιο GHK φαίνεται να καθοδηγεί το Δ-ισομερές στον τύπο αυτό της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο. Μια διαφορετική στρατηγική σύνθεσης σε στερεά φάση χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση του συμπλόκου του Rh(III) με τύπο [Rh(phi)<sub>2</sub>(agphen)]<sup>3+</sup><sup>249,250</sup> (phi =φαινανθρενοκινον-διμίνη και agphen = 5-(αμιδογλουταρυλ)-1,10-φαινανθρολίνη). Στο σχήμα που ακολουθεί

παρουσιάζεται η στρατηγική στερεάς φάσης που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του συμπλόκου.



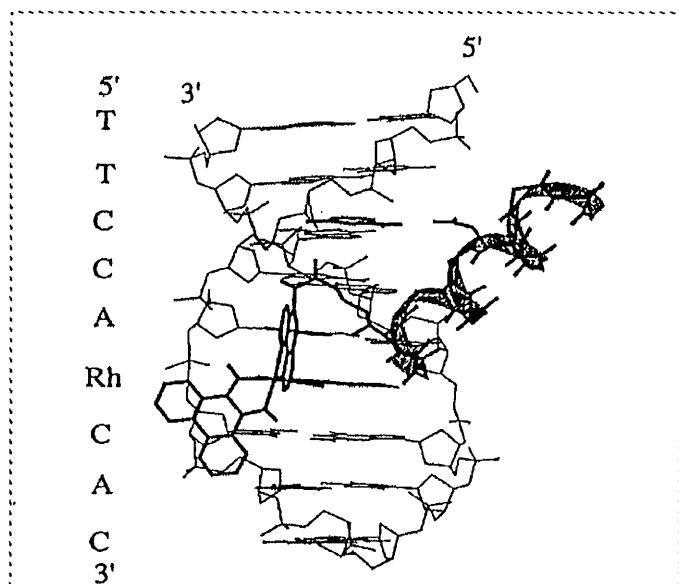
Σχήμα 3.5. Σύνθεση σε στερεά φάση του  $[Rh(phi)_2(agphen)]^{3+}$ .

Στην σύνθεση αυτή, το αποπροστατευμένο πεπτίδιο, που βρίσκεται ακινητοποιημένο σε μια ρητίνη, αντιδρά με τον ενεργοποιημένο υποκαταστάτη *agphen* και έτσι προκύπτει ο νέος πλέον υποκαταστάτης ρητίνη-πεπτίδιο-*agphen*, ο οποίος εντάσσεται στο σύμπλοκο  $[Rh(phi)_2(DMF)_2]^{3+}$ . Το τελικό προϊόν λαμβάνεται μετά τη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων *t*-Boc και το κόσμητο όλου του συμπλόκου από την ρητίνη. Στην μελέτη αυτή, βρέθηκε ότι το σύμπλοκο  $[Rh(phi)_2(agphen)]^{3+}$  δεσμεύεται στο DNA με παρεμβολή του ενός υποκαταστάτη ρηί μεταξύ των βάσεων από την πλευρά της κύριας αλυσίδας. Κατά την φωτοενεργοποίηση του συμπλόκου παρατηρήθηκε εκλεκτικό κόσμητο του DNA, στο σημείο αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου<sup>249,250</sup>. Στο παρακάτω σχήμα παριστάνεται η δομή του συμπλόκου  $[Rh(phi)_2(agphen)]^{3+}$  με το συζευγμένο πεπτίδιο.



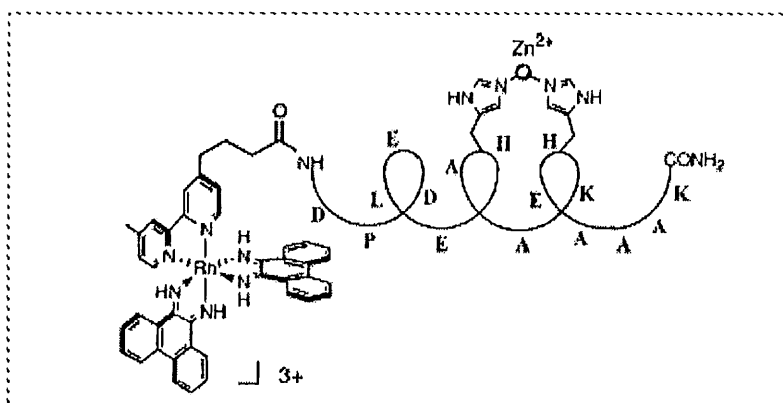
Σχήμα 3.6. Δομή του συμπλόκου  $[Rh(phi)_2(agphen)]^{3+}$ .

Οι Hastings και Sardesai <sup>249,250</sup> που μελέτησαν το σύμπλοκο  $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{agphen})]^{3+}$  διαπίστωσαν την αναγκαιότητα του γλουταμικού οξέος στο πεπτιδίο για την αναγνώριση συγκεκριμένης αλληλουχίας στο DNA κατά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου με αυτό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ύπαρξη του γλουταμικού οξέος είναι αναγκαία στο να αποκτήσει το σύμπλοκο μια συγκεκριμένη διαμόρφωση και να αλληλεπιδράσει με τις βάσεις του DNA.



Σχήμα 3.7. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου  $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{agphen})]^{3+}$  με το DNA.

Η συνθετική πορεία που πραγματοποιήθηκε στην περίπτωση του συμπλόκου  $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{agphen})]^{3+}$  χρησιμοποιήθηκε και στο σύμπλοκο  $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bry}') ]^{3+}$  <sup>251</sup>, όπου ένα δωδεκαπεπτιδίο συζεύχτηκε στο σύμπλοκο του Rh. Το σύμπλοκο αυτό, κατόπιν φωτοενεργοποίησης, προκαλεί οξειδωτική διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA, ενώ η φύση και η διαμόρφωση του πεπτιδίου φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA <sup>251</sup>.



Σχήμα 3.8. Δομή του συμπλόκου  $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bry}') ]^{3+}$  με το συζευγμένο δωδεκαπεπτιδίο.

Συντέθηκε και χαρακτηρίστηκε ένα μεταλλοπεπτίδιο του Ru που περιέχει ένα συζευγμένο πεπτίδιο με 54 αμινοξέα το  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phenIA})](\text{PF}_6)_2$  ( $\text{phenIA} = \text{N}$ -ιωδοακετυλ-5-αμινο-1,10-φαινανθρολίνη)<sup>252</sup>. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του με το DNA έδειξε ότι το σύμπλοκο αυτό δεν προκαλεί καταστροφή του DNA κατά την φωτοενεργοποίηση του, πιθανόν λόγω της μεγάλης απόστασης μεταξύ του κέντρου του ρουθηνίου και των βάσεων του DNA<sup>252</sup>. Η σύνθεση αρκετών συμπλόκων του ρουθηνίου που περιέχουν πολυπεπτίδια έχει πραγματοποιηθεί με τη στρατηγική της στερεάς φάσης και έχει μελετηθεί η στερεοχημεία τους<sup>253-255</sup>. Μεταξύ του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phenam})\text{-Cys-(Glu)}_5\text{-Gly}]^{3-}$  και του φεροκυτοχρώματος c παρατηρήθηκε φωτοπροκαλούμενη μεταφορά ηλεκτρονίου.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η στρατηγική της στερεάς φάσης για την σύνθεση συμπλόκων του ρουθηνίου με γενικό τύπο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COXCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  με συζευγμένα αμινοξέα και πεπτίδια. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται για πρώτη φορά η σύνθεση χλωροπολυπυριδινο-συμπλόκων του ρουθηνίου με τη στρατηγική της στερεάς φάσης, η οποία οδηγεί σε καθαρά προϊόντα και σχετικά καλές αποδόσεις. Η σειρά των χλωροπολυπυριδινο συμπλόκων που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή μπορεί να αποτελέσει μια νέα τάξη αντικαρκινικών ενώσεων, αφού τα σύμπλοκα είναι δυνατόν να υδρολυθούν και να αλληλεπιδράσουν με απευθείας δεσμό στο DNA. Επιπλέον, τα σύμπλοκα αυτά περιλαμβάνουν και μόρια, όπως τα πεπτίδια και τα αμινοξέα, τα οποία μπορούν να αναγνωρίσουν συγκεκριμένες αλληλουχίες και έτσι να κατευθύνουν την αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA.



## ***B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>**

## 4.1. Υλικά και φυσικές μετρήσεις

### 4.1.1. Υλικά

Η 2,2':6',2''-τερπυριδίνη αγοράστηκε από την εταιρία Aldrich και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το ένυδρο τριχλωριούχο ρουθίνιο  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , η 9-αιθυλογουανίνη, το DNA θυμοειδή αδένα, η αγαρόζη, το βρωμιούχο αιθίδιο και το ρυθμιστικό διάλυμα PIPES (piperazine N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)) αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma. Το πλασμίδιο pUC9, 2665bp, απομονώθηκε και καθαρίστηκε δυο φορές με CsCl με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Η απομόνωση του πλασμιδίου περιείχε περισσότερο από 95 % κυκλικό DNA. Τα περιοριστικά ένζυμα DraI (με τρεις θέσεις αναγνώρισης στην αλληλουχία TTTAAA στις θέσεις 1073, 1765 και 1784) και SmaI (με πλευρά αναγνώρισης GGGCCC στην θέση 260) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εργασία αυτή για το κόψιμο του κυκλικού DNA, αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma. Το κόψιμο του DNA σε μικρότερα τμήματα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο υπερήχων.

### 4.1.2. Φυσικές μετρήσεις

Η λήψη των φασμάτων υπερύθρου των συμπλόκων και των υποκαταστατών στην περιοχή  $4000\text{--}300\text{ cm}^{-1}$  έγινε στο φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Paragon 1000 FTIR εξοπλισμένο με τη συσκευή Golden Gate Diamond ATR χρησιμοποιώντας την τεχνική της διαχυτικής ανάκλασης. Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού UV-Vis λήφθηκαν στο όργανο Varian Cary 3-Bio που έφερε θερμοστάτη. Η ακτινοβολήση των διαλυμάτων, κατά την μελέτη της φωτοχημείας των συμπλόκων, πραγματοποιήθηκε με μια λάμπα υδραργύρου Philips. Η λήψη των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού έγινε με το όργανο Jobin Yvon CD-6 σε θερμοκρασία δωματίου. Για τις μετρήσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR,  $^{23}\text{Na}$  NMR και  $^{31}\text{P}$  NMR χρησιμοποιήθηκε ένα όργανο Bruker 300 DPX με συχνότητες συντονισμού στα 300.13 MHz, στα 121.49 MHz και στα 79.39 MHz για το  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  και  $^{23}\text{Na}$  NMR αντίστοιχα. Τα φάσματα λήφθηκαν σε  $\text{D}_2\text{O}$ , ενώ ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το 2, 2-διμεθυλ-5-σουλφο-2-σιλαπεντανιο (DSS). Η θερμοκρασία λήψης των φασμάτων ήταν σταθερή στους 298 K. Οι τιμές του σημείου

τήξης  $T_m$  και της διαφοράς  $\Delta T$  για το DNA μετρήθηκαν σε μια συσκευή Varian Cary 3-Bio με θερμοστάτη και ο υπολογισμός έγινε με τις μεθόδους της βιβλιογραφίας<sup>256</sup>. Τα πειράματα LC-MS πραγματοποιήθηκαν σε ένα όργανο Finnigan MAT TSQ-700 (ESI) συνδεδεμένο με εξοπλισμό υγρής χρωματογραφίας που αποτελούνταν από μια αντλία Dionex P580, ένα UV-ανιχνευτή Gilson 119 στα 214 και 254 nm και μια στήλη Alltima C18 150 mm x 4.6 mm ID. Για τις μετρήσεις MALDI-TOF-MS χρησιμοποιήθηκε το όργανο Vision 2000 (Finnigan MAT). Το όργανο λειτούργησε με laser αζώτου στα 337 nm, ενώ ως matrix χρησιμοποιήθηκε το 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB) (Aldrich). Στα πειράματα ηλεκτροφόρησης τα δείγματα αναλύθηκαν με πηκτή 0.8% (w/v) αγαρόζης στα 10 V/cm. Οι ταινίες φωτογραφήθηκαν με μια digital κάμερα SONY. Η δομή του νιτρο συμπλόκου (3) λύθηκε στο όργανο Nonius KappaCCD περιθλασίμετρο και σε θερμοκρασία 150 K.

#### **4.1.3. Βασικές αρχές των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν**

##### **4.1.3.1. Καμπύλες τήξης του DNA**

Όπως είναι γνωστό, το DNA αποτελείται από δυο κλώνους που συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων γουανίνη-κυτοσίνη και αδενίνη-θυμίνη. Η αποσταθεροποίηση του DNA συμβαίνει όταν όλοι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δυο κλώνων σπάσουν και έτσι η διπλή έλικα μετατρέπεται σε δυο μονές, αφού οι δυο κλώνοι πλέον ξεχωρίζουν. Η αποσταθεροποίηση αυτή μπορεί να προκληθεί από πολλούς φυσικούς παράγοντες, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης αλάτων ή του pH. Πιο σημαντική είναι η αύξηση της θερμοκρασίας αφού πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο προκαλείται η αποσταθεροποίηση του DNA, που συνεπάγεται πολλές φυσικές μεταβολές στο βιολογικό μόριο. Μερικές από αυτές τις μεταβολές είναι η αύξηση της πυκνότητας του συστήματος και η μείωση του ιξώδους των διαλυμάτων. Επίσης, η οπτική συμπεριφορά αλλάζει σε πιο αρνητικές τιμές και αυξάνεται η απορρόφηση στα 260 nm. Η μεταβολή αυτή στην απορρόφηση στο υπεριώδες προκύπτει λόγω των ηλεκτρονιακών αλληλεπιδράσεων των βάσεων του DNA. Κατά την αποσταθεροποίηση του DNA οι βάσεις στους δυο κλώνους πλησιάζουν την περίπτωση των απομονωμένων βάσεων και έτσι η απορρόφηση UV αυξάνεται

περίπου κατά 40%. Παρακολουθώντας την αύξηση αυτή μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την αποσταθεροποίηση του DNA. Σύμπλοκες ενώσεις είναι δυνατό να προκαλέσουν την αποσταθεροποίηση αυτή και ειδικότερα στην περίπτωση των συμπλόκων του ρουθηνίου διαπιστώθηκε ότι προκαλούν λόγω της αλληλεπίδρασης τους με αυτό, μεταβολή στο σημείο τήξεως του DNA ( $T_m$ ). Έτσι λοιπόν, παρακολουθώντας την μεταβολή στην απορρόφηση στα 260 nm μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την αλληλεπίδραση των συμπλόκων αυτών με το DNA.

#### ***4.2. Προετοιμασία των διαλυμάτων για λήψη φασμάτων υπεριώδους-ορατού, κυκλικού διχρωϊσμού και καμπυλών τήξης του DNA***

Στην μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων του ρουθηνίου με το DNA, χρησιμοποιώντας τις φασματοσκοπίες υπεριώδους ορατού, κυκλικού διχρωϊσμού και καμπυλών τήξης του DNA, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο κομμάτι γραμμικού DNA θυμοειδή αδένα που προήλθε μετά από κατάλληλη επεξεργασία DNA του εμπορίου. Το κόψιμο του DNA πραγματοποιήθηκε, στην περίπτωση αυτή, με υπέρηχους και ο αριθμός των βάσεων προσδιορίστηκε χρωματογραφικά. Το DNA του εμπορίου διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PIPES (piperazine N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)) (1 mM PIPES, 0.1 mM EDTA, pH = 7.0) για 48 h στους 4°C και ακολούθησε καταβύθιση με αιθανόλη στους -10°C για 24 h. Στη συνέχεια πλύθηκε με αιθανόλη και ξεράθηκε στον αέρα. Το DNA αυτό, ξαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PIPES για 24 h στους 4°C και πραγματοποιήθηκε το κόψιμο του με υπέρηχους για 3 h. Οι υπέρηχοι διαρκούσαν 10 s, ενώ ακολουθούσε παύση για άλλα 10 s ώστε να αποφευχθεί η θέρμανση του διαλύματος. Μετά την χρήση των υπερήχων, το διάλυμα του DNA διηθήθηκε από μια μεμβράνη Millipore Durapore PVDF και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές διαλυτοποιήσεις στους 4°C και επαναδιηθήσεις, χρησιμοποιώντας μεμβράνη Spectrapore-25. Στο τελικό διάλυμα του DNA πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση, ενώ το μοριακό βάρος του και ο αριθμός των βάσεων βρέθηκε με ηλεκτροφόρηση (gel) και χρωματογραφικές μεθόδους. Το μοριακό βάρος προσδιορίστηκε σε 126000, ενώ ο αριθμός των βάσεων μεταξύ 70-300 ζεύγη. Η συγκέντρωση του DNA, εκφρασμένη σε moles νουκλεοτιδίων ανά

λίτρο [P], καθορίστηκε με UV-Vis φασματοσκοπία μετρώντας την απορρόφηση στα 260 nm ( $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ). Το δείγμα παρουσίασε τιμή αναλογίας  $A_{260}/A_{280}$  ίση με 1.9 που αντιστοιχεί σε πολύ χαμηλή περιεκτικότητα πρωτεϊνών στο δείγμα.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις μεταξύ όλων των συμπλόκων και του DNA, με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας ενός πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος των συμπλόκων σε 1 mM PIPES και 20 mM χλωριούχου νατρίου σε ένα διάλυμα DNA 100  $\mu\text{M}$ . Τα δείγματα με τις διαφορετικές αναλογίες συμπλόκου-DNA επώαστηκαν στους 25 °C για 24 h. Η προσθήκη των συμπλόκων έγινε με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε η τελική αναλογία συμπλόκου ανά ζεύγος βάσης DNA ( $r$ ) να είναι 0.1, 0.3 και 0.5. Η συγκέντρωση του συμπλόκου ήταν αντίστοιχα 10, 30 και 50  $\mu\text{M}$ . Μετά την παρασκευή και επώαση των δειγμάτων λήφθηκαν φάσματα υπεριώδους-ορατού, κυκλικού διχρωϊσμού σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την εύρεση του σημείου τήξης του DNA. Τα πειράματα τήξης του DNA έγιναν σε κυψελίδες χαλαζία, ενώ τα δείγματα θερμαινόταν με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 1 °C ανά λεπτό. Ταυτόχρονα, γινόταν η καταγραφή της απορρόφησης στα 260 nm. Το εύρος της θερμοκρασίας στα πειράματα αυτά ήταν από 24 μέχρι τους 98 °C.

#### ***4.3. Προετοιμασία των διαλυμάτων των συμπλόκων με το DNA για τα πειράματα της ηλεκτροφόρησης***

Στα πειράματα της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA pUC9 2665bp, το οποίο απομονώθηκε και καθαρίστηκε δυο φορές με CsCl με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Η απομόνωση του πλασμιδίου περιείχε περισσότερο από 95 % κυκλικό DNA. Τα δείγματα ετοιμάστηκαν προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα ενός φρεσκοπαρασκευασμένου διαλύματος των συμπλόκων στο διάλυμα του πλασμιδιακού DNA. Η συγκέντρωση του pUC9 ήταν 38 ng/ml, του ρυθμιστικού διαλύματος PIPES ήταν 10 mM και του χλωριούχου νατρίου 4 mM. Οι συγκεντρώσεις των συμπλόκων ήταν τέτοιες ώστε ο λόγος μετάλλου ανά ζεύγος βάσης pUC9 DNA να είναι αντίστοιχα 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 και 1. Τα δείγματα

επωάστηκαν για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης για 2 h, ενώ η πηκτή παρέμεινε για 1 h σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 0.5 mg/ml (w/v).

Ο έλεγχος της εκλεκτικότητας της δέσμευσης των συμπλόκων στις βάσεις GC ή AT πραγματοποιήθηκε με την χρήση των περιοριστικών ενζύμων *DraI* και *SmaI*, τα οποία αναγνωρίζουν διαφορετικές αλληλουχίες στο DNA και προκαλούν κόψιμο στο σημείο αυτό. Οι ενζυμικές υδρολύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα φρεσκοπαρασκευασμένου διαλύματος πλασμιδιακού DNA pUC9 και σε δείγματα που υπήρξε συμπλοκοποίηση. Τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν αυτά των λόγων μετάλλου ανά ζεύγος βάσης pUC9  $r = 0.1$  και  $r = 0.3$ . 200 ng από κάθε δείγμα επωάστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα *DraI* και *SmaI* στους 37 °C για 1h. Στην συνέχεια τα κλάσματα του DNA αναλύθηκαν με πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v), η οποία στη συνέχεια παρέμεινε για 1 h σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 0.5 mg/ml (w/v).

#### 4.4. Φωτοχημική μελέτη των συμπλόκων

##### 4.4.1. Φωτοχημική μελέτη των συμπλόκων με IR φασματοσκοπία

1 mg από τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν στην διατριβή με τύπους *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl, [Ru(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)(terpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, [Ru(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)(terpy)(NO<sub>2</sub>)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, [Ru(4-COXCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)(terpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> X= αλανίνη, πεπτίδιο GHK, διαλύθηκαν σε απαερωμένο ακετονιτρίλιο και ακτινοβολήθηκαν για 2 h με λάμπα υδραργύρου, ενώ διατηρούνταν στη θερμοκρασία δωματίου με ψυκτήρα για την αποφυγή εξάτμισης του διαλύτη. Το χρώμα των διαλυμάτων κατά την ακτινοβολήση άλλαζε σε πορτοκαλί. Η ανάλυση των δειγμάτων με φασματοσκοπία υπερύθρου πραγματοποιήθηκε αφού εξατμίστηκε ο διαλύτης με ρεύμα αργού.

#### 4.4.2. Φωτοχημική μελέτη των συμπλόκων με φασματοσκοπία UV

Παρασκευάστηκαν διαλύματα των συμπλόκων *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl, [Ru(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)(terpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, [Ru(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)(terpy)(NO<sub>2</sub>)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, [Ru(4-COXCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)(terpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> X= αλανίνη, πεπτίδιο GHK, με συγκέντρωση 10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup> σε ακετονιτρίλιο αλλά και σε υδατικά διαλύματα συγκεκριμένου pH χρησιμοποιώντας σε κάθε περίπτωση το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε κυψελίδες χαλαζία πάχους 1 cm και ακτινοβολήθηκαν με λάμπα υδραργύρου, ενώ λαμβανόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα φάσματα υπεριώδους-ορατού. Και στα πειράματα αυτά η θερμοκρασία των δειγμάτων διατηρούνταν στη θερμοκρασία δωματίου με ψυκτήρα για την αποφυγή εξάτμισης του διαλύτη.

#### 4.5. Κυτταροτοξικά πειράματα

Στα κυτταροτοξικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών A2780 φυσιολογικές, αλλά και A2780 που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο cisplatin. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 2000 κύτταρα ανά πλακίδιο σε 100 μL θρεπτικού υλικού. Τα πλακίδια επωάστηκαν στους 37 °C σε 5% CO<sub>2</sub> για 48 h πριν την προσθήκη του συμπλόκου, έτσι ώστε να επιτευχθεί κορεσμός. Τα διαλύματα του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl παρασκευάστηκαν σε DMSO με συγκέντρωση 1 mg/mL και χρησιμοποιήθηκαν κατευθείαν για τις διαλυτοποιήσεις. Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των κυττάρων λόγω των συμπλόκων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την γνωστή μέθοδο MTT<sup>257</sup>. Στα πειράματα της κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα σε DMSO εξαιτίας της μικρής διαλυτότητας του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl σε νερό (~ 3x10<sup>-3</sup> M στους 310 K) αλλά και για να υπάρξει καλύτερη σύγκριση με τα άλλα κυτταροτοξικά σύμπλοκα. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα σύμπλοκα για αρκετό διάστημα (3 μέρες), έτσι ώστε να υπάρχει αρκετός χρόνος για να αλληλεπιδράσουν τα

σύμπλοκα με το DNA ή με άλλο βιολογικό στόχο στο επίπεδο αυτό. Οι τιμές IC<sub>50</sub> παριστάνουν την συγκέντρωση του συμπλόκου που χρειάζεται για την μείωση κατά 50% της κυτταρικής αύξησης.

#### 4.6. Σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων του ρουθηνίου

##### 4.6.1. Σύνθεση του υποκαταστάτη 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυλικό οξύ (4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)

###### Σύνθεση του 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξαλδεϋδη

5,27 g (28,6 mmol) 4,4'-διμεθυλ-2,2'-διπυριδίνη και 3,48 g (31,4 mmol) SeO<sub>2</sub> διαλύονται σε 160 ml 1,4-διοξάνιο. Ακολουθεί reflux στους 100<sup>0</sup>C για 2 ημέρες. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης διηθείται εν θερμώ και αφού κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος διηθείται ξανά. Απομακρύνεται ο διαλύτης με εξάτμιση και το υπόλειμμα διαλύεται σε 500 ml αιθυλακετοξικό εστέρα. Ακολουθεί διήθηση για την απομάκρυνση του στερεού και το διήθημα εκχυλίζεται με 2x100 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> με σκοπό την απομάκρυνση των καρβοξυλικών οξέων. Στη συνέχεια η οργανική στοιβάδα (πάνω) εκχυλίζεται με 3x100 ml 0,3 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> και το pH της υδατικής στοιβάδας (κάτω) ρυθμίζεται με στερεό Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> περίπου στο 10. Ακολουθεί εκχύλιση με 4x100 ml διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) και αφού απομονωθεί η οργανική στοιβάδα (κάτω) εξατμίζεται ο διαλύτης (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) και παραμένει ένα άσπρο ίζημα που είναι το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 42%.

###### Σύνθεση του 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυλικό οξύ

Διάλυμα AgNO<sub>3</sub> 1,12 g σε 12 ml H<sub>2</sub>O προστίθεται σε αιώρημα 1, 251 g 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξαλδεϋδη σε 55 ml αιθανόλης (EtOH). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται ισχυρά, ενώ ένα διάλυμα 26 ml 1 M NaOH προστίθεται στάγδην με σταγονομετρικό χωνί για 30 min. Αρχίζει να σχηματίζεται ένα μαύρο ίζημα καθώς το διάλυμα αναδεύεται για 24 h. Στη συνέχεια, η αιθανόλη απομακρύνεται με εξάτμιση και το υπόλειμμα διηθείται για την απομάκρυνση του



Ag<sub>2</sub>O και του μεταλλικού αργύρου που σχηματίστηκαν κατά την αντίδραση. Τα στερεά εκπλένονται με 2x20 ml 1,3 M NaOH και 20 ml H<sub>2</sub>O. Τα ενωμένα διηθήματα εκχυλίζονται με 2x26 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> για να απομακρυνθεί η αλδεύδη που δεν αντέδρασε, ενώ το pH ρυθμίζεται περίπου στα 3,5 χρησιμοποιώντας διάλυμα 1:1 (v/v) 4 N HCl/CH<sub>3</sub>COOH. Αφού το μίγμα διατηρηθεί στους -10<sup>0</sup>C για όλη την νύχτα, το άσπρο ίζημα διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται. Απόδοση: 61%. ESI-MS: m/z 215, [MH<sup>+</sup>]. Στοιχειακή Ανάλυση. Θεωρητικά για C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 67.28; H, 4.71; N, 13.08%, Βρέθηκε : C, 66.91; H, 4.67; N, 12.93%.

#### 4.6.2. Σύνθεση του συμπλόκου Ru<sup>III</sup>(terpy)Cl<sub>3</sub>

Σε μια σφαιρική φιάλη που περιέχει 125 ml απόλυτης αιθανόλης προστίθενται 162 mg RuCl<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O και 233 mg 2,2',6',2''-τερπυριδίνης. Ακολουθεί θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για 3 ώρες και στη συνέχεια, αφού το μίγμα της αντίδρασης κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, διηθείται υπό κενό. Ακολουθούν πλύσεις του καφέ-κόκκινου ιζήματος με απόλυτη αιθανόλη και 3x30 ml διαιθυλαιθέρα και ξήρανση. Απόδοση: 80%. Στοιχειακή Ανάλυση για RuC<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>. Θεωρητικά: C, 40.88; H, 2.52; N, 9.53%. Βρέθηκε : C, 39.984; H, 2.63; N, 9.58%.

#### 4.6.3. Σύνθεση του συμπλόκου cis-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl (1)

Αιώρημα από 0.1 g [RuCl<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NO)] (0.365 mmol) και 0.085 g terpy (0.365 mmol) σε 20 mL EtOH αναδεύεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Καταβυθίζεται καφέ ίζημα που απομακρύνεται με διήθηση, ενώ το διήθημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για μερικές μέρες να κρυσταλλώσει. Καφέ κρύσταλλοι εμφανίζονται και αφού συλλεχθούν με διήθηση, ακολουθούν πλύσεις του προϊόντος με διαιθυλαιθέρα (2x5 mL) και ξήρανση. Απόδοση: 44%. ESI-MS: m/z 435, [M<sup>+</sup>]. Στοιχειακή Ανάλυση για RuC<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>OCl<sub>3</sub>. Θεωρητικά: C, 38.28; H, 2.36; N, 11.90%. Βρέθηκε : C, 38.34; H, 1.98; N, 11.58%.

#### 4.6.4. Σύνθεση του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$

Σε αιώρημα από 1 g  $[Ru(terpy)Cl_3]$  (2.26 mmol) και 485.9 mg 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy (2.26 mmol) σε 100 ml απόλυτης αιθανόλης-νερού (75%-25%) προστίθενται 100 mg LiCl και 100 μl Et<sub>3</sub>N. Ακολουθεί θέρμανση με reflux για 4h. Μετά το τέλος της θέρμανσης πραγματοποιείται διήθηση εν θερμώ και εξάτμιση της αιθανόλης. Το χλωριούχο άλας του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl]^+$  σχηματίζεται με την προσθήκη περίσσειας (~100 ml) ακετόνης στους 4 °C για 12 h. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθείται και το ιώδες ίζημα πλένεται με ακετόνη, διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται. Η μετατροπή του χλωρο-συμπλόκου στο εξαφθοροφωσφορικό του άλας γίνεται με τη διάλυση του σε μια μικρή ποσότητα μεθανόλης και την προσθήκη αυτού σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα εξαφθοροφωσφορικού αμμωνίου NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται μερικές σταγόνες HCl 3 N για την πρωτονίωση της καρβοξυλομάδας του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy. Η καταβύθιση διευκολύνεται με απομάκρυνση της μεθανόλης με εξάτμιση και το ιώδες ίζημα που καταβυθίζεται, συλλέγεται με διήθηση, πλένεται με κορεσμένο όξινο διάλυμα NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται. Απόδοση: 68%. ESI-MS: *m/z* 584,  $[M]^+$ . Στοιχειακή Ανάλυση για C<sub>27</sub>H<sub>21</sub>ClF<sub>6</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>PRu: Θεωρητικά: C, 44.49; H, 2.90; N, 9.61%. Βρέθηκε : C, 45.04; H, 3.07; N, 9.53%.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$  με χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 σε μεθανόλη. Το σύμπλοκο διαλύεται στη μικρότερη δυνατή ποσότητα μεθανόλης και προστίθεται στην στήλη με διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Αρχικά εκλύεται μια κίτρινη ταινία, πιθανόν το σύμπλοκο με διαλύτη, και ακολουθεί μια πορτοκαλί ταινία που είναι το σύμπλοκο  $[Ru^{II}(terpy)_2]^{2+}$ . Στη συνέχεια εκλύονται δυο διαδοχικές ιώδεις ταινίες που περιέχουν τα δυο ισομερή θέσης του συμπλόκου και συλλέγονται μαζί. Ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση και το σύμπλοκο  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$  απομονώνεται ως λεπτόκοκκο ιώδες ίζημα.

Τα δυο ισομερή του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$  είναι δυνατόν να απομονωθούν κατά ένα ποσοστό λόγω της διαφορετικής διαλυτότητας σε ακετονιτρίλιο και μεθανόλη. Ο απόλυτος διαχωρισμός τους, όμως, είναι πολύ δύσκολος εξαιτίας των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζουν μεταξύ τους τα δυο ισομερή. Έτσι, έγινε προσπάθεια για την απομόνωση του *cis*- $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-$

Mebpy)Cl]PF<sub>6</sub> και του *trans*-[Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)Cl]PF<sub>6</sub>. Για το *cis* ισομερές 40 mg από το μίγμα των ισομερών διαλύεται σε 4 ml ακετονιτριλίου και προστίθενται στην στήλη Sephadex LH-20 (30 cm x 5 cm<sup>2</sup>) με διαλύτη έκλουσης 95:5 (v:v) μεθανόλης –ακετονιτριλίου. Η πρώτη ταινία περιέχει κυρίως το *cis*-ισομερές, ενώ η δεύτερη και τα δυο ισομερή και εκλύεται με 50:50 (v:v) μεθανόλης–ακετονιτριλίου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται αρκετές φορές γιατί ο διαχωρισμός των δυο ισομερών είναι σχετικά δύσκολος. Για το *trans*-ισομερές το μίγμα των ισομερών διαλύεται σε 4 ml μεθανόλης και προστίθενται στην στήλη Sephadex LH-20 (30 cm x 5 cm<sup>2</sup> κολώνα) με διαλύτη έκλουσης ακετονιτρίλιο 100%. Μια διευρυμένη ταινία ξεχωρίζει δύσκολα από μια άλλη λεπτή ταινία και έτσι χρησιμοποιείται μίγμα 95:5 (v:v) ακετονιτρίλιο-μεθανόλη για την έκλυση, ενώ αυξάνεται διαδοχικά το ποσοστό της μεθανόλης σε 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 (v:v). Έτσι, η ευρεία ταινία εκλύεται από τη στήλη και περιέχει κυρίως το *trans*-ισομερές. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές.

#### 4.6.5. Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (2)

Ζυγίζονται 500 mg από το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (0.68 mmol) και αφού προστεθούν 10 ml νερό το διάλυμα βράζει για 15 min, έτσι ώστε να επιτευχθεί η υδρόλυση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>). Στη συνέχεια το καφέ κόκκινο διάλυμα διηθείται εν θερμώ και αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται περίπου ~2 χρησιμοποιώντας την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος 1 N HCl. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται στάγδην 1 ml υδατικού διαλύματος NaNO<sub>2</sub> (47 mg, 0.68 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί θέρμανση στους 60 °C για 45 min, ενώ το καφέ-κόκκινο διάλυμα αλλάζει σε βαθύ κίτρινο. Μετά την θέρμανση, στο διάλυμα της αντίδρασης προστίθενται 4 ml κορεσμένου υδατικού διαλύματος εξαφθοροφωσφορικού αμμωνίου NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> και σιγά σιγά αρχίζει να καταβυθίζεται ίζημα χρώματος πορτοκαλί. Το προϊόν συλλέγεται με διήθηση και αφού γίνουν πλύσεις με διαιθυλαιθέρα, ξηραίνεται. Απόδοση: 58%. ESI-MS: *m/z* 579. Στοιχειακή Ανάλυση

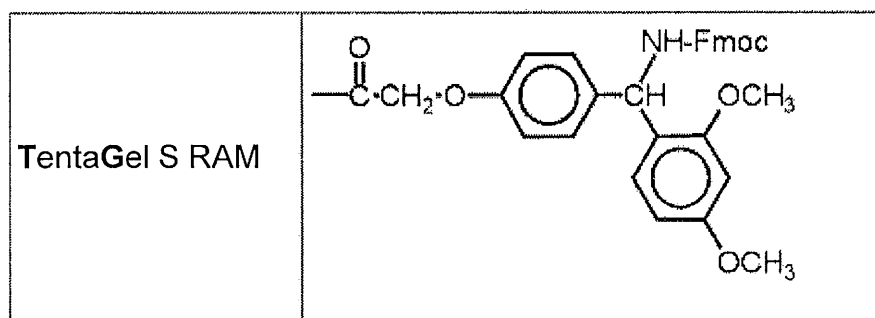
για  $C_{27}H_{21}F_{18}N_6O_3P_3Ru$ : Θεωρητικά: C, 32.00; H, 2.09; N, 8.29%. Βρέθηκε : C, 31.34; H, 2.23; N, 8.23%.

#### 4.6.6. Σύνθεση του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ (3)

500 mg από το σύμπλοκο  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$  (0.68 mmol) διαλύονται σε 10 ml νερό και το διάλυμα βράζει για 15 min, έτσι ώστε να επιτευχθεί η υδρόλυση του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$ . Το καφέ κόκκινο διάλυμα διηθείται εν θερμώ και αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται σε περίπου 10 χρησιμοποιώντας διάλυμα 1N NaOH. Στη συνέχεια στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται στάγδην 1 ml υδατικού διαλύματος  $NaNO_2$  (47 mg, 0.68 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και 30 min με θέρμανση στους 60 °C. Μετά την θέρμανση, στο διάλυμα της αντίδρασης προστίθενται 4 ml κορεσμένου υδατικού διαλύματος εξαφθοροφωσφορικού αμμωνίου  $NH_4PF_6$  και έτσι αρχίζει να καταβυθίζεται ίζημα χρώματος καφέ-πορτοκαλί. Το προϊόν συλλέγεται με διήθηση και αφού γίνουν πλύσεις με διαιθυλαιθέρα, ξηραίνεται. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ , διαλύοντας το σε μια μικρή ποσότητα ακετόνης. Το καφέ ίζημα καταβυθίζεται προσθέτοντας σιγά σιγά περίσσεια διαιθυλαιθέρα. Το προϊόν συλλέγεται και ξηραίνεται υπό κενό. Απόδοση: 52%. ESI-MS:  $m/z$  595,  $[M^+]$ . Στοιχειακή Ανάλυση για  $C_{27}H_{21}F_6N_6O_4PRu$ : Θεωρητικά: C, 43.85; H, 2.86; N, 11.36%. Βρέθηκε : C, 43.34; H, 2.63; N, 11.02 %.

#### 4.7. Πεπτιδική σύνθεση

Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε κατά την πεπτιδική σύνθεση είναι η TentaGel S RAM και η δομή της παριστάνεται στο παρακάτω σχήμα. Η υποκατάσταση της ρητίνης είναι 0.22 mmol/ gr.



Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την σύζευξη των αμινοξέων αλλά και των υποκαταστατών στα αμινοξέα είναι τα παρακάτω:

HCTU=1H-βενζοτρίαζολιο-1-[δισ(διμεθυλαμινο)μεθυλενο]-5-χλωρο-

εξαφθοροφωσφορικό-1,3-οξείδιο

DIPEA= δισοπροπυλαιθυλαμίνη

NMP = N-μεθυλ-πυρολιδόνη,

Πιπεριδίνη

Το πρωτόκολλο της πεπτιδικής σύνθεσης που χρησιμοποιήθηκε για την σύζευξη των αμινοξέων αλλά και του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Ζυγίζονται  $x$  mg ρητίνης ( $x$  mmol) και πλένονται καλά με NMP για να φουσκώσει η ρητίνη.
- Προστίθεται πιπεριδίνη 20 % σε NMP και αφού γίνουν 2-3 γρήγορες πλύσεις, η ρητίνη αφήνεται με πιπεριδίνη για 15-20 λεπτά με ανάδευση, ανανεώνοντας κάθε 5-6 λεπτά το διάλυμα της πιπεριδίνης.
- Ακολουθούν πλύσεις με NMP αρκετές φορές για απομάκρυνση των παραπροϊόντων (8- 10 φορές)

- Πραγματοποιείται το Test Kaiser για πιστοποίηση της ελεύθερης αμινοομάδας. (ΘΕΤΙΚΟ)
- Ζυγίζονται 10 x mmol του πρώτου αμινοξέος για να γίνει η σύζευξη. Προστίθενται 10 x mmol HCTU και διαλύονται σε NMP. Στη συνέχεια προστίθενται 20 x mmol DIPEA και αφού αντιδράσουν για λίγα δευτερόλεπτα προστίθενται όλα στην ρητίνη. Ακολουθεί ανάδευση για 2 h.
- Γίνονται πλύσεις με NMP αρκετές φορές για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων (8- 10 φορές)
- Πραγματοποιείται το Test Kaiser για πιστοποίηση της σύζευξης. (ΑΡΝΗΤΙΚΟ)
- Επαναλαμβάνεται η προσθήκη διαλύματος πιπεριδίνης 20 % σε NMP για την απομάκρυνση της Fmoc ομάδας και αφού γίνουν πάλι 2-3 γρήγορες πλύσεις, η ρητίνη αναδεύεται με πιπεριδίνη για 15-20 λεπτά ανανεώνοντας κάθε 5-6 λεπτά το διάλυμα της πιπεριδίνης.
- Γίνονται πλύσεις ξανά με NMP για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων (8- 10 φορές).
- Πραγματοποιείται Test Kaiser για πιστοποίηση της σύζευξης. (ΘΕΤΙΚΟ)

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται για την σύζευξη και άλλων αμινοξέων. Στην περίπτωση της σύζευξης με τον υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy χρησιμοποιούνται 5 x mmol του καρβοξυ-υποκαταστάτη, 5 x mmol PyBOP και 10 x mmol DIPEA σε NMP. Η ανάδευση στην περίπτωση αυτή γίνεται για 3 h.

### Test Kaiser

Διαλύματα:

1. 5 g νινυδρίνης σε 100 ml αιθανόλης.
2. 80 g φαινόλης σε 20 ml αιθανόλης.
3. 2 ml 0.001 M υδατικού διαλύματος KCN σε 98 ml πυριδίνης.

Φέρουμε λίγους κόκκους ρητίνης σε δοκιμαστικό σωλήνα. Προσθέτουμε τρεις σταγόνες από καθένα από τα παραπάνω διαλύματα και τοποθετούμε σε υδρόλουτρο που βράζει για 30-60 δευτερόλεπτα. Μπλέ κόκκοι υποδεικνύουν την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων (Θετικό Test). Άχρωμοι κόκκοι υποδεικνύουν τη μη ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων (Αρνητικό Test).

#### 4.7.1. Σύζευξη του αμινοξέος αλανίνη

Η σύζευξη του αμινοξέος αλανίνη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε παραπάνω. Έτσι, ζυγίζονται 500 mg ρητίνης (0.11 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.22 mmol/ gr) TentaGel S RAM σε μια μικροσύριγγα και γίνονται αρκετές πλύσεις με NMP για να φουσκώσει η ρητίνη. Προστίθεται διάλυμα πιπεριδίνης 20% σε NMP για την απομάκρυνση της Fmoc ομάδας και αφού γίνουν πάλι 2-3 γρήγορες πλύσεις, η ρητίνη αναδεύεται με πιπεριδίνη για 15-20 λεπτά ανανεώνοντας κάθε 5-6 λεπτά το διάλυμα. Ακολουθούν αρκετές πλύσεις με NMP και πιστοποίηση της ελεύθερης αμινομάδας με Test Kaiser. Οι κόκκοι της ρητίνης χρωματίζονται έντονα κόκκινοι γεγονός που υποδηλώνει την αποπροστασία της τελικής αμινομάδας της ρητίνης. Στην συνέχεια ζυγίζονται 41 mmol αμινοξέος (311.3 mg αλανίνης) και 1 mmol HCTU (515 mg) και διαλύονται 4 ml NMP. Στη συνέχεια προστίθενται 2 mmol DIPEA (320μl) και αφού αφήσουμε το μίγμα να αντιδράσει για 1 min το προσθέτουμε στην ρητίνη. Ακολουθεί ανάδευση 2h και μετά αρκετές πλύσεις με NMP και Test Kaiser για την πιστοποίηση της σύζευξης. Οι κόκκοι της ρητίνης παραμένουν άχρωμοι γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει ελεύθερη αμινομάδα άρα η σύζευξη έχει επιτευχθεί.

#### 4.7.2. Σύνθεση του υποκαταστάτη 4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy

Σε 500 mg (0.11 mmol, με υποκατάσταση ρητίνης 0.22 mmol/g) ρητίνης-αλανίνης προστίθενται 3 ml διαλύματος πιπεριδίνης 20% σε NMP για 45 min, ανανεώνοντας κάθε 10-15 min το διάλυμα της πιπεριδίνης. Έτσι, απομακρύνεται η προστατευτική ομάδα Fmoc και παραμένει ελεύθερη η τελική αμινομάδα του αμινοξέος για την σύζευξη με τον υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy. Η σύζευξη αυτή γίνεται με 0.5 mmol (107.5 mg) του 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο σύζευξης PyBOP (0.75 mmol, 390 mg), τα οποία διαλύονται σε 1.25 ml NMP. Προστίθεται η DIPEA (1 mmol, 160μl) και αφού αντιδράσουν για 1min το μίγμα προστίθεται στην ρητίνη και αναδεύεται για 3 h. Η σύζευξη πιστοποιείται με Test Kaiser όπου οι κόκκοι της ρητίνης παραμένουν άχρωμοι γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει ελεύθερη αμινομάδα. Το κόσμιμο από την ρητίνη για τη

πιστοποίηση του προϊόντος γίνεται με διάλυμα TFA/ H<sub>2</sub>O 95/5, v/v για 2h. Η ταυτοποίηση του προϊόντος γίνεται με LC-MS. ESI-MS [C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: *m/z* 284.

#### 4.7.3. Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (4)

500 mg (0.11 mmol, με υποκατάσταση ρητίνης 0.22 mmol/g) 4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy συζευγμένων στη ρητίνη, περίσσεια συμπλόκου Ru(terpy)Cl<sub>3</sub> (3 equiv., 0.33 mmol, 145 mg), 15 mg LiCl (0.36 mmol,) και 0.25 ml Et<sub>3</sub>N προστίθενται σε σφαιρική φιάλη σε DMF/EtOH (3:1) και ακολουθεί θέρμανση με reflux για 7 h. Αφού το μίγμα της αντίδρασης κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μεταφέρεται σε σύριγγα και ακολουθούν πλύσεις με DMF (5 x 5 min) για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων αλλά και της περίσσειας των αντιδραστηρίων, όπως το Ru(terpy)Cl<sub>3</sub> που δεν αντέδρασε. Μετά από τις πλύσεις με DMF, συνεχίζονται οι πλύσεις με διχλωρομεθάνιο CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 5 min) για την απομάκρυνση του DMF και την ξήρανση του προϊόντος πριν το κόψιμο από την ρητίνη. Το κόψιμο του πεπτιδίου από την ρητίνη γίνεται με τη χρήση διαλύματος (95/5, v/v) για 3h. Το διάλυμα του TFA/H<sub>2</sub>O που περιέχει το προϊόν εκχύνεται σε διαιθυλαιθέρα και έτσι πραγματοποιείται η καταβύθιση του. Το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) συλλέγεται με διήθηση και αφού ξηρανθεί, διαλύεται σε 1 ml μεθανόλης και το διάλυμα προστίθεται σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα εξαφθοροφωσφορικού αμμωνίου για την καταβύθιση του ως εξαφθοροφωσφορικό άλας. Η καταβύθιση διευκολύνεται με απομάκρυνση της μεθανόλης με εξάτμιση και το προϊόν συλλέγεται, πλένεται με διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται. Απόδοση: ~70-75%.

(4). ESI-MS: *m/z* 654. [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl]<sup>+</sup>. Στοιχειακή Ανάλυση για C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>ClF<sub>6</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>PRu: Θεωρητικά: C, 45.09; H, 3.41; N, 12.27%. Βρέθηκε : C, 45.34; H, 3.23; N, 12.02%.

#### 4.7.4. Σύνθεση του πεπτιδίου GHK

Η σύζευξη των αμινοξέων Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH and Fmoc-Gly-OH πραγματοποιείται πάνω στην ρητίνη TentaGel S RAM σύμφωνα με το πρωτόκολλο πεπτιδικής σύνθεσης που παρουσιάστηκε παραπάνω. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την σύζευξη είναι τα HCTU και η δισοπροπυλαιθυλαμίνη



DIPEA. Η αποπροστασία των Fmoc ομάδων γίνεται χρησιμοποιώντας διάλυμα πιπεριδίνης 20% σε NMP. Αρχικά πραγματοποιείται η σύζευξη της λυσίνης και αφού αποπροστατευτεί η τελική αμινομάδα της συζευγνύεται με την ελεύθερη καρβοξυλομάδα της ιστιδίνης. Η σύνθεση συνεχίζεται με αποπροστασία της αμινομάδας της ιστιδίνης με διάλυμα πιπεριδίνης 20% σε NMP και σύζευξη με την ελεύθερη καρβοξυλομάδα της γλυκίνης. Το κόσμιμο του πεπτιδίου από την ρητίνη γίνεται με τη χρήση διαλύματος TFA/ H<sub>2</sub>O (95/5, v/v) για 2h και η πιστοποίηση γίνεται με φασματοσκοπία μάζας. Απόδοση: 40 %. Η ταυτοποίηση του προϊόντος γίνεται με LC-MS. ESI-MS [C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>: *m/z* 340.

#### 4.7.5. Σύνθεση του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy

Σε 500 mg (0.11 mmol, με υποκατάσταση ρητίνης 0.22 mmol/g) πεπτιδίου GHK στη ρητίνη προστίθενται 3 ml διαλύματος πιπεριδίνης 20% σε NMP για 45 min ανανεώνοντας κάθε 10-15 min το διάλυμα της πιπεριδίνης. Έτσι, απομακρύνεται η προστατευτική ομάδα Fmoc της γλυκίνης και παραμένει ελεύθερη η αμινομάδα του αμινοξέος για την σύζευξη με τον υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy. Η σύζευξη αυτή γίνεται με 0.5 mmol 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy (107.5 mg) και 0.75 mmol PyBOP (390 mg), τα οποία διαλύονται σε 1.25 ml NMP. Προστίθεται 1 mmol DIPEA (160μl) και αφού αντιδράσουν για 1min το μίγμα προστίθεται στην ρητίνη και αναδεύεται για 3 h. Το κόσμιμο από την ρητίνη για τη πιστοποίηση του προϊόντος γίνεται με διάλυμα TFA/ H<sub>2</sub>O 95/5, v/v για 2h. Η ταυτοποίηση του προϊόντος γίνεται με LC-MS. ESI-MS [C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>9</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: *m/z* 536.

#### 4.7.6. Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (7)

500 mg (0.11 mmol, με υποκατάσταση ρητίνης 0.22 mmol/g) 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy συζευγμένου στη ρητίνη, περίσσεια συμπλόκου Ru(terpy)Cl<sub>3</sub> (3 equiv., 0.33 mmol, 145 mg), 15 mg LiCl (0.36 mmol,) και 0.25 ml Et<sub>3</sub>N προστίθενται σε σφαιρική φιάλη σε DMF/EtOH (3:1) και ακολουθεί θέρμανση με reflux για 7 h. Αφού το μίγμα της αντίδρασης κρυώσει σε θερμοκρασία

περιβάλλοντος μεταφέρεται σε σύριγγα και ακολουθούν πλύσεις με DMF (5 x 5 min) για την απομάκρυνση παραπροϊόντων αλλά και της περίσσειας του συμπλόκου Ru(terpy)Cl<sub>3</sub>, που δεν αντέδρασε. Μετά από τις πλύσεις με DMF, συνεχίζονται οι πλύσεις με διχλωρομεθάνιο CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 5 min) για την απομάκρυνση του DMF και την ξήρανση του προϊόντος πριν το κόψιμο από την ρητίνη. Το κόψιμο του πεπτιδίου από την ρητίνη γίνεται με τη χρήση διαλύματος (95/5, v/v) για 3h. Το διάλυμα του TFA/ H<sub>2</sub>O που περιέχει το προϊόν εκχύνεται σε διαιθυλαιθέρα και έτσι πραγματοποιείται η καταβύθιση του. Το σύμπλοκο συλλέγεται με διήθηση και αφού ξηρανθεί, διαλύεται σε 1 mL μεθανόλης και προστίθεται σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα εξαφθοροφωσφορικού αμμωνίου για την καταβύθιση του ως εξαφθοροφωσφορικό άλας. Η καταβύθιση διευκολύνεται με απομάκρυνση της μεθανόλης με εξάτμιση και το προϊόν συλλέγεται, πλένεται με διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται. Απόδοση: 77%.

(7). ESI-MS: [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl]<sup>+</sup> *m/z* 905. Στοιχειακή Ανάλυση για C<sub>41</sub>H<sub>44</sub>ClF<sub>6</sub>N<sub>12</sub>O<sub>4</sub>PRu: Θεωρητικά: C, 46.88; H, 4.22; N, 16.00%. Βρέθηκε : C, 46.63; H, 4.03; N, 15.82%.

#### 4.7.7. Σύνθεση των συμπλόκων [Ru(terpy)(4-COXCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> και [Ru(terpy)(4-COXCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) όπου X= Αλανίνη (5) και (6), GHK (8) και (9)

Ζυγίζονται 375 και 500 mg (0.47 mmol) αντίστοιχα από το κάθε σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COXCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>), όπου X= Αλανίνη, GHK και αφού προστεθούν 10 ml νερό σε κάθε σύμπλοκο, τα διαλύματα βράζουν για 20 min έτσι ώστε να επιτευχθεί η υδρόλυση του κάθε χλωρο-συμπλόκου (4) και (7). Στη συνέχεια τα καφέ κόκκινα διαλύματα διηθούνται εν θερμώ και αφήνονται να κρυσώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Το pH των διαλυμάτων για τα νιτροσουλ-σύμπλοκα [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (5) και [Ru(terpy)(4-COGHKCGNH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (8) ρυθμίζεται σε περίπου ~2 χρησιμοποιώντας την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος 1 N HCl. Αντίστοιχα για τα νιτρο-σύμπλοκα [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) (6) και [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) (9) το pH των διαλυμάτων ρυθμίζεται σε περίπου ~10 χρησιμοποιώντας διάλυμα 1N NaOH. Στα παραπάνω

τέσσερα συνολικά διαλύματα προστίθενται στάγδην από 0.47 mmol υδατικού διαλύματος  $\text{NaNO}_2$  και ακολουθεί ανάδευση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά θέρμανση στους  $60\text{ }^\circ\text{C}$  για 45 min. Το χρώμα των διαλυμάτων κατά την πάροδο της αντίδρασης αλλάζει σε βαθύ κίτρινο στα νιτροσουλ-σύμπλοκα **(5)** και **(8)** και βαθύ πορτοκαλί στα νιτρο-σύμπλοκα **(6)** και **(9)**. Μετά την θέρμανση, στα διαλύματα των αντιδράσεων προστίθενται 3 ml κορεσμένου υδατικού διαλύματος εξαφθοροφωσφορικού αμμωνίου  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  και σιγά σιγά αρχίζουν να καταβυθίζονται τα αντίστοιχα εξαφθοροφωσφορικά άλατα των συμπλόκων. Τα προϊόντα συλλέγονται με διήθηση και αφού γίνουν πλύσεις με διαιθυλαιθέρα, ξηραίνονται. Απόδοση: ~55-60 %.

**(5)**. ESI-MS:  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}]^{3+}$   $m/z$  649. Στοιχειακή Ανάλυση για  $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{F}_{18}\text{N}_8\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ : Θεωρητικά: C, 33.25; H, 2.51; N, 10.34%. Βρέθηκε : C, 32.97; H, 2.43; N, 10.12%.

**(6)**. ESI-MS:  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2]^+$   $m/z$  665. Στοιχειακή Ανάλυση για  $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{F}_6\text{N}_8\text{O}_4\text{PRu}$ : Θεωρητικά: C, 44.51; H, 3.36; N, 13.84%. Βρέθηκε : C, 44.97; H, 3.43; N, 13.99%.

**(8)**. ESI-MS:  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}]^{3+}$   $m/z$  900. Στοιχειακή Ανάλυση για  $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{F}_{18}\text{N}_{13}\text{O}_5\text{P}_3\text{Ru}$ : Θεωρητικά: C, 36.89; H, 3.32; N, 13.64%. Βρέθηκε : C, 36.97; H, 3.43; N, 13.12%.

**(9)**. ESI-MS:  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{Z4-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2]^+$   $m/z$  916. Στοιχειακή Ανάλυση για  $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{F}_6\text{N}_{13}\text{O}_6\text{PRu}$ : Θεωρητικά: C, 46.42; H, 4.18; N, 17.16%. Βρέθηκε : C, 46.17; H, 4.13; N, 17.09%.

# Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ -ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>

---

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ

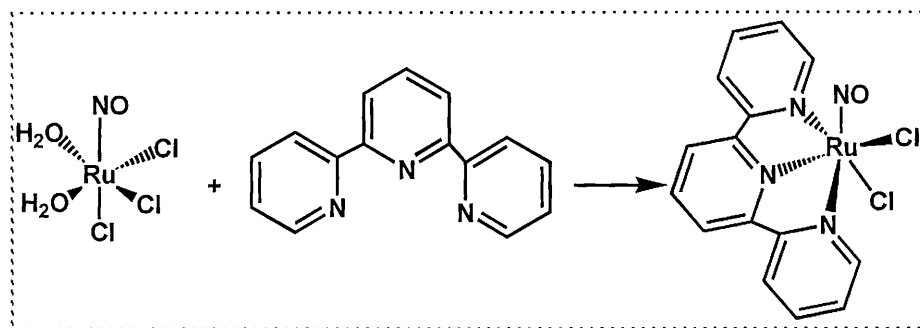
*cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl (**1**)

---

## 5.1. Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Φωτοχημεία του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl (1)

### 5.1.1. Σύνθεση

Το σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl παρασκευάστηκε από την αντίδραση του συμπλόκου [RuCl<sub>3</sub>(NO)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>258</sup> με τερπυριδίνη και χαρακτηρίστηκε με στοιχειακή ανάλυση, διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές τεχνικές, όπως φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (<sup>1</sup>H-NMR), φασματομετρία μάζας (LC-MS) κ.α. Η αντίδραση σύνθεσης του συμπλόκου (1) παριστάνεται στο παρακάτω σχήμα:



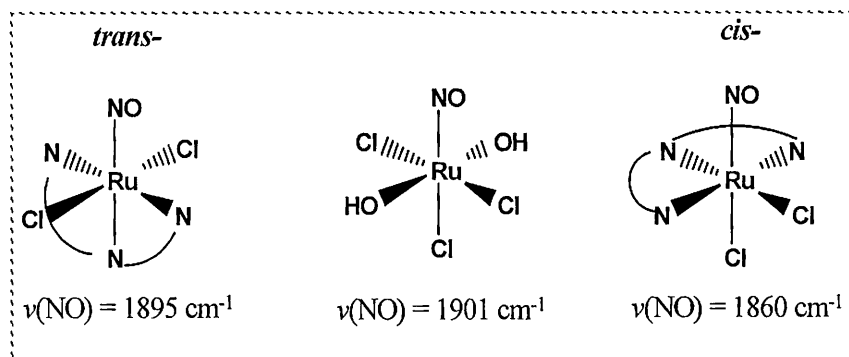
Σχήμα 5.1. Αντίδραση σύνθεσης του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl.

Η στοιχειακή ανάλυση έδειξε ότι κατά την παραπάνω αντίδραση και τα δυο μόρια νερού αντικαθίστανται από τα άτομα αζώτου των δακτυλίων της τερπυριδίνης. Έτσι, το νέο σύμπλοκο που προκύπτει αντιστοιχεί στον τύπο [RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl. Είναι γνωστό ότι κατά την αντίδραση του συμπλόκου [RuCl<sub>5</sub>(NO)]<sup>2-</sup> με τερπυριδίνη προκύπτει το σύμπλοκο *trans*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]<sup>+</sup>, το οποίο έχει τα δύο χλώρια σε αξονικές θέσεις<sup>158</sup>. Στην αντίδραση αυτή, η προσθήκη του KCl γίνεται για να αποφευχθεί η γρήγορη υδρόλυση του χλωρίου στο αρχικό σύμπλοκο, αφού το χλώριο που βρίσκεται σε *trans* θέση ως προς το NO μπορεί εύκολα να αντικατασταθεί από ένα μόριο διαλύτη<sup>259</sup>. Με τον τρόπο αυτό, ο υποκαταστάτης τερπυριδίνη εντάσσεται στο ρουθίνιο αφήνοντας τα δυο χλώρια σε *trans* θέση μεταξύ τους.

## 5.1.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Η δόνηση τάσης για το μη ενταγμένο NO είναι  $1870\text{ cm}^{-1}$  και στη σύνδεση με ένα μέταλλο η  $\nu_{\text{NO}}$  μπορεί να αυξάνεται ή να μειώνεται, ανάλογα με την φύση των υπολοίπων υποκαταστατών στο σύμπλοκο, την ηλεκτρονιακή διαμόρφωση και το φορτίο και την δομή των σωματιδίων<sup>260</sup>. Γενικά, η δόνηση τάσης του NO για τα σύμπλοκα με γραμμικό δεσμό M-N-O εμφανίζεται στην περιοχή  $1950\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$  ενώ για τα σύμπλοκα που περιλαμβάνουν κυρτούς δεσμούς M-N-O εμφανίζεται στην περιοχή  $1720\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ . Όταν το NO γεφυρώνει δύο ή περισσότερα άτομα μετάλλου η  $\nu_{\text{NO}}$  μπορεί να εμφανίζεται μεταξύ  $1650$  και  $1300\text{ cm}^{-1}$ . Κάποιες φορές όμως, αυτές οι περιοχές επικαλύπτονται σημαντικά και έτσι η φασματοσκοπία αυτή δεν αποτελεί ένα απόλυτα αξιόπιστο εργαλείο για το συσχετισμό ανάμεσα στη θέση της  $\nu_{\text{NO}}$  και της γωνίας δεσμού M-N-O. Στην παρούσα μελέτη η φασματοσκοπία υπερύθρου χρησιμοποιήθηκε για την πιστοποίηση της μορφής του NO ως  $\text{NO}^+$ , αφού παρατηρήθηκαν υψηλές δονήσεις τάσης για το ενταγμένο NO.

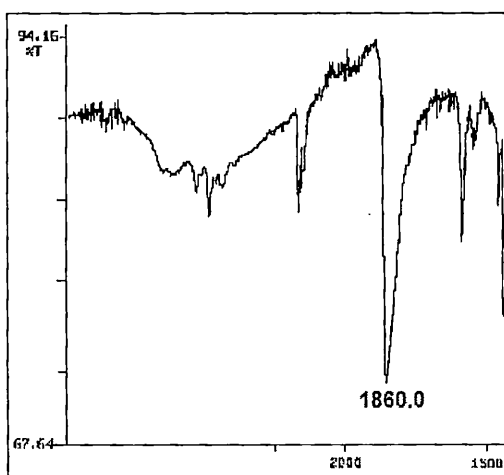
Το φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου *trans*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl εμφανίζει μια ταινία στα  $1895\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης  $\nu(\text{NO})$ . Στην ίδια αντίδραση μεταξύ του [RuCl<sub>5</sub>(NO)]<sup>2-</sup> και τερπυριδίνης, σχηματίζεται σε ένα μικρό ποσοστό και ένα άλλο προϊόν διαφορετικού μοριακού τύπου, το οποίο μπορεί να περιέχει H<sub>2</sub>O ή και OH<sup>-</sup> αντί του Cl<sup>-</sup>. Το προϊόν αυτό παρουσιάζει μια τιμή δόνησης τάσης αρκετά υψηλή στα  $1920\text{ cm}^{-1}$ . Στην περίπτωση μας, το σύμπλοκο που συντέθηκε κατά την αντίδραση του [RuCl<sub>3</sub>(NO)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] με τερπυριδίνη εμφανίζει τον ίδιο μοριακό τύπο με το σύμπλοκο *trans*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]<sup>+</sup> δείχνοντας ότι είναι ισομερές του, ενώ παρουσιάζει την τιμή δόνησης τάσης  $\nu(\text{NO})$  στα  $1860\text{ cm}^{-1}$ , υποδεικνύοντας ότι είναι το *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl.



Σχήμα 5.2. Νιτροσυσμπλοκα του ρουθενίου με τερπυριδίνη βάσει των συχνοτήτων δόνησης τάσης του δεσμού N-O.

Η τιμή της δόνησης τάσης του δεσμού N-O  $\nu(\text{NO})$  αποτελεί μια ένδειξη για τον τρόπο ένταξης του NO, καθώς και τη σχετική του θέση με τα ενταγμένα άτομα αζώτου της τερπυριδίνης ή των χλωρο-υποκαταστατών. Έτσι, στο σύμπλοκο  $[\text{RuCl}_5(\text{NO})]^{2-}$  που το NO βρίσκεται σε *trans* θέση ως προς το χλώριο, η τιμή της δόνησης τάσης του δεσμού N-O,  $\nu(\text{NO})$  είναι  $1904 \text{ cm}^{-1}$  <sup>261</sup>. Το σύμπλοκο  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{H}_2\text{O})_2]$  παρουσιάζει τιμή δόνησης τάσης  $\nu(\text{NO})$  στα  $1901 \text{ cm}^{-1}$ , το οποίο επίσης περιέχει το ενταγμένο NO σε *trans* θέση ως προς το χλώριο. Από την άλλη μεριά, όταν το NO εντάσσεται σε *trans* θέση ως προς ένα υποκαταστάτη πυριδινικού δακτυλίου δότη αζώτου, η  $\nu(\text{NO})$  μετατοπίζεται σε υψηλότερες συχνότητες, όπως για παράδειγμα στο σύμπλοκο *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\text{Cl}](\text{PF}_6)_2$  με  $\nu(\text{NO}) = 1931 \text{ cm}^{-1}$  <sup>262</sup> ή στο σύμπλοκο *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2(\text{py})](\text{PF}_6)_3$  με  $\nu(\text{NO}) = 1950 \text{ cm}^{-1}$  <sup>262</sup>.

Επιπλέον, το σύμπλοκο *trans*- $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{bpy})_2](\text{PF}_6)_2$  με *trans*- διαμόρφωση NO και χλωρίου εμφανίζει συχνότητα δόνησης τάσης  $\nu(\text{NO})$  στα  $1912 \text{ cm}^{-1}$  ομοιάζοντας σημαντικά στις περιπτώσεις των συμπλόκων  $[\text{RuCl}_5\text{NO}]^{2-}$  και  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$  που έχουν ενταγμένο τον υποκαταστάτη NO σε *trans* θέση ως προς το χλώριο <sup>263</sup>. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στο φαινόμενο της μετατόπισης σε υψηλότερες συχνότητες όταν το NO βρίσκεται σε *trans*- θέση ως προς τους χλώρο υποκαταστάτες ( $\sigma/\pi$ -δότες υποκαταστάτες). Τα παραπάνω αποτελέσματα της βιβλιογραφίας ενισχύουν την άποψη ότι η γεωμετρία του συμπλόκου που συνθέσαμε είναι *cis*-. Στο σχήμα 5.3. δίνεται τμήμα του φάσματος υπερύθρου του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$ , όπου φαίνεται η ταινία της δόνησης τάσης του δεσμού N-O.



Σχήμα 5.3. Φάσμα IR του συμπλόκου (1) στο οποίο παρουσιάζεται η ταινία απορρόφησης που οφείλεται στην δόνηση τάσης του δεσμού N-O.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι σημαντικότερες ταινίες απορρόφησης του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl. Έτσι, εκτός από την ταινία που οφείλεται στην δόνηση τάσης του δεσμού N-O στα 1860 cm<sup>-1</sup> παρατηρούνται ταινίες στα 1600 και στα 1568 cm<sup>-1</sup>, που οφείλονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C=C και C=N αντίστοιχα.

*Πίνακας 5.1. Χαρακτηριστικές ταινίες του φάσματος υπερόθρου του συμπλόκου cis-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl.*

IR	$\nu(\text{NO})$	C=C	C=N	$\gamma(\text{py})$	$\delta(\text{py})$
cm <sup>-1</sup>	1860 (s)	1600 (s)	1568 (s)	646	440

### 5.1.3. Φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR

Στο <sup>1</sup>H NMR φάσμα του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl παρατηρήθηκε ότι τα πρωτόνια των δύο τερματικών πυριδινικών δακτυλίων, H<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, H<sub>5</sub>H<sub>5</sub>, H<sub>4</sub>H<sub>4</sub> και H<sub>3</sub>H<sub>3</sub> του υποκαταστάτη τερπυριδίνη είναι χημικά ισοδύναμα αφού δίνουν μόνο ένα σείτ συντονισμών. Από τη παρατήρηση αυτή προκύπτει το συμπέρασμα ότι το περιβάλλον των πρωτονίων αυτών είναι ισοδύναμο, καθώς η τέταρτη θέση του ισημερινού επιπέδου του συμπλόκου καταλαμβάνεται από Cl. Έτσι, τα πρωτόνια H<sub>6</sub>H<sub>6</sub> εμφανίζονται ως μια διπλή ταινία συντονισμού στα 9.15 ppm λόγω της σύζευξής τους με τα H<sub>5</sub>H<sub>5</sub>. Η τιμή συντονισμού των H<sub>6</sub>H<sub>6</sub> (9.15 ppm) είναι αρκετά υψηλή και οφείλεται πιθανότατα στην αποπροστασία που προκαλεί στα πρωτόνια αυτά το γειτονικό Cl, που συμπληρώνει την τέταρτη θέση του ισημερινού επιπέδου του συμπλόκου. Τα H<sub>5</sub>H<sub>5</sub> εμφανίζονται στα 7.98 ppm ως μια τριπλή ταινία συντονισμού ενώ τα H<sub>3</sub>H<sub>3</sub> στα 8.50 ppm. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl καθώς και οι σταθερές σύζευξης <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> μεταξύ τους.

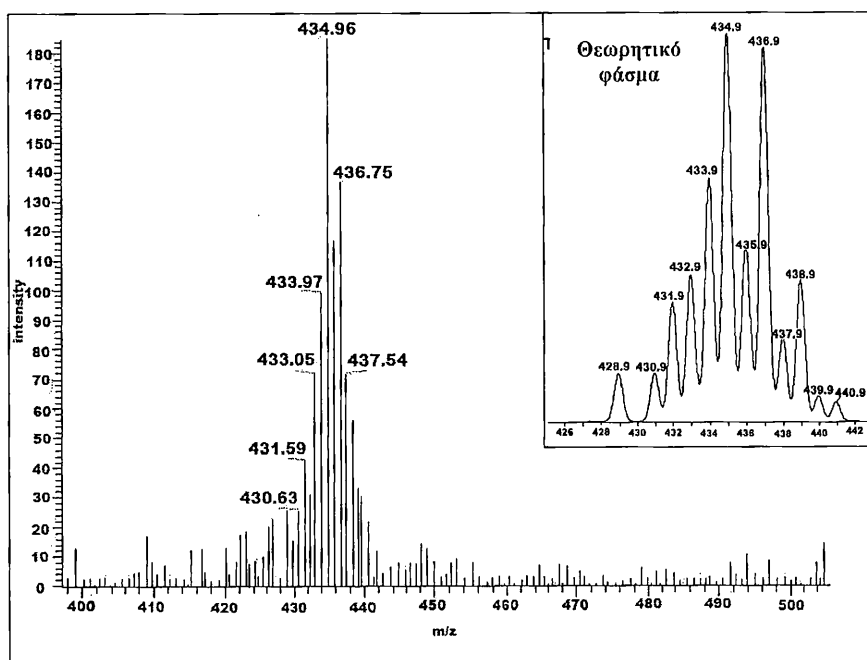


Πίνακας 5.2. Χημικές μετατοπίσεις (ppm)  $^1\text{H}$  NMR των πρωτονίων του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$  σε  $\text{DMSO}-d_6$

	$\text{H}_6\text{H}_6'$	$\text{H}_5\text{H}_5'$	$\text{H}_4\text{H}_4'$	$\text{H}_3\text{H}_3', \text{H}_3''\text{H}_5''$	$\text{H}_4''$
<i>cis</i> -(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$	9.15 (d)	7.98(t)	8.50(t)	8.94(m)	8.83(t)
$^3J_{\text{HH}}$ (Hz)	5.0	6.8	7.8		7.2

#### 5.1.4. Φασματομετρία μάζας

Η καθαρότητα του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$  διαπιστώθηκε με συνδυασμένη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρία μάζας, LC-MS, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης ακετονιτρίλιο. Το φάσμα ESI-MS που λήφθηκε φαίνεται στο σχήμα 5.4. Η κεντρική κορυφή βρίσκεται σε  $m/z = 435$  και αντιστοιχεί στο θετικά φορτισμένο κατιόν  $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]^+$ , όπως διαπιστώνεται και από την θεωρητική μορφή της ισοτοπικής κατανομής του φάσματος.

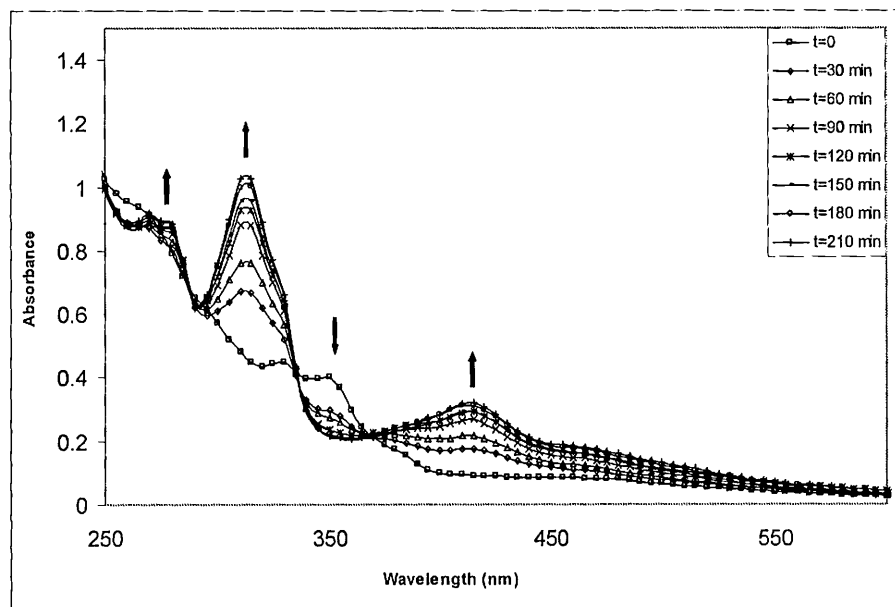


Σχήμα 5.4. ESI-MS φάσμα του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$  και σύγκριση με το θεωρητικό φάσμα.

### 5.1.5. Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους

Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-Vis χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για τον χαρακτηρισμό του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl σε ακετονιτρίλιο (10<sup>-4</sup> M) (Σχήμα 5.5., t=0 min). Στο φάσμα αυτό η ταινία στα 274 nm αντιστοιχεί στην  $\pi \rightarrow \pi^*$  μετάπτωση του πολυπυριδινικού υποκαταστάτη (terpy), όπως εξάλλου έχει παρατηρηθεί και για άλλα πολυπυριδινο-σύμπλοκα του ρουθηνίου<sup>166,264</sup>. Οι ταινίες στα 330 και 349 nm αποδίδονται πιθανόν σε MLCT ταινίες του  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$  και  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{terpy})$ . Στην περιοχή αυτή έχουν αποδοθεί αντίστοιχες ταινίες αναλόγων συμπλόκων του ρουθηνίου, όπως των συμπλόκων [Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)X]<sup>2+</sup> (X= N<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)<sup>129</sup> αλλά και αντίστοιχων συμπλόκων του οσμίου<sup>166</sup>.

Η φωτοχημεία του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl μελετήθηκε κατά την ακτινοβόληση των διαλυμάτων του με λάμπα υδραργύρου και καταγραφή των φασμάτων υπεριώδους-ορατού, όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.5. Έτσι, διαπιστώθηκε η απελευθέρωση του NO με τον παράλληλο σχηματισμό φωτοπροϊόντων, τα οποία χαρακτηρίστηκαν με φασματομετρία μάζας. Η μελέτη της φωτοχημείας πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα ακετονιτρίλιου.



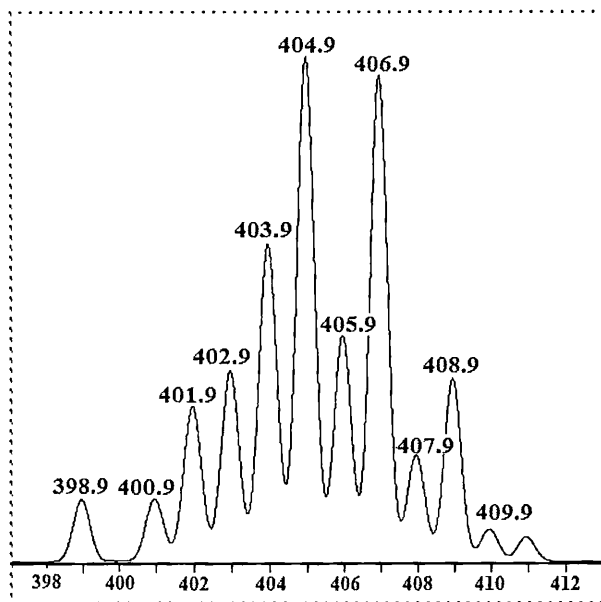
Σχήμα 5.5. Φάσμα υπεριώδους-ορατού του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(terpy)(NO)]Cl σε CH<sub>3</sub>CN κατά την ακτινοβόληση του με λάμπα υδραργύρου.

Με την πάροδο του χρόνου ακτινοβόλησης, το χρώμα του διαλύματος άλ από ανοικτό πορτοκαλί σε σκούρο πορτοκαλί-καφέ, ενώ στα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν, διαπιστώθηκε η εμφάνιση νέων ταινιών και η εξαφάνιση κάπ άλλων. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.5., παρατηρήθηκε μείωση της έντασης ταινιών στα 330 και 349 nm, που όπως ήδη αναφέρθηκε, αντιστοιχούν στις Μ ταινίες του  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$  και  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{terpy})$ . Η αποδέσμευση, λοιπόν νιτροσουλ-ομάδας συνοδεύεται με την μείωση της έντασης της ταινίας που αντιστοιχεί στην μετάπτωση  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$ . Η μείωση της έντασης της ταινίας αποδόθηκε στην μετάπτωση  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{terpy})$  πιθανόν να οφείλεται στην αλ της οξειδωτικής κατάστασης του Ru αλλά και στην αντικατάσταση του NO από μόριο διαλύτη. Επίσης, παρατηρείται αύξηση των εντάσεων για τις ταινίες στα 309 και 414 nm, οι οποίες αποδίδονται στα φωτοπροϊόντα που προκύπτουν μετά την απόσπαση του NO. Το τέλος της φωτοαντίδρασης διαπιστώνεται όταν μετά από εξαντλητική ακτινοβόληση στο φάσμα που καταγράφεται δεν παρατηρούνται μεταβολές.

Μετά το τέλος της ακτινοβόλησης και απομάκρυνσης του διαλύτη, λήφθηκε φάσμα υπερύθρου και διαπιστώθηκε η απουσία της ταινίας που αντιστοιχεί στην συχνότητα δόνησης τάσης του δεσμού N-O, γεγονός που επιβεβαιώνει την απελευθέρωση του NO από το σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl. Επιπλέον, το φάσμα EPR του ακτινοβολημένου δείγματος είναι ανάλογο με παραμαγνητικά σύμπλοκα του Ru(III). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με τους προτεινόμενους από την βιβλιογραφία μηχανισμούς φωτοαπόσπασης του NO σε ανάλογα σύμπλοκα του ρουθηνίου<sup>155,265</sup>.

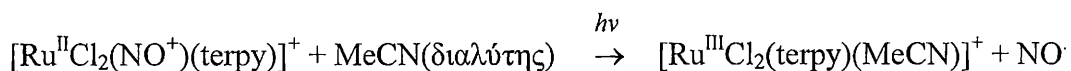
Τέλος κατά την υγρή χρωματογραφία του φωτοπροϊόντος ένα μόνο σύμπλοκο ανιχνεύθηκε. Το φάσμα ESI-MS παρουσιάζει μια κεντρική κορυφή σε *m/z* 404.9 που αντιστοιχεί στο κατιόν [Ru(terpy)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Κατά τη διάρκεια λήψης του φάσματος ESI-MS (80eV), η απόσπαση του ασθενώς ενταγμένου μορίου διαλύτη στην αέρια φάση μπορεί εύκολα να πραγματοποιηθεί, εξαιτίας του ασθενούς δεσμού μεταξύ του Ru(III) με το ακετονιτρίλιο. Έτσι λοιπόν, στο φάσμα μάζας ESI-MS παρατηρούμε το κατιόν [Ru(terpy)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, γεγονός που επιβεβαιώνει για μια ακόμη φορά την απόσπαση του NO από το αρχικό σύμπλοκο.

Στο Σχήμα 5.6. παρουσιάζεται η κεντρική κορυφή του φάσματος ESI-MS του φωτοπροϊόντος [Ru(terpy)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

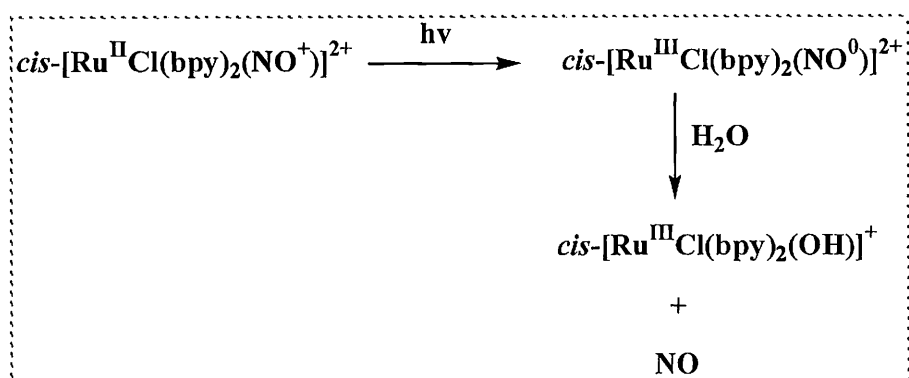


Σχήμα 5.6. ESI-MS φάσμα του κατιόντος  $[RuCl_2(terpy)]^+$ .

Η φωτοχημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά την ακτινοβόληση του ακετονιτριλικού διαλύματος του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[RuCl_2(NO)(terpy)]Cl$  μπορεί να παρασταθεί από την παρακάτω χημική αντίδραση:



Σύμφωνα με την αντίδραση αυτή, κατά την ακτινοβόληση συμβαίνουν δυο διαδικασίες, η αντικατάσταση του NO από διαλύτη και η οξείδωση του Ru(II) σε Ru(III). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και κατά την μελέτη του συμπλόκου *cis*- $[RuCl(bpy)_2(NO)](PF_6)_2$  σε υδατικά διαλύματα κατά την ακτινοβόληση του στα 355 nm<sup>155</sup>. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του NO που απελευθερώνεται, πραγματοποιήθηκε με εξειδικευμένη συσκευή και διαπιστώθηκε ότι ο μηχανισμός απόσπασης του NO κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου *cis*- $[RuCl(bpy)_2(NO)](PF_6)_2$  είναι ο ίδιος σε υδατικά και μη υδατικά διαλύματα. Ως προϊόν της φωτόλυσης προσδιορίστηκε σε υδατικό διάλυμα με pH 5.7 το σύμπλοκο *cis*- $[Ru^{III}Cl(bpy)_2(OH)]^+$ . Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στο φάσμα υπεριώδους-ορατού κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου αυτού ήταν ανάλογες με αυτές του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[RuCl_2(NO)(terpy)]Cl$ . Οι μεταβολές αυτές αφορούν την απόσπαση του NO από τα αντίστοιχα σύμπλοκα του ρουθηνίου και το σχηματισμό των αντίστοιχων επιδιαλυτωμένων προϊόντων. Στο παρακάτω σχήμα παριστάνεται ο προτεινόμενος μηχανισμός της μελέτης αυτής για το σύμπλοκο *cis*- $[RuCl(bpy)_2(NO)](PF_6)_2$ <sup>155</sup>.



Σχήμα 5.7. Μηχανισμός απόσπασης του NO από το σύμπλοκο  $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$  κατά την ακτινοβόληση του.

Κατά την μελέτη της ακτινοβόλησης του συμπλόκου  $[\text{RuL}(\text{bpy})_2(\text{NO})]^{3+}$  (L = πυριδίνη, 4-πικολίνη και 4-ακετυλοπυριδίνη) με laser στα 355 nm που συνοδεύεται από απόσπαση του NO, παρατηρήθηκαν ανάλογες μεταβολές στο φάσμα υπεριώδους-ορατού με αυτές του συμπλόκου  $\text{cis-}(\text{Cl},\text{Cl})\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$ <sup>152</sup>. Κατά την φωτοαντίδραση αυτή, σχηματίζεται αρχικά ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο με τύπο  $\text{cis-}[\text{Ru}^{\text{III}}\text{L}(\text{bpy})_2(\text{NO})]^{3+}$ , το οποίο στη συνέχεια όταν βρεθεί σε υδατικά διαλύματα, λαμβάνει χώρα η απελευθέρωση του NO και ο σχηματισμός του συμπλόκου  $[\text{RuL}(\text{bpy})_2(\text{OH})]^{2+}$ . Ο φωτοχημικός αυτός μηχανισμός βασίστηκε στην ανίχνευση του παραγόμενου NO κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου  $[\text{RuL}(\text{bpy})_2(\text{NO})]^{3+}$  και μάλιστα βρέθηκε ότι η ταχύτητα αποδέσμευσης του NO, στην φωτοχημική αυτή αντίδραση, μειώνεται καθώς αυξάνεται η π-δοτικότητα του υποκαταστάτη L<sup>152</sup>. Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και κατά τη μελέτη των συμπλόκων  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{PaPy}_3)]^{2+266}$  (PaPy<sub>3</sub>H = N,N'-δισ(2-πυριδυλμεθυλ)αμινο-N-αιθυλ-2-πυριδινό-2-καρβαμίδιο) και  $[\text{RuCl}(\text{salen})(\text{NO})]^{265}$  (salen = N,N'-αιθυλενοδισ(σαλικυλιδινοϊμινο)διανιόν). Όταν ένα υδατικό διάλυμα  $[\text{Ru}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})](\text{BF}_4)_2$  εκτεθεί σε λάμπα υπεριώδους, χάνει πολύ γρήγορα το NO και σχηματίζεται το φωτοπροϊόν  $[\text{Ru}(\text{PaPy}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ . Το σύμπλοκο αυτό ταυτοποιήθηκε κατά την σύγκριση του ηλεκτρονιακού του φάσματος με αυτό του συμπλόκου που προκύπτει από την αντίδραση του αντίστοιχου χλωρο-συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})](\text{BF}_4)$  με  $\text{AgClO}_4$ . Η απελευθέρωση του NO από το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})](\text{BF}_4)_2$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μεταφορά NO σε πρωτεΐνες, όπως η μυογλοβίνη και η κυτοχρωμική c οξειδάση. Ανάλογα, και το σύμπλοκο  $[\text{RuCl}(\text{salen})(\text{NO})]^{265}$  κατά την

ακτινοβόληση του μπορεί να απελευθερώσει NO και να σχηματιστούν τα επιδιαλυτώμενα αντίστοιχα σύμπλοκα ως προϊόντα της φωτόλυσης.

## 5.2. Κυτταροτοξικές ιδιότητες του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl

Στην παρούσα μελέτη έγιναν πειράματα κυτταροτοξικής δραστηριότητας του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl σε καρκινικές κυτταρικές σειρές A2780 (φυσιολογικές και ανθεκτικές στο *cisplatin*) σύμφωνα με γνωστή μέθοδο της βιβλιογραφίας <sup>257</sup>. Η ανθεκτική κυτταρική σειρά στο *cisplatin* αποτελεί ένα καλό μοντέλο για την εύρεση νέων μεταλλικών αντικαρκινικών ενώσεων <sup>237</sup>. Έτσι, τα κύτταρα εκτέθηκαν στο σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl για αρκετό χρονικό διάστημα (3 μέρες), έτσι ώστε το σύμπλοκο να καταφέρει να αλληλεπιδράσει με το DNA ή οποιοδήποτε άλλο βιολογικό στόχο στο επίπεδο αυτό. Οι IC<sub>50</sub> τιμές αναφέρονται στη συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί 50% μείωση του ποσοστού των καρκινικών κυττάρων.

Οι τιμές IC<sub>50</sub> που προσδιορίστηκαν για το σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl για τις φυσιολογικές και ανθεκτικές καρκινικές κυτταρικές σειρές A2780 είναι 0.49 μM και 0.64 μM αντίστοιχα (Πίνακας 5.3). Οι τιμές αυτές είναι πολύ καλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές άλλων πολυπυριдино-συμπλόκων του ρουθηνίου, όπως το αντικαρκινικό σύμπλοκο *mer*-[Ru(terpy)Cl<sub>3</sub>] που παρουσιάζει IC<sub>50</sub> = 11.0 και 32.5 μM για την φυσιολογική A2780 και ανθεκτική καρκινική κυτταρική σειρά A2780cisR αντίστοιχα <sup>267</sup>. Το γεγονός ότι το μελετούμενο σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα από το σύμπλοκο [Ru(terpy)Cl<sub>3</sub>] παραπέμπει στην υπόθεση της μεσολάβησης της νιτροσυλομάδας στην βελτίωση της κυτταροτοξικής δραστηριότητας του συμπλόκου ή ακόμη και σε παράγοντες όπως η διαλυτότητα ή η δομή του συμπλόκου, που μπορούν και αυτοί επίσης να επηρεάσουν τη δραστηριότητα στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές IC<sub>50</sub> για το σύμπλοκο συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl αλλά και για άλλα κυτταροτοξικά σύμπλοκα του ρουθηνίου συγκρινόμενα με το *cisplatin*.

**Πίνακας 5.3.** Οι τιμές  $IC_{50}$  του συμπλόκου  $cis-(Cl,Cl)-[RuCl_2(terpy)(NO)]Cl$  και άλλων ανάλογων συμπλόκων έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A2780 και A2780cisR.

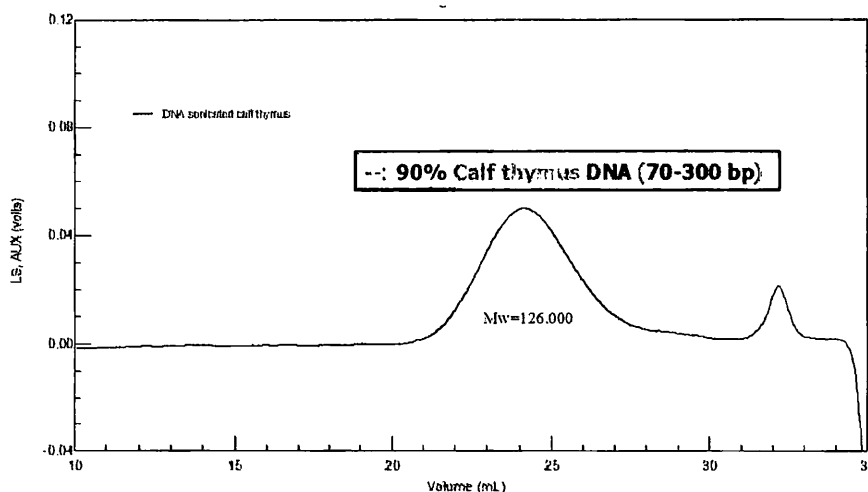
Σύμπλοκο	$IC_{50}$ σε A2780 ( $\mu M$ )	$IC_{50}$ σε A2780cisR ( $\mu M$ )
$cis-(Cl,Cl)-[RuCl_2(terpy)(NO)]Cl$	0.49	0.64
$[RuCl_3(terpy)]$	11	32.5
$\alpha-[RuCl_2(azpy)]Cl$	0.85	0.98
Cisplatin	1.45	2.6
carboplatin	9.4	42.8

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται και οι τιμές των επίσης δραστικών συμπλόκων του ρουθηνίου με τον υποκαταστάτη 2-φαινυλαζοπυριδίνη (azpy) έναντι της ίδιας καρκινικής κυτταρικής σειράς A2780<sup>267</sup>. Το σύμπλοκο  $\alpha-[RuCl_2(azpy)_2]$  που θεωρείται το πιο δραστικό παρουσίασε τιμές  $IC_{50}$  0.86 and 0.98  $\mu M$  για την A2780 and A2780cisR αντίστοιχα<sup>267</sup>. Το σύμπλοκο αυτό, παρουσιάζει αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δραστηριότητα αλλά όχι καλύτερη από το σύμπλοκο  $cis-(Cl,Cl)-[RuCl_2(NO)(terpy)]Cl$ , το οποίο παρουσιάζει σχεδόν 2 φορές υψηλότερη δραστηριότητα.

Στο ίδιο πείραμα προσδιορίστηκαν οι τιμές  $IC_{50}$  για το cisplatin και carboplatin, έτσι ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή σύγκριση με το μελετούμενο σύμπλοκο  $cis-(Cl,Cl)-[RuCl_2(NO)(terpy)]Cl$  στις ίδιες συνθήκες. Όπως φαίνεται και στον πίνακα με τις τιμές  $IC_{50}$ , το σύμπλοκο  $cis-(Cl,Cl)-[RuCl_2(NO)(terpy)]Cl$  εμφανίζει υψηλότερη δραστηριότητα και από τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου, cisplatin και carboplatin, έναντι της ίδιας κυτταρικής σειράς A2780. Στην ανθεκτική κυτταρική σειρά A2780cisR το σύμπλοκο  $cis-(Cl,Cl)-[RuCl_2(NO)(terpy)]Cl$  παρουσιάζει  $IC_{50}$  0.64  $\mu M$ , ενώ το carboplatin 42.8  $\mu M$  και το cisplatin 2.6  $\mu M$ , γεγονός που παραπέμπει στην υπόθεση ότι πιθανόν η δραστηριότητα του συμπλόκου  $cis-(Cl,Cl)-[RuCl_2(NO)(terpy)]Cl$  δεν επηρεάζεται από τους μηχανισμούς αντίστασης της κυτταρικής σειράς A2780cisR.

### 5.3. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl με DNA

Λόγω της αξιοσημείωτης κυτταροτοξικής δραστηριότητας του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη αλληλεπίδρασης του με DNA, χρησιμοποιώντας διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές τεχνικές, όπως υγρή χρωματογραφία, φασματομετρία μάζας, UV-Vis, <sup>23</sup>Na NMR, <sup>31</sup>P NMR, φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD), ηλεκτροφόρηση κ.α. Το DNA που χρησιμοποιήθηκε κατά την μελέτη αυτή ήταν πλασμιδιακό DNA pUC9 και γραμμικό DNA. Το τελευταίο απομονώθηκε από τον θυμοειδή αδένα μοσχαριού και διασπάστηκε σε μικρά τμήματα με υπέρηχους. Ο προσδιορισμός του μέσου μοριακού του βάρους έγινε με ηλεκτροφορητικές και χρωματογραφικές τεχνικές. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το χρωματογράφημα, σύμφωνα με το οποίο προσδιορίστηκε το μέσο μοριακό βάρος του DNA που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και η διακύμανση του αριθμού των ζευγών βάσεων του. Το DNA αυτό χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα υπεριώδους-ορατού, κυκλικού διχρωϊσμού, <sup>23</sup>Na, <sup>31</sup>P-NMR και καμπυλών τήξης του DNA.

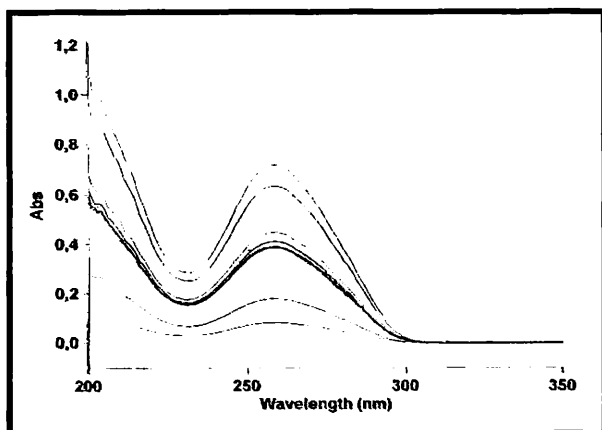


Σχήμα 5.8. Χρωματογράφημα του DNA θυμοειδή αδένου.

Το μέσο μοριακό του βάρους προσδιορίστηκε σε 126 KDalton και δεδομένης της κατανομής του, προκύπτει ότι τα κομμάτια αυτά αποτελούνται από ένα αριθμό ζευγών βάσεων που κυμαίνεται μεταξύ 70-300. Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε σε κάθε περίπτωση με τη λήψη φασμάτων υπεριώδους ορατού



(σχήμα 5.9.) στα 260 nm, υδατικών διαλυμάτων του DNA και τη χρήση των παρακάτω εξισώσεων. Επίσης, βρέθηκε βάσει των απορροφήσεων στα 260 nm και 280 nm ότι το ποσοστό των πρωτεϊνών που περιέχεται στο δείγμα είναι μικρό και εντός των επιτρεπτών ορίων.

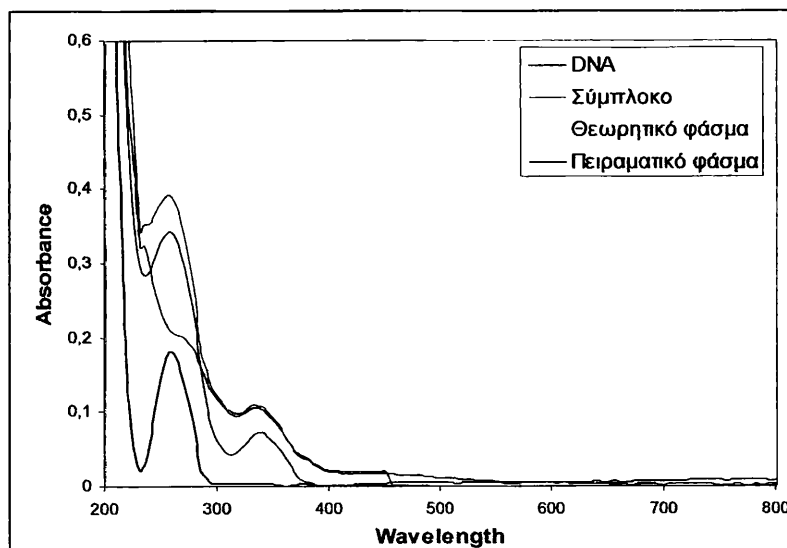


Σχήμα 5.9. Φάσμα υπεριώδους-ορατού προσδιορισμού της συγκέντρωσης του DNA.

1.  $A_{260} = \epsilon_{260} \cdot b$  [DNA]
2.  $b = 1$  cm
3.  $\epsilon_{260} = 6600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
4.  $A_{260}/A_{280} = 1.9$  όπου  $A_{260}$  η απορρόφηση στα 260 nm,  $\epsilon$  ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης και  $b$  το πάχος της κυψελίδας.

### 5.3.1. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και κυκλικού διχρωϊσμού (CD)

Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού αποτελεί μια εύχρηστη και εύκολη μέθοδο μελέτης της αλληλεπίδρασης διαφόρων συμπλόκων με DNA. Έτσι, στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl με το DNA λήφθηκαν φάσματα υπεριώδους-ορατού σε αναλογία  $r = [\text{Ru}]/[\text{DNA}] = 0.1$ . Συγκρίνοντας το πειραματικό φάσμα του συστήματος [Ru]-[DNA] με το φάσμα του συμπλόκου παρατηρείται υποχρωμία στην ταινία του συμπλόκου που αποδόθηκε σε μεταφορά φορτίου από το μέταλλο στους υποκαταστάτες, MLCT (330 nm), κατά 24 % ( $H\% = 100(A_{\text{free}} - A_{\text{bound}}) / A_{\text{free}}$ ) και μετατόπιση προς το ερυθρό κατά  $\Delta\lambda = 6$  nm. Οι παραπάνω παρατηρήσεις αποδίδονται στην δέσμευση του συμπλόκου στο DNA. Στο παρακάτω σχήμα δίνεται το φάσμα υπεριώδους-ορατού του συμπλόκου παρουσία και απουσία DNA του σε αναλογία  $r = [\text{Ru}]/[\text{DNA}] = 0.1$ .



**Σχήμα 5.10.** Φάσμα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (1) σε αναλογία  $r=[Ru]/[DNA]=0.1$  και σύγκριση με το θεωρητικό φάσμα.

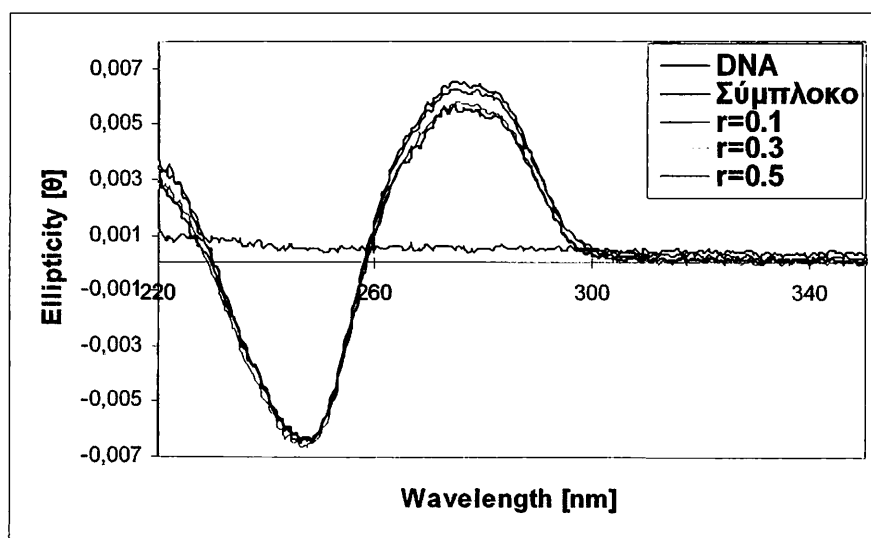
Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού σε σύγκριση με την φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού αποτελεί ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο παρέχοντας σημαντικότερες πληροφορίες για τη αλληλεπίδραση συμπλόκων με το DNA. Ένα τυπικό φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού B-DNA παρουσιάζει μια θετική ταινία στα 278 nm (UV:  $\lambda_{\max}$  260 nm) που αποδίδεται στη συσσώρευση των βάσεων και μια αρνητική ταινία στα 245 nm που αποδίδεται στην περιέλιξη της έλικας του B-DNA.

Στο σχήμα 5.11. παρουσιάζονται τα φάσματα CD του B-DNA, του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl και τα φάσματα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση τους με αναλογίες  $r = [Ru]/[DNA] = 0.1, 0.3$  και  $0.5$ . Το σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl δεν είναι οπτικά ενεργό και έτσι δεν παρατηρείται διαφορά στο φάσμα CD που καταγράφεται σαν μια ευθεία γραμμή. Σε αναλογία  $r = 0.1$  το σύμπλοκο δεν προκαλεί πολύ μεγάλες μεταβολές στις χαρακτηριστικές ταινίες του B-DNA στα 278 και 245 nm. Όσο αυξάνεται όμως η αναλογία μεταξύ του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl και του DNA οι μεταβολές που παρατηρούνται γίνονται εντονότερες. Συγκεκριμένα σε αναλογία  $r = 0.5$  η ταινία στα 278 nm αλλάζει σημαντικά και συγκεκριμένα μειώνεται, εξαιτίας της αποσυσσώρευσης των βάσεων που προκαλείται κατά την ένταξη του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl στις βάσεις του DNA. Κατά την ένταξη του συμπλόκου (1) στις βάσεις του DNA μεταβάλλεται η γεωμετρία του βιολογικού μορίου και συγκεκριμένα προκαλείται ξετύλιγμα της διπλής έλικας. Καθώς το κατιονικό σύμπλοκο (1) βρίσκεται κοντά πλέον στις βάσεις διακόπτει τους δεσμούς υδρογόνου που υπάρχουν μεταξύ τους και έτσι προκαλείται ξετύλιγμα της διπλής έλικας, γεγονός

που δικαιολογεί και τις μικρές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην ένταση της ταινίας στα 245 nm. Η ταινία στα 245 nm δεν παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές καθώς αυξάνεται η αναλογία συμπλόκου-DNA, γεγονός που δείχνει ότι το DNA παραμένει Β-τύπου.

Οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων NAMI, ( $\text{Na}[\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]$ , Im = ιμιδαζόλιο) και RAP [διγλωρο(1,2-προπυλενοδιαμινο-τετραοξικό)ρουθίνιο (III)] με Β-DNA μελετήθηκαν από τους Gallori και τους συνεργάτες του χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού<sup>268</sup>. Τα σύμπλοκα αυτά έχουν ενταγμένα χλώρια, τα οποία μετά την υδρόλυσή τους, δίνουν τη δυνατότητα αντίδρασης του συμπλόκου με απευθείας δεσμό με βιολογικά μόρια, όπως το DNA. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα φάσματα CD ειδικά στην ταινία στα 278 nm λόγω της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων NAMI και RAP ήταν ανάλογες με αυτές του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl, γεγονός που υποδεικνύει τον παρόμοιο τρόπο αλληλεπίδρασης των συμπλόκων αυτών με το DNA.

Στο παρακάτω σχήμα δίνονται τα διαδοχικά φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού κατά την προσθήκη του μελετούμενου συμπλόκου στο Β-DNA σε διάφορες αναλογίες.



Σχήμα 5.11. Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(terpy)(NO)]Cl.

Η αλληλεπίδραση του *cisplatin* με το DNA μελετήθηκε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού από τον Brabec και τους συνεργάτες του<sup>269</sup>. Κατά την προσθήκη του *cisplatin* στο DNA σε αναλογία  $r = 0.1$  παρατηρήθηκε μια αύξηση στην θετική ταινία στα 278 nm, ενώ καθώς αυξάνεται ο λόγος  $r$  παρατηρείται μείωση

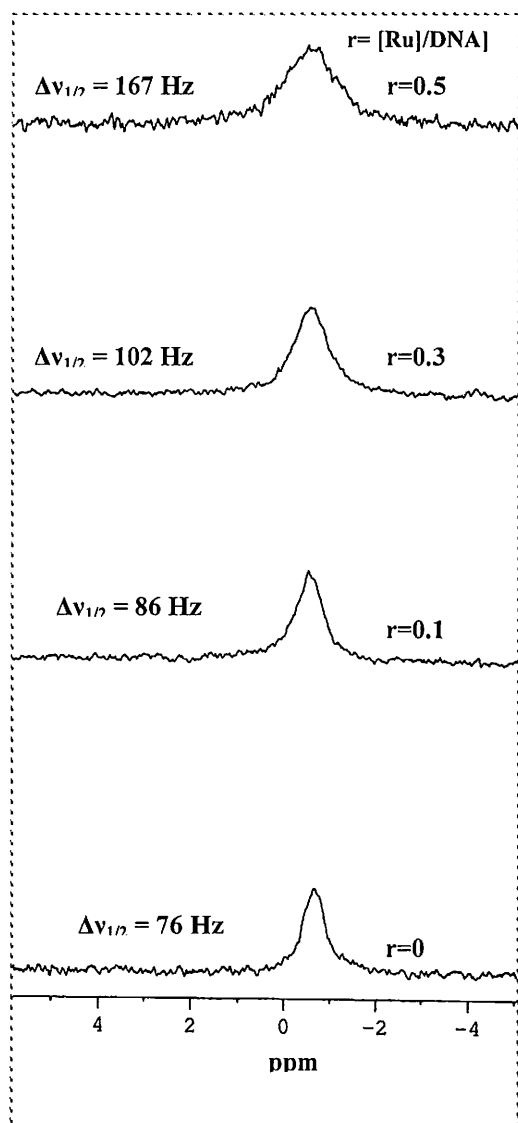
της ταινίας αυτής που αποδίδεται στην αύξηση της συσσώρευσης των βάσεων. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl αλληλεπιδρά με διαφορετικό τρόπο με το DNA από το *cisplatin* αφού προκαλεί μια συνεχόμενη μείωση της ταινίας στα 278 nm.

### 5.3.2. Φασματοσκοπία <sup>23</sup>Na και <sup>31</sup>P NMR

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική τεχνική για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων συμπλόκων με μικρά κομμάτια DNA (70-300 ζεύγη βάσεων), τα οποία μπορούν να προκύψουν με υπέρηχους (sonicated DNA) ή με τη χρήση νουκλεολυτικών ενζύμων <sup>270</sup>. Οι χημικές μετατοπίσεις του πυρήνα <sup>31</sup>P των φωσφορικών ομάδων του DNA, παρουσιάζουν μια σχετική ευαισθησία στις αλληλεπιδράσεις με κατιόντα ή θετικά φορτισμένα σύμπλοκα των ομάδων αυτών, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο αλληλεπίδρασης αλλά και με αλλαγές στη γεωμετρία που υφίσταται το DNA <sup>271,272,273</sup>. Στην παρούσα εργασία, η φασματοσκοπία <sup>31</sup>P-NMR χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl με DNA Β-τύπου.

Αρχικά λήφθηκε το φάσμα <sup>31</sup>P NMR του DNA (70-300ζεύγη βάσεων), που προέκυψε με κόψιμο μεγάλων τμημάτων CT-DNA με υπέρηχους, σε σταθερή θερμοκρασία 37 °C και σε ρυθμιστικό διάλυμα pH = 7.0 (PIPES), διατηρώντας την ιονική ισχύ σταθερή, αφού όπως είναι γνωστό η ιονική ισχύς επηρεάζει την χημική μετατόπιση του πυρήνα <sup>31</sup>P. Η αναλογία μεταξύ του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl/DNA στα πειράματα <sup>31</sup>P NMR ήταν *r* = 0.1, 0.3 και 0.5. Στο παρακάτω σχήμα δίνονται τα φάσματα <sup>31</sup>P NMR της αλληλεπίδρασης του *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl με το DNA.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.12. το σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(terpy)(NO)]Cl δεν προκαλεί πολύ σημαντικές μεταβολές στην χημική μετατόπιση του πυρήνα <sup>31</sup>P στο DNA. Κατά τη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε μια μικρή μετατόπιση κατά 0.1 ppm, στα όρια του πειραματικού σφάλματος και μια αρκετά σημαντική διαπλάτυνση της κορυφής του DNA, η οποία στο μισό του ύψους, απουσία του συμπλόκου, παρουσιάζει  $\Delta\nu_{1/2} = 76$  Hz.



Σχήμα 5.12. Φάσμα  $^{31}\text{P}$  NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου *cis*-(Cl, Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(terpy)(NO)]Cl σε διάφορες αναλογίες  $r$ .

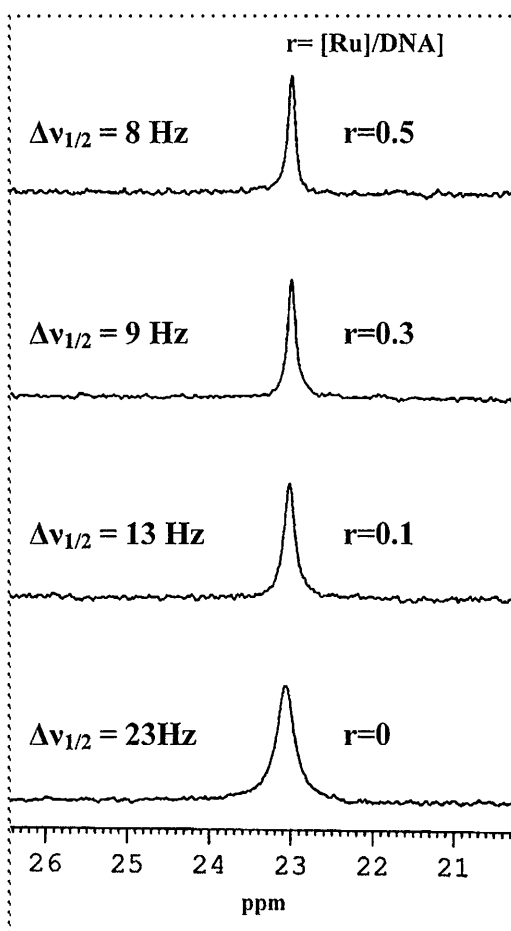
Κατά τη προσθήκη του συμπλόκου σε αναλογία  $r = 0.1$  στο σύμπλοκο προκαλείται μια διαπλάτυνση της ταινίας του DNA κατά  $\Delta\nu_{1/2} = 10 \text{ Hz}$ , ενώ για αναλογία  $r = 0.5$  το εύρος στο μισό του ύψους αυξάνεται κατά  $\Delta\nu_{1/2} = 91 \text{ Hz}$  σε σύγκριση με το  $\Delta\nu_{1/2}$  του DNA απουσία του συμπλόκου (Σχήμα 5.12.). Η διαπλάτυνση αυτή, μπορεί να οφείλεται στην διασπορά των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων  $^{31}\text{P}$  εξαιτίας της ανισοδυναμίας στο χημικό τους περιβάλλον λόγω της ένταξης του συμπλόκου (1) σε κάποιες από τις βάσεις του DNA.

Είναι λογικό, κατά την ένταξη του συμπλόκου σε κάποιες από τις βάσεις της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας να επηρεάζεται και το περιβάλλον των πυρήνων φωσφόρων στους κοντινούς φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Έτσι, εντείνεται η αρχική χημική ανισοδυναμία των πυρήνων του  $^{31}\text{P}$  (ανισοδυναμία που προκύπτει από τις διαφορετικές βάσεις που βρίσκονται και αντανακλά το αρχικό  $\Delta\nu_{1/2}$  των 76 Hz). Έτσι, τα διαφορετικά αυτά σήματα λόγω της ενδιάμεσης (intermediate) κινητικής (σε θερμοκρασία δωματίου) της ισορροπίας μεταξύ των διαφόρων πυρήνων του  $^{31}\text{P}$ , κατά τον χρόνο που διαρκεί η συλλογή δεδομένων του φάσματος, δεν εμφανίζονται ως πολλές διακριτές ταινίες αλλά ως μια περισσότερο διαπλατυσμένη κορυφή.

Πιο γρήγορες είναι οι κινητικές σε σύμπλοκα Pt και Sn. Έτσι, η ένταξη του *cis*-platin στο DNA έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση της κορυφής στο φάσμα  $^{31}\text{P}$ -

NMR σε υψηλότερα ppm και όχι την διαπλάτυνσή της <sup>273</sup>. Κατά την μελέτη της αλληλεπίδρασης της ένωσης Et<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub> με τα νουκλεοτίδια 5'-CMP και 5'-UMP, σε όξινο περιβάλλον παρατηρήθηκε μια ανάλογη μεταβολή της χημικής μετατόπισης της κορυφής του πυρήνα <sup>31</sup>P κατά 2 με 3 ppm <sup>274,275</sup>.

Εκτός από τη φασματοσκοπία <sup>31</sup>P-NMR, για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl με το B-DNA χρησιμοποιήθηκε και η φασματοσκοπία <sup>23</sup>Na NMR. Με την φασματοσκοπία <sup>23</sup>Na NMR είναι δυνατό να διαπιστωθεί αντικατάσταση σε τοπικό επίπεδο των ιόντων Na<sup>+</sup> από το κατιονικό σύμπλοκο [RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]<sup>+</sup> και να μελετηθεί η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ του συμπλόκου και του DNA. Οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα αυτά ήταν ανάλογες με αυτές των πειραμάτων <sup>31</sup>P-NMR. Το εύρος στο μισό του ύψους της κορυφής <sup>23</sup>Na για το μη συμπλοκοποιημένο DNA προσδιορίστηκε σε Δν<sub>1/2</sub> = 23 Hz (Σχήμα 5.13.), ενώ κατά την προσθήκη του συμπλόκου παρατηρήθηκε μια μείωση στο Δν<sub>1/2</sub>.



Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.13., όταν η αναλογία είναι  $r = 0.1$  το εύρος προσδιορίστηκε Δν<sub>1/2</sub> = 13 Hz, ενώ κατά την αύξηση της αναλογίας σε  $r = 0.5$  το εύρος στο μισό της κορυφής μειώνεται αρκετά και γίνεται Δν<sub>1/2</sub> = 8 Hz. Το γεγονός αυτό, δείχνει τη μεταβολή των ιόντων Na<sup>+</sup> που αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του DNA.

Σχήμα 5.13. Φάσμα <sup>23</sup>Na-NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(terpy)(NO)]Cl σε διάφορες αναλογίες  $r$ .

Το θετικά φορτισμένο σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl, που εντάσσεται στις βάσεις του DNA, προκαλεί μια μη αντιστρεπτή διαφοροποίηση στο

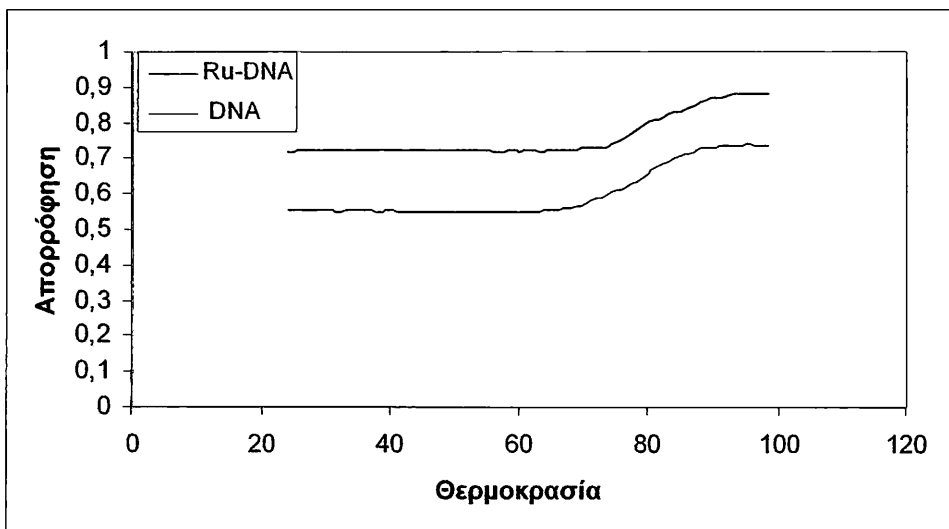
συνολικό φορτίο του πολυανιονικού βιολογικού μορίου, αντικαθιστώντας ιόντα  $\text{Na}^+$  που αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες.

Το φαινόμενο αυτό είναι υπεύθυνο για την ελάττωση του πλάτους στο μισό του ύψους  $\Delta\nu_{1/2}$  της κορυφής του πυρήνα  $^{23}\text{Na}$ , καθώς αυξάνεται η αναλογία συμπλόκου-DNA δείχνοντας και μια σημαντική ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA. Παρόμοιες μεταβολές σε πειράματα  $^{23}\text{Na}$ -NMR έχουν παρατηρηθεί και κατά τη μελέτη της αλληλεπίδρασης συμπλόκων του λευκοχρύσου, όπως τα *cis*-DDP και *trans*-DDP, με το DNA <sup>276</sup>. Η ελάττωση του πλάτους της κορυφής  $^{23}\text{Na}$  είναι χαρακτηριστική σε όλες τις περιπτώσεις ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης συμπλόκων με το DNA.

### 5.3.3. Καμπύλη τήξης του DNA

Διάφορες ενώσεις είναι δυνατό να προκαλέσουν αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας του DNA κατά την αλληλεπίδραση τους και ειδικότερα να μεταβάλουν το σημείο τήξεως του (θερμοκρασία στην οποία καταστρέφονται οι δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι συγκρατούν τη διπλή έλικα). Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα τήξης με σκοπό τον προσδιορισμό της μεταβολής της θερμοκρασίας τήξης του DNA που προκαλεί το σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl κατά την αλληλεπίδρασή του με αυτό. Η θερμοκρασία τήξης του DNA προσδιορίστηκε σε δείγματα απουσία και παρουσία του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl σε αναλογία  $r = 0.1$ . Η θερμοκρασία τήξης του DNA απουσία του συμπλόκου βρέθηκε 78 °C, ενώ κατά την προσθήκη του σε αναλογία  $r = 0.1$  η θερμοκρασία τήξης  $\Delta T_m$  ( $T_m(\text{Ru}) - T_m$ ) μειώθηκε κατά 3 °C. Η μείωση αυτή οφείλεται στην ένταξη του συμπλόκου του ρουθηνίου στις βάσεις του DNA, που προκαλεί αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας <sup>272</sup>. Η τιμή  $\Delta T_m$  που παρατηρήθηκε είναι σχετικά μικρή, αποκλείοντας έτσι την περίπτωση αλληλεπίδρασης μέσω παρεμβολής του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Οι αλληλεπιδράσεις παρεμβολής έχουν συνήθως ως αποτέλεσμα πολύ μεγαλύτερες τιμές  $\Delta T_m$  που κυμαίνονται από 10 έως 14°C για απλά οργανικά μόρια και κατά πολύ μεγαλύτερες, όπως η περίπτωση των 37 °C για το σύμπλοκο [Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppz)]<sub>2</sub> <sup>50</sup>. Αντίθετα, σύμπλοκα όπως το [RuCl(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>]<sup>2+</sup>, το οποίο εντάσσεται με απευθείας δεσμό στις βάσεις του DNA προκαλεί μια μείωση στο σημείο τήξης του κατά 2 °C <sup>277</sup>. Ένα άλλο παράδειγμα συμπλόκου του ρουθηνίου

που βρίσκεται στα όρια μεταξύ της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με το DNA και της παρεμβολής στις βάσεις του είναι το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{dppz})]^{2+}$  που παρουσιάζει μια τιμή  $\Delta T_m = -5.2 \text{ }^\circ\text{C}$ <sup>278</sup>. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι καμπύλες τήξης του DNA απουσία και παρουσία του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$ .



Σχήμα 5.14. Καμπύλες τήξης του DNA απουσία και παρουσία του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$ .

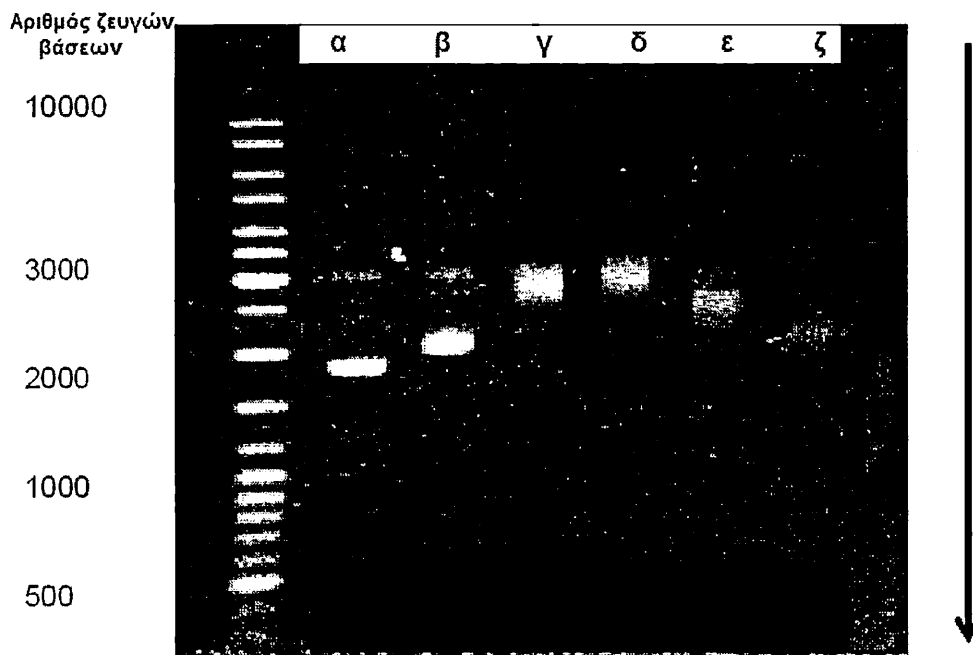
#### 5.3.4. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης

Η κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA, λόγω αλληλεπίδρασης με διάφορα σύμπλοκα, μπορεί να μεταβληθεί με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα σύμπλοκα του λευκοχρύσου προκαλούν αλλαγές στην κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA κατά την αλληλεπίδραση τους και ένταξη τους σε αυτό<sup>279,280</sup>. Συγκεκριμένα, το *cisplatin* καθώς εντάσσεται στο DNA προκαλεί μια μείωση στην κινητικότητα της κλειστής δομής του πλασμιδίου, που παρατηρείται κατά τα πειράματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Οι μεταβολές αυτές στην κινητικότητα που προκαλούνται από τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου εμφανίζονται λόγω του απευθείας δεσμού μετάλλου-DNA και οδηγούν τελικά σε ξεδίπλωμα της κλειστής κυκλικής δομής του πλασμιδιακού DNA<sup>279,280</sup>.

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$  με πλασμιδιακό DNA pUC9 για την πιστοποίηση



του τρόπου αλληλεπίδρασης του. Στο σχήμα 5.15. φαίνεται η πηκτική αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε και οι διάφορες ταινίες του pUC9 DNA απουσία και παρουσία του συμπλόκου. Οι αναλογίες *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl/pUC9-DNA που χρησιμοποιήθηκαν κατά το πείραμα αυτό ήταν 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 και 1.



Σχήμα 5.15. Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA (α) pUC9 και με τη προσθήκη του *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(terpy)(NO)]Cl σε αναλογία (β)  $r = 0.1$ , (γ)  $r = 0.3$ , (δ)  $r = 0.5$ , (ε)  $r = 0.7$ , (ζ)  $r = 1$  ( $r = [Ru]/[DNA]$ ).

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, στο πείραμα της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε πρότυπο DNA με ζεύγη βάσεων που κυμαίνονται από 100 έως 10000 από κάτω προς τα πάνω. Το πλασμιδιακό DNA pUC9 (λωρίδα α) εμφανίζεται ως μια έντονη ταινία που αντιστοιχεί στην κλειστή κυκλική πλασμιδιακή μορφή<sup>281</sup>. Η προσθήκη του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της κινητικότητας της ταινίας του pUC9 για τις αναλογίες 0.1, 0.3 και 0.5, ενώ σε αναλογία 0.7 εμφανίζεται μια μικρή αύξηση στην κινητικότητα της ταινίας αυτής. Η ταινία του πλασμιδιακού DNA στην αναλογία  $r = 0.1$  (λωρίδα β) γίνεται πιο έντονη και μεγάλη εξαιτίας του ξεδιπλώματος των ελίκων του DNA, καθώς το σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl αρχίζει να εντάσσεται στις βάσεις και αυξάνεται το μοριακό βάρος του, ενώ ταυτόχρονα η κινητικότητα της ταινίας μειώνεται. Το φαινόμενο αυτό είναι ακόμα πιο έντονο όταν η αναλογία συμπλόκου-pUC9 αυξάνεται σε 0.3 (λωρίδα γ). Στις επόμενες λωρίδες (δ, ε) οι ταινίες αρχίζουν

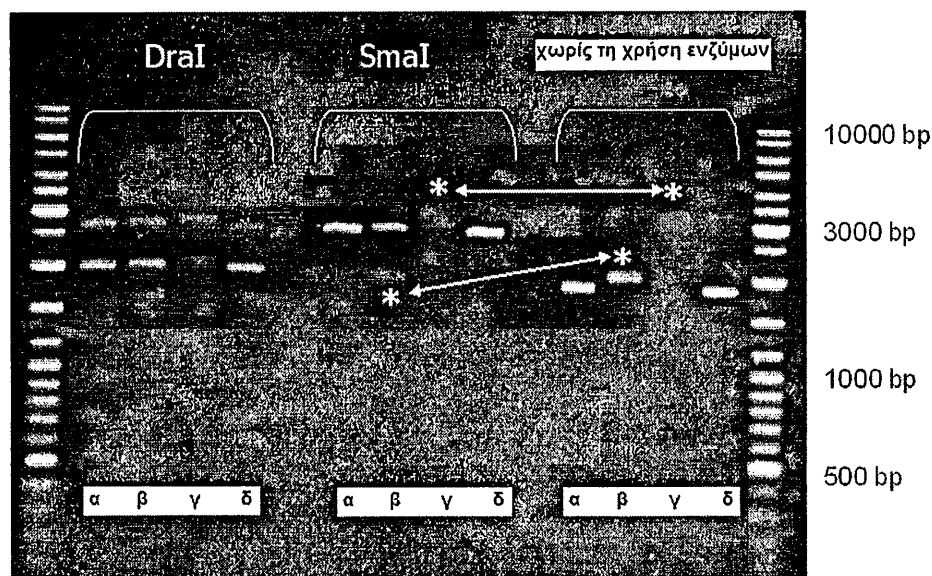
να διαχέονται, καθώς η συγκέντρωση του συμπλόκου αυξάνεται και το πλασμιδιακό DNA αρχίζει να χάνει τη δίκλωνη μορφή του και αρχίζει να είναι μονόκλωνο. Σε αναλογία  $r = 1$  είναι πιθανό το πλασμιδιακό DNA να παραμένει κυκλικό αλλά τα νουκλεοτίδια των δυο κλώνων να μην είναι ζευγαρωμένα πια. Στο πείραμα αυτό δεν παρατηρήθηκαν ταινίες που αντιστοιχούν στην χαλαρωμένη ή γραμμική μορφή του DNA.

Βλέπουμε λοιπόν, ότι η ένταξη του συμπλόκου στις βάσεις του πλασμιδιακού DNA pUC9 προκαλεί μεταβολή στην ηλεκτροφορητική του κινητικότητα που συνεπάγεται αλλαγές στη διαμόρφωση και γεωμετρία του. Κατά την αλληλεπίδραση των συμπλόκων NAM1 και RAP με πλασμιδιακό DNA pHV14 DNA<sup>268</sup> σε αναλογία  $r=0.05$  και  $r=0.025$  δεν παρατηρήθηκαν πολύ μεγάλες μεταβολές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των αντίστοιχων ταινιών. Ιδιαίτερη μείωση στην κινητικότητα των ταινιών του παρατηρήθηκε στην περίπτωση της αλληλεπίδραση του *cisplatin* με το πλασμιδιακό DNA καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου. Συγκεκριμένα, η ένταξη του συμπλόκου σε πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της κινητικότητας της κλειστής μορφής και μια αύξηση στην κινητικότητα της ανοικτής μορφής. Έχει επίσης παρατηρηθεί και η ύπαρξη μικρών κλασμάτων DNA<sup>279</sup>. Γενικότερα, αλλαγές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA υποδεικνύει τον απευθείας δεσμό του μετάλλου με τις βάσεις του βιολογικού μορίου.

### 5.3.5. Χρήση των περιοριστικών ενζύμων *DraI* και *SmaI*

Η δράση διαφόρων περιοριστικών ενζύμων σε δείγματα πλασμιδιακού DNA προσδιορίζεται μέσω της πιστοποίησης των κλασμάτων που προκύπτουν από την ενζυμική υδρόλυση του DNA. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δυο περιοριστικά ένζυμα με σκοπό τον προσδιορισμό της εκλεκτικότητας της δέσμευσης του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl στις βάσεις του pUC9. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε για τις αναλογίες συμπλόκου pUC9 0.1 και 0.3 και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά της υδρόλυσης pUC9 απουσία του συμπλόκου αλλά και με δείγματα χωρίς τη χρήση των δυο ενζύμων. Τα δυο περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα *DraI* και *SmaI*. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα σε δείγματα του DNA με το σύμπλοκο παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της περιοριστικής δράσης του ενζύμου *SmaI*, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία των

βάσεων –CCCGGG–. Στο πείραμα της ηλεκτροφόρησης παρατηρήθηκε μια ασθενής ταινία στην ίδια θέση που υπάρχει και για το δείγμα του πλασμιδιακού DNA χωρίς όμως τη χρήση του ενζύμου *SmaI* (συμβολίζεται ως \* στο σχήμα 5.16.).

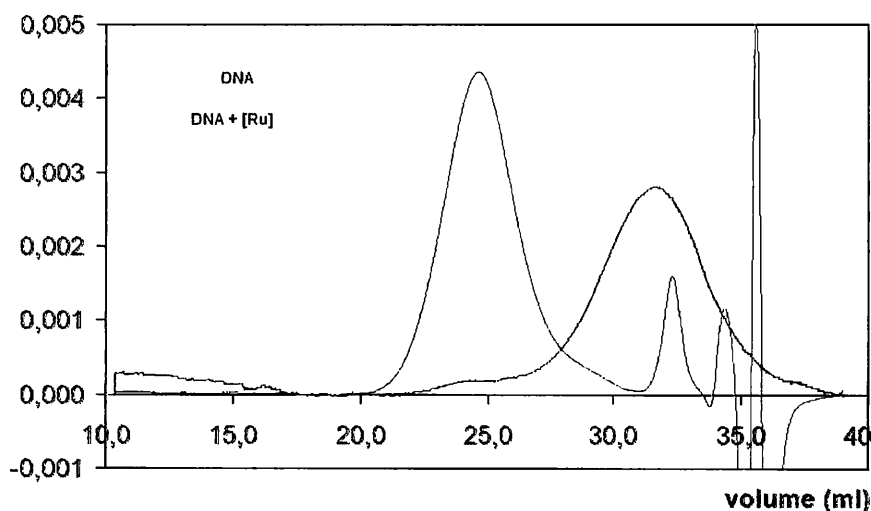


Σχήμα 5.16. Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA κατά την υδρόλυση του με τα ένζυμα *DraI* and *SmaI*. (α) DNA (β)  $r = 0.1$ , (γ)  $r = 0.3$ , (δ) φρέσκο διάλυμα DNA ( $r = [Ru]/[\zeta\epsilon\upsilon\gamma\omicron\varsigma\ \beta\acute{\alpha}\sigma\eta\varsigma]$ ). Οι αστερίσκοι αναφέρονται στις ασθενείς ταινίες που δεν αναγνωρίστηκαν από το ένζυμο.

Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι το σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl δείχνει κάποια προτίμηση στις βάσεις γουανίνη και κυτοσίνη. Έτσι, το ένζυμο *SmaI* δεν μπορεί πλέον να αναγνωρίσει την συγκεκριμένη αλληλουχία και να προκαλέσει κόψιμο στο πλασμιδιακό DNA εξαιτίας της ένταξης του συμπλόκου στις βάσεις αυτές. Στην αναλογία  $r = 0.1$  οι ταινίες αυτές είναι πιο διακριτές από ότι στην αναλογία  $r = 0.3$ . Κατά τη χρήση του ενζύμου *DraI*, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία –TTTAA–, δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμπόδιση στη δράση του στα δείγματα του pUC9 με το σύμπλοκο. Το ένζυμο προκάλεσε το κόψιμο του πλασμιδιακού DNA στη συγκεκριμένη αλληλουχία, που είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των κλασμάτων 2665bp, 1954bp, 692bp και 19bp. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl κατά τη συμπλοκοποίηση του με το πλασμιδιακό DNA pUC9 παρουσιάζει κάποια προτίμηση στις βάσεις γουανίνη και κυτοσίνη παρά στις αδενίνη και θυμίνη.

### 5.3.6. Υγρή Χρωματογραφία (Size exclusion Chromatography)

Το προϊόν της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl με μικρά τμήματα CT-DNA που προέκυψε με τη χρήση υπερήχων, μελετήθηκε και με χρωματογραφικές μεθόδους με ανιχνευτές προσδιορισμού μοριακού βάρους με σκέδαση φωτός. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το μέσο μοριακό βάρος και η διασπορά των μικρών τμημάτων DNA που χρησιμοποιήθηκαν στα προηγούμενα πειράματα προσδιορίστηκε με την εν λόγω μέθοδο σε 126 KD αποτελούμενο από 70-300 ζεύγη βάσεων. Έτσι, με την ίδια τεχνική έγινε και η ανάλυση του δείγματος DNA/*cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl σε αναλογία  $r=0.25$  και προσδιορίστηκε και στην περίπτωση αυτή το μοριακό βάρος του συστήματος. Όπως αναμένεται, η ένταξη του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl στις βάσεις του νουκλεϊκού οξέος έχει ως αποτέλεσμα τη αύξηση του μοριακού του βάρους κατά το άθροισμα των μοριακών βαρών του αριθμού των συμπλόκων που εντάσσονται.



Σχήμα 5.17.  
Χρωματογράφη  
μα του DNA και  
του συστήματος  
DNA-[Ru].

Το μοριακό βάρος που προέκυψε κατά την έκλυση του συστήματος DNA-*cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl προσδιορίστηκε σε 1650 KD κατά πολύ μεγαλύτερο του μοριακού βάρους για την περίπτωση που εντασσόταν ολόκληρος ο αριθμός των συμπλόκων στην αναφερόμενη αναλογία ζευγών βάσεων-DNA. Το γεγονός αυτό παραπέμπει στην υπόθεση ότι σχηματίζονται συσσωματώματα, δηλαδή διασταυρούμενοι δεσμοί μεταξύ του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl και των βάσεων του DNA συγκεντρώνοντας περισσότερες της μια έλικας σε ένα

συσσωμάτωμα. Έτσι ενισχύεται η άποψη για διδοντικό τρόπο ένταξης του συμπλόκου μετά την υδρόλυση των δύο χλωρίων με γειτονικά μόρια DNA.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>

---

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

[Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> **(2)** ΚΑΙ

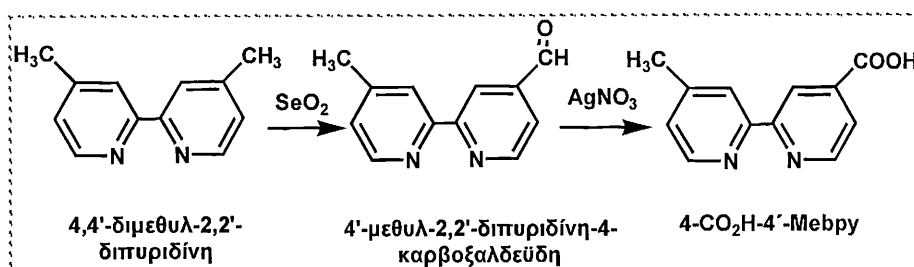
[Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) **(3)**

---

6.1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$  (2) και  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)_3$  (3)

6.1.1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy σύμφωνα με τις εξής αντιδράσεις με μικρή τροποποίηση των μεθόδων της βιβλιογραφίας<sup>245</sup>:



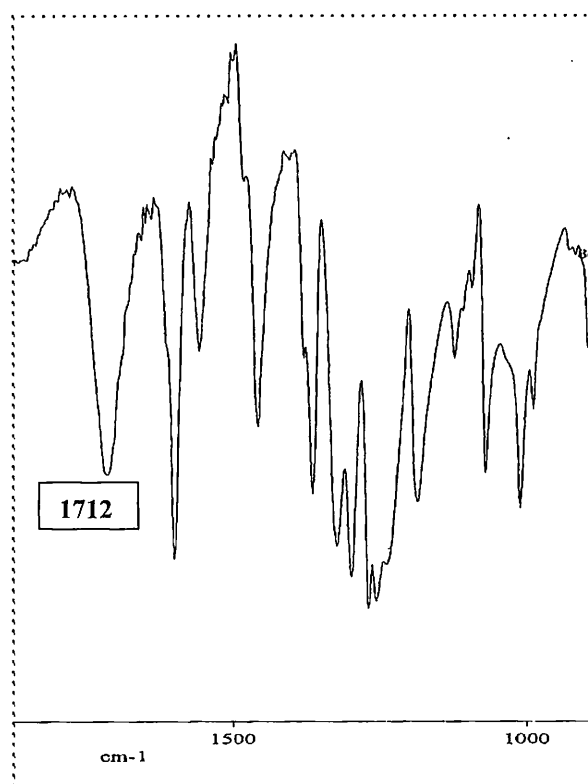
Σχήμα 6.1. Αντίδραση σύνθεσης του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα αρχικά πραγματοποιείται η εκλεκτική οξείδωση της μιας μεθυλομάδας σε αλδεϋδομάδα με SeO<sub>2</sub> και στην συνέχεια σε καρβοξυλομάδα με AgNO<sub>3</sub>. Τα προϊόντα των δυο αυτών σταδίων ταυτοποιήθηκαν πλήρως με διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές μεθόδους. Με την φασματοσκοπία υπερύθρου ταυτοποιήθηκε η οξείδωση της 4,4'-διμεθυλ-2,2'-διπυριδίνης αρχικά σε 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυαλδεΐδη και μετά σε 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυλικό οξύ, αφού παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες δόνησης τάσης των δεσμών CH=O και C=O στα 1702 και 1712 cm<sup>-1</sup> αντίστοιχα. Στον Πίνακα 6.1. που ακολουθεί παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές ταινίες των 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυαλδεΐδη και 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυλικό οξύ.

Πίνακας 6.1. Χαρακτηριστικές ταινίες IR των προϊόντων της σύνθεσης του 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy.

Ένωση	CH=O	C=O	C=C	C=N
4-CHO-4'-Mebpy	1702		1605	1596
4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy		1712	1602	1560

Στο σχήμα 6.2. φαίνεται τμήμα του φάσματος υπερέθρου του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy με την χαρακτηριστική ταινία δόνησης τάσης του δεσμού C=O.



Σχήμα 6.2. Φάσμα υπερέθρου του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy.

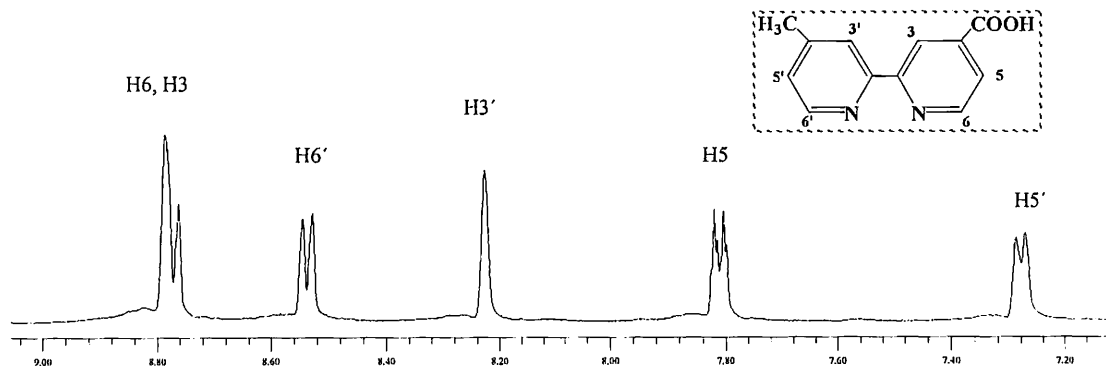
Τα παραπάνω προϊόντα ταυτοποιήθηκαν και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού <sup>1</sup>H-NMR. Στον παρακάτω Πίνακα παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων που παρατηρούνται στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR των ενώσεων, που προκύπτουν κατά τη σύνθεση του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy.

Πίνακας 6.2. Χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων κατά τη σύνθεση του 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy.

Ένωση	Πρωτόνια							
	CH <sub>3</sub>	CHO	H3	H3'	H5	H5'	H6	H6'
4,4'-Me <sub>2</sub> bpy (dmsο-d <sub>6</sub> )	2.43(s)		8.54(s)		7.14(d)		8.24(d)	
4-CHO-4'- Mebpy (CDCl <sub>3</sub> )	2.47(s)	10.19 (s)	8.83	8.28(s)	7.72	7.20(d)	8.90	8.58(d)
4-CO <sub>2</sub> H-4'- Mebpy (dmsο-d <sub>6</sub> )	2.39(s)		8.75	8.22(s)	7.81	7.28(d)	8.78	8.54(d)



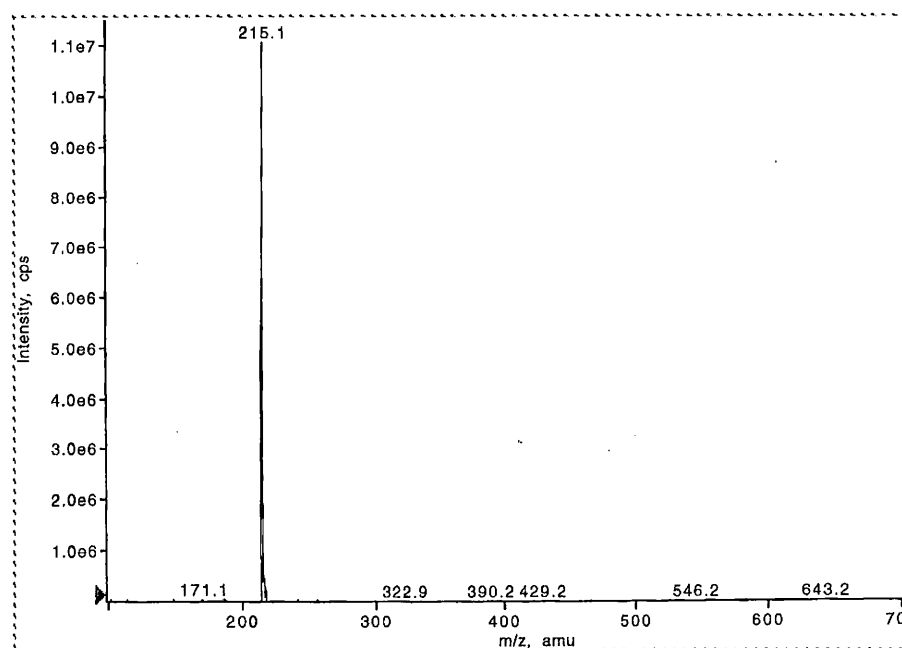
Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται μέρος του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  του καρβοξυ-υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebrpy καθώς και η αρίθμηση των πρωτονίων των δυο πυριδινικών δακτυλίων.



Σχήμα 6.3. Τμήμα του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebrpy.

Διαπιστώθηκε η εκλεκτική οξείδωση της μιας μόνο μεθυλομάδας καθώς τα πρωτόνια των δύο πυριδινικών δακτυλίων της διπυριδίνης δεν εμφανίζονται ισοδύναμα αφού το χημικό τους περιβάλλον δεν είναι πλέον το ίδιο. Επίσης, εμφανίζεται μια ταινία συντονισμού της μεθυλομάδας στα 2.39 ppm μετατοπισμένη κατά 0.04 ppm σε σύγκριση με τον υποκαταστάτη 4,4'-διμεθυλ-2,2'-διπυριδίνη.

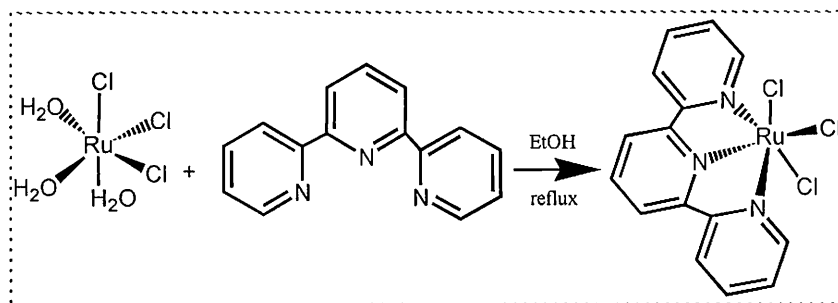
Η τελική ένωση 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυλικό οξύ ταυτοποιήθηκε, επίσης, με φασματομετρία ESI-MS. Έτσι, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα, το φάσμα ESI-MS εμφανίζει μια κορυφή σε  $m/z = 215$ .



Σχήμα 6.4. Φάσμα ESI-MS του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebrpy

6.1.2. Σύνθεση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Me bpy)Cl](PF_6)$ ,  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Me bpy)NO](PF_6)_3$  και  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Me bpy)NO_2](PF_6)$

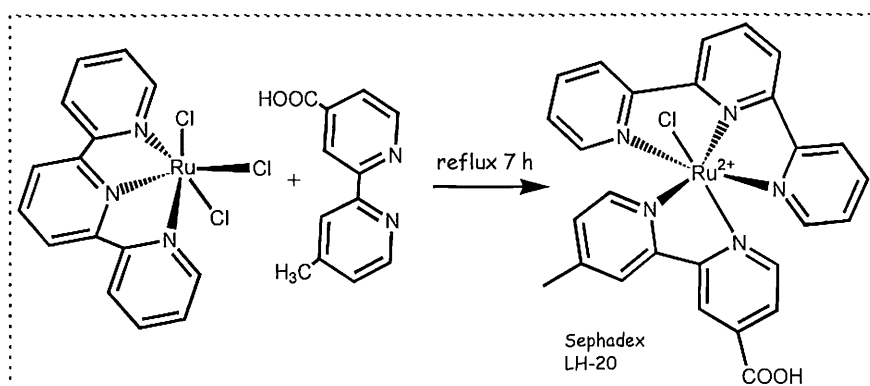
Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του συμπλόκου  $[Ru(terpy)Cl_3]$  σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Σχήμα 6.5. Αντίδραση σύνθεσης του συμπλόκου  $[Ru(terpy)Cl_3]$

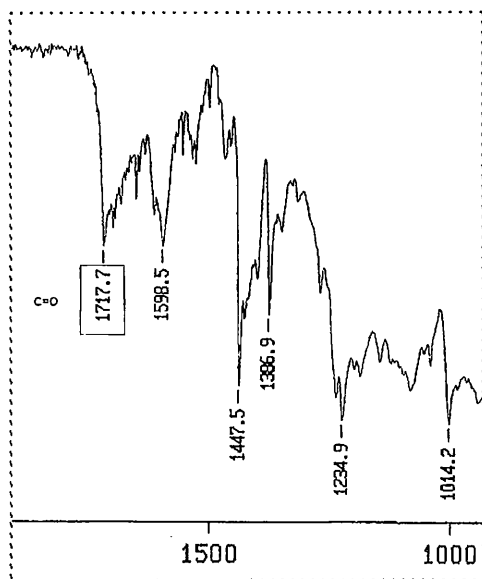
Η σύνθεση του συμπλόκου αυτού είναι απλή και πραγματοποιήθηκε με βάση τις μεθόδους της βιβλιογραφίας<sup>282</sup>. Το προϊόν απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για το επόμενο στάδιο μετά από ανακρυστάλλωση.

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται η αντίδραση μεταξύ του συμπλόκου  $[Ru(terpy)Cl_3]$  και του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Me bpy<sup>283</sup>. Το προϊόν της αντίδρασης καταβυθίζεται ως εξαφθοροφωσφορικό άλας  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Me bpy)Cl](PF_6)$  και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης Sephadex LH20. Στο παρακάτω σχήμα δίνεται η αντίδραση σχηματισμού του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Me bpy)Cl](PF_6)$ .



Σχήμα 6.6. Αντίδραση σύνθεσης του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Me bpy)Cl](PF_6)$ .

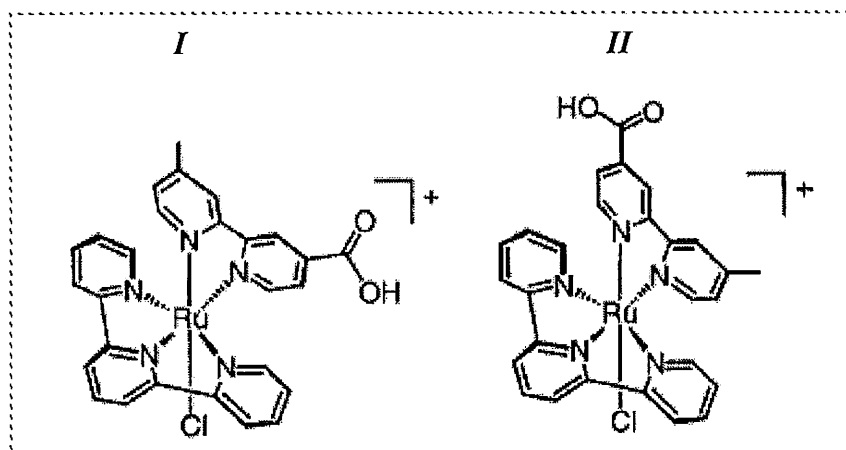
Από το φάσμα υπερόθρου του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebrpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  φαίνεται η ένταξη του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebrpy αφού παρατηρείται μια ταινία στα 1717 cm<sup>-1</sup>, που αντιστοιχεί δόνηση τάσης του δεσμού C=O, όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.7.



Σχήμα 6.7. Φάσμα υπερόθρου του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebrpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ .

Η καρβοξυλομάδα παραμένει πρωτονιωμένη κατά τη συμπλοκοποίηση και δεν συμμετέχει στην ένταξη του υποκαταστάτη στο ρουθίνιο. Μια μικρή διαφορά κατά 7 cm<sup>-1</sup> που παρατηρείται κατά την συμπλοκοποίηση στην ταινία αυτή, είναι δυνατόν να οφείλεται είτε στην γενικότερη αλλαγή που προκαλείται στον υποκαταστάτη λόγω της ένταξης των δύο αζώτων της διπυριδίνης ή ακόμη να οφείλεται και σε πειραματικό σφάλμα.

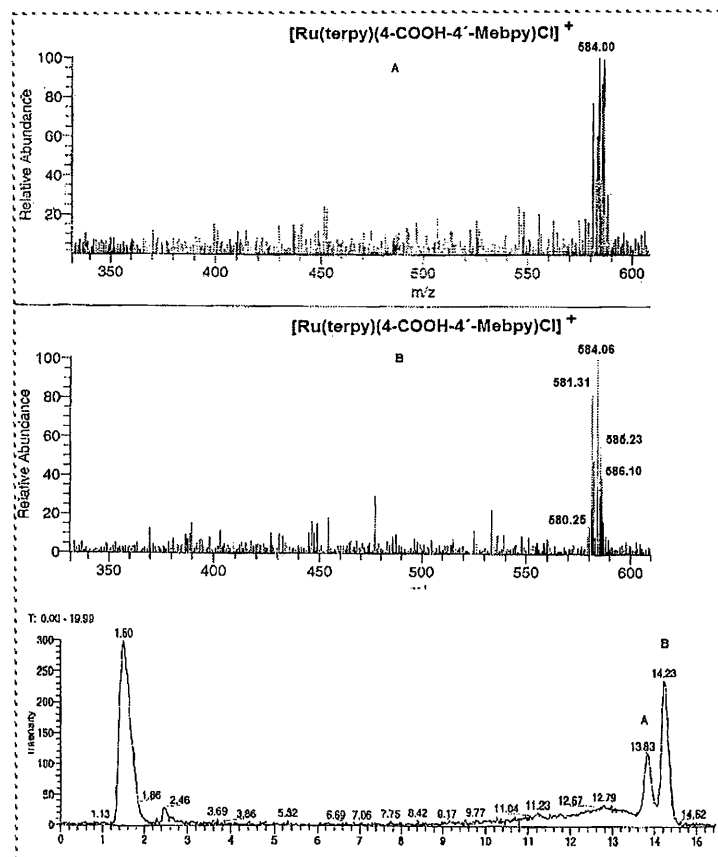
Κατά την αντίδραση αυτή υπάρχουν δυο πιθανοί προσανατολισμοί ένταξης του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebrpy ως προς το χλώριο και έτσι προκύπτουν δυο ισομερή θέσης τα *I* και *II* όπως φαίνονται στο σχήμα 6.8.



Σχήμα 6.8. Ισομερή θέσης *I* και *II* του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebrpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ .

Ο διαχωρισμός των δυο ισομερών *I* και *II* βασίστηκε στη διαφορά στη διαλυτότητα τους σε ακετονιτρίλιο και μεθανόλη. Το ένα ισομερές φαίνεται να είναι πιο διαλυτό σε ακετονιτρίλιο ενώ το άλλο σε μεθανόλη. Έτσι έγινε προσπάθεια διαχωρισμού των δυο ισομερών με χρωματογραφία στήλης Sephadex LH20 βάσει της διαλυτότητας τους στους παραπάνω διαλύτες. Όμως ο διαχωρισμός τους ήταν μερικός παρόλο το γεγονός ότι η διαδικασία διαχωρισμού επαναλήφθηκε για 6 φορές. Έτσι τελικά επιτεύχθηκε διαχωρισμός κατά 80% με την συνύπαρξη 20% από το άλλο ισομερές και με πολύ μικρή απόδοση. Για το λόγο αυτό στα επόμενα στάδια σύνθεσης αλλά και μελέτης των συμπλόκων χρησιμοποιήθηκε το μίγμα των δυο ισομερών.

Η ύπαρξη των ισομερών διαπιστώθηκε και με την τεχνική LC-MS όπου στο χρωματογράφημα παρατηρήθηκαν δυο ταινίες A και B που αντιστοιχούν στα δυο ισομερή με το ίδιο ακριβώς  $m/z = 584.0$  που αντιστοιχεί στο κατιόν  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Me bpy})\text{Cl}]^+$ . Παρόλο τη σχετική απόσταση που παρουσιάζουν οι δύο κορυφές A και B (Σχήμα 6.9.) δεν κατέστη δυνατός σε παρασκευαστικό επίπεδο ο πλήρης διαχωρισμός τους. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται το χρωματογράφημα (LC) σε αυξανόμενη αναλογία ακετονιτρίλιου-μεθανόλης, καθώς και τα φάσματα μάζας (MS) που αντιστοιχούν στις κορυφές A και B.



Σχήμα 6.9. LC-MS των ισομερών θέσης *I* και *II* του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Me bpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ .

Στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρήθηκαν διπλοί συντονισμοί που αντιστοιχούν στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των δυο ισομερών σε αναλογία 1:4. Γενικά, στις υποκατεστημένες πυριδίνες, οι καρβοξυλομάδες αποπροστατεύουν τα πρωτόνια του πυριδινικού δακτυλίου περισσότερο από τις μεθυλομάδες. Έτσι, το πρωτόνιο H<sub>6</sub> της διπυριδίνης του *I* ισομερούς εμφανίζεται πρώτο στα 10.35 ppm και ακολουθεί το H<sub>6'</sub> της διπυριδίνης του *II* ισομερούς στα 9.97 ppm. Στο *I* ισομερές η καρβοξυλομάδα βρίσκεται κοντά στο χλώριο ενώ στο *II* η μεθυλομάδα.

Παρακάτω παρουσιάζεται ο Πίνακας με τις χημικές μετατοπίσεις (ppm) των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  των δυο ισομερών του  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ .

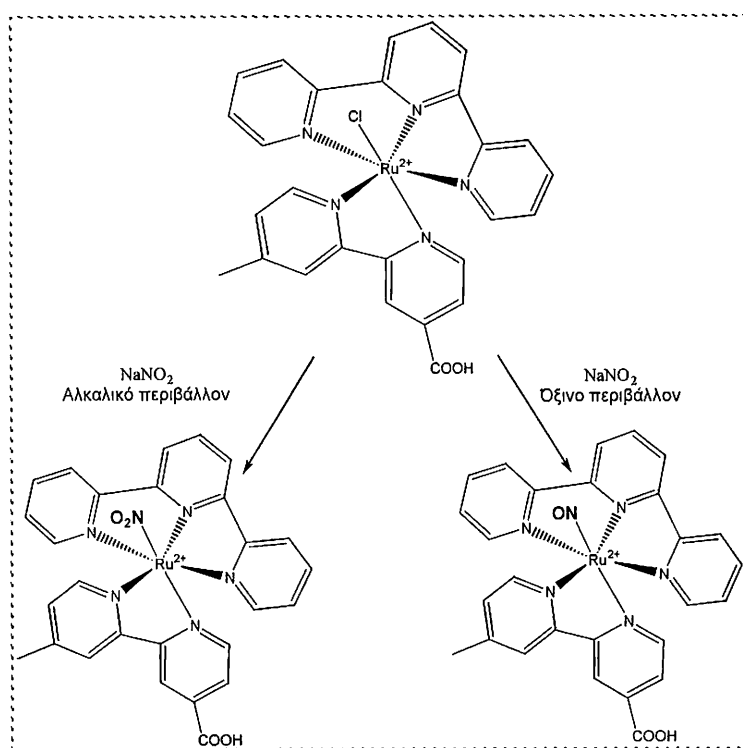
**Πίνακας 6.3.** Χημικές μετατοπίσεις των ισομερών του  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$

	Ισομερές I	Ισομερές II
4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy		
H <sub>6</sub>	10.35 (d)	7.35 (d)
H <sub>5</sub>	8.42 (d)	7.36 (d)
H <sub>3</sub>	9.14 (s)	8.74(s)
H <sub>6'</sub>	7.20 (d)	9.97 (d)
H <sub>5'</sub>	6.93 (d)	7.85 (d)
H <sub>3'</sub>	8.45 (s)	8.61 (s)
4-Me	2.39 (s)	2.82(s)
Terpy		
H <sub>3</sub>	8.53 (d)	8.51 (d)
H <sub>3'</sub>	8.53 (d)	8.51 (d)
H <sub>4</sub>	7.94 (t)	7.93 (t)
H <sub>4'</sub>	7.94(t)	7.93 (t)
H <sub>5,5'</sub>	7.34 (t)	7.32 (t)
H <sub>6,6'</sub>	7.70 (d)	7.69 (d)
H <sub>3''</sub>	8.66(d)	8.63 (d)
H <sub>4''</sub>	8.19 (m)	8.14 (m)
H <sub>5''</sub>	8.66 (d)	8.63 (d)

Η απόδοση των ταινιών στα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των πειραμάτων  $^1\text{H}^1\text{H-COSY}$  και  $^1\text{H}^1\text{H-TOCSY}$ . Τα φάσματα  $^1\text{H NMR}$  και των δυο ισομερών έδειξαν διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις για κάθε ένα πρωτόνιο των δυο πυριδινικών δακτυλίων του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy. Στο  $^1\text{H NMR}$  φάσμα του *I* ισομερούς η διπλή ταινία στα  $\delta=10.35$  ppm αποδόθηκε στο H<sub>6</sub> του 4-COOH υποκατεστημένου

πυριδινικού δακτυλίου αφού δεν παρατηρήθηκε στο φάσμα TOCSY (mixing time 80ms) κανένα σήμα συσχέτισης με τα πρωτόνια της 4'-μεθυλομάδας. Αντίθετα, στην περίπτωση του II ισομερούς η διπλή ταινία στα  $\delta=9.97$  ppm σχετίζεται στο δισδιάστατο φάσμα με τα πρωτόνια της μεθυλομάδας δείχνοντας έτσι ότι αυτό το πρωτόνιο ανήκει στο 4'-μεθυλ-υποκατεστημένο πυριδινικό δακτύλιο.

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις σύνθεσης των συμπλόκων (2) και (3). Οι αντιδράσεις δίνονται στο σχήμα 6.10. Όπως φαίνεται στο σχήμα τα σύμπλοκα συντίθενται μετά την αντικατάσταση του χλωρο υποκαταστάτη από νιτρο-ομάδα ή νιτροσουλ-ομάδα με ρύθμιση του pH της αντίδρασης.

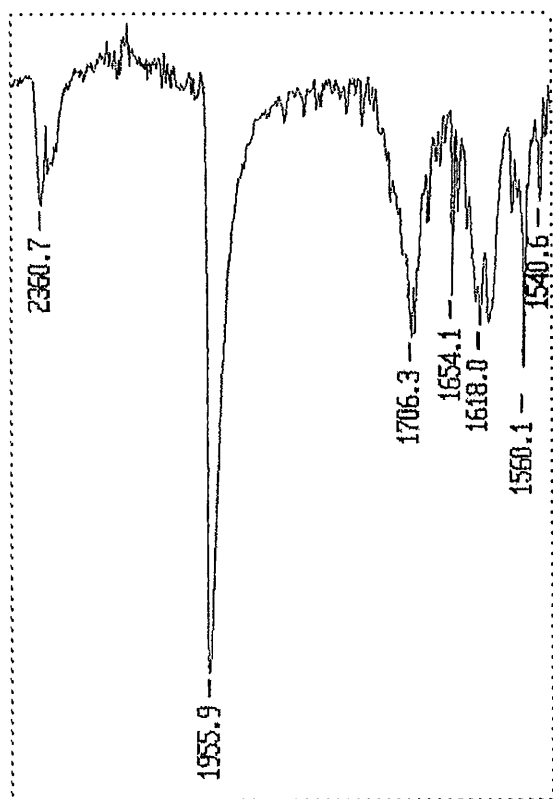


Σχήμα 6.10. Αντιδράσεις σύνθεσης των συμπλόκων (2) και (3).

Σε όξινες συνθήκες λαμβάνεται το νιτροσυλο σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  ενώ σε βασικό περιβάλλον το νιτρο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ .

Ο χαρακτηρισμός των δυο αυτών συμπλόκων έγινε με τη χρήση διάφορων φασματοσκοπικών και αναλυτικών τεχνικών. Στο φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  η ταινία της δόνησης τάσης του δεσμού N-O παρατηρήθηκε στα  $1955\text{ cm}^{-1}$ . Η τιμή αυτή συμφωνεί με τη βιβλιογραφία για περιπτώσεις όπου η ένταξη του NO στο ρουθίνιο γίνεται ως  $\text{NO}^+$ . Χαρακτηριστική

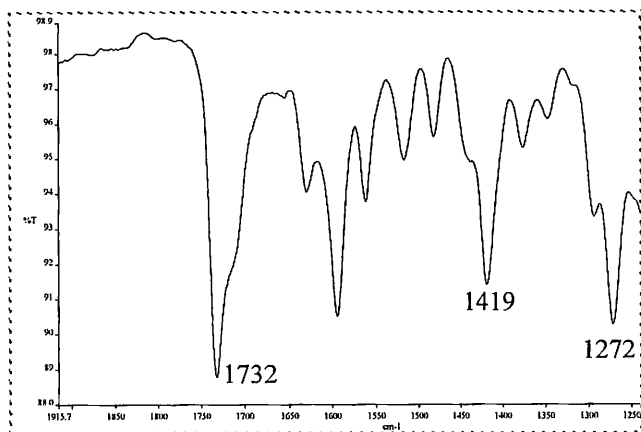
είναι και η ταινία δόνησης τάσης του δεσμού C=O της καρβοξυλομάδας του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy που εμφανίζεται στα 1706 cm<sup>-1</sup>, μετατοπισμένη κατά 11 cm<sup>-1</sup> σε σχέση με το χλωρο-σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (1717 cm<sup>-1</sup>).



Σχήμα 6.11. Φάσμα υπερέθρου του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>.

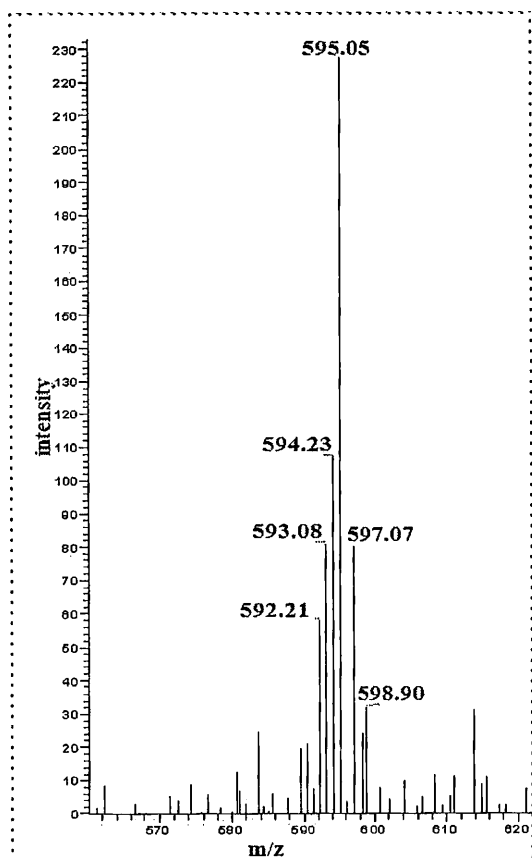
Η δόνηση τάσης του δεσμού N-O εμφανίζεται στην περίπτωση μας πιο ψηλά από ότι σε ανάλογα σύμπλοκα του τύπου [Ru(terpy)(NO)L] όπου L= υποκαταστάτες σ-δότες, όπως η 2-φαινυλοπυριδίνη (1858 cm<sup>-1</sup>)<sup>168</sup> και η ακετυλακετόνη (1914 cm<sup>-1</sup>)<sup>165</sup>, ενώ εμφανίζεται περίπου στην ίδια συχνότητα με άλλα παρόμοια σύμπλοκα με υποκαταστάτες όπως η διπυριδίνη (1953 cm<sup>-1</sup>)<sup>166</sup>. Στο σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) παρατηρήθηκαν ταινίες που αποδίδονται στη ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού N-O και ειδικότερα ν<sub>as</sub> = 1419 cm<sup>-1</sup> και ν<sub>s</sub> = 1272 cm<sup>-1</sup>. Η ταινία δόνησης τάσης του δεσμού C=O της καρβοξυλομάδας του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy στην περίπτωση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) παρατηρήθηκε στα 1732 cm<sup>-1</sup>, μετατοπισμένη σε υψηλότερες συχνότητες σε σχέση με το χλωρο-σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (1717 cm<sup>-1</sup>). Στο παρακάτω σχήμα δίνεται τμήμα του φάσματος υπερέθρου του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>), όπου φαίνονται

οι χαρακτηριστικές ταινίες δόνησης των δεσμών N-O και C=O της καρβοξυλομάδας του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy.



Σχήμα 6.12. Φάσμα υπερόθρου του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ .

Η καθαρότητα των συμπλόκων  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$  και  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  ελέγχθηκε με χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας (LC-MS, ESI-MS και MALDI-TOF).

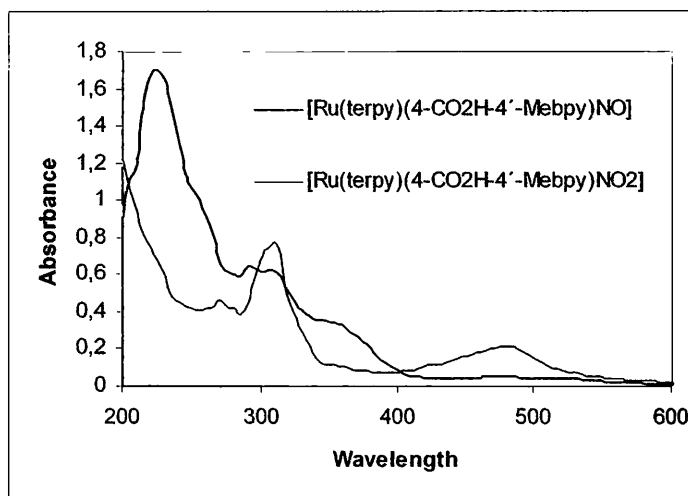


Σχήμα 6.13. ESI-MS του συμπλόκου (3).



Στο φάσμα ESI-MS του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  εμφανίζεται μια κορυφή με κέντρο σε  $m/z = 595$  που αντιστοιχεί στο κατιόν  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2]^+$  ενώ χαρακτηριστική είναι και η ισοτοπική κατανομή του φάσματος (Σχήμα 6.13).

Τα σύμπλοκα  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  και  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  χαρακτηρίστηκαν και με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Τα ηλεκτρονιακά τους φάσματα φαίνονται στο σχήμα.



Σχήμα 6.14. Φάσματα υπεριώδους-ορατού των συμπλόκων (2) και (3) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο.

Οι ταινίες που παρατηρήθηκαν στην περιοχή 275-300 nm, αντιστοιχούν στις μεταπτώσεις  $\pi \rightarrow \pi^*$  (terpy) και  $\pi \rightarrow \pi^*$  (bpy) των υποκαταστατών τερπυριδίνη και διπυριδίνη, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλα ανάλογα πολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου<sup>166,264</sup>.

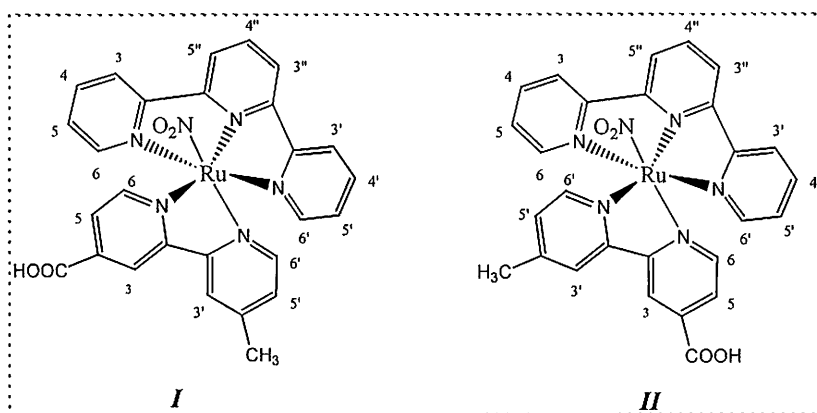
Οι ταινίες στην περιοχή 320-340 nm του νιτροσουλ-συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  αντιστοιχούν στις MLCT ταινίες  $d_\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$  και  $d_\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{terpy})$ <sup>129,166</sup>. Η ταινία στα 475 nm που παρατηρήθηκε στο νιτρο σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  αντιστοιχεί σε MLCT ταινία  $d_\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2)$  χαρακτηριστική των πολυπυριδινο νιτρο συμπλόκων του ρουθηνίου<sup>166</sup>. Αναλυτικά οι ταινίες των συμπλόκων παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 6.4.

Πίνακας 6.4. Χαρακτηριστικές ταινίες των φασμάτων υπεριώδους-ορατού των συμπλόκων (2) και (3) σε άνυδρο  $CH_3CN$ .

Σύμπλοκο	$\lambda_{max}$	$(\epsilon_{max}, M^{-1} cm^{-1})$	Μετάπτωση
$[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO]^{3+}$	250(s)	(24000)	$\pi \rightarrow \pi^*$ υποκαταστατών
	289	(26000)	$d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(terpy)$
	304	(25400)	$d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(bpy)$
	349	(14000)	$d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^* NO$
$[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2]^+$	269 (s)	(16000)	$\pi \rightarrow \pi^*$ υποκαταστατών
	280 (s)	(16800)	$\pi \rightarrow \pi^*$ υποκαταστατών
	304	(26000)	$d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(terpy)$
	329 (s)	(10400)	$d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(bpy)$
	475	(6400)	$d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^* NO_2$

Τα σύμπλοκα  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$  και  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  χαρακτηρίστηκαν και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Η απόδοση των ταινιών στα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πειραμάτων δυο διαστάσεων  $^1H^1H-COSY$  και  $^1H^1H-TOCSY$ . Όπως και στο αντίστοιχο χλωρο σύμπλοκο  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$  έτσι και στο νιτρο σύμπλοκο (3) παρατηρήθηκαν δυο σετ συντονισμών που αντιστοιχούν στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των δυο ισομερών. Τα φάσματα και των δυο ισομερών έδειξαν διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις για κάθε ένα πρωτόνιο των δυο πυριδινικών δακτυλίων του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy, αντανακλώντας την ανισοδυναμία των δυο πυριδινικών δακτυλίων λόγω της διαφορετικής υποκατάστασης στην θέση 4 και 4'. Στο  $^1H$  NMR φάσμα του *I* ισομερούς η διπλή ταινία στα  $\delta=9.45$  ppm αποδόθηκε στο H6 του 4-COOH υποκατεστημένου πυριδινικού δακτυλίου ενώ στην περίπτωση του *II* ισομερούς η διπλή ταινία στα  $\delta=9.17$  ppm αποδόθηκε στο H6' του 4'-Me υποκατεστημένου δακτυλίου. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευτεί με την ισχυρή αποπροστασία του νιτρο υποκαταστάτη, καθώς στο *I* ισομερές η καρβοξυλομάδα βρίσκεται κοντά στο νιτρο υποκαταστάτη ενώ αντίστοιχα στο *II* η μεθυλομάδα. Τα πρωτόνια των δύο τερματικών πυριδινικών δακτυλίων, H<sub>6</sub>H<sub>6'</sub>, H<sub>5</sub>H<sub>5'</sub>,

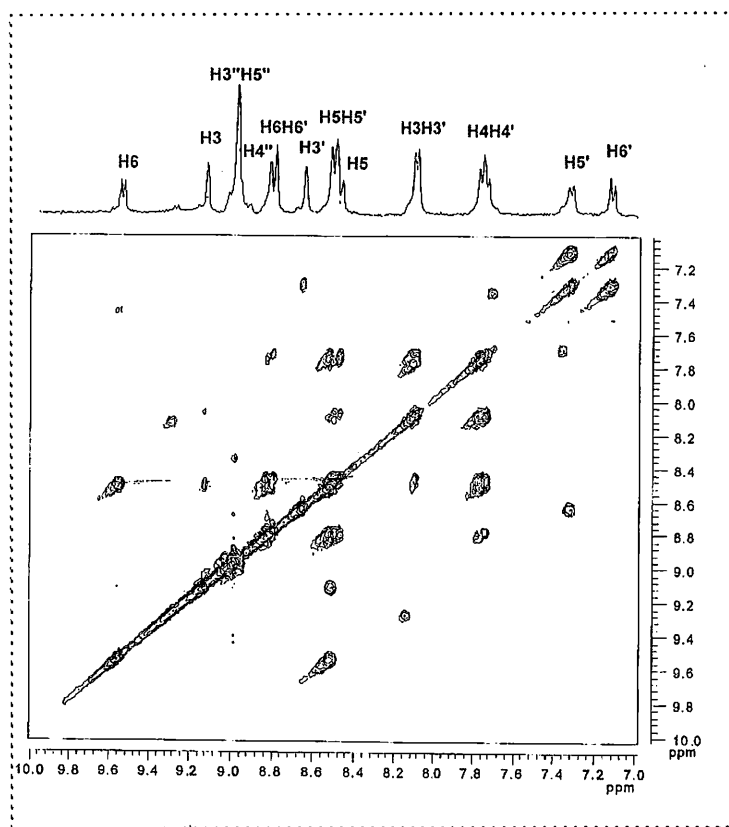
$H_4H_4'$  και  $H_3H_3'$  του υποκαταστάτη τερπυριδίνη είναι χημικά ισοδύναμα αφού δίνουν μόνο ένα σείν συντονισμών. Από τη παρατήρηση αυτή προκύπτει το συμπέρασμα ότι το περιβάλλον των πρωτονίων αυτών είναι ισοδύναμο. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της τερπυριδίνης και των δυο ισομερών δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Παρακάτω παρουσιάζεται ο Πίνακας με τις χημικές μετατοπίσεις των δυο ισομερών του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ .



Πίνακας 6.5. Χημικές μετατοπίσεις των ισομερών του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ .

	Ισομερές I	Ισομερές II
4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy		
H <sub>6</sub>	9.45 (d)	7.07 (d)
H <sub>5</sub>	8.08 (d)	6.79 (d)
H <sub>3</sub>	8.75 (s)	8.14(s)
H <sub>6'</sub>	7.32 (d)	9.17 (d)
H <sub>5'</sub>	7.21 (d)	7.68 (d)
H <sub>3'</sub>	8.43 (s)	8.51 (s)
4-Me	2.62 (s)	2.24(s)
Terpy		
H <sub>3</sub>	7.62 (d)	7.62 (d)
H <sub>3'</sub>	7.62 (d)	7.62 (d)
H <sub>4</sub>	7.18 (t)	7.18 (t)
H <sub>4'</sub>	7.18(t)	7.18 (t)
H <sub>5,5'</sub>	7.84 (t)	7.84 (t)
H <sub>6,6'</sub>	8.27 (d)	8.27 (d)
H <sub>3''</sub>	8.41(d)	8.42 (d)
H <sub>4''</sub>	8.17 (m)	8.17 (m)
H <sub>5''</sub>	8.41 (d)	8.42 (d)

Κατά τις προσπάθειες κρυστάλλωσης του νιτροσυλ-συμπλόκου απομονώθηκε το ένα ισομερές του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  και χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία NMR. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου δεν λύθηκε λόγω κακής ποιότητας του κρυστάλλου. Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR εμφανίζονται απλοί συντονισμοί και η απόδοση των ταινιών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των δισδιάστατων πειραμάτων. Το φάσμα λήφθηκε σε  $\text{D}_2\text{O}$  σε pH 3.4 καθώς είναι γνωστό ότι υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της νιτροσυλο και νιτρο μορφής που εξαρτάται από το pH<sup>260</sup>. Από την σύγκριση των φασμάτων των δυο ισομερών προέκυψε ότι το ισομερές που απομονώθηκε σε κρυσταλλική μορφή ήταν το II.

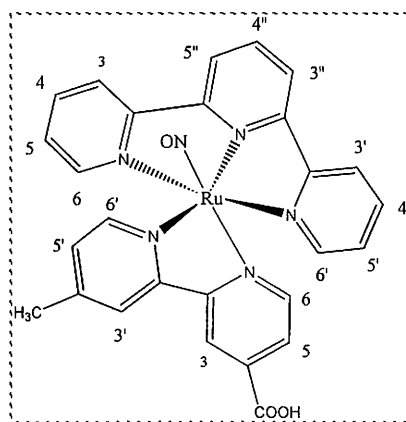


Σχήμα 6.15. Φάσμα 2D-NMR του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  σε  $\text{D}_2\text{O}$  pH 3.4.

Παρακάτω παρουσιάζεται ο Πίνακας με τις χημικές μετατοπίσεις του trans-ισομερούς του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ .

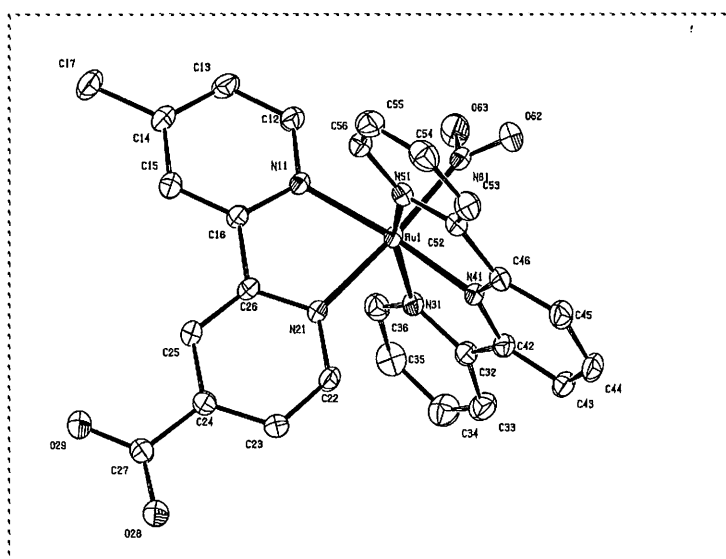
Πίνακας 6.6. Χημικές μετατοπίσεις του II ισομερούς του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$ .

Ισομερές II	
4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy	
H <sub>6</sub>	7.12 (d)
H <sub>5</sub>	7.32 (d)
H <sub>3</sub>	8.65(s)
H <sub>6'</sub>	9.57 (d)
H <sub>5'</sub>	8.47 (d)
H <sub>3'</sub>	9.13 (s)
4-Me	
Terpy	
H <sub>3</sub>	8.09 (d)
H <sub>3'</sub>	8.09 (d)
H <sub>4</sub>	7.76 (t)
H <sub>4'</sub>	7.76 (t)
H <sub>5,5'</sub>	8.50 (t)
H <sub>6,6'</sub>	8.82 (d)
H <sub>3''</sub>	8.99 (d)
H <sub>4''</sub>	8.97 (m)
H <sub>5''</sub>	8.99 (d)



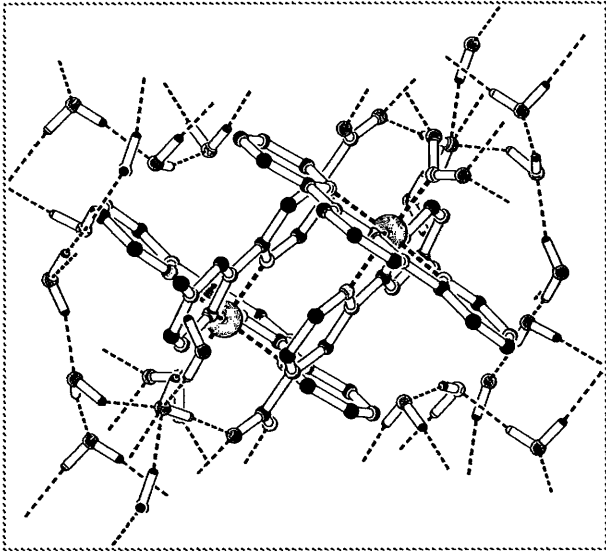
### 6.1.3. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2]^+$

Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2]^+$  λύθηκε από κατάλληλου μεγέθους κρύσταλλο που απομονώθηκε από υδατικό διάλυμα. Οι διαστάσεις του κρυστάλλου ήταν 0.09 x 0.12 x 0.12 mm και το χρώμα του καφέ-πορτοκαλί. Στο σχήμα 6.16 δίνεται η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου.



Σχήμα 6.16.  
Κρυσταλλική δομή του  
συμπλόκου (3).

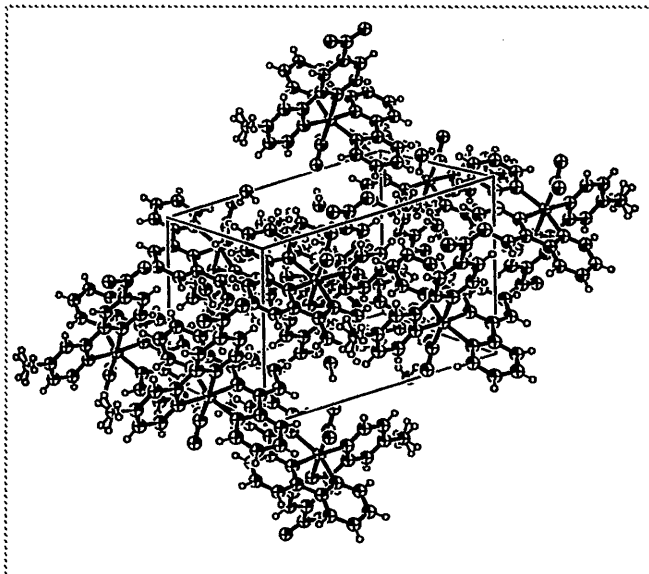
Το σύμπλοκο κρυσταλλώθηκε σε διμερή μορφή όπου τα δυο κατιόντα συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στην καρβοξυλομάδα και το  $\text{NO}_2$  (Σχήμα 6.17). Συγκρυσταλλώθηκαν 15 μόρια νερού, τα οποία σχηματίζουν μεταξύ τους δεσμούς υδρογόνου. Η καρβοξυλομάδα του υποκαταστάτη 4- $\text{CO}_2\text{H}$ -4'-Mebry είναι αποπρωτονιωμένη.



Σχήμα 6.17. Δεσμοί υδρογόνου της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου (3).

Η μοναδιαία κυψελίδα του συμπλόκου (3) δίνεται στο σχήμα 6.18.

Σχήμα 6.18. Μοναδιαία κυψελίδα του συμπλόκου (3).



Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.7.

Πίνακας 6.7. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για το σύμπλοκο  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ .

Τύπος	C27H20N6O4Ru 7.5
M.W.	(H <sub>2</sub> O)
Χρώμα κρυστάλλου	728.68
Μέγεθος κρυστάλλου (mm)	Καφέ-πορτοκαλί 0.09 x 0.12 x 0.12
Κρυσταλλικό σύστημα	Τρικλινές
Ομάδα χώρου	P-1
a (Å)	9.4982(1)
b (Å)	13.1330(1)
c (Å)	14.2498(2)
α (Å)	110.5870(6)
β (Å)	98.4048(5)
γ (Å)	106.4353(5)
V (Å <sup>3</sup> )	1535.12(3)
Z	2
T (K)	150
λ (Å)	0.71073
d (g cm <sup>-3</sup> )	1.5764
R	0.0341
R <sub>w</sub>	0.0899

Το μήκος δεσμού Ru-N41 του κεντρικού πυριδινικού δακτυλίου του υποκαταστάτη *terpy* βρέθηκε να είναι μικρότερο από τους υπόλοιπους δυο δεσμούς Ru-N31 και Ru-N51 του ίδιου υποκαταστάτη που είναι 2.078 και 2.065 Å αντίστοιχα. Στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου  $[Ru^{II}(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl]^+$  το μήκος του κοντότερου αντίστοιχου δεσμού βρέθηκε να είναι πολύ κοντά στη δική μας περίπτωση (1,968 Å)<sup>283</sup>. Οι αποστάσεις των δεσμών Ru-N11 και Ru-N21 για τον υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-*Mebpy* βρέθηκαν διαφορετικές μεταξύ τους και συγκεκριμένα 2.096 Å και 2.071 Å αντίστοιχα. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στο σύμπλοκο  $[Ru^{II}(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl]^+$  και μπορεί να αποδοθεί στην *trans*-επίδραση του κοντού δεσμού Ru-N41 του υποκαταστάτη *terpy*<sup>283</sup> στον δεσμό Ru-N11. Η γεωμετρία γύρω από το ρουθίνιο είναι παραμορφωμένου οκταέδρου

προκαλούμενη κυρίως από τον τριδοντικό τρόπο που συνδέεται το *terpy*, καθώς η τιμή της γωνίας N51-Ru-N31 ξεφεύγει από τη γραμμικότητα με τιμή 159.30°. Παράλληλα η γωνία που σχηματίζεται από τον υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy και το ρουθίνιο N11-Ru-N21 παρεκκλίνει από την ορθή με τιμή 78.24°. Ακόμη από τις διεδρες γωνίες που παρατηρήθηκαν δεν προκύπτουν σημαντικές αποκλίσεις από την επιπεδότητα των υποκαταστατών 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy και *terpy*

Στον Πίνακα 6.8. δίνονται τα σημαντικότερα μήκη δεσμών και γωνιών του συμπλόκου. Όλα τα δεδομένα που αφορούν στα μήκη δεσμών και γωνιών παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα.

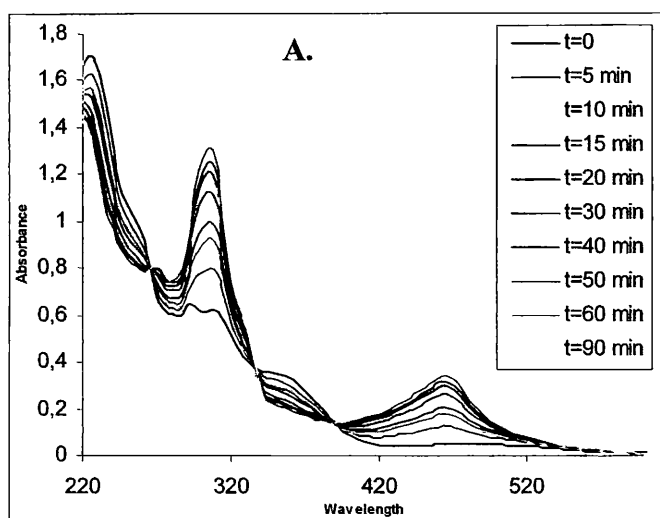
Πίνακας 6.8. Σημαντικότερα μήκη δεσμών και γωνίες της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου (3).

Άτομα	Μήκος δεσμού
N11 Ru1	2.096
N21 Ru1	2.071
N31 Ru1	2.078
N41 Ru1	1.967
N51 Ru1	2.065
N61 Ru1	2.029
	Γωνία δεσμού
N11 Ru1 N21	78.24
N11 Ru1 N31	101.87
N11 Ru1 N41	174.05
N11 Ru1 N51	98.47
N11 Ru1 N61	97.10
N21 Ru1 N31	89.76
N21 Ru1 N41	96.02
N21 Ru1 N51	90.64
N21 Ru1 N61	175.34
N31 Ru1 N41	79.48
N31 Ru1 N51	159.30
N31 Ru1 N61	91.43
N41 Ru1 N51	79.90
N41 Ru1 N61	88.63
N51 Ru1 N61	89.85

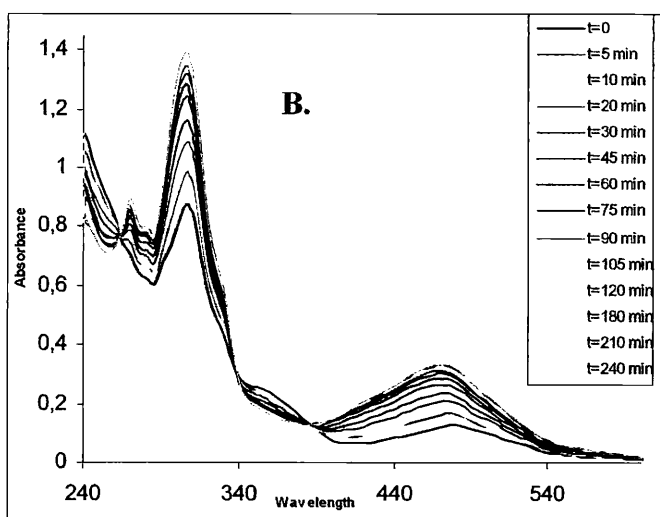


## 6.2. Φωτοχημεία των συμπλόκων $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$ (2) και $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ (3)

Κατά την μελέτη της φωτοχημείας των συμπλόκων  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$  και  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  πραγματοποιήθηκε ακτινοβολία διαλυμάτων τους με λάμπα υδραργύρου και μελέτη των φωτοπροϊόντων που σχηματίζονται. Στην περίπτωση του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$  χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα του σε ακετονιτρίλιο, και υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα σε pH 3.0.



Σχήμα 6.19. Φάσματα υπεριώδους-ορατού της ακτινοβολήσης του συμπλόκου (2) σε Α.  $CH_3CN$ , Β. ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 3



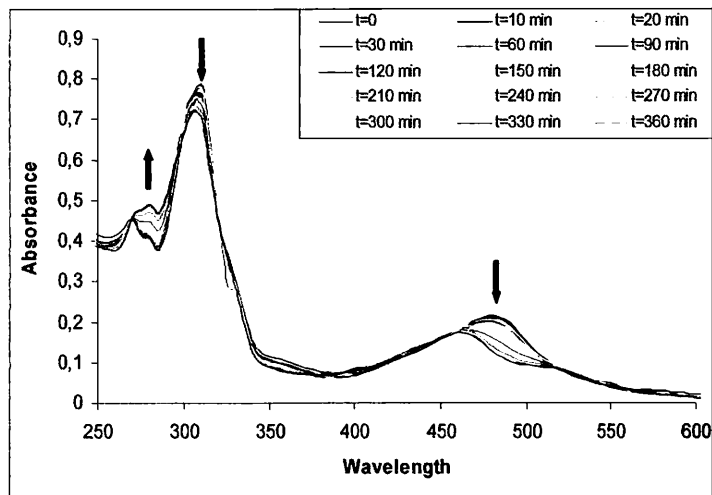
Η παραπάνω τιμή pH επιλέχθηκε καθώς είναι γνωστό ότι υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της νιτροσυλο και νιτρο μορφής που εξαρτάται από το pH<sup>260</sup>. Κατά την ακτινοβόληση των διαλυμάτων σε όλες τις περιπτώσεις των διαλυτών καταγράφηκαν τα φάσματα υπεριώδους-ορατού ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή. Τα φωτοπροϊόντα αναλύθηκαν με την τεχνική LC-MS. Σε διάλυμα ακετονιτριλίου (γράφημα A), η ταινία στα 349 nm που αντιστοιχεί στην μετάπτωση  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$  μειώνεται κατά την πάροδο της ακτινοβόλησης, ενώ αυξάνεται η ένταση της ταινίας στα 304 και εμφανίζεται μια νέα στα 460 nm. Η μείωση της έντασης της ταινίας στα 349 nm μπορεί να συνδεθεί με την απόσπαση του NO από το ρουθίνιο, ενώ η αύξηση της έντασης της ταινίας στα 304 nm που αποδόθηκε σε  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$  και η ταυτόχρονη εμφάνιση της ταινίας στα 460 nm μπορεί να αποδοθεί σε φωτοπροϊόντα του Ru(III). Σε pH = 3 (γράφημα B), σε αρκετά δηλαδή όξινο περιβάλλον όπου η νιτροσυλομάδα παραμένει σταθερή<sup>260</sup>, οι ταινίες στα 329 και 354 nm που αποδίδονται στις MLCT ταινίες του  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$  και  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{terpy})$  μειώνονται, ενώ αυξάνεται η ένταση της ταινίας στα 305 nm και μια νέα ταινία εμφανίζεται στα 469 nm. Οι παρατηρήσεις αυτές, είναι ανάλογες με εκείνες του ακετονιτριλίου και δείχνουν ότι και σε όξινα διαλύματα το NO αποδεσμεύεται από το ρουθίνιο.

Κατά τη μελέτη της φωτοχημείας των συμπλόκων [Ru(salen)NOCl] και [Ru(salen)NO(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup> διαπιστώθηκε η απόσπαση του NO υπό την επίδραση ορατού φωτός σε ακετονιτρίλιο<sup>265</sup>. Κατά την καταγραφή των φασμάτων υπεριώδους-ορατού διαπιστώθηκαν μεταβολές στις ταινίες των συμπλόκων παρόμοιες με αυτές του μελετούμενου νιτροσυλ-συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Me<sub>2</sub>bpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>. Οι ταινίες που αποδόθηκαν στις μεταπτώσεις  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$  μειώθηκαν, ενώ στα φάσματα υπερύθρου μετά την ακτινοβόληση δεν παρατηρήθηκαν οι ταινίες της δόνησης τάσης του δεσμού N-O. Το φωτοπροϊόν χαρακτηρίστηκε με διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές και βρέθηκε να είναι το σύμπλοκο [Ru<sup>III</sup>(salen)Cl(CH<sub>3</sub>CN)]<sup>+</sup><sup>265</sup>. Στην ίδια μελέτη, διαπιστώθηκε ότι σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο τα φωτοπροϊόντα που προκύπτουν είναι ένα πενταϋποκατεστημένο σύμπλοκο το [Ru<sup>III</sup>(salen)Cl] και ένα χλωρογεφυρωμένο διμερές του ρουθινίου<sup>265</sup>. Ο Sauer και οι συνεργάτες του μελέτησαν την απελευθέρωση του NO από το σύμπλοκο *cis*-[RuL(bpy)<sub>2</sub>NO]<sup>3+</sup><sup>152</sup> (L= πυριδίνη, 4-πικολίνη, 4-ακετυλπυριδίνη) κατά την ακτινοβόληση του στα 355 nm σε υδατικό διάλυμα τριφθοροξικού οξέος (pH = 2) ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός του συμπλόκου *cis*-[RuL(bpy)<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Οι

μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα φάσματα υπεριώδους-ορατού στο σύμπλοκο  $cis-[RuL(bpy)_2NO]^{3+}$ <sup>152</sup> ήταν ανάλογες με αυτές του συμπλόκου που μελετάμε, καθώς οι ταινίες που αντιστοιχούν στις μεταπτώσεις  $d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(NO^+)$  μειώνονται και νέες ταινίες εμφανίζονται που αντιστοιχούν στα φωτοπροϊόντα της αντίδρασης. Στην περίπτωση του συμπλόκου  $cis-[RuL(bpy)_2NO]^{3+}$  (L= πυριδίνη, 4-πικολίνη, 4-ακετυλπυριδίνη) ως φωτοπροϊόν προσδιορίστηκε το σύμπλοκο  $cis-[RuL(bpy)_2(OH)]^{2+}$ <sup>152</sup>. Το ίδιο σύμπλοκο προέκυψε κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου  $cis-[RuL(bpy)_2NO]^{3+}$  σε pH = 5.7<sup>155</sup>. Σε υδατικό διάλυμα μελετήθηκε και η φωτόλυση του συμπλόκου  $cis-[Ru(NO)(PaPy_3)]^{2+}$  (PaPy<sub>3</sub>H= *N,N'*-δισ(2-πυριδυλμεθυλ)αμινο-*N*-αιθυλ-2-πυριдино-2-καρβαμίδιο) όπου και στην περίπτωση αυτή η ακτινοβόληση είχε ως αποτέλεσμα την οξειδωση του Ru(II) σε Ru(III) και την αντικατάσταση του NO με νερό δίνοντας το σύμπλοκο  $cis-[Ru(H_2O)(PaPy_3)]^{2+}$ <sup>266</sup>.

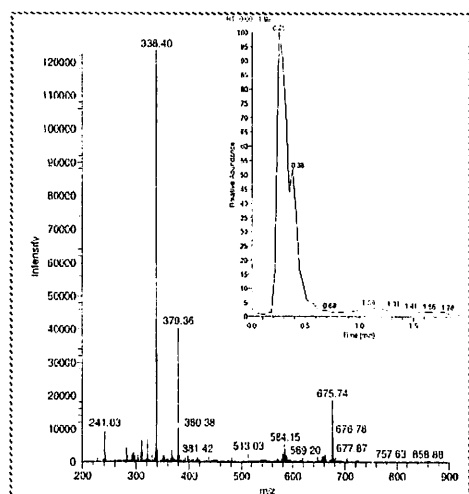
Προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση του φωτός και στο σύμπλοκο  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Me bpy)NO_2](PF_6)$  εκτελέστηκαν πειράματα φωτόλυσης αντίστοιχα με το νιτροσουλ-σύμπλοκο με τα ίδια μήκη κύματος (λάμπα υδραργύρου) σε διάλυμα ακετονιτριλίου. Έτσι, κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Me bpy)NO_2](PF_6)$  καταγράφηκαν τα φάσματα υπεριώδους-ορατού ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια, αφού δεν παρατηρήθηκαν πλέον αλλαγές στο φάσμα, τα φωτοπροϊόντα αναλύθηκαν με φασματομετρία ESI-MS. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το φάσμα υπεριώδους-ορατού του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Me bpy)NO_2](PF_6)$  κατά την ακτινοβόληση του διαλύματος του. Έτσι η ταινία στα 475 nm που αντιστοιχεί σε ταινία μεταφοράς φορτίου (MLCT)  $d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(NO_2)$  μειώνεται και τελικά εξαφανίζεται, ενώ αρχίζει να εμφανίζεται μια καινούργια ταινία στα 459 nm που αντιστοιχεί στο προϊόν της φωτόλυσης. Η ταινία, επίσης, στα 304 nm που όπως αναφέρθηκε αντιστοιχεί σε ταινία MLCT  $d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(terpy)$  μειώνεται ενώ η ταινία στα 280 nm αυξάνεται. Οι παραπάνω μεταβολές μπορούν να ερμηνευτούν με την αποδέσμευση του NO<sub>2</sub> από το ρουθίνιο και ταυτόχρονη δημιουργία κέντρων Ru(III) χωρίς να είναι δυνατό να αποκλειστούν και άλλα φωτοπροϊόντα. Η αποδέσμευση του NO<sub>2</sub> από σύμπλοκα του Ru(II) και η δημιουργία επιδιαιλυμένων συμπλόκων του Ru(III) ακόμα και σε υδατικά διαλύματα έχει διαπιστωθεί κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου  $trans-[Ru(NH_3)_4(NO_2)P(OEt)_3]^+$  σε ακετονιτρίλιο και υδατικά διαλύματα. Έτσι βρέθηκε ότι το προϊόν της φωτόλυσης ήταν το σύμπλοκο  $trans-[Ru(NH_3)_4(H_2O)P(OEt)_3]^{2+}$ . Η ταυτοποίηση του φωτοπροϊόντος έγινε και με φασματοσκοπία <sup>31</sup>P-NMR εκτός από

την καταγραφή των φασμάτων υπεριώδους-ορατού<sup>284</sup>. Ακόμη, στην περίπτωση του συμπλόκου  $\text{Ru}(\text{TPP})(\text{NO}_2)(\text{NO})$  όπου TPP = τετραφαινυλπορφυρίνη σε οργανικό διαλύτη παρατηρήθηκε απόσπαση του  $\text{NO}_2$  και σχηματισμός οξο-ενδιάμεσων συμπλόκων αλλά και διαφόρων σωματιδίων  $\text{NO}_x$ <sup>145</sup>



Σχήμα 6.20. Φάσμα υπεριώδους-ορατού της ακτινοβόλησης του συμπλόκου (3) σε  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

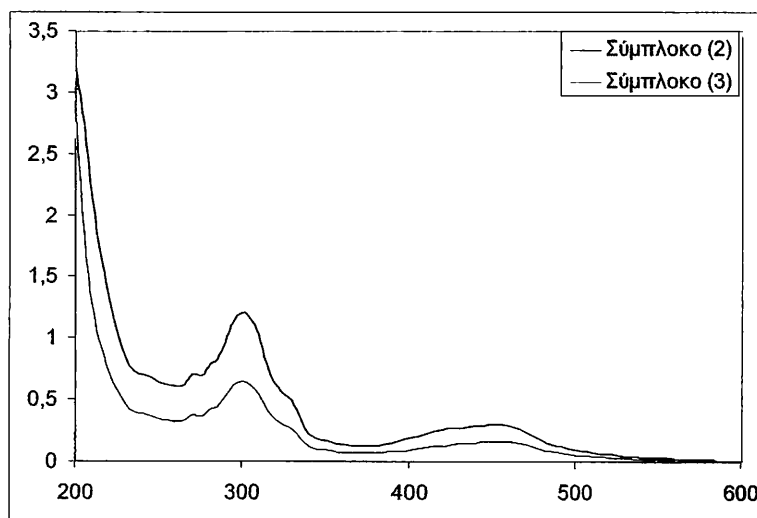
Κατά την ανάλυση του φωτοπροϊόντος με συνδυασμένη χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας, LC-MS, παρατηρήθηκε ένα θετικά φορτισμένο ιόν με φορτίο +1 στα  $m/z = 657.7$  που αντιστοιχεί σε τύπο  $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_4\text{Ru}$  και μπορεί να αποδοθεί στο σύμπλοκο  $\{[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{-}4'\text{-Mebpy})\text{NO}_2]2\text{MeCN}\}^+$ . Επίσης, το διπλά φορτισμένο θετικό ιόν  $\{[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-}4'\text{-Mebpy})\text{NO}_2]2\text{MeCN}\}^{2+}$  εμφανίζεται στα  $m/z = 338.9$ . Μια ακόμη ταινία που παρατηρείται στο φάσμα ESI-MS στα  $m/z = 379.4$  αντιστοιχεί στο διπλά φορτισμένο σωματίδιο  $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_2\text{F}_6\text{PNaRu}$ , το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο κατιόν  $\{[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{Na-}4'\text{-Mebpy})(\text{MeCN})]\text{PF}_6\}^{2+}$ . Η ύπαρξη και των δυο κατιόντων στο τελικό διάλυμα, αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί και η δημιουργία τους κατά τον ιονισμό, συνηγορούν τόσο με αποδέσμευση του  $\text{NO}_2$  από το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-}4'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  όσο και στην ύπαρξη κέντρων Ru (III).



Σχήμα 6.21. LC-MS του φωτοπροϊόντος κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου (3).

### 6.3. Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ με DNA

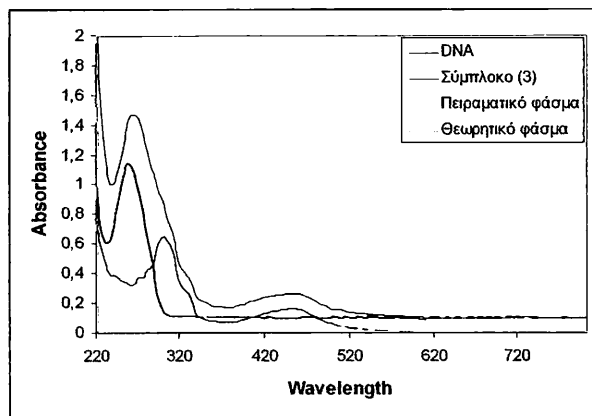
Εξαιτίας της γνωστής ισορροπίας ανάμεσα στην NO και NO<sub>2</sub> μορφής των συμπλόκων που σε τιμές pH=7 προσεγγίζει σχεδόν αποκλειστικά την νιτρο μορφή, εκτελέσαμε τα βιολογικά πειράματα με το νιτρο σύμπλοκο. Μια σύγκριση των φασμάτων UV-Vis των συμπλόκων  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$  και  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  σε pH=7 αποδεικνύει την επικράτηση του νιτρο-συμπλόκου στο pH αυτό (Σχήμα 6.22). Η αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δραστηριότητα του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(NO)Cl_2]$  που μελετήθηκε στο κεφάλαιο 5, μας οδήγησε να μελετήσουμε και το σύμπλοκο  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  ως προς τις αλληλεπιδράσεις του με DNA. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές τεχνικές. Το DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν το πλασμιδιακό DNA τύπου pUC9 και μικρά τμήματα από γραμμικό CT-DNA που απομονώθηκαν όπως είδαμε στο κεφάλαιο 5. Το DNA αυτό, χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα υπεριώδους-ορατού, κυκλικού διχρωϊσμού, <sup>23</sup>Na, <sup>31</sup>P-NMR και καμπυλών τήξης.



Σχήμα 6.22. Φάσματα υπεριώδους-ορατού των συμπλόκων (2) και (3) σε pH=7

Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού χρησιμοποιήθηκε κατά τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  με το CT-DNA. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα υπεριώδους-ορατού του συμπλόκου (3), του DNA, καθώς και το πειραματικό και θεωρητικό φάσμα του συστήματος DNA-συμπλόκου. Το θεωρητικό φάσμα προκύπτει από την απλή

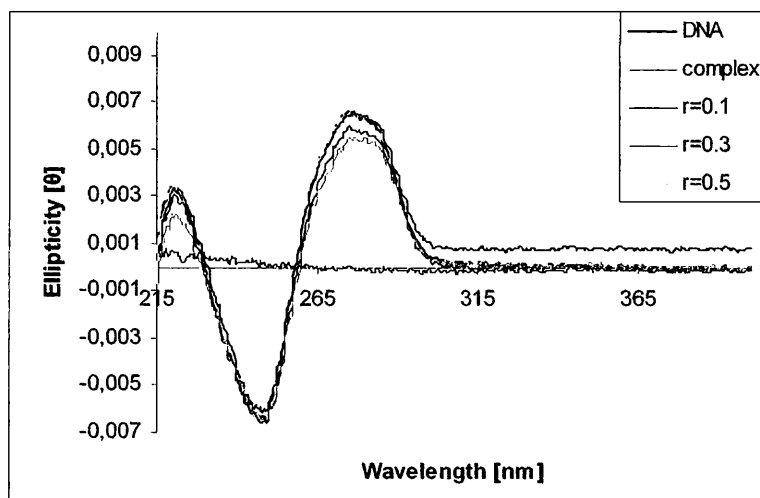
προσθήκη του φάσματος του συμπλόκου και του DNA χωρίς να υπήρχε η παραμικρή αλληλεπίδραση.



**Σχήμα 6.23.** Φάσματα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (3) σε αναλογία  $r=[Ru]/[DNA]=0.1$  και σύγκριση με το θεωρητικό φάσμα.

Η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτά είναι  $r = [Ru]/[DNA] = 0.1$ . Συγκρίνοντας το πειραματικό φάσμα του συστήματος (3)-[DNA] με το φάσμα του συμπλόκου παρατηρείται μια υποχρωμία στην ταινία μεταφοράς φορτίου MLCT (455 nm) του συμπλόκου κατά 15 % ( $H\% = 100(A_{free} - A_{bound}) / A_{free}$ ), ενώ δεν παρατηρήθηκε μετατόπιση προς την περιοχή του ερυθρού. Είναι γνωστό ότι τα σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με το DNA με παρεμβολή προκαλούν υποχρωμία και μετατόπιση προς το ερυθρό και μάλιστα η έκταση των διαφορών στα ηλεκτρονιακά φάσματα σχετίζεται με την ισχύ της αλληλεπίδρασης. Για παράδειγμα, τα σύμπλοκα  $[Ru(bpy)(\phi)_2]^{2+}$ <sup>285</sup> και  $[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$ <sup>286</sup> αλληλεπιδρούν με το DNA με παρεμβολή των υποκαταστατών τους ανάμεσα στις βάσεις και για το λόγο αυτό παρατηρείται υποχρωμία (20-30 %) και μετατόπιση προς το ερυθρό κατά  $\Delta\lambda \sim 10$  nm. Τρις-χηλικά σύμπλοκα του Ru(II) με ογκώδεις υποκαταστάτες που δεν μπορούν να πλησιάσουν τις αύλακες του DNA για να συνδεθούν με παρεμβολή παρουσιάζουν πολύ μικρή υποχρωμία  $H \sim 5$  % και πρακτικά μηδενική μετατόπιση προς το ερυθρό<sup>287</sup>. Αυτού του είδους οι τιμές για  $\Delta H$  και  $\Delta\lambda$  αποδίδονται περισσότερο σε ηλεκτροστατικού τύπου αλληλεπιδράσεις. Εξάλλου στην περίπτωση του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl, που μελετήθηκε στο Κεφάλαιο 5, η ένταξη του στις βάσεις του DNA συνοδευόταν από αλλαγές στο ηλεκτρονιακό φάσμα και συγκεκριμένα από υποχρωμία  $\sim 24$  % και μικρή μετατόπιση προς το ερυθρό κατά  $\Delta\lambda = 6$  nm. Συνεπώς, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα ηλεκτρονιακά φάσματα των συμπλόκου (3) υποδεικνύουν ένα μάλλον ηλεκτροστατικό τρόπο αλληλεπίδρασης του με το DNA.

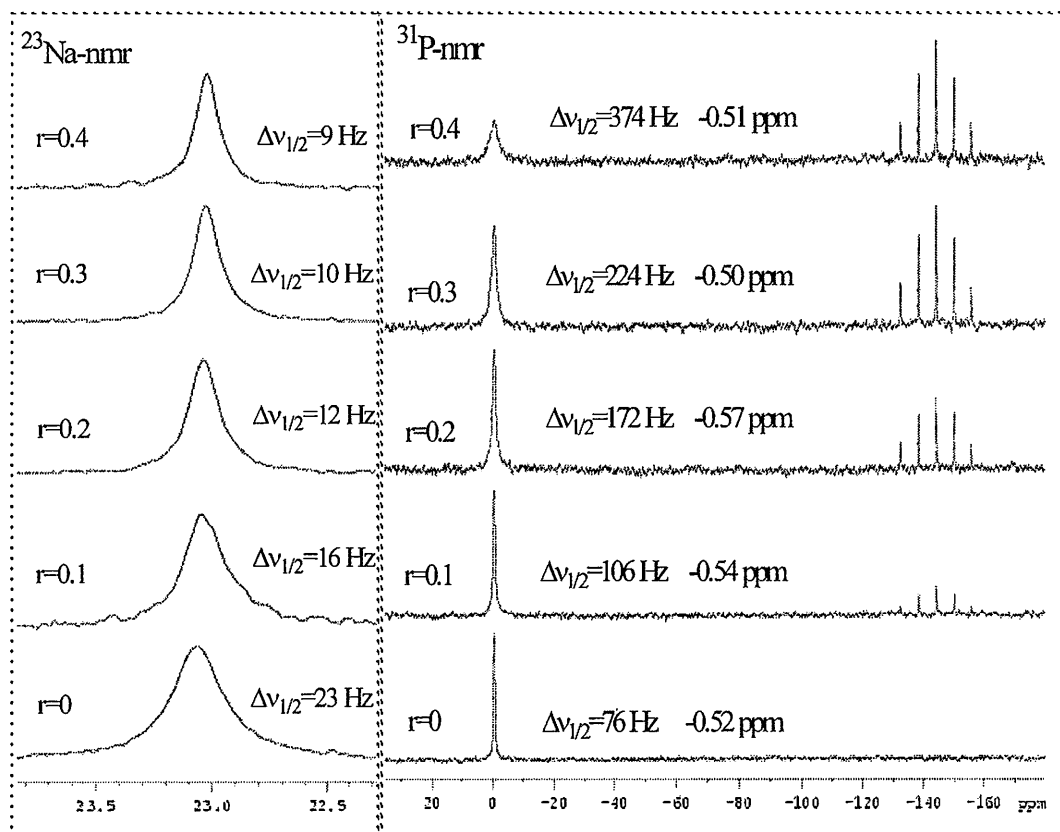
Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη τεχνική που δίνει περισσότερες πληροφορίες σε σχέση με την φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού για αλλαγές στη διαμόρφωση ή την αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA. Στο παρακάτω σχήμα δίνονται τα φάσματα CD του CT-DNA, του συμπλόκου (3) και της αλληλεπίδρασης τους σε αναλογίες  $r = [\text{Ru}]/[\text{DNA}] = 0.1, 0.3$  και  $0.5$ . Καθώς το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  δεν είναι οπτικά ενεργά παρατηρείται μια ευθεία γραμμή στο φάσμα του. Καθώς η αναλογία  $r$  αυξάνεται, παρατηρούνται μεταβολές στις χαρακτηριστικές ταινίες του CT-DNA στα 278 και 245 nm. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του συμπλόκου αυτού δεν είναι πολύ σημαντικές δείχνοντας ότι η έλικα παραμένει Β-τύπου. Σε αναλογία  $r = 0.1$  το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  δεν προκαλεί πρακτικά μεταβολή στις ταινίες του Β-DNA στα 278 και 245 nm που σχετίζονται με τη συσσώρευση των βάσεων και την περιέλιξη της έλικας του Β-DNA αντίστοιχα. Καθώς αυξάνεται η αναλογία σε 0.3 και 0.5 παρατηρείται μείωση στην ένταση της ταινίας στα 278 nm, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην σχετική αποσυσώρευση των βάσεων. Η ανταλλαγή των αντισταθμιστικών ιόντων των φωσφορικών ομάδων με το κατιονικό υδρόφοβο, λόγω των πολυπυριδινικών υποκαταστατών, σύμπλοκο δημιουργεί αλλαγές στο υδατικό περιβάλλον των φωσφορικών ομάδων επιφέροντας γενικά απομάκρυνση των βάσεων<sup>288</sup>. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν κατά την αλληλεπίδραση ενός κατιονικού λιπιδίου με CT-DNA<sup>289</sup>. Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού που καταγράφηκαν κατά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  με το DNA φαίνονται στο σχήμα 6.24.



Σχήμα 6.24. Φάσμα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (3) σε διάφορες αναλογίες  $r = [\text{Ru}]/[\text{DNA}]$ .

Επιπλέον, λόγω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης του κατιονικού ογκώδους συμπλόκου του ρουθηνίου που βρίσκεται κοντά στο DNA, είναι πιθανό να προκαλείται διακοπή των CW-δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων και το ξετύλιγμα της διπλής έλικας. Αυτό αντανακλά την μικρή αύξηση της ελλειπτικότητας της ταινίας στα 245 nm, που όπως αναφέρθηκε σχετίζεται με την περιέλιξη της έλικας του DNA.

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 5 η φασματοσκοπία  $^{23}\text{Na}$  και  $^{31}\text{P}$ -NMR αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων διαφόρων ενώσεων με το DNA <sup>271</sup>. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  με μικρά τμήματα CT-DNA. Κατά την προσθήκη του συμπλόκου και καθώς αυξάνεται η αναλογία του με το DNA προκαλείται διαπλάτυνση της κορυφής του  $^{31}\text{P}$ . Το εύρος της κορυφής μεταβάλλεται από  $\Delta\nu_{1/2} = 76$  Hz όταν η αναλογία  $r = 0$  σε  $\Delta\nu_{1/2} = 374$  Hz για αναλογία  $r = 0.4$ . Η διαπλάτυνση αυτή οφείλεται στην αυξανόμενη διασπορά των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων  $^{31}\text{P}$  εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  με το DNA.



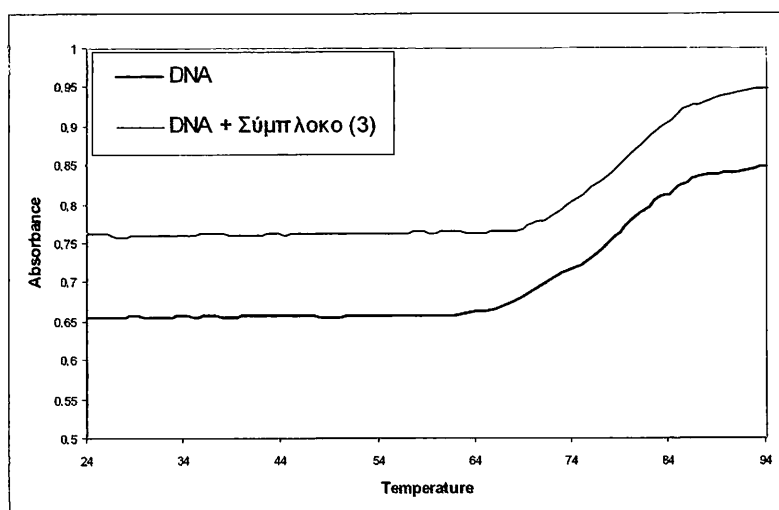
Σχήμα 6.25. Φάσματα  $^{31}\text{P}$  και  $^{23}\text{Na}$  NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (3) σε διάφορες αναλογίες r.



Κατά την αλληλεπίδραση αυτή επηρεάζεται το περιβάλλον των φωσφόρων στους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και έτσι υπάρχουν μη ισοδύναμοι πυρήνες φωσφόρου που δίνουν διαφορετικό σήμα. Τα διαφορετικά αυτά σήματα λόγω μιας ενδιάμεσης κινητικής, δεν εμφανίζονται ως πολλές διακριτές ταινίες αλλά ως μια αρκετά διευρυμένη κορυφή. Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της χημικής μετατόπισης γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην ασθενή αλληλεπίδραση του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  με το DNA που πιθανόν περιορίζεται στην ηλεκτροστατική. Στην περίπτωση πιο ισχυρών αλληλεπιδράσεων με το DNA όπως παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις ή απευθείας δεσμό έχουν παρατηρηθεί σημαντικές μετατοπίσεις της κορυφής του πυρήνα  $^{31}\text{P}^{290}$ , γεγονός που δεν παρατηρήθηκε κατά τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του συμπλόκου (**3**) με το DNA.

Στα πειράματα της φασματοσκοπίας  $^{23}\text{Na}$  NMR προσδιορίστηκε το εύρος στο μισό του ύψους της κορυφής  $^{23}\text{Na}$  για το DNA για αναλογία  $r=[\text{Ru}]/[\text{DNA}]=0, 0.1, 0.2, 0.3$  και  $0.4$ . Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.25., όσο η αναλογία αυξάνεται, το εύρος  $\Delta\nu_{1/2}$  μειώνεται και συγκεκριμένα από  $\Delta\nu_{1/2} = 23$  Hz που είναι στο ελεύθερο DNA μεταβάλλεται σε  $\Delta\nu_{1/2} = 9$  Hz όταν η αναλογία  $r = 0.4$ . Το γεγονός αυτό, δείχνει τη μεταβολή των ιόντων  $\text{Na}^+$  που υπάρχουν στο διάλυμα ελεύθερα αλλά και αυτών που αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του DNA. Το θετικά φορτισμένο σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  προκαλεί μια μη αντιστρεπτή διαφοροποίηση στο συνολικό φορτίο του πολυανιονικού βιολογικού μορίου, αντικαθιστώντας ιόντα  $\text{Na}^+$ . Το φαινόμενο αυτό είναι υπεύθυνο για την ελάττωση του πλάτους στο μισό του ύψους  $\Delta\nu_{1/2}$  της κορυφής του πυρήνα  $^{23}\text{Na}$  καθώς αυξάνεται η αναλογία συμπλόκου-DNA δείχνοντας μια ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA. Κατά τη μελέτη του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$  που αναφέρεται στο κεφάλαιο 5, ο ρυθμός μεταβολής της διαλέπτυνσης της κορυφής  $^{23}\text{Na}$  του ανάλογου συντονισμού είναι μεγαλύτερος, πιθανόν λόγω και της ένταξης του συμπλόκου στο DNA.

Οι αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  με CT-DNA μελετήθηκαν, και με τις καμπύλες τήξης του DNA προκειμένου να διαπιστωθεί η σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση της έλικάς του. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι καμπύλες τήξης του DNA απουσία και παρουσία του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  σε αναλογία  $r = 0.1$ . Η θερμοκρασία τήξης του DNA απουσία των συμπλόκων βρέθηκε  $78^\circ\text{C}$ .

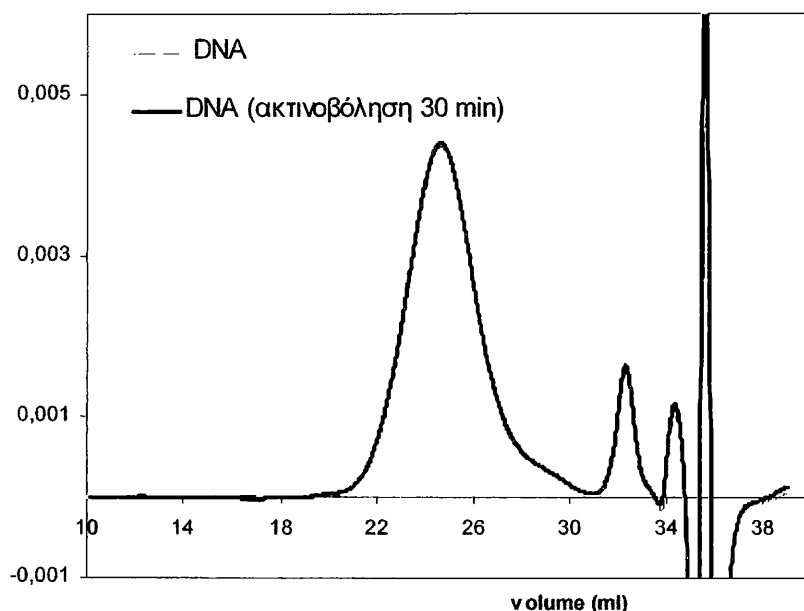


Σχήμα 6.26. Καμπύλες τήξης του DNA απουσία και παρουσία του συμπλόκου (3).

Κατά τη προσθήκη των συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebrpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  σε αναλογία  $r = 0.3$  το σημείο τήξης του DNA προσδιορίστηκε και  $79^\circ\text{C}$ . Η τιμή  $\Delta T_m$  παρατηρήθηκε είναι σχετικά μικρή και έτσι αποκλείει την περίπτωση ισχυρής αλληλεπίδρασης, όπως παρεμβολής του συμπλόκου μεταξύ των βάσεων του DNA. Σύμπλοκα τα οποία εντάσσονται με απευθείας δεσμό στις βάσεις του DNA προκαλούν μια μεταβολή στο σημείο τήξης του DNA κατά  $\Delta T_m = -2^\circ\text{C}$ <sup>277</sup>, ενώ το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{dppz})]^{2+}$  που παρουσιάζει μια τιμή  $\Delta T_m = -5.2^\circ\text{C}$ <sup>278</sup> βρίσκεται στα όρια μεταξύ της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με το DNA και της παρεμβολής του υποκαταστάτη  $\text{dppz}$  μεταξύ των βάσεων του. Για το σύμπλοκο  $\text{cis}(\text{Cl},\text{Cl})\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$  που εξετάστηκε στο κεφάλαιο 5, το οποίο εντάσσεται στις βάσεις του DNA ενώ αλληλεπιδρά και ηλεκτροστατικά με τις φωσφορικές ομάδες της διπλής έλικας βρέθηκε  $T_m = -3$ . Η ένταξη των συμπλόκων NAMI και RAP στις βάσεις του DNA προκαλούν μια μεταβολή στο σημείο τήξης του DNA κατά  $\Delta T_m = 14$  και  $11.5$  αντίστοιχα σε αναλογία  $r=0.1$ <sup>291</sup>. Οι μικρές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στο σημείο τήξης του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebrpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  μπορούν να εξηγηθούν με ασθενείς αλληλεπιδράσεις, όπως για παράδειγμα οι ηλεκτροστατικές.

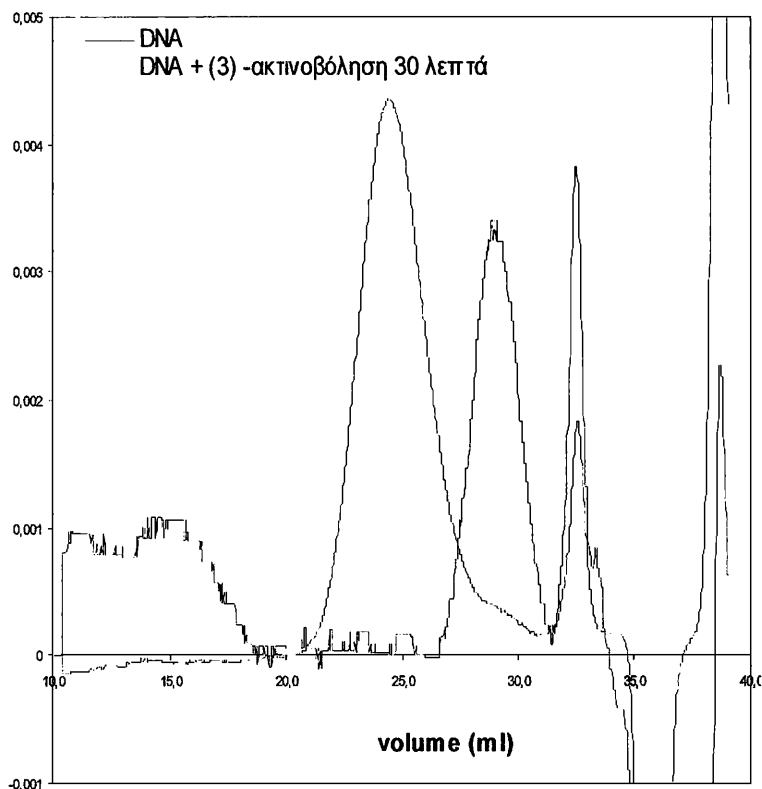
#### 6.4. Μελέτη της ακτινοβόλησης του συστήματος DNA-[Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)

Στην συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του ορατού φωτός κατά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) με το DNA χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές που παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω. Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε με λάμπα υδραργύρου για 30 λεπτά ενώ η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή. Ένα τυφλό δείγμα με διάλυμα μόνο του CT-DNA ακτινοβολήθηκε στις ίδιες συνθήκες για 30 λεπτά και στη συνέχεια αναλύθηκε χρωματογραφικά. Στο παρακάτω σχήμα δίνεται το χρωματογράφημα από το οποίο προκύπτει ότι η ακτινοβόληση δεν επιφέρει καμία μεταβολή στο μήκος της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας.



Σχήμα 6.27.  
Χρωματογράφημα του  
DNA με και χωρίς  
ακτινοβόληση.

Στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη του συμπλόκου (3) σε αναλογία  $r=0.1$  και το δείγμα ακτινοβολήθηκε για 30 λεπτά. Το χρωματογράφημα που λήφθηκε παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 6.28. Χρωματογράφημα του DNA και του συστήματος  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$ -DNA μετά την ακτινοβόληση του με λάμπα υδραργύρου.

Όπως γίνεται εμφανές από το χρωματογράφημα η ακτινοβόληση του συστήματος (3)-DNA επιφέρει κάποιες σημαντικές μεταβολές στο μοριακό βάρος του DNA. Το μέσο μοριακό βάρος που προσδιορίστηκε για το σύστημα αυτό ήταν 30200 Dalton ενώ το μέσο μοριακό βάρος του DNA, όπως έχει ήδη αναφερθεί, προσδιορίστηκε 126000 Dalton. Βλέπουμε λοιπόν, ότι η ακτινοβόληση προκαλεί μια μείωση στο μέσο μοριακό βάρος του βιολογικού μορίου γεγονός που δείχνει με τον καλύτερο τρόπο την κατάτμηση του σε μικρότερα μόρια.

Για να ενισχύσουμε την άποψη αυτή επαναλάβουμε τα πειράματα της φωτοπροκαλούμενης διάσπασης του DNA χρησιμοποιώντας ηλεκτροφορητικές μεθόδους με πλασμιδιακό DNA τύπου pUC9. Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες με μεγαλύτερο λόγο ( $r=0.25$ ). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης.



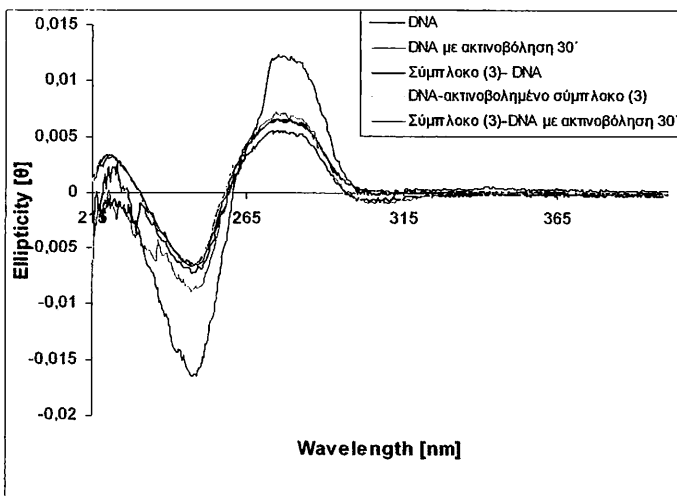
*Σχήμα 6.29. Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (3) και την ακτινοβόληση του με λάμπα υδραγύρου.*

Η λωρίδα α περιλαμβάνει το πλασμιδιακό DNA pUC9, η λωρίδα β πλασμιδιακό DNA pUC9 με ακτινοβόληση 30 λεπτών, η γ το σύστημα [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebrpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)-DNA σε αναλογία  $r=0.25$ , η δ το ίδιο σύστημα με ακτινοβόληση 30 λεπτών και η ε το σύστημα (3)-DNA σε αναλογία το  $r=0.25$ , μόνο που τώρα γίνεται η ανάμειξη του ακτινοβολημένου συμπλόκου (3) με το DNA και όχι η ακτινοβόληση του όλου συστήματος όπως στη λωρίδα δ. Το πλασμιδιακό DNA pUC9 εμφανίζεται στην θέση 1, η χαλαρωμένη του μορφή στην ταινία 2 και όταν το πλασμιδιακό DNA παύει να είναι κυκλικό και είναι πλέον γραμμικό εμφανίζεται στην ταινία 3. Βλέπουμε λοιπόν, ότι η ακτινοβόληση προκαλεί το κόψιμο του πλασμιδιακού DNA pUC9 φαινόμενο που δεν παρατηρείται κατά την ακτινοβόληση του πλασμιδιακού DNA απουσία του συμπλόκου, αλλά ούτε και κατά τη προσθήκη του ακτινοβολημένου συμπλόκου στο DNA. Στην λωρίδα δ εμφανίζεται η ταινία 3 που αντιστοιχεί στο γραμμικό DNA γεγονός που δείχνει ότι η ακτινοβόληση του συμπλόκου κατά την προσθήκη του στο pUC9 προκαλεί το κόψιμο της δίκλωνης

κυκλικής του μορφής. Ένα ενδιαφέρον συμπέρασμα που μπορεί να προκύψει ακόμη είναι ότι το κόψιμο αυτό δεν οφείλεται στο φωτοπροϊόν του συμπλόκου αλλά πιθανόν σε κάποια σωματίδια που δημιουργούνται *in situ*, καθώς το ακτινοβολημένο σύμπλοκο δεν προκαλεί κόψιμο του πλασμιδιακού DNA.

Μια άλλη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της ακτινοβολήσης του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  στο DNA ήταν η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε, και στα πειράματα αυτά, με λάμπα υδραργύρου για 30 λεπτά, στην αναλογία  $r=[\text{Ru}]/[\text{DNA}]=0.1$  και την ίδια σταθερή θερμοκρασία. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα CD του DNA με και χωρίς ακτινοβολήση, του συστήματος DNA-(3) σε αναλογία  $r=0.1$  με και χωρίς ακτινοβολήση 30 λεπτών καθώς και του συστήματος DNA με το ήδη ακτινοβολημένο σύμπλοκο.

Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, η ακτινοβολήση με λάμπα υδραργύρου δεν επιφέρει μεταβολές στις ταινίες του DNA στα 278 και 245 nm. Συγκρίνοντας όμως τα φάσματα CD της αλληλεπίδρασης του DNA-(3) με και χωρίς ακτινοβολήση (κόκκινη και μπλε γραμμή) προκύπτει ότι δεν ταυτίζονται και ότι η ακτινοβολήση του συστήματος επιφέρει μεταβολές στην διαμόρφωση του DNA, σχετιζόμενες με την κατάτμηση του σε μικρότερα μόρια.



Σχήμα 6.30. Φάσματα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (3) με και χωρίς ακτινοβολήση.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της ακτινοβολήσης του συστήματος DNA- $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)_3$  διαφέρει από αυτό του DNA με το ήδη ακτινοβολημένο σύμπλοκο. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει το προηγούμενο συμπέρασμα για τον σχηματισμό *in situ* σωματιδίων που μπορεί να ευθύνονται για το κόψιμο του DNA.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>**

---

ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΠΥΡΙΔΙΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ  
ΤΟΥ ΡΟΥΘΗΝΙΟΥ ΜΕ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΑ  
ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΚΑΙ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

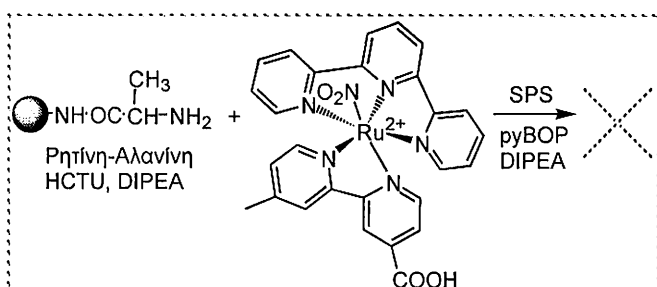
---

## 7.1. Μελέτη πολυπυριδινικών συμπλόκων του ρουθηνίου με συζευγμένο το αμινοξύ αλανίνη

### 7.1.1. Σύνθεση με τη μέθοδο της στερεάς φάσης και χαρακτηρισμός των συμπλόκων $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)X]^{+n}$ $X=Cl, NO, NO_2$

Στο Κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η σύζευξη του αμινοξέος αλανίνη και του πεπτιδίου GHK σε πολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου και μελετώνται οι αλληλεπιδράσεις τους με γραμμικό και πλασμιδιακό DNA. Πρέπει να σημειωθεί ότι η σύνθεση χλωροπολυπυριδινικών συμπλόκων του ρουθηνίου με την τεχνική της στερεάς φάσης δεν έχει αναφερθεί ως τώρα στην βιβλιογραφία. Η διαφορά από τις γνωστές μεθόδους σύνθεσης πολυπυριδινικών συμπλόκων του Ru, Rh κ.λ.π με τη μέθοδο της στερεάς φάσης βρίσκεται στον χλωρο υποκαταστάτη της περίπτωσης των χλωροπολυπυριδινικών συμπλόκων που δημιουργεί πρόσθετα συνθετικά προβλήματα. Στην μελέτη αυτή παρουσιάζεται αναλυτικά η σύνθεση χλωροπολυπυριδινικών συμπλόκων του ρουθηνίου με συζευγμένα αμινοξέα και πεπτίδια με τη μέθοδο της σύνθεσης σε στερεά φάση. Η τεχνική αυτή αποτελεί μια εύχρηστη και γρήγορη τεχνική σύνθεσης συμπλόκων του ρουθηνίου, ενώ πιθανότατα μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα μέταλλα.

Μετά τη σύνθεση και τη μελέτη των συμπλόκων  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$  (**2**) και  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  (**3**) που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 6, έγινε προσπάθεια σύζευξης του απλού αμινοξέος αλανίνη στα παραπάνω σύμπλοκα. Η σύζευξη πραγματοποιήθηκε στην καρβοξυλομάδα του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy. Αρχικά, έγινε προσπάθεια σύζευξης του αμινοξέος αλανίνη στο σύμπλοκο  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  βάσει γνωστής μεθόδου της βιβλιογραφίας<sup>245 248</sup>, κατά την οποία το αμινοξύ αλανίνη ακινητοποιείται στην ρητίνη και αντιδρά με το σύμπλοκο αφού ενεργοποιηθεί η καρβοξυλομάδα του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy.

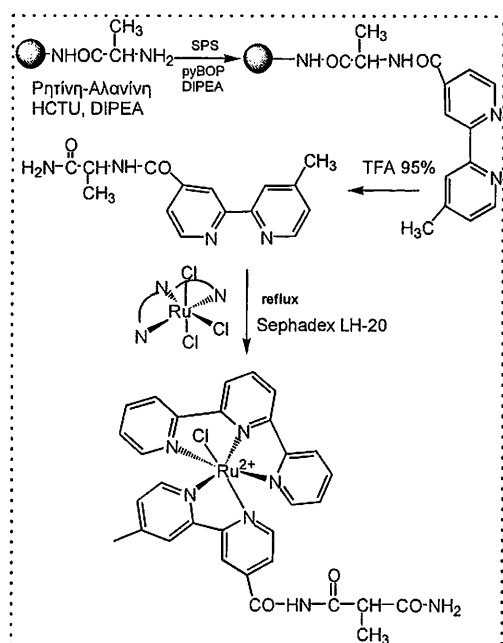


Σχήμα 7.1. Μη επιτυχής αντίδραση σύζευξης της αλανίνης στο σύμπλοκο του ρουθηνίου.



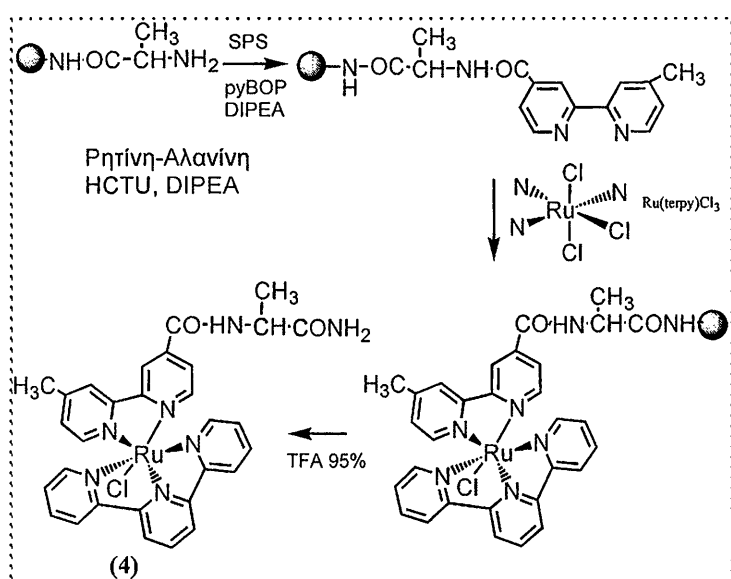
Η αντίδραση αυτή δεν ήταν επιτυχής, πιθανόν λόγω την ευαισθησίας της νιτρο-ομάδας στις συνθήκες που χρησιμοποιούνται κατά τη σύζευξη, οι οποίες είναι αρκετά δραστικές λόγω των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά την πεπτιδική σύνθεση. Κατά τον χαρακτηρισμό των προϊόντων της αντίδρασης διαπιστώθηκε η απόσπαση της νιτρο ομάδας με φασματοσκοπία υπερύθρου αλλά και η σύζευξη του αμινοξέος δεν ήταν επιτυχής. Έτσι, η μέθοδος αυτή δεν απέδωσε το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Κατόπιν επιχειρήθηκε η τεχνική που παρουσιάζεται στο σχήμα 7.2. Σύμφωνα με αυτή, η αλανίνη ακινητοποιήθηκε στην ρητίνη και ακολούθησε η σύζευξη με τον υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy ενεργοποιώντας την καρβοξυλομάδα του υποκαταστάτη με τα αντιδραστήρια ενεργοποίησης της πεπτιδικής σύνθεσης. Η σύζευξη ήταν επιτυχής, όπως διαπιστώθηκε με το test Kaiser. Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε το κόψιμο του υποκαταστάτη 4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy από τη ρητίνη με TFA και αφού χαρακτηρίστηκε πλήρως πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του με το [Ru(terpy)Cl<sub>3</sub>]. Με τον τρόπο αυτό συντέθηκε το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl]<sup>+</sup> αλλά και κάποια παραπροϊόντα της αντίδρασης, τα οποία απομακρύνθηκαν με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων. Έτσι, αφού το σύμπλοκο καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 απομονώθηκε ως το εξαφθοροφωσφορικό του άλας. Η παραπάνω διαδικασία ήταν επιτυχής αλλά παρουσίαζε κάποια μειονεκτήματα. Καταρχήν ήταν σχετικά δύσκολη και χρονοβόρα, ενώ η διαδικασία καθαρισμού απαιτούσε υψηλό κόστος με πολύ μικρές αποδόσεις. Το μεγαλύτερο όμως πρόβλημα, στην στρατηγική αυτή σύνθεσης, ήταν στην σύζευξη πιο σύνθετων αμινοξέων της αλανίνης που παρουσιάζουν πλευρικές ομάδες.



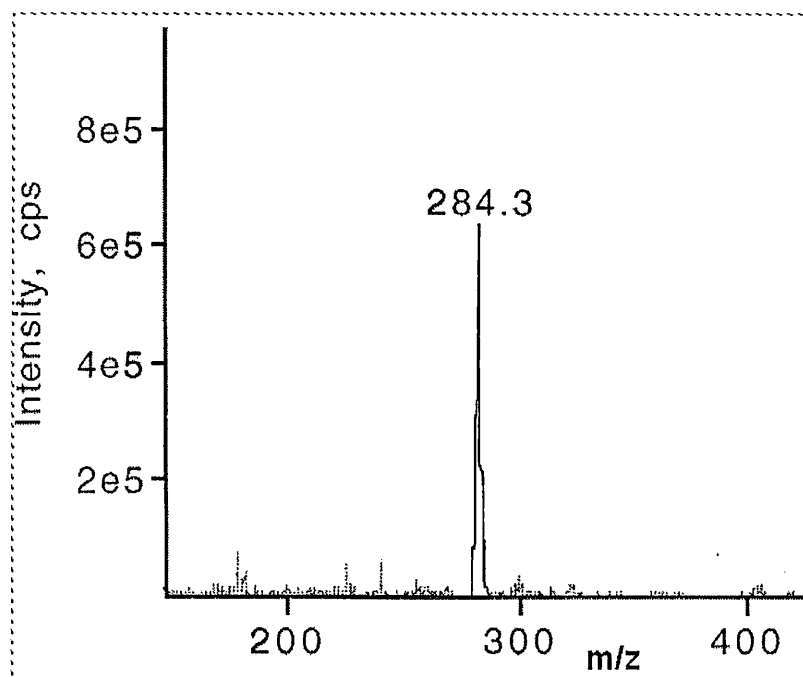
Σχήμα 7.2. Επιτυχής αντίδραση σύζευξης της αλανίνης στο σύμπλοκο του ρουθηνίου.

Κατά το κόψιμο του υποκαταστάτη 4-COXCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy, όπου X=αμινοξέα ή πεπτίδια απομακρύνονται και οι προστατευτικές ομάδες και έτσι κατά την αντίδραση με το [Ru(terpy)Cl<sub>3</sub>] θα ήταν πιθανή η ένταξη και των πλευρικών ομάδων στο ρουθίνιο, γεγονός που περιέπλεκε τη σύνθεση και δημιούργησε πολλά παραπροϊόντα. Έτσι, αυτή η στρατηγική σύνθεσης κρίθηκε μη εφαρμόσιμη στην περίπτωση πιο σύνθετων αμινοξέων και ιδιαίτερα του πεπτιδίου GHK, αφού θα μπορούσε ή ιστιδίνη που περιέχει ιμιδαζολικό δακτύλιο να ενταχθεί στο ρουθίνιο. Για το λόγο αυτό, επιχειρήθηκε η σύνθεση όλου του συμπλόκου σε στερεά φάση και έγινε κατά κάποιο τρόπο το «χτίσιμο» όλου του συμπλόκου πάνω στη ρητίνη. Η διαδικασία αυτή παριστάνεται στο παρακάτω σχήμα 7.3. Σύμφωνα με τη στρατηγική αυτή, μετά την σύζευξη του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy, δεν πραγματοποιείται κόψιμο από τη ρητίνη αλλά η αντίδραση συνεχίζεται σε στερεά φάση. Έτσι, κατά την αντίδραση με μεγάλη περίσσεια [Ru(terpy)Cl<sub>3</sub>] και την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη της αντίδρασης, που βρέθηκε το μίγμα διμεθυλφορμαμιδίου-αιθανόλης, συντίθεται το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl]<sup>+</sup>, το οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο στην ρητίνη και αποτελεί το μόνο δυνατό προϊόν. Ακολουθούν πολλές πλύσεις για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων και της περίσσειας των αντιδραστηρίων και με τον τρόπο αυτό το σύμπλοκο μπορεί να απομονωθεί καθαρό χωρίς τη χρήση χρωματογραφικών στηλών. Η απόδοση, επίσης, της αντίδρασης είναι αρκετά ικανοποιητική και υψηλότερη από αυτή που προσδιορίστηκε κατά την δεύτερη κατά σειρά διαδικασία σύνθεσης που παρουσιάστηκε παραπάνω. Το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl]<sup>+</sup>, κόπηκε από τη ρητίνη με TFA και καταβυθίστηκε σε αιθέρα, ενώ απομονώθηκε και το εξαφθοροφωσφορικό του άλας.



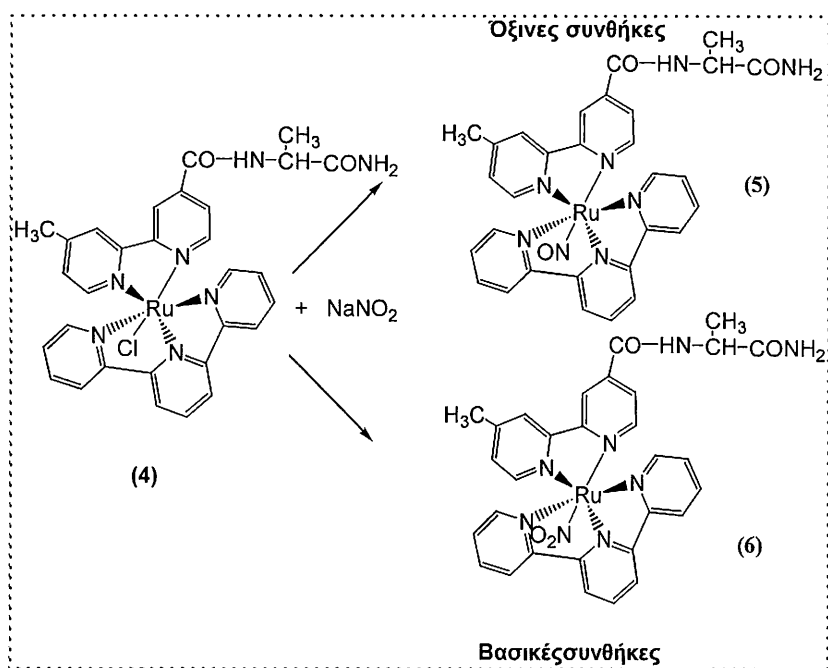
Σχήμα 7.3. Αντίδραση σύζευξης της αλανίνης στο σύμπλοκο του ρουθηνίου.

Το προϊόν κάθε σταδίου χαρακτηρίστηκε πλήρως αφού κοβόταν μια μικρή ποσότητα από τη ρητίνη κάθε φορά με τη χρήση του τριφθοροξικού οξέος. Επίσης, οι αποπροστασίες των αμινομάδων και οι συζεύξεις κάθε σταδίου επιβεβαιωνόταν με το test Kaiser. Στο στάδιο της σύνθεσης του υποκαταστάτη 4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy πραγματοποιείται το κόψιμο του από τη ρητίνη και ο χαρακτηρισμός του προϊόντος πριν την αντίδραση με το [Ru(terpy)Cl<sub>3</sub>]. Έτσι το μοριακό βάρος του υποκαταστάτη 4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy και η καθαρότητα του πιστοποιήθηκε με την τεχνική LC-MS. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του φαίνονται στον Πίνακα που ακολουθεί. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το φάσμα ESI-MS του υποκαταστάτη 4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy μετά το κόψιμο του από τη ρητίνη.



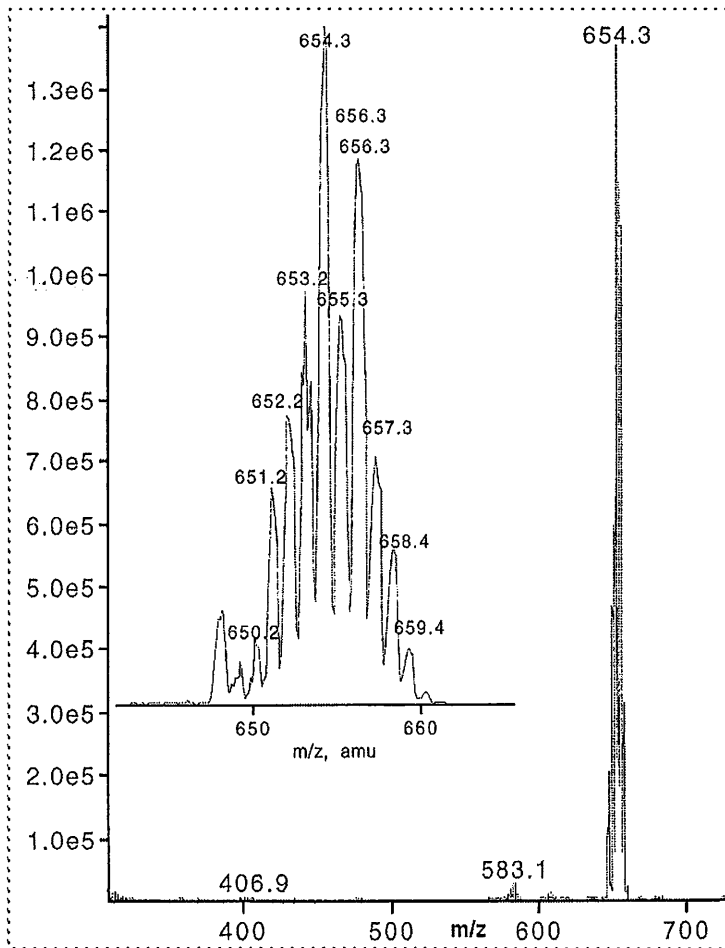
Σχήμα 7.4. Φάσμα ESI-MS του υποκαταστάτη 4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy.

Μετά τον χαρακτηρισμό του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (**4**) πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των συμπλόκων [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (**5**) και [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) (**6**), όπως φαίνεται στο σχήμα 7.5. Η σύνθεση των δυο αυτών συμπλόκων πραγματοποιείται μετά την αντικατάσταση του χλωρίου από το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>), η οποία γίνεται σε pH ~ 2 για το νιτροσουλ-σύμπλοκο και σε pH ~ 12 για τη σύνθεση του νιτρο. Στο παρακάτω σχήμα παριστάνεται η αντίδραση σύνθεσης των συμπλόκων (**5**) και (**6**).



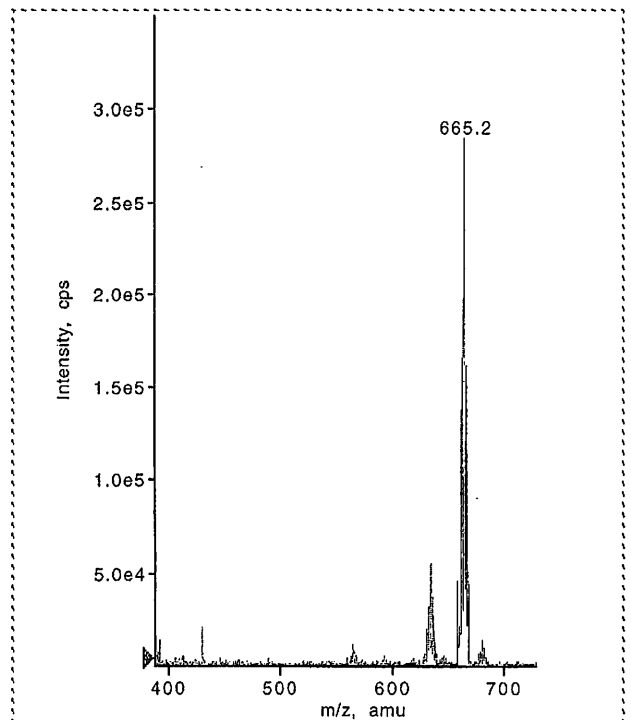
Σχήμα 7.5. Αντίδραση  
σύνθεσης των  
συμπλόκων (5) και (6).

Τα σύμπλοκα (4), (5) και (6) χαρακτηρίστηκαν με διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές μεθόδους, όπως φασματομετρία LC-MS, φασματοσκοπίες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, υπερύθρου και υπεριώδους-ορατού. Στο χρωματογράφημα των συμπλόκων παρατηρήθηκε η ύπαρξη των δυο ισομερών θέσης που προκύπτουν από τη δυνατότητα ένταξης του υποκαταστάτη 4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy με δυο τρόπους. Τα δυο ισομερή διαφέρουν ως προς τον προσανατολισμό του αμινοξέος αλανίνη σε σχέση με τη σφαίρα ένταξης του ρουθηνίου. Στο ένα ισομερές ο δακτύλιος με την 4'-μεθυλομάδα βρίσκεται στο ισημερινό επίπεδο του οκταεδρικού συμπλόκου του Ru(II), ενώ στην περίπτωση του άλλου ισομερούς βρίσκεται ο δακτύλιος με την 4-COAlaCONH<sub>2</sub>. Το γεγονός ότι πρόκειται για ισομερή θέσης γίνεται εμφανές από το φάσμα ESI-MS, όπου εμφανίζεται μια μόνο ταινία σε  $m/z$  που αντιστοιχεί μια μοριακή μάζα. Στα παρακάτω σχήματα δίνονται τα φάσματα ESI-MS των συμπλόκων [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) και [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>), όπου φαίνονται μια ταινία σε  $m/z = 654$  και μια ταινία σε  $m/z = 665$  και αντιστοιχούν στα κατιόντα [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl]<sup>+</sup> και [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, όπως διαπιστώθηκε και από την ισοτοπική κατανομή των ταινιών.

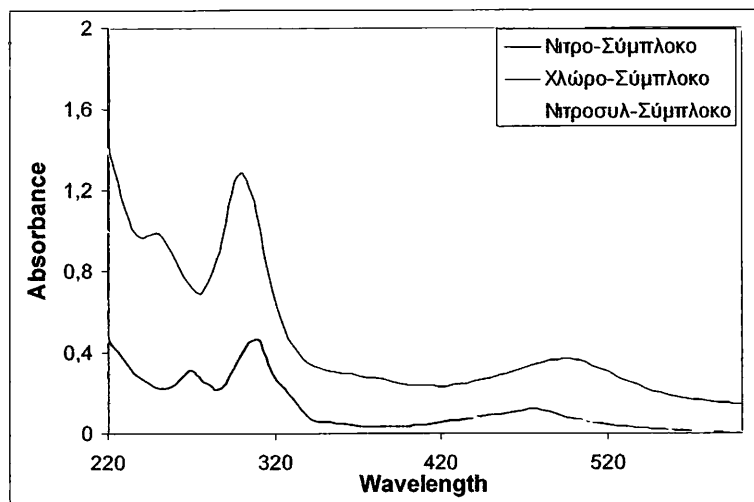


Σχήμα 7.6. Φάσμα ESI-MS του κατιονικού συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)Cl]^+$ .

Σχήμα 7.7. Φάσμα ESI-MS του κατιονικού συμπλόκου (6).



Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα υπεριώδους ορατού και των τριών συμπλόκων που μελετώνται στο Κεφάλαιο αυτό.



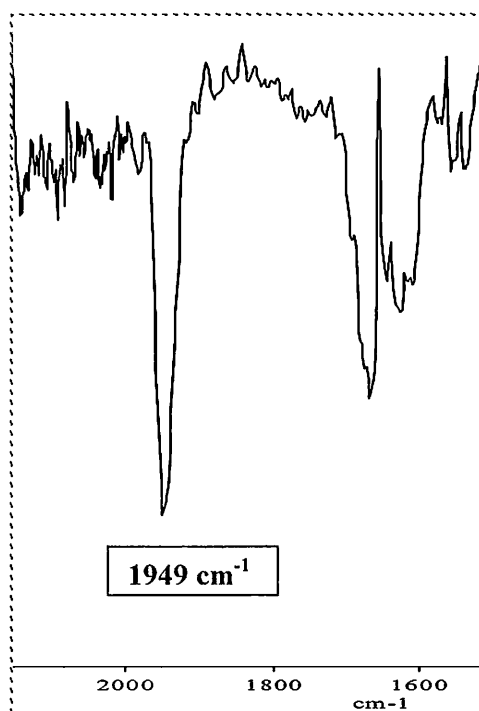
Σχήμα 7.8. Φάσματα υπεριώδους ορατού των συμπλόκων (4), (5) και (6).

Οι ταινίες που παρατηρούνται στην περιοχή 270-300 nm και στα τρία σύμπλοκα αντιστοιχούν σε εσωτερικές μεταπτώσεις του υποκαταστάτη τερπυριδίνη (intraligand)  $\pi \rightarrow \pi^*$  (terpy),  $\pi \rightarrow \pi^*$  (bpy), όπως εξάλλου έχει παρατηρηθεί και σε άλλα ανάλογα πολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου<sup>166,264</sup>. Στο σύμπλοκο (5) παρατηρείται ακόμη μια ταινία στα 355 nm που αντιστοιχεί στην MLCT ταινία  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$ <sup>129,166</sup>. Στο σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  η αντίστοιχη ταινία εμφανίστηκε στα 349 nm δείχνοντας ότι η σύζευξη του αμινοξέος στην διπυριδίνη δεν επηρεάζει σημαντικά την ενέργεια των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων στην σφαίρα ένταξης του μετάλλου. Αντίστοιχα, στο σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  η ταινία στα 474 nm αντιστοιχεί σε MLCT ταινία  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2)$ , χαρακτηριστική των πολυπυριδινο νιτρο-συμπλόκων του ρουθηνίου<sup>166</sup> και εμφανίζεται πολύ κοντά σε εκείνη του συμπλόκου χωρίς το συζευγμένο αμινοξύ  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  (475 nm). Αναλυτικά οι ταινίες των συμπλόκων παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1. Χαρακτηριστικές ταινίες των φασμάτων υπεριώδους-ορατού των συμπλόκων (4), (5) και (6).

Σύμπλοκο	$\lambda_{\max}$
$[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}]^+$ $\text{CH}_3\text{CN}$	270 $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{terpy})$ 305 $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ 355 $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^* \text{NO}$
$[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2]^+$ $\text{CH}_3\text{CN}$	270 $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligand 279 $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligand 310 $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{terpy})$ 330 $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ 474 $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^* \text{NO}_2$
$[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}]^+$ $\text{H}_2\text{O}$	249 $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligand 299 $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{terpy})$

Τα σύμπλοκα  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  και  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  χαρακτηρίστηκαν και με φασματοσκοπία υπερέθρου. Η ταινία της δόνησης τάσης του δεσμού N-O στο σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  παρατηρήθηκε στα  $1949 \text{ cm}^{-1}$ , ενδεικτική του τρόπου ένταξης του NO στο κέντρο του ρουθηνίου ως  $\text{NO}^+$ . Στο σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  η ταινία της δόνησης τάσης του δεσμού N-O παρατηρήθηκε στα  $1955 \text{ cm}^{-1}$ . Η μετατόπιση αυτή, δεν είναι σημαντική και δείχνει μικρή επίδραση στην δραστικότητα του NO από την υποκατάσταση του πυριδινικού δακτυλίου στην 4 θέση με την AlaCONH<sub>2</sub>. Στο σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  παρατηρήθηκαν οι ταινίες δόνησης τάσης του δεσμού N-O και ειδικότερα η ασύμμετρη  $\nu_{\text{as}}$  στα  $1449 \text{ cm}^{-1}$  και η συμμετρική  $\nu_{\text{s}}$  στα  $1294 \text{ cm}^{-1}$ , ενώ μικρές σχετικά είναι οι διαφορές από το αντίστοιχο σύμπλοκο χωρίς το αμινοξύ  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ , όπου οι ταινίες αυτές παρατηρήθηκαν στα  $1419 \text{ cm}^{-1}$  και  $1272 \text{ cm}^{-1}$  αντίστοιχα. Στο παρακάτω σχήμα δίνεται τμήμα του φάσματος υπερέθρου του συμπλόκου (5) με τη χαρακτηριστική δόνηση τάσης του δεσμού N-O.



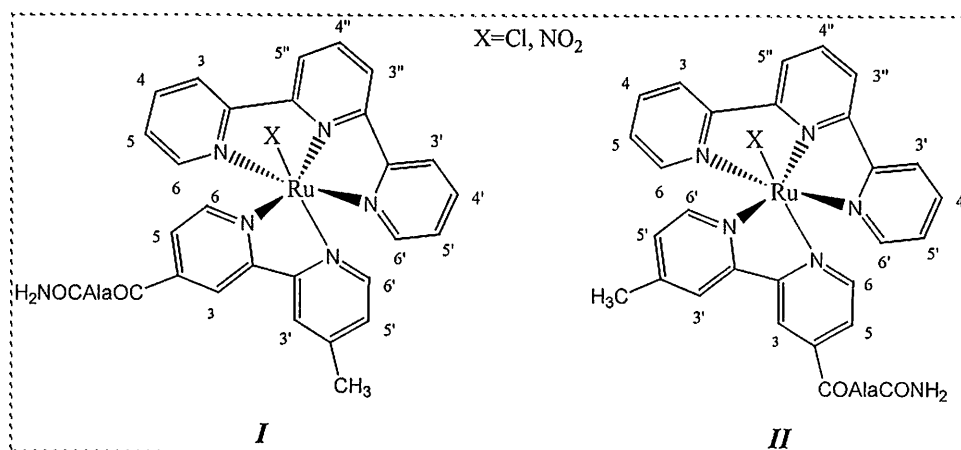
Σχήμα 7.9. Φάσμα υπερόθρου του συμπλόκου (5) με τη χαρακτηριστική δόνηση τάσης του δεσμού N-O.

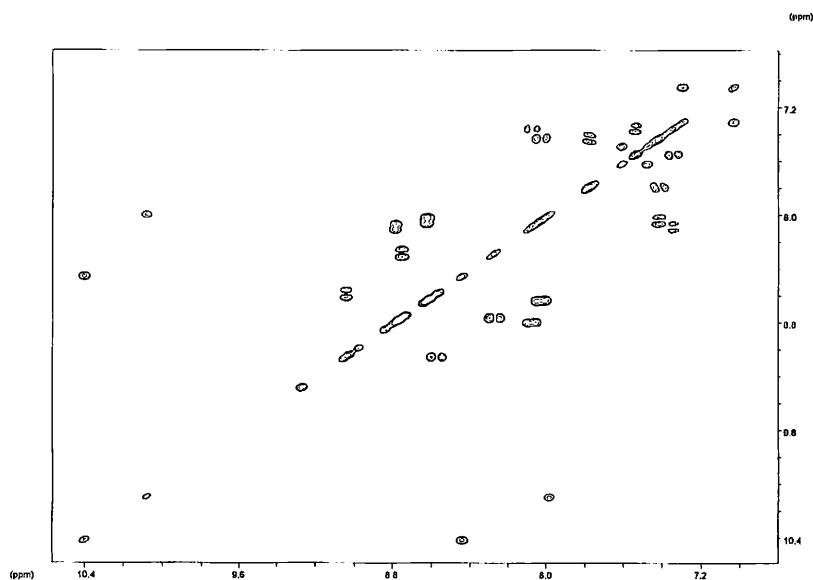
Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων με τη συζευγμένη αλανίνη έγινε και με φασματοσκοπία NMR. Το  $^1\text{H}$  NMR φάσμα του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  έδειξε δυο σήματα για κάθε πρωτόνιο του συμπλόκου που οφείλονται στην ύπαρξη των δυο ισομερών. Η προσπάθεια διαχωρισμού των δυο ισομερών έγινε με χρωματογραφία στήλης Sephadex LH20 βάσει της διαλυτότητας τους στους διαλύτες ακετονιτρίλιο και μεθανόλη. Η διαδικασία διαχωρισμού πραγματοποιήθηκε αρκετές φορές αλλά δυστυχώς ο διαχωρισμός τους δεν επιτεύχθηκε απόλυτα ποσοτικά. Η απόδοση των ταινιών στα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των πειραμάτων  $^1\text{H}^1\text{H-COSY}$  και  $^1\text{H}^1\text{H-TOCSY}$ . Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και των δυο ισομερών του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη καθώς και τμήμα του δισδιάστατου φάσματος δίνονται στον παρακάτω Πίνακα 7.2. και στο σχήμα 7.10 αντίστοιχα. Ανάλογα και το φάσμα NMR του συμπλόκου (6) έδειξε διπλούς συντονισμούς για τα πρωτόνια των υποκαταστατών, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη και των δυο ισομερών. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  φαίνονται στον Πίνακα 7.3. ενώ τμήμα του δισδιάστατου φάσματος δίνεται στο σχήμα 7.11.



Πίνακας 7.2.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz) χημικές μετατοπίσεις για τα δυο ισομερή του συμπλόκου (4).

	Αλανίνη	4- COAlaCONH 2-4'-Mebpy	Ισομερές I	Ισομερές II
4-CO <sub>2</sub> H-4'- Mebpy				
H <sub>6</sub>		8.83 (d)	10.41 (d)	9.03 (d)
H <sub>5</sub>		7.84 (d)	8.43 (d)	8.60 (d)
H <sub>3</sub>		8.42 (s)	9.28 (s)	7.41 (s)
H <sub>6'</sub>		8.55 (d)	9.05 (d)	10.07 (d)
H <sub>5'</sub>		7.81 (d)	8.54 (d)	7.99 (d)
H <sub>3'</sub>		8.38 (s)	7.03 (s)	8.98 (s)
4-Me		2.61 (s)	2.50 (s)	2.12(s)
Terpy				
H <sub>3</sub>			7.53 (d)	7.78 (d)
H <sub>3'</sub>			7.53 (d)	7.78 (d)
H <sub>4</sub>			7.33 (t)	7.41 (t)
H <sub>4'</sub>			7.33 (t)	7.41 (t)
H <sub>5,5'</sub>			8.07 (t)	8.01 (t)
H <sub>6,6'</sub>			8.77 (d)	8.61 (d)
H <sub>3''</sub>			8.74(d)	8.77 (d)
H <sub>4''</sub>			8.25 (m)	8.06 (m)
H <sub>5''</sub>			8.74 (d)	8.77 (d)
Αλανίνη				
α-CH-Ala	3.60 (m)	4.43 (m)	4.60 (m)	4.84 (m)
β-CH-Ala	1.45 (d)	1.42 (d)	1.53 (d)	1.71(d)

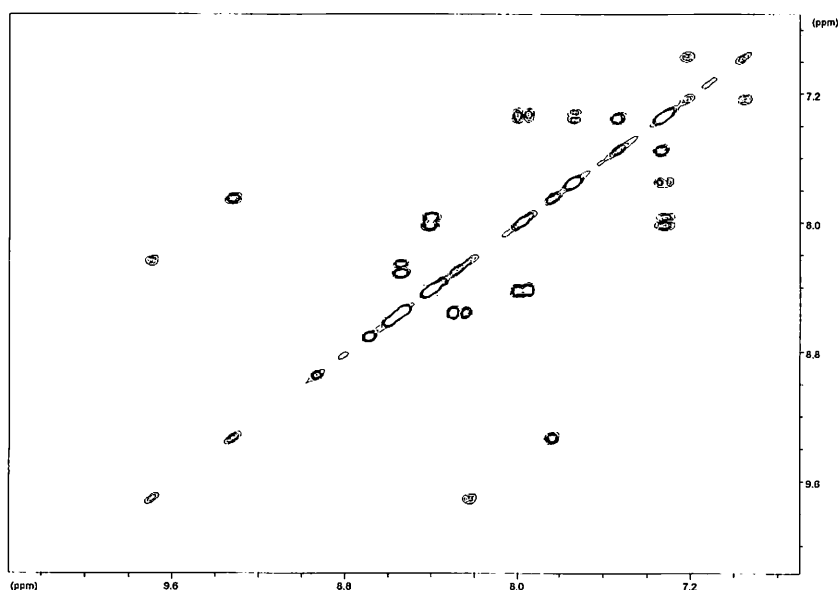




Σχήμα 7.10. Τμήμα του δισδιάστατου φάσματος του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$ .

Πίνακας 7.3.  $^1H$  NMR (300 MHz) χημικές μετατοπίσεις για τα δυο ισομερή του συμπλόκου (6).

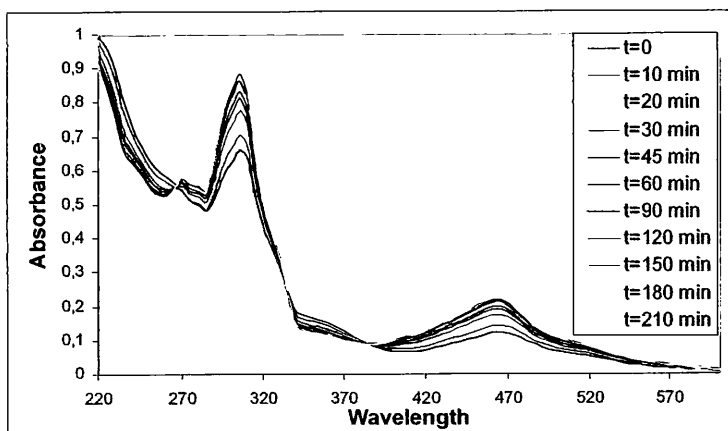
	Ισομερές I	Ισομερές II
4-CO <sub>2</sub> H-4'-		
Mebpy		
H <sub>6</sub>	9.69 (d)	7.21 (d)
H <sub>5</sub>	8.24 (d)	6.97 (d)
H <sub>3</sub>	8.92 (s)	7.76 (s)
H <sub>6</sub> '	8.54 (d)	9.31 (d)
H <sub>5</sub> '	8.28 (d)	7.85 (d)
H <sub>3</sub> '	8.60 (s)	8.70 (s)
4-Me	2.98 (s)	2.74(s)
Terpy		
H <sub>3</sub>	7.75 (d)	7.75 (d)
H <sub>3</sub> '	7.75 (d)	7.75 (d)
H <sub>4</sub>	7.31 (t)	7.31 (t)
H <sub>4</sub> '	7.31 (t)	7.31 (t)
H <sub>5,5</sub> '	8.00 (t)	8.00 (t)
H <sub>6,6</sub> '	8.40 (d)	8.40 (d)
H <sub>3</sub> ''	7.34(d)	7.34 (d)
H <sub>4</sub> ''	7.52 (m)	7.52 (m)
H <sub>5</sub> ''	7.34 (d)	7.34 (d)
Αλανίνη		
α-CH-Ala	4.45 (m)	4.97 (m)
β-CH-Ala	1.45 (d)	1.52(d)



Σχήμα 7.11. Τμήμα του δισδιάστατου φάσματος του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$ .

### 7.1.2. Φωτοχημεία του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$

Στο Κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε και η φωτοχημεία του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$  προκειμένου να διαπιστωθεί αν η σύζευξη της αλανίνης επιφέρει μεταβολές στη συμπεριφορά του συμπλόκου κατά την ακτινοβόληση με ορατό φως. Έτσι, διάλυμα ακετονιτριλίου του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$  ακτινοβολήθηκε με λάμπα υδραργύρου, καταγράφοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα τα φάσματα υπεριώδους-ορατού έως ότου το φάσμα δεν παρουσίαζε πρακτικά καμιά μεταβολή. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η ταινία που παρατηρήθηκε στα 355 nm αντιστοιχεί στην MLCT ταινία  $d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(NO)$ .



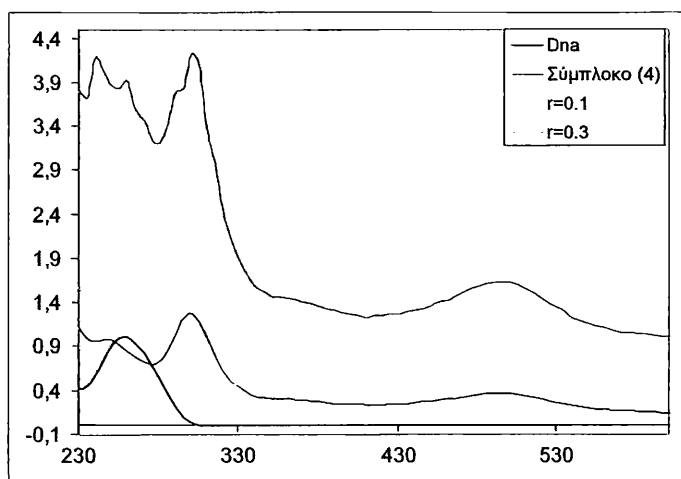
Σχήμα 7.12.  
Φάσματα υπεριώδους-ορατού της ακτινοβόλησης του συμπλόκου (5) σε  $CH_3CN$ .

Κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου σε ακετονιτρίλιο (Σχήμα 7.12.), η ταινία αυτή αλλάζει σημαντικά και συγκεκριμένα μειώνει την ένταση της, ενώ εμφανίζονται νέες ταινίες στα 305 και 459 nm. Η ταινία που εμφανίστηκε στα 459 nm αντιστοιχεί προφανώς στο προϊόν της φωτόλυσης και αποδίδεται στα επιδιαιλυτώμενα προϊόντα της φωτόλυσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί για άλλα νιτροσυλ-σύμπλοκα. Κατά την ακτινοβόληση, λοιπόν, του συμπλόκου το ενταγμένο NO αποσπάται από το σύμπλοκο του ρουθηνίου, όπως είδαμε και στα προηγούμενα σύμπλοκα. Η υποκατάσταση της αλανίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την φωτοαποδέσμευση του NO. Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου (5) είναι ανάλογες με αυτές που παρατηρήθηκαν και στα νιτροσυλ-σύμπλοκα *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl και [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Me<sub>2</sub>py)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> που μελετήθηκαν στα Κεφάλαια 5 και 6 αντίστοιχα, αλλά και σε ανάλογα σύμπλοκα της βιβλιογραφίας, όπως στα *cis*-[RuCl(NO)](bpy)<sub>2</sub><sup>2+</sup><sup>152,155</sup>, στο σύμπλοκο *cis*-[Ru(NO)(PaPy<sub>3</sub>)]<sup>2+</sup><sup>266</sup> και στο [RuCl(salen)(NO)]<sup>265</sup>. Στο φάσμα IR που λήφθηκε στο δείγμα, μετά το τέλος της ακτινοβόλησης, διαπιστώθηκε η απουσία της ταινίας στα 1949 cm<sup>-1</sup> που αντιστοιχεί στην συχνότητα δόνησης τάσης του δεσμού N-O επιβεβαιώνοντας, την απελευθέρωση του NO από το σύμπλοκο (5).

7.1.3. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$  (4) και  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  (6) με DNA

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο Κεφάλαιο, εξαιτίας της γνωστής ισορροπίας ανάμεσα στην NO και NO<sub>2</sub> μορφής των συμπλόκων του ρουθηνίου, που σε τιμές pH=7 προσεγγίζει σχεδόν αποκλειστικά την νιτρο μορφή, εκτελέσαμε τα βιολογικά πειράματα με το νιτρο και χλώρο σύμπλοκο και όχι το νιτροσουλ. Έτσι, μετά τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό τους πραγματοποιήθηκε η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των συμπλόκων  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$  και  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  με γραμμικό CT-DNA. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι φασματοσκοπίες UV-Vis, κυκλικού διχρωϊσμού (CD), <sup>23</sup>Na, <sup>31</sup>P-NMR και καμπύλες τήξης του DNA.

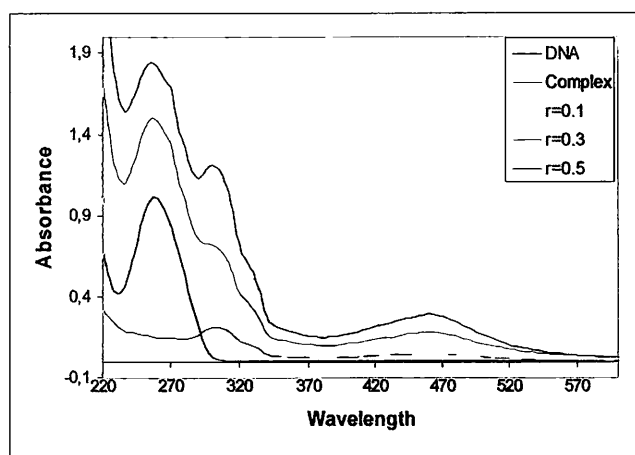
Το σύμπλοκο (4) είναι δυνατό να υδρολυθεί και να ενταχθεί στις βάσεις του DNA. Αντίθετα στο νιτρο σύμπλοκο  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)NO_2](PF_6)$  δεν υπάρχει αυτή η δυνατότητα και έτσι η αλληλεπίδραση του με το DNA είναι διαφορετικού τύπου. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα υπεριώδους-ορατού των δυο συμπλόκων με γραμμικό DNA σε διάφορες αναλογίες  $r=[Ru]/[DNA]$ . Όπως φαίνεται και στο σχήμα, η ταινία του DNA στα 260 nm μεταβάλλεται σημαντικά καθώς αυξάνεται η αναλογία  $r$ . Συγκεκριμένα σε αναλογία  $r = 0.1$  η ταινία του DNA μετατοπίζεται στα 255 nm ενώ σε αναλογία  $r = 0.3$  η ταινία αυτή αλλάζει ριζικά. Συγκεκριμένα μειώνει σημαντικά την ένταση της, ενώ εμφανίζεται μια νέα ταινία στα 239 nm. Έτσι, είναι πιθανό, καθώς αυξάνεται η αναλογία  $r$  και το σύμπλοκο  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$  εντάσσεται όλο και περισσότερο στις βάσεις του DNA, να αλλάζει η γεωμετρία του βιολογικού μορίου και έτσι η ταινία, που οφείλεται στις  $\pi \rightarrow \pi^*$  μεταπτώσεις των βάσεων του, να μετατοπίζεται στα 239 nm που αντιστοιχεί πλέον στην νέα γεωμετρία του. Μικρές μεταβολές παρατηρούνται στις ταινίες του συμπλόκου και συγκεκριμένα στην MLCT  $d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(terpy)$  ταινία στα 299 nm παρατηρήθηκε μια υπερχρωμία κατά 4% χωρίς όμως η ταινία να μετατοπιστεί. Η πιθανότητα αλληλεπίδρασης με παρεμβολή αποκλείεται στην περίπτωση του συμπλόκου (4) αφού σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με το DNA με παρεμβολή προκαλούν σημαντική υποχρωμία και μετατόπιση προς το ερυθρό<sup>285,286</sup>.



**Σχήμα 7.14.** Φάσματα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (4) σε διάφορες αναλογίες  $r = [Ru]/[DNA]$ .

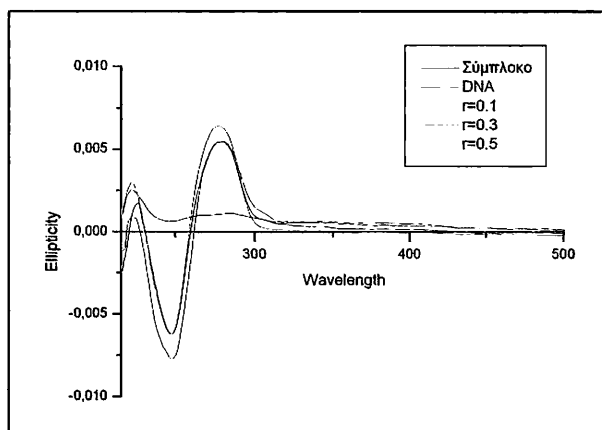
Αντίστοιχα μελετήθηκαν και οι αλληλεπιδράσεις του νιτρο συμπλόκου (6) με γραμμικό CT-DNA. Στο σχήμα 7.15. παρουσιάζονται τα φάσματα υπεριώδους-ορατού του συμπλόκου (6), του DNA και του συστήματος συμπλόκου-DNA σε διάφορες αναλογίες  $r$ . Σε αναλογία  $r = 0.1$  η ταινία του DNA αρχίζει να μετατοπίζεται προς το κυανό και παραμένει στα 255 nm όταν η αναλογία γίνεται ακόμη και  $r = 0.3$ . Η μετατόπιση αυτή μπορεί να οφείλεται όχι μόνο στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του κατιόντος  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebrpy)NO_2]^+$  με τις φωσφορικές ομάδες του DNA, αλλά και σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του Me της αλανίνης ή ακόμη σε δεσμούς υδρογόνου του ψευτοπεπτιδικού δεσμού με τις βάσεις του DNA. Στις ταινίες του συμπλόκου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές και συγκεκριμένα στην MLCT  $d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(NO_2)$  (455 nm) παρατηρήθηκε μια υπερχρωμία κατά 3% χωρίς η ταινία να μετατοπιστεί. Στην περίπτωση του ανάλογου συμπλόκου χωρίς το αμινοξύ αλανίνη  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebrpy)NO_2](PF_6)$ , που μελετήθηκε στο Κεφάλαιο 6, παρατηρήθηκε μια υποχρωμία στην ταινία μεταφοράς φορτίου MLCT (455 nm) του συμπλόκου κατά 15 %, ενώ δεν παρατηρήθηκε μετατόπιση προς την περιοχή του ερυθρού. Βλέπουμε λοιπόν, ότι η σύζευξη του αμινοξέος επιφέρει αλλαγές στην ένταση της ταινίας MLCT του συμπλόκου (6) αυξάνοντας ελαφρά την ένταση της (υπερχρωμία) ενώ το σύμπλοκο (3) προκαλεί μείωση της έντασης αυτής (υποχρωμία). Όπως ήδη αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 6, τα σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με το DNA με παρεμβολή προκαλούν υποχρωμία και μετατόπιση προς το ερυθρό όπως για παράδειγμα, τα σύμπλοκα  $[Ru(bpy)(\phi)_2]^{2+}$  <sup>285</sup> και  $[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$  <sup>286</sup>. Στην περίπτωση των συμπλόκων αυτών παρατηρείται υποχρωμία (20-30%) και μετατόπιση προς το ερυθρό κατά  $\Delta\lambda \sim 10$  nm. Τρις-χηλικά σύμπλοκα του Ru(II) με ογκώδεις

υποκαταστάτες που δεν μπορούν να πλησιάσουν τις αύλακες του DNA για να συνδεθούν με παρεμβολή παρουσιάζουν πολύ μικρή υποχρωμία  $H \sim 5\%$  και πρακτικά μηδενική μετατόπιση προς το ερυθρό<sup>287</sup>. Οι τιμές αυτές για  $\Delta H$  και  $\Delta\lambda$  αποδίδονται περισσότερο σε ηλεκτροστατικού τύπου αλληλεπιδράσεις. Επίσης, η ένταξη του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl, που μελετήθηκε στο Κεφάλαιο 5, συνοδευόταν από υποχρωμία  $\sim 24\%$  και μικρή μετατόπιση προς το ερυθρό στο ηλεκτρονικό του φάσμα. Συνεπώς, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα ηλεκτρονικά φάσματα των συμπλόκου (6) υποδεικνύουν ένα μάλλον ηλεκτροστατικό τρόπο αλληλεπίδρασης του με το DNA.



Σχήμα 7.15. Φάσματα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (6) σε διάφορες αναλογίες  $r = [Ru]/[DNA]$ .

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA καθώς και της γεωμετρίας του. Έτσι, καταγράφηκαν φάσματα CD κατά την προσθήκη των συμπλόκων [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) και [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) σε αναλογίες  $r = 0.1$ ,  $r = 0.3$  και  $r = 0.5$  (Σχήμα 7.16.). Κατά την προσθήκη του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) με το DNA σε αναλογία  $r = 0.1$  παρατηρείται μια σημαντική μείωση



του θετικού Cotton στην ταινία στα 278 nm ενώ δεν επηρεάζεται η ταινία στα 245 nm που οφείλεται στην διαμόρφωση Β-τύπου.

Σχήμα 7.16. Φάσμα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (4) σε διάφορες αναλογίες  $r = [Ru]/[DNA]$ .

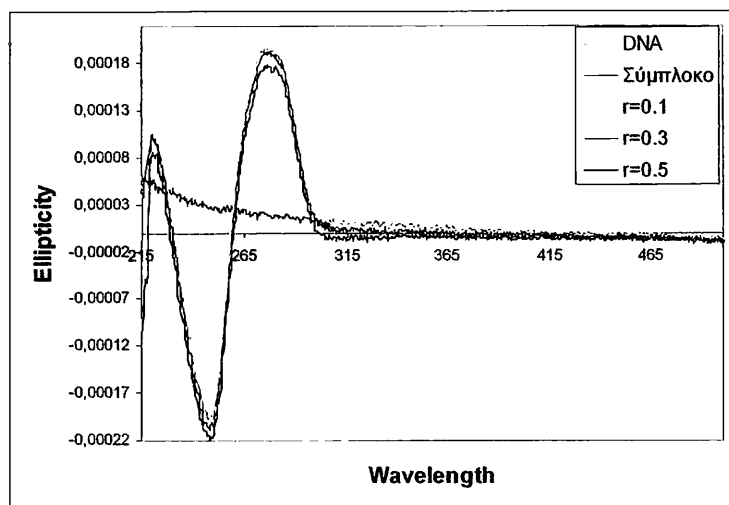
Όταν η αναλογία αυξάνεται και γίνεται  $r = 0.3$  η ταινία στα 278 nm δεν αλλάζει πλέον σημαντικά αλλά η ταινία στα 245 nm που αντιστοιχεί στο αρνητικό Cotton αυξάνεται γεγονός που υποδεικνύει ότι συμβαίνουν αλλαγές στην περιέλιξη της έλικας του B-DNA. Αυξάνοντας την αναλογία συμπλόκου-DNA σε  $r = 0.5$  παρατηρήθηκαν αλλαγές και στις δυο ταινίες, οι οποίες μπορούν να εξηγηθούν βάσει της μεταβολής στην συσσώρευση των βάσεων και των αλλαγών που προκαλούνται στην περιέλιξη της έλικας του B-DNA. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια μείωση της ελλειπτικότητας και στις δυο ταινίες στα 245 nm και 278 nm. Όπως εξάλλου αναμενόταν, η ένταξη του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebrpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  στις βάσεις του DNA επιφέρει τόσο απομάκρυνση των βάσεων μεταξύ τους, όσο και ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA. Αξίζει να σημειωθεί, ότι κατά την προσθήκη του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebrpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  στα δείγματα του DNA η ταινία στα 278 nm μειώνεται ομαλά με την αύξηση της αναλογίας  $r$  γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην σχετική αποσυσώρευση των βάσεων κατά την ένταξη του συμπλόκου σε αυτές. Αντίθετα, η ταινία στα 245 nm δεν μεταβάλλεται ομαλά. Σε αναλογία  $r = 0.1$  η ταινία δεν μεταβάλλεται σημαντικά, στη συνέχεια αυξάνεται ενώ σε αναλογία  $r = 0.5$  μειώνεται. Αυτό μπορεί ίσως να εξηγηθεί βάσει των πολλαπλών αλληλεπιδράσεων του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebrpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  με το DNA αφού εκτός από τον απευθείας δεσμό που σχηματίζει με τις βάσεις του και την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, είναι πιθανό να αλληλεπιδρά και το αμινοξύ αλανίνη. Είναι λοιπόν πιθανό, ο τύπος του B-DNA να αλλάζει σημαντικά κατά την προσθήκη όλο και μεγαλύτερης ποσότητας συμπλόκου. Αύξηση και μετά μείωση στις ταινίες του DNA έχει παρατηρηθεί στις περιπτώσεις συμπλόκων που εντάσσονται στις βάσεις του DNA, όπως σύμπλοκα λευκοχρύσου<sup>292</sup>. Η μείωση αυτή έχει εξηγηθεί βάσει των μεταβολών που επέρχονται στην δευτεροταγή δομή του B-DNA<sup>292</sup>.

Στην περίπτωση του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$ , που μελετήθηκε στο Κεφάλαιο 5, που επίσης εντάσσεται στις βάσεις του DNA παρατηρήθηκαν ανάλογες μεταβολές στην ταινία στα 278 nm λόγω της αποσυσώρευσης των βάσεων που προκαλείται κατά την ένταξη του συμπλόκου.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού και για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebrpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  με το DNA. Τα φάσματα CD στην περίπτωση του συμπλόκου αυτού καταγράφηκαν σε συνθήκες ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην



περίπτωση του χλωρο συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ . Όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα, η προσθήκη του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  στο DNA επιφέρει μεταβολές και στις δυο χαρακτηριστικές ταινίες του. Συγκεκριμένα σε αναλογία  $r = 0.1$  η ταινία στα 278 nm και 245 nm δεν μεταβάλλονται σημαντικά. Καθώς η αναλογία όμως αυξάνεται σε  $r = 0.3$  και  $r = 0.5$  η ταινία στα 278 nm αρχίζει να μειώνεται, ενώ η αρνητική ταινία αυξάνεται γεγονός που δείχνει ότι το DNA αλλάζει γεωμετρία και προφανώς δεν συνεχίζει να είναι Β-τύπου.

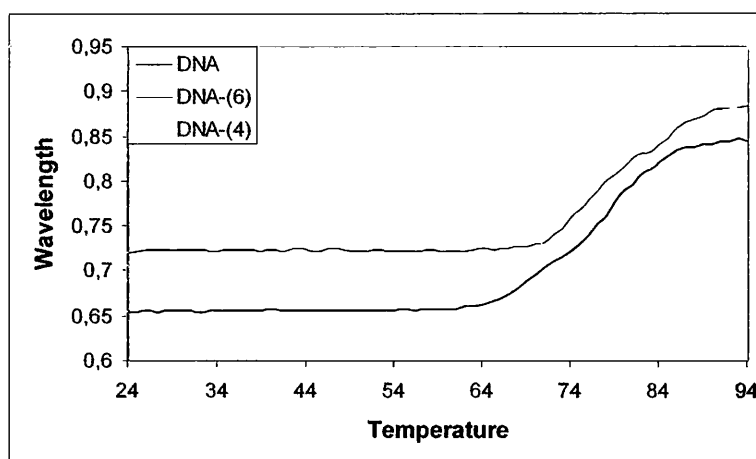


Σχήμα 7.17. Φάσμα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (6) σε διάφορες αναλογίες  $r = [\text{Ru}]/[\text{DNA}]$ .

Στο αντίστοιχο σύμπλοκο χωρίς το αμινοξύ αλανίνη  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  παρατηρήθηκε επίσης μια μείωση στην ένταση της ταινίας στα 278 nm γεγονός που αποδόθηκε στη σχετική αποσυσώρευση των βάσεων κατά την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του συμπλόκου (3) με το DNA. Στην ένταση της ταινίας στα 245 nm δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή. Βλέπουμε λοιπόν ότι η σύζευξη της αλανίνης, στην περίπτωση του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  επηρεάζει τον τρόπο αλληλεπίδρασης του όλου συμπλόκου με το DNA. Είναι πιθανό, κατά την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  με το DNA σε συνδυασμό και με τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της συζευγμένης αλανίνης ή τους δεσμούς υδρογόνου που μπορεί να σχηματίσει, να προκαλείται διακοπή των δεσμών υδρογόνου-CW μεταξύ των βάσεων και έτσι το ξετύλιγμα της διπλής έλικας. Στο φαινόμενο αυτό

είναι πιθανό να οφείλεται η αλλαγή στην ένταση της ταινίας στα 245 nm, που όπως αναφέρθηκε σχετίζεται με την περιέλιξη της διπλής έλικας του DNA.

Οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  και  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  με CT-DNA μελετήθηκαν ακόμη και με τη μέθοδο των καμπυλών τήξης, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση τους στο σημείο τήξεως του DNA. Αυτό αντιπροσωπεύει την σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας παρουσία των συμπλόκων. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι καμπύλες τήξης του DNA κατά την προσθήκη των συμπλόκων (4) και (6) σε αναλογία  $r = 0.1$ . Το σημείο τήξης του DNA  $T_m$  προσδιορίστηκε κατά την προσθήκη των συμπλόκων (4) και (6) υπολογίστηκε 74 και 77 °C αντίστοιχα. Η θερμοκρασία τήξης του DNA απουσία των συμπλόκων βρέθηκε 78 °C.



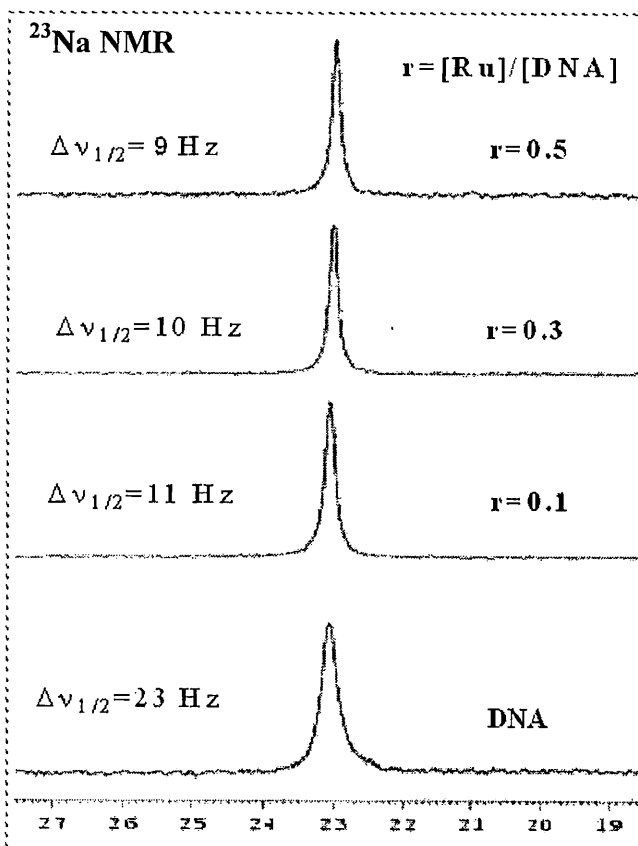
**Σχήμα 7.18.**  
Καμπύλες τήξης του DNA απουσία και παρουσία των συμπλόκων (4) και (6).

Έτσι, το σύμπλοκο (4) που εντάσσεται στις βάσεις του DNA παρουσίασε  $\Delta T_m = -4^\circ\text{C}$ . Ανάλογη τιμή παρατηρήθηκε και στο σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$ , που εξετάστηκε στο κεφάλαιο 5, και συγκεκριμένα με τιμή  $\Delta T_m (T_m(\text{Ru}) - T_m) = -3^\circ\text{C}$ . Σύμπλοκα τα οποία εντάσσονται με απευθείας δεσμό στις βάσεις του DNA, όπως το μελετούμενο σύμπλοκο (4), μεταβάλλουν το σημείο τήξης του DNA κατά  $\Delta T_m = -2^\circ\text{C}$ <sup>277</sup>.

Η τιμή  $\Delta T_m = -1^\circ\text{C}$  που παρατηρήθηκε κατά την προσθήκη του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  στο DNA είναι παρόμοια του ανάλογου συμπλόκου χωρίς τη συζευγμένη αλανίνη, στο οποίο όμως παρατηρήθηκε αύξηση του σημείου τήξης κατά  $\Delta T_m = +1^\circ\text{C}$ . Το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{dppz})]^{2+}$

παρουσιάζει μια τιμή  $\Delta T_m = -5.2 \text{ }^\circ\text{C}$ <sup>278</sup> και βρίσκεται στα όρια μεταξύ της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με το DNA και της παρεμβολής στις βάσεις του. Η μικρή μεταβολή που παρατηρήθηκε στο σημείο τήξης του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (6) μπορεί να εξηγηθεί, όπως και στην περίπτωση του συμπλόκου (3), μόνο με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις σε συνδυασμό ίσως με μια μικρή επίδραση του συζευγμένου αμινοξέος.

Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων (4) και (6) με γραμμικό DNA μελετήθηκαν και με τις φασματοσκοπίες <sup>31</sup>P NMR και <sup>23</sup>Na NMR. Κατά την προσθήκη των συμπλόκων (4) και (6) στα δείγματα του DNA είναι δυνατόν να προκληθούν κάποιες μεταβολές στην χημική μετατόπιση του πυρήνα <sup>31</sup>P, αλλά και διαπλάτυνση της κορυφής του λόγω της αυξανόμενης διασποράς των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων <sup>31</sup>P. Επίσης, και τα δυο σύμπλοκα είναι θετικά φορτισμένα, και έτσι λόγω της ανταλλαγής ιόντων Na<sup>+</sup> στο περιβάλλον του B-DNA, είναι δυνατό με τη φασματοσκοπία <sup>23</sup>Na NMR να διαπιστωθεί η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση τους με το DNA. Οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν και για τα δυο σύμπλοκα ήταν  $r=0.1$  έως  $0.5$ .



Στο σχήμα 7.19. παρουσιάζονται τα φάσματα <sup>23</sup>Na NMR κατά τη προσθήκη του συμπλόκου (4) στα δείγματα του DNA καθώς και του DNA χωρίς την προσθήκη συμπλόκου ( $r=0$ ).

Σχήμα 7.19. Φάσματα <sup>23</sup>Na NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (4) σε διάφορες αναλογίες  $r$ .

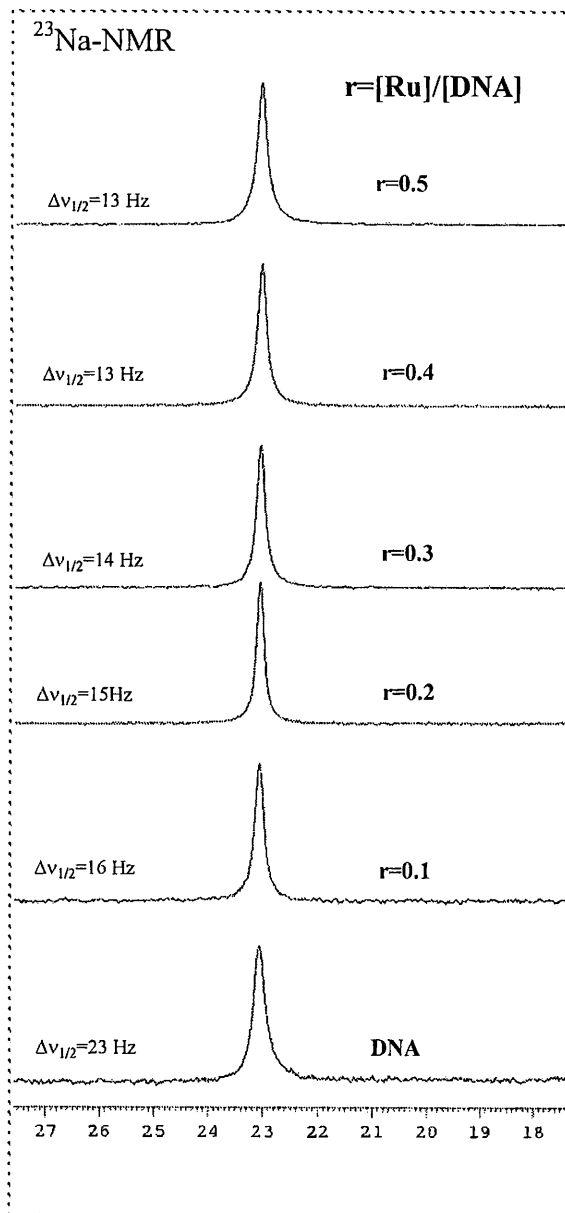
Στο φάσμα του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  και σε αναλογία  $r = 0.1$  διαπιστώθηκε διαλέπτυνση στο εύρος της κορυφής του  $^{23}\text{Na}$  κατά 12 Hz από  $\Delta\nu_{1/2} = 23$  Hz για το ελεύθερο DNA ( $r=0$ ) σε  $\Delta\nu_{1/2}=11$  Hz σε  $r=0.1$ . Όπως φαίνεται στο σχήμα 7.19., όταν η αναλογία αυξάνεται σε  $r = 0.3$  το εύρος προσδιορίστηκε  $\Delta\nu_{1/2} = 10$  Hz, ενώ σε  $r = 0.5$  δεν μεταβάλλεται πολύ και προσδιορίστηκε  $\Delta\nu_{1/2} = 9$  Hz. Ουσιαστικά δηλαδή, η αναλογία ενός κατιόντος συμπλόκου ανά 10 ζεύγη βάσεων DNA ( $r=0.1$ ) είναι εκείνη που επιφέρει τη μεγαλύτερη αλλαγή. Αυτό φαίνεται από το εύρος της διαλέπτυνσης της κορυφής του  $^{23}\text{Na}$  που προκαλείται καθώς αυξάνεται η αναλογία  $r$ , αφού σε αναλογία 0.3 και 0.5 δεν επέρχονται σημαντικές αλλαγές. Πραγματοποιείται δηλαδή, μια μεταβολή στα ιόντα  $\text{Na}^+$ , τα οποία αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του DNA, προκαλώντας μια μη αντιστρεπτή διαφοροποίηση στο συνολικό φορτίο του πολυανιονικού βιολογικού μορίου.

Ανάλογες μεταβολές σε πειράματα  $^{23}\text{Na}$ -NMR έχουν παρατηρηθεί και για άλλα σύμπλοκα της βιβλιογραφίας, όπως σε σύμπλοκα του λευκοχρύσου *cis*-DDP και *trans*-DDP, με το DNA <sup>276</sup> αλλά και στο σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$ . Η διαλέπτυνση της κορυφής  $^{23}\text{Na}$  είναι χαρακτηριστική στις περιπτώσεις της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης συμπλόκων με το DNA που στην περίπτωση μας ανταναικλά το αποτέλεσμα του ενταγμένου κατιόντος στο συνολικό φορτίο του DNA.

Μεταβολές όμως, παρατηρήθηκαν και στα πειράματα  $^{23}\text{Na}$ -NMR κατά τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  με το DNA.

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα  $^{23}\text{Na}$ -NMR σε διάφορες αναλογίες. Σε αναλογία  $r = 0.1$  το εύρος στο μισό της κορυφής προσδιορίστηκε  $\Delta\nu_{1/2}=16$  Hz σε σύγκριση με το δείγμα του DNA για  $r=0$ , το οποίο παρουσιάζει  $\Delta\nu_{1/2}=23$  Hz. Καθώς αυξάνεται η αναλογία σε  $r = 0.5$  (Σχήμα 7.20.) το εύρος της κορυφής του  $^{23}\text{Na}$  μειώνεται και συγκεκριμένα γίνεται  $\Delta\nu_{1/2} = 13$  Hz. Ουσιαστικά, η μεγαλύτερη διαλέπτυνση παρατηρήθηκε κατά την προσθήκη του συμπλόκου **(6)** σε αναλογία  $r = 0.1$ . Καθώς η αναλογία αυξάνεται δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στο εύρος της κορυφής  $^{23}\text{Na}$ . Βλέπουμε λοιπόν, ότι και στην περίπτωση του συμπλόκου αυτού, πραγματοποιείται μια μεταβολή στα ιόντα  $\text{Na}^+$ , αφού το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  είναι θετικά φορτισμένο. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και κατά τη μελέτη του θετικά

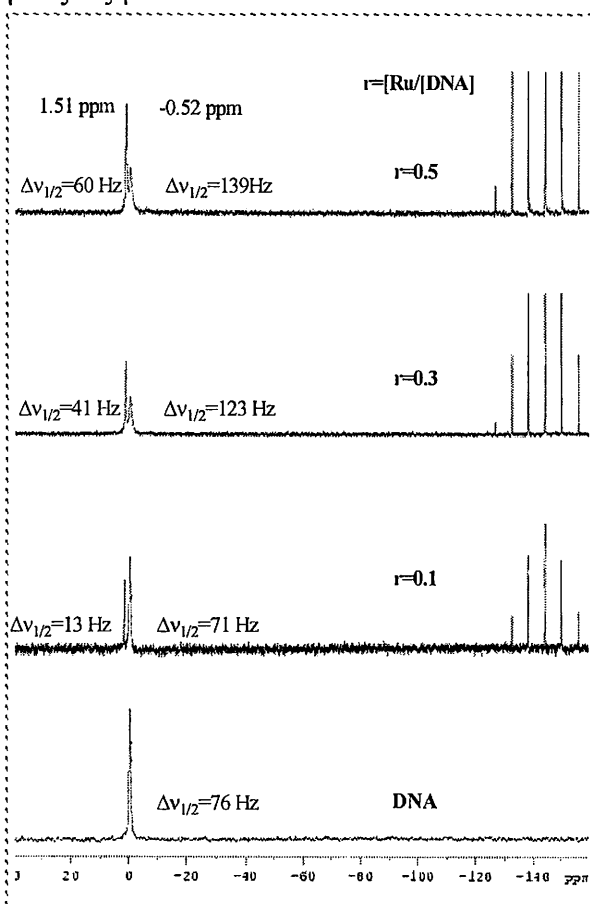
φορτισμένου συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ , χωρίς τη συζευγμένη αλανίνη. Συνεπώς, κατά την αλληλεπίδραση των συμπλόκων αυτών πραγματοποιείται μια μη αντιστρεπτή διαφοροποίηση στο συνολικό φορτίο του πολυανιονικού DNA, καθώς μεταβάλλεται η συγκέντρωση των ιόντα  $\text{Na}^+$  που αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του.



Σχήμα 7.20. Φάσματα  $^{23}\text{Na}$  NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (6) σε διάφορες αναλογίες  $r$ .

Η φασματοσκοπία  $^{31}\text{P}$  NMR είναι μια ακόμη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων των συμπλόκων (4) και (6) με γραμμικό DNA. Έτσι, κατά την προσθήκη αρχικά του χλωρο-συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4}'\text{-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  στα δείγματα του DNA λήφθηκαν τα φάσματα που φαίνονται στο παρακάτω σχήμα. Όπως φαίνεται, εμφανίστηκε μια καινούργια

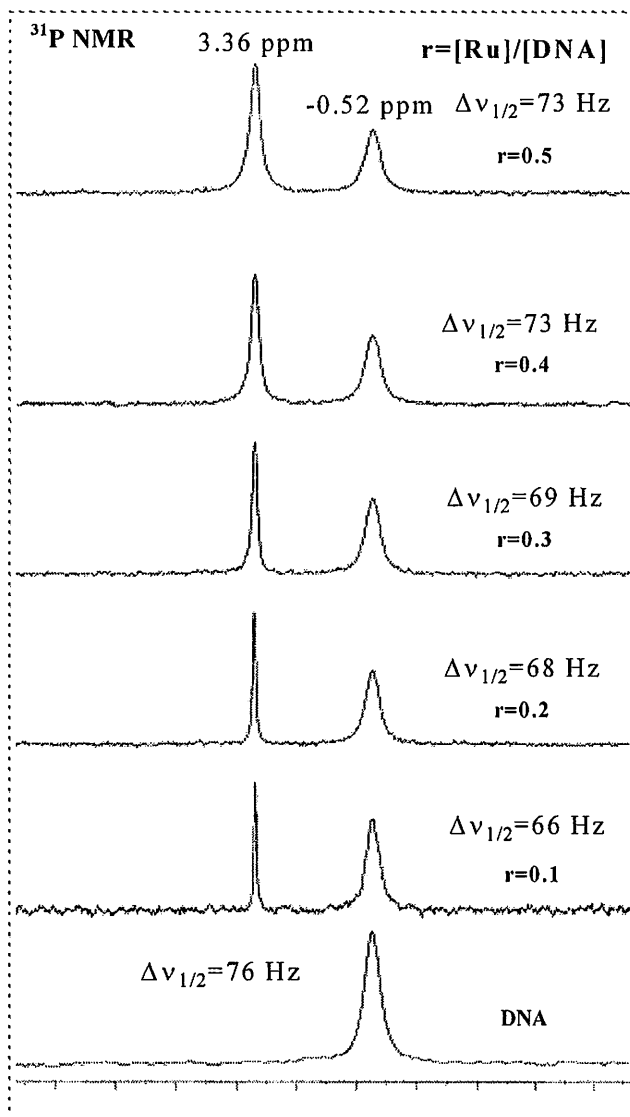
κορυφή, από την αναλογία  $r = 0.1$ , στα  $\delta$  1.51 ppm ( $\Delta\delta = -2.3$  ppm). Η ένταση της ταινίας αυξάνεται συνεχώς καθώς η αναλογία αυξάνεται, ενώ παράλληλα η ταινία στα -0.52 ppm που αντιστοιχεί στο ελεύθερο DNA μειώνεται. Συγχρόνως, η ταινία αυτή διευρύνεται σημαντικά από  $\Delta\nu_{1/2} = 76$  Hz για  $r = 0$  σε  $\Delta\nu_{1/2} = 139$  Hz για  $r = 0.5$ . Είναι προφανές, ότι στην περίπτωση αυτή, έχουμε δυο φαινόμενα που συμβαίνουν παράλληλα. Το μεν πρώτο είναι κινητικά αργό στην κλίμακα χρόνου του NMR, και γ'αυτό εμφανίζεται μια νέα ταινία μετατοπισμένη κατά  $\sim 2$  ppm σε χαμηλότερα πεδία. Η ταινία αυτή αφορά σε πυρήνες  $^{31}\text{P}$ , όπου το χημικό τους περιβάλλον έχει μικρότερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τους αρχικούς. Είναι γνωστό, ότι η ένταξη του λευκοχρύσου στο N7 της γουανίνης, για παράδειγμα, ακολουθείται από αποπροστασία του  $^{31}\text{P}$  της φωσφορικής της ομάδας και μετατόπιση σε χαμηλότερα πεδία ανάλογης τιμής. Βέβαια, το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε στις προηγούμενες περιπτώσεις χωρίς το συζευγμένο αμινοξύ, αν και πάλι η διαπλάτυνση είχε ερμηνευτεί όπως παραπάνω, σε μια ενδιάμεση όμως ή σχετικά γρήγορη κινητική. Το ερώτημα λοιπόν, δεν είναι γιατί έχουμε μετατόπιση της ταινίας του  $^{31}\text{P}$  σε χαμηλότερα πεδία αλλά γιατί η σύζευξη της αλανίνης κάνει την κινητική αυτή από γρήγορη στο σύμπλοκο χωρίς το συζευγμένο αμινοξύ σε αργή στο σύμπλοκο (4) με τη σύζευξη.



Σχήμα 7.21. Φάσματα  $^{31}\text{P}$  του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (4) σε διάφορες αναλογίες  $r$ .

Η ερμηνεία της παραπάνω παρατήρησης έχει να κάνει με την υψηλή εκλεκτικότητα που ίσως παρουσιάζει το σύμπλοκο για κάποιες βάσεις του DNA, η οποία συνδέεται με έναν ειδικό τρόπο που γίνεται η ένταξη και στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις του αμινοξέος με το DNA, όπως είναι οι υδρόφοβες της –Me αλλά και δεσμοί υδρογόνου, όπως αναφέραμε πιο πάνω. Είναι γνωστό ότι οι κινητικές τέτοιων αντιδράσεων είναι σχετικά αργές<sup>250</sup>. Έτσι, θα μπορούσε το σύμπλοκο να αλληλεπιδρά μέσω των πιο πάνω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με το DNA με μια αντίδραση αργής κινητικής, ενώ η ομοιοπολική ένταξη να γίνεται όπως είδαμε και στις προηγούμενες περιπτώσεις με μια ενδιάμεσης ταχύτητας κινητική. Ο διπλασιασμός του  $\Delta\nu_{1/2}$  της σταθερής ταινίας είναι το αποτέλεσμα της ομοιοπολικής ένταξης, όπως είδαμε και για το σύμπλοκο χωρίς το συζευγμένο αμινοξύ αλλά και για το σύμπλοκο (1).

Θα περίμενε κανείς, τα παραπάνω να επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου (6) με το DNA. Πράγματι, τα φάσματα <sup>31</sup>P NMR που λήφθηκαν στην περίπτωση του νιτρο-συμπλόκου [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebrpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) σε διάφορες αναλογίες φαίνονται στο σχήμα 7.22. Και στην περίπτωση του συμπλόκου αυτού εμφανίστηκε μια καινούργια ταινία στα  $\delta$  3.36 ppm ( $\Delta\delta = -3.88$  ppm), που αποδίδεται στους <sup>31</sup>P του συστήματος DNA/συμπλόκου. Η ταινία αυτή είναι μετατοπισμένη κατά ~4 ppm σε χαμηλότερα πεδία από την αρχική του ελεύθερου DNA. Η εμφάνιση της ταινίας αυτής παραπέμπει σε αργή κινητική, ενδεικτική των αλληλεπιδράσεων μέσω δεσμών υδρογόνου ή υδρόφοβων. Η αρχική ταινία στα 0.52 ppm δεν μετατοπίζεται ουσιαστικά, ενώ υφίσταται μια διαπλάτυνση στα όρια του πειραματικού σφάλματος. Το φαινόμενο αυτό ανταναικλά την ιδιαιτερότητα του συμπλόκου αυτού να μην εντάσσεται ομοιοπολικά στο DNA. Έτσι, παρατηρείται ουσιαστικά μόνο το φαινόμενο της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου εξαιτίας του αμινοξέος με το DNA. Στο σχήμα 7.22. παρουσιάζονται τα φάσματα <sup>31</sup>P NMR κατά τη προσθήκη του συμπλόκου (6) στα δείγματα του DNA, καθώς και του DNA χωρίς την προσθήκη συμπλόκου ( $r=0$ ).



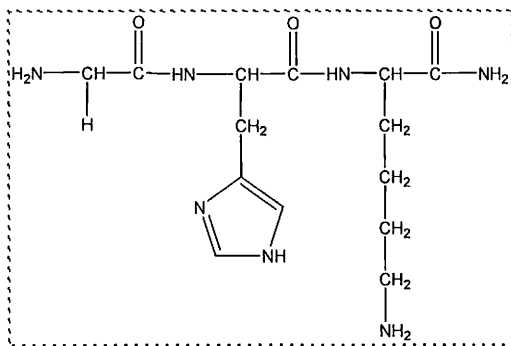
Σχήμα 7.22. Φάσματα  $^{31}\text{P}$  του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (6) σε διάφορες αναλογίες  $r$ .



## 7.2. Μελέτη πολυπυριдино-συμπλόκων του ρουθηνίου με συζευγμένο το πεπτιδίο GHK

### 7.2.1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός των συμπλόκων $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebrpy)X]^{+n}$ $X=Cl$ (7), $NO$ (8), $NO_2$ (9)

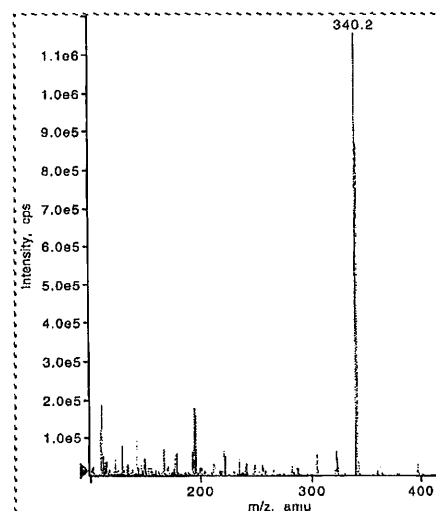
Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η σύζευξη του πεπτιδίου γλυκίνη-ιστιδίνη-λυσίνη (GHK) στο σύμπλοκο  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebrpy)X](PF_6)_n$ , όπου  $X= Cl$ ,  $NO_2$  και  $NO$  με  $n=1, 1$  και  $3$  αντίστοιχα. Η σύζευξη πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο, όπως και στη περίπτωση της αλανίνης που παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 7.1.1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του πεπτιδίου βάσει του πρωτοκόλλου που παρουσιάστηκε στο πειραματικό μέρος. Το πεπτιδίο GHK επιλέχθηκε γιατί είναι ρυθμιστικός παράγοντας ανάπτυξης και διαμεμβρανικός μεταφορέας. Έτσι, θα είχε σημαντικές πιθανότητες να αλληλεπιδρά με βιολογικά μόρια όπως το DNA. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται ο συντακτικός τύπος του πεπτιδίου GHK.



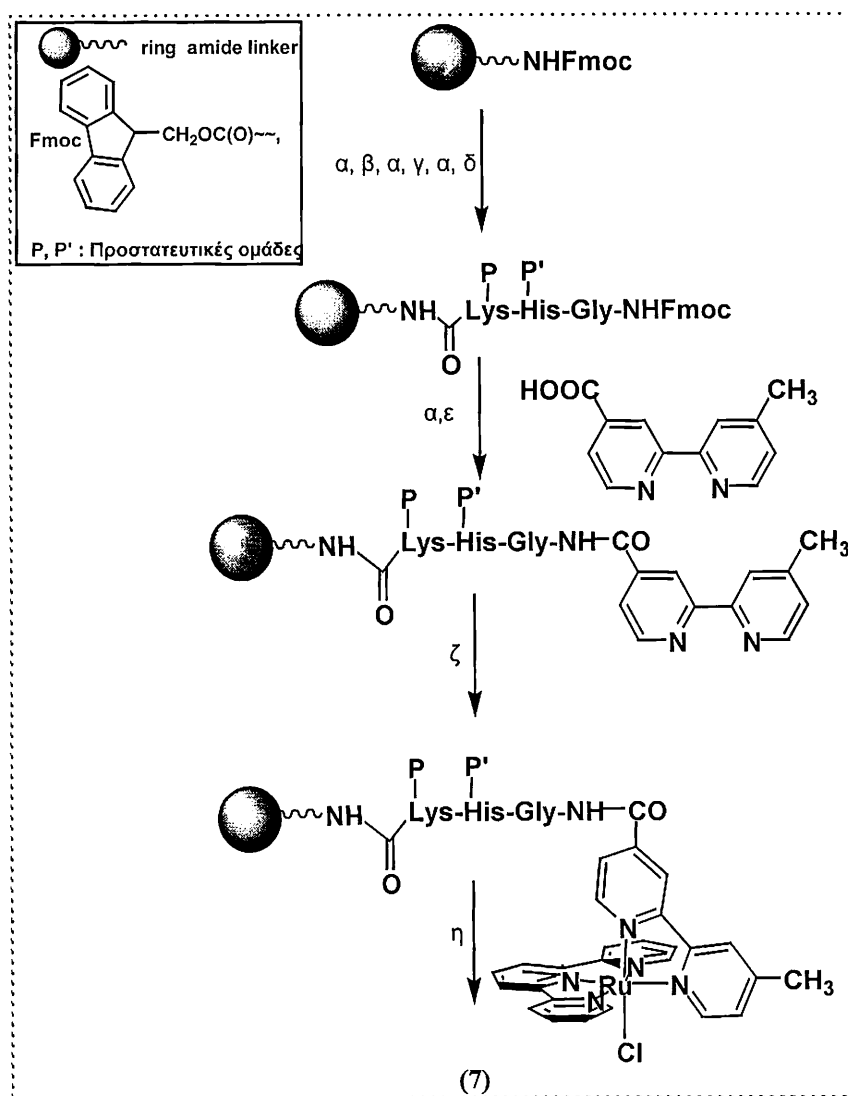
Σχήμα 7.23. Δομή του πεπτιδίου GHK.

Η καθαρότητα του πεπτιδίου και η μοριακή του μάζα ελέγχθηκαν με την τεχνική LC-MS. Επίσης, το πεπτιδίο GHK χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία  $^1H$  NMR και οι χημικές μετατοπίσεις του φαίνονται στον Πίνακα. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το φάσμα ESI-MS του πεπτιδίου.

Σχήμα 7.24. Φάσμα ESI-MS του πεπτιδίου GHK.

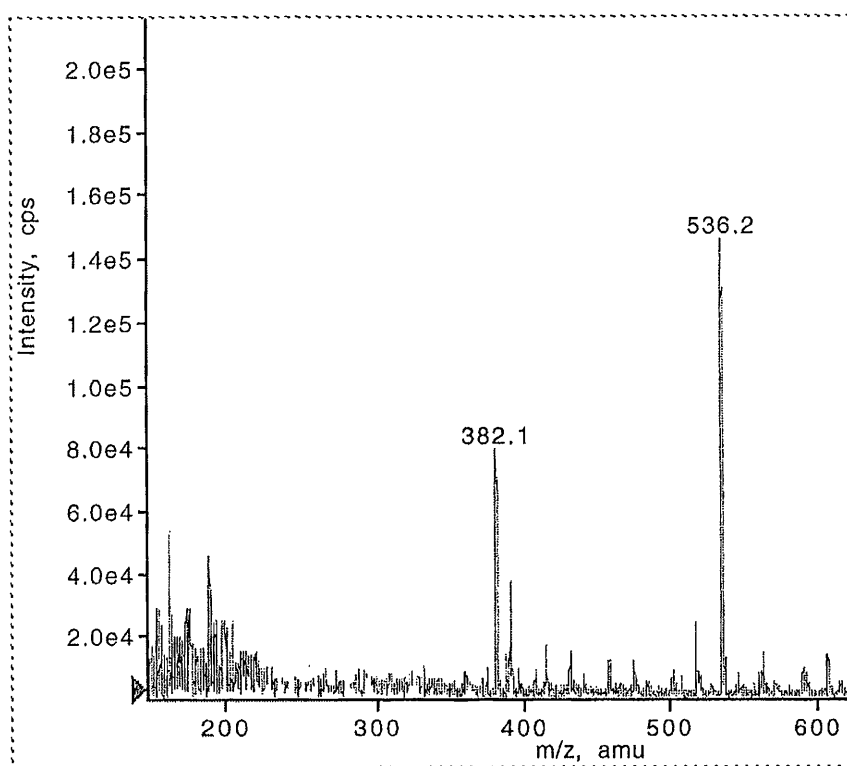


Η στρατηγική που εφαρμόστηκε για τη σύνθεση του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Me bpy)Cl](PF_6)$  παρουσιάζεται στο σχήμα 7.25. Αρχικά γίνεται η σύνθεση του πεπτιδίου GHK σε στερεά φάση με τη χρήση των αντιδραστηρίων σύζευξης HCTU και DIPEA και ακολουθεί η σύζευξη του καρβοξυλικής ομάδας του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Me bpy με την τελική αμινομάδα της γλυκίνης χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια σύζευξης pyBOP και DIPEA.



**Σχήμα 7.25.** (α) πιπεριδίνη (β) Fmoc-Λυσίνη(Boc)-OH, HCTU, DIPEA, NMP (γ) Fmoc-Ιστιδίνη(Trt)OH, HCTU, DIPEA, NMP (δ) Fmoc-Γλυκίνη-OH, HCTU, DIPEA, NMP (ε) pyBOP, DIPEA, NMP (ζ)  $Ru(terpy)Cl_3$ , LiCl, Et<sub>3</sub>N, DMF/EtOH (3:1), reflux 7h, (η) TFA/H<sub>2</sub>O (95/5, v/v), 2h, HCTU=1H-Benzotriazolium 1-[bis(dimethylamino)methylene]-5chloro-hexafluorophosphate(1-),3-oxide, DIPEA= diisopropylethylamine, NMP = N-methylpyrrolidone, PyBOP = benzotriazol-1-yl-oxyltris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate.

Στο στάδιο αυτό, πραγματοποιήθηκε κόψιμο από τη ρητίνη μιας μικρής ποσότητας για τον χαρακτηρισμό του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy. Το κόψιμο πραγματοποιείται με τριφθοροξικό οξύ, ενώ γίνεται συγχρόνως και η αποπροστασία των πλευρικών αμινομάδων. Ο υποκαταστάτης 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR και η καθαρότητα του ελέγχθηκε με φασματομετρία ESI-MS. Οι χημικές μετατοπίσεις του υποκαταστάτη αυτού φαίνονται στον Πίνακα, ενώ στο παρακάτω σχήμα 7.26 παρουσιάζεται το φάσμα ESI-MS που εμφανίζει μια κεντρική κορυφή στο  $m/z=536$ .

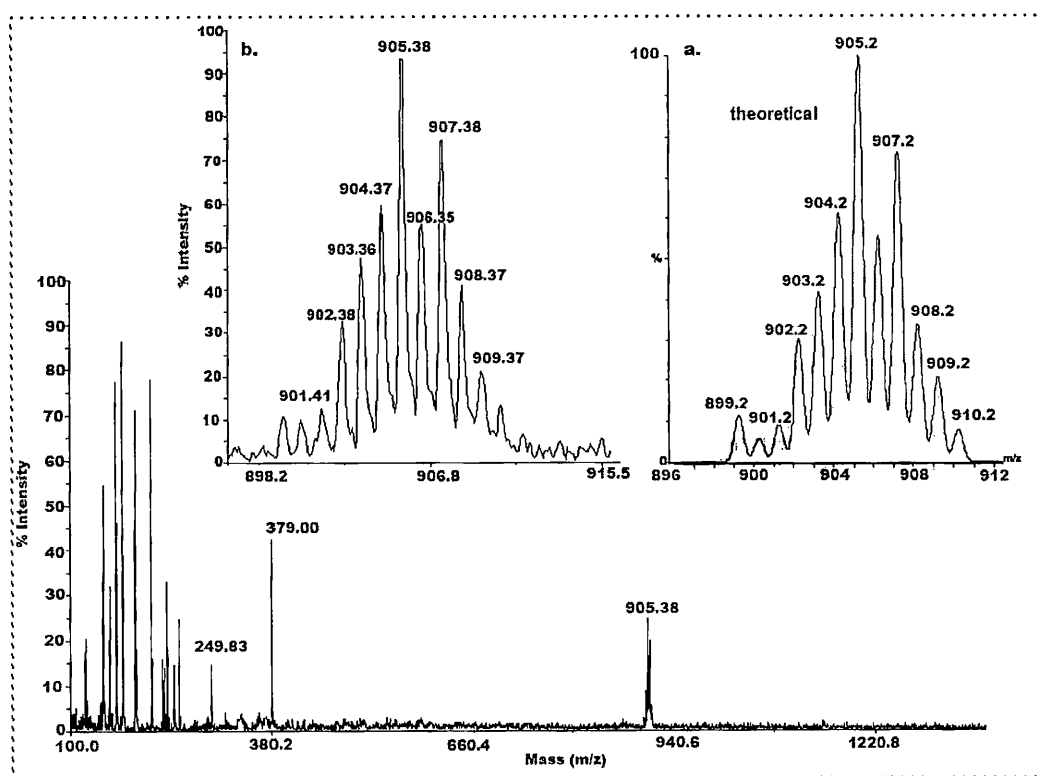


Σχήμα 7.26. Φάσμα ESI-MS του 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της ρητίνης-4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy με το σύμπλοκο [Ru(terpy)Cl<sub>3</sub>] με θέρμανση στους 80 °C σε διαλύτη DMF/EtOH (3:1). Η συγκεκριμένη ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε επιλέχθηκε για την ανθεκτικότητα της σε υψηλές σχετικά θερμοκρασίες. Έτσι, το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl]Cl συντίθεται και βρίσκεται ακινητοποιημένο πάνω στην ρητίνη. Η ρητίνη πλένεται αρκετά για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων και της περίσσειας των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μέγιστη καθαρότητα του συμπλόκου αλλά και η αποφυγή μεθόδων καθαρισμού, όπως χρωματογραφίας στήλης. Τέλος, το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl]<sup>+</sup> κόβεται από τη ρητίνη με τη χρήση

τριφθοροξικού οξέος, ενώ απομακρύνονται συγχρόνως και οι προστατευτικές ομάδες των αμινομάδων του πεπτιδίου. Ακολουθεί η καταβύθιση του σε αιθέρα και η μετατροπή του σε εξαφθοροφωσφορικό άλας με τη χρήση μεθανολικού διαλύματος του σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα  $\text{NH}_4\text{PF}_6$ .

Το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  χαρακτηρίστηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους, όπως φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ , φασματομετρία ESI-MS αλλά και MALDI-TOF MS. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το MALDI-TOF MS του συμπλόκου καθώς και το θεωρητικό φάσμα. Η κεντρική κορυφή εντοπίζεται σε  $m/z$  905 που αντιστοιχεί στο κατιόν  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}]^+$ , όπως διαπιστώθηκε και από την ισοτοπική κατανομή της ταινίας.

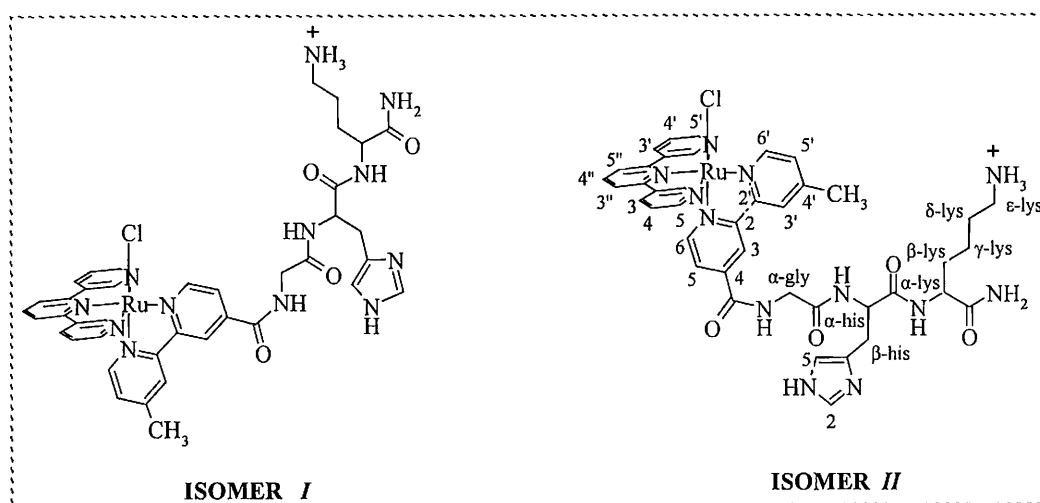


Σχήμα 7.27. MALDI-TOF MS του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}]$ . (a)

Σύγκριση με το θεωρητικό φάσμα (β) Πειραματικό φάσμα.

Το  $^1\text{H NMR}$  φάσμα του συμπλόκου έδειξε δυο σήματα για κάθε πρωτόνιο του συμπλόκου. Το γεγονός αυτό οφείλεται και στη περίπτωση αυτή στο σχηματισμό δυο ισομερών θέσης, τα οποία διαφέρουν ως προς τον προσανατολισμό του πεπτιδίου σε σχέση με τη σφαίρα ένταξης του ρουθηνίου. Ο υποκαταστάτης τερπυριδίνη

εντάσσεται στο οκτάεδρο του ρουθηνίου σε ισημερινή θέση, ενώ ο υποκαταστάτης 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy στην απομένονσα ισημερινή και στην αξονική θέση του οκταέδρου. Έτσι, στο σύμπλοκο που προκύπτει υπάρχουν δυο πιθανά ισομερή που σχετίζονται με την τοποθέτηση των δυο πυριδινικών δακτυλίων του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy. Στο ισομερές **I** ο δακτύλιος με την 4'-μεθυλομάδα βρίσκεται στο ισημερινό επίπεδο του οκταεδρικού συμπλόκου του Ru(II), ενώ στην περίπτωση του ισομερούς **II** βρίσκεται ο δακτύλιος με την 4-COGHK υποκατάσταση. Στο παρακάτω σχήμα παριστάνονται τα δυο αυτά ισομερή, καθώς και η αρίθμηση των πρωτονίων του συμπλόκου.



Σχήμα 7.28. Δομή των ισομερών θέσης I και II του συμπλόκου (7).

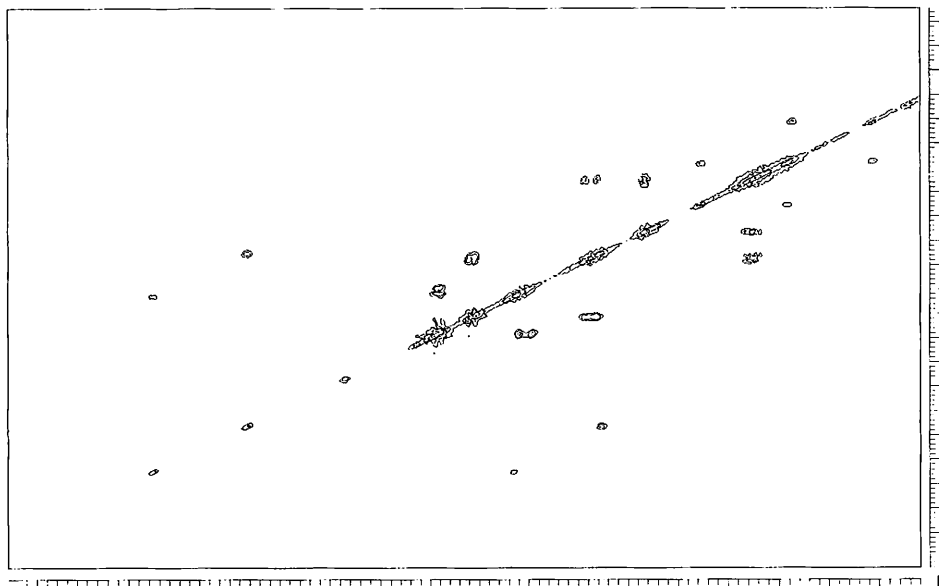
Ο διαχωρισμός των δυο ισομερών επιχειρήθηκε με χρωματογραφικές μεθόδους και συγκεκριμένα με χρωματογραφία στήλης Sephadex LH-20 που βασίστηκε στη διαφορετική διαλυτότητα των δυο ισομερών σε ακετονιτρίλιο. Ο διαχωρισμός αποδείχτηκε αρκετά δύσκολος λόγω των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζουν μεταξύ τους τα δυο ισομερή. Μετά από διαδοχικές και πολλαπλές επαναλήψεις της διαδικασίας διαχωρισμού τα δυο ισομερή διαχωρίστηκαν κατά ένα μεγάλο ποσοστό, όπως διαπιστώθηκε στα φάσματα <sup>1</sup>H NMR, όπου οι συντονισμοί του ισομερούς στη μικρότερη αναλογία παρατηρούνται σε κάθε περίπτωση. Η απόδοση των ταινιών στα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των πειραμάτων <sup>1</sup>H<sup>1</sup>H-COSY και <sup>1</sup>H<sup>1</sup>H-TOCSY. Τα φάσματα <sup>1</sup>H NMR και των δυο ισομερών έδειξαν διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις για κάθε ένα δακτύλιο των δυο πυριδινικών δακτυλίων του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy. Διπλοί συντονισμοί για τους δυο

πυριδινικούς δακτυλίους παρατηρήθηκαν ακόμη και στο φάσμα του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy που αντανακλούν τη διαφορετική υποκατάσταση (4-COGHK και 4'-Me) των δυο πυριδινικών δακτυλίων. Οι τιμές στα 8.96 και 8.67 ppm αποδόθηκαν στα πρωτόνια H<sub>6</sub> και H<sub>6'</sub> αντίστοιχα του υποκαταστάτη καθώς, μια διασταυρούμενη κορυφή που συσχετίζει τα πρωτόνια της μεθυλομάδας του 4'-μεθυλ-υποκαταστημένου πυριδινικού δακτυλίου και του πρωτονίου H<sub>6'</sub> παρατηρήθηκε στο φάσμα TOCSY του υποκαταστάτη. Στον παρακάτω Πίνακα παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των δυο ισομερών καθώς και του πεπτιδίου GHK και του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy.

*Πίνακας 7.4. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz) χημικές μετατοπίσεις (δ ως προς τοTMS) για τα δυο ισομερή σύμπλοκα (7).*

	GHK	Bpy-GHK	Ισομερές I	Ισομερές II
4-CO <sub>2</sub> H-4'-Mebpy				
H <sub>6</sub>		8.96 (d)	9.72 (d)	8.58 (d)
H <sub>5</sub>		7.95 (d)	8.29 (d)	8.24 (d)
H <sub>3</sub>		8.54 (s)	8.96 (s)	8.62 (s)
H <sub>6'</sub>		8.67 (d)	8.58 (d)	9.34 (d)
H <sub>5'</sub>		7.91 (d)	8.26 (d)	7.94 (d)
H <sub>3'</sub>		8.48 (s)	8.62 (s)	8.62 (s)
4-Me		2.73 (s)	3.00 (s)	2.02 (s)
Terpy				
H <sub>3</sub>			8.44 (d)	8.44 (d)
H <sub>3'</sub>			8.44 (d)	8.44 (d)
H <sub>4</sub>			7.98 (t)	7.98 (t)
H <sub>4'</sub>			7.98 (t)	7.98 (t)
H <sub>5,5'</sub>			7.32 (t)	7.32 (t)
H <sub>6,6'</sub>			7.76 (d)	7.76 (d)
H <sub>3''</sub>			8.60 (d)	8.60 (d)
H <sub>4''</sub>			8.19 (m)	8.19 (m)
H <sub>5''</sub>			8.60 (d)	8.60 (d)
GHK				
His-H <sub>2</sub>	8.58 (s)	8.62 (s)	8.03 (s)	7.99 (s)
His-H <sub>5</sub>	7.29 (s)	7.31 (s)	7.18 (s)	7.16 (s)
α-His	4.62 (d)	4.64 (d)	4.73 (d)	4.69 (d)
β-His	3.21 (t)	3.23 (t)	3.26 (t)	3.17 (d)
α-Gly	3.83 (s)	3.85 (s)	4.03 (s)	3.86 (s)
α-Lys	4.28 (d)	4.31 (d)	4.29 (d)	4.26 (d)
β-Lys	1.75 (m)	1.79 (m)	1.82 (m)	1.79 (m)
γ-Lys	1.42 (m)	1.43 (m)	1.49 (m)	1.43 (m)
δ-Lys	1.66 (m)	1.69 (m)	1.74 (m)	1.67 (m)
ε-Lys	2.98 (t)	2.96 (t)	2.99 (t)	2.98 (m)

Τμήμα του δισδιάστατου φάσματος του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  δίνεται στο σχήμα 7.29.



Σχήμα 7.29. Τμήμα του δισδιάστατου φάσματος του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$ .

Στο  $^1\text{H}$  NMR φάσμα του ισομερούς **I** η διπλή ταινία στα  $\delta=9.72$  ppm αποδόθηκε στο H6 του 4-COGHK υποκατεστημένου πυριδινικού δακτυλίου αφού δεν παρατηρήθηκε στο φάσμα TOCSY κανένα σήμα συσχέτισης με τα πρωτόνια της 4'-μεθυλομάδας. Αντίθετα, στην περίπτωση του ισομερούς **II** η διπλή ταινία στα  $\delta=9.34$  ppm σχετίζεται στο διδιάστατο φάσμα με τα πρωτόνια της μεθυλομάδας δείχνοντας έτσι ότι αυτό το πρωτόνιο ανήκει στο 4'-μεθυλ-υποκατεστημένο πυριδινικό δακτύλιο. Γενικά, τόσο υψηλές χημικές μετατοπίσεις για πρωτόνια πυριδινικών δακτυλίων, όπως στην περίπτωση μας το H6, έχουν αναφερθεί σε πολλές περιπτώσεις συμπλόκων του ρουθηνίου που περιέχει ενταγμένο χλώριο<sup>283,293</sup>. Όταν όλες οι θέσεις ένταξης του Ru(II) είναι κατειλημμένες από άτομα αζώτου, όπως στη περίπτωση των συμπλόκων  $\Lambda$ - και  $\Delta$ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})]^{2+}$ , οι ταινίες χαμηλότερου πεδίου του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy παρατηρήθηκαν στα  $\delta$  8.76 και 8.39 ppm<sup>248</sup>. Η διευθέτηση του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy επηρεάζει, επίσης, τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της μεθυλομάδας, αφού παρατηρήθηκε μια μετατόπιση σε υψηλότερα

πεδία κατά  $\Delta\delta -0.27$  ppm στο ισομερές **II** και κατά  $\Delta\delta +0.73$  ppm σε χαμηλότερα πεδίο στο ισομερές **I**.

Και στα δυο ισομερή παρατηρήθηκαν σχετικά μικρές διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του πεπτιδίου, πιθανόν εξαιτίας της μεγάλης απόστασης τους από το κέντρο του ρουθηνίου. Η υψηλότερη διαφορά παρατηρήθηκε για το Ha της γλυκίνης ( $\Delta\delta 0.18$  ppm), το οποίο βρίσκεται πιο κοντά από τα υπόλοιπα στους πολυπυριδινικούς δακτυλίους του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy. Αξίζει να σημειωθεί, ότι και στα δυο ισομερή τα πρωτόνια του πεπτιδίου GHK μετακινήθηκαν ελάχιστα σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy, εκτός από το πρωτόνιο H<sub>2</sub> του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης. Το πρωτόνιο αυτό, μετατοπίστηκε σε χαμηλότερα πεδία περίπου κατά 0.6 ppm και στα δυο ισομερή σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί βάσει του pH των διαλυμάτων, το οποίο βρίσκεται κοντά στην τιμή pK<sub>a</sub> του ιμιδαζολικού δακτυλίου (N1-H pK<sub>a</sub> = 6.04). Ανάλογες μετατοπίσεις έχουν παρατηρηθεί και στην περίπτωση των διαστερομερών συμπλόκων του ρουθηνίου Λ- και Δ-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)]<sup>2+</sup>, όπου όλες οι θέσεις ένταξης του ρουθηνίου είναι κατειλημμένες και έτσι δεν είναι εφικτή η ένταξη του πεπτιδίου στο ρουθίνιο<sup>248</sup>.

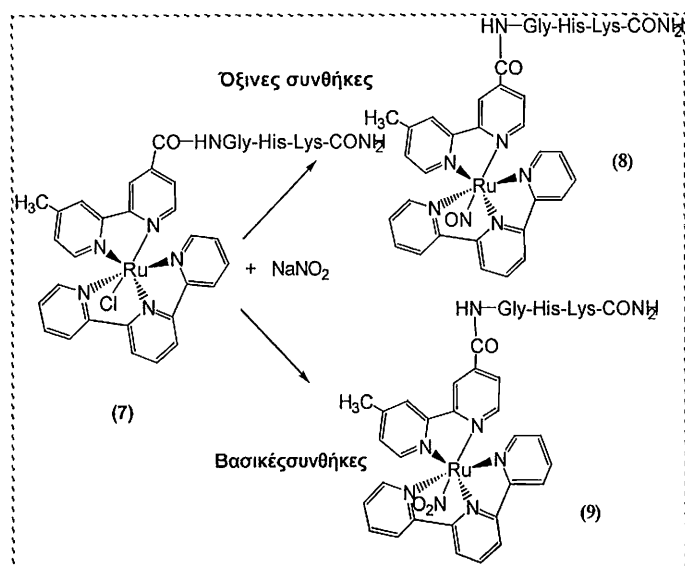
Ο υποκαταστάτης τερπυριδίνη παρουσίασε παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις και για τα δυο ισομερή, δείχνοντας έτσι ότι η ασύμμετρη δομή του υποκαταστάτη 4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy δεν επηρεάζει σημαντικά το χημικό περιβάλλον των πρωτονίων του υποκαταστάτη τερπυριδίνη, ο οποίος βρίσκεται στο ισημερινό επίπεδο του ρουθηνίου.

Η πλήρης αντικατάσταση του χλωρίου από ένα μόριο νερού επιτυγχάνεται μέσα σε 6 h και προκύπτει το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)(H<sub>2</sub>O)](PF<sub>6</sub>), όπως διαπιστώθηκε από το φάσμα ESI-MS μετά τη διάλυση του σε νερό. Η αντίδραση της υδρόλυσης παρακολούθηθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR και μετά την πάροδο μερικών λεπτών, στο φάσμα του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) σε D<sub>2</sub>O εμφανίστηκαν νέες ταινίες που δηλώνουν την υδρόλυση του συμπλόκου. Οι ταινίες του αρχικού συμπλόκου εξαφανίζονται πρακτικά μετά την πάροδο 6 h. Το γεγονός αυτό, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα για τη δραστηριότητα του συμπλόκου σε βιολογικά μόρια, εφόσον η ένταξη του στις βάσεις του DNA προϋποθέτει την υδρόλυση του. Για το



λόγο αυτό τα πειράματα με το DNA, που παρουσιάζονται παρακάτω, πραγματοποιήθηκαν μετά την επώαση των δειγμάτων για τουλάχιστον 6 h.

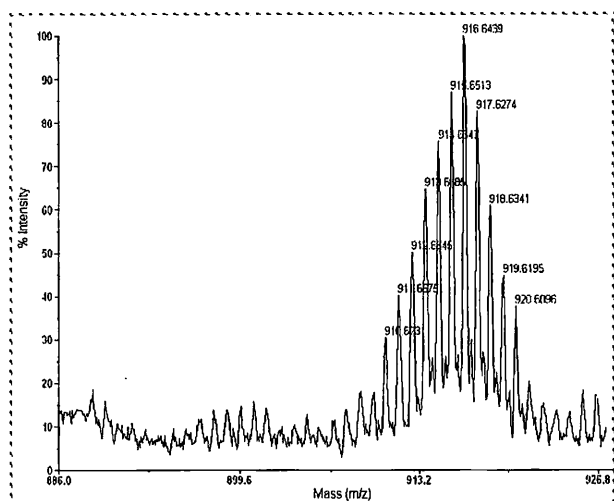
Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των συμπλόκων  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  και  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  που παριστάνεται στο σχήμα 7.30.



Σχήμα 7.30. Αντίδραση σύνθεσης των συμπλόκων (8) και (9).

Όπως φαίνεται στο σχήμα τα νιτροσουλ και νιτρο σύμπλοκα συντίθενται μετά την υδρόλυση του χλωρο συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  που γίνεται με βρασμό σε  $\text{H}_2\text{O}$  και ρύθμιση του pH της αντίδρασης. Σε όξινες συνθήκες λαμβάνεται το νιτροσουλ σύμπλοκο ενώ σε βασικό περιβάλλον το νιτρο παράγωγο.

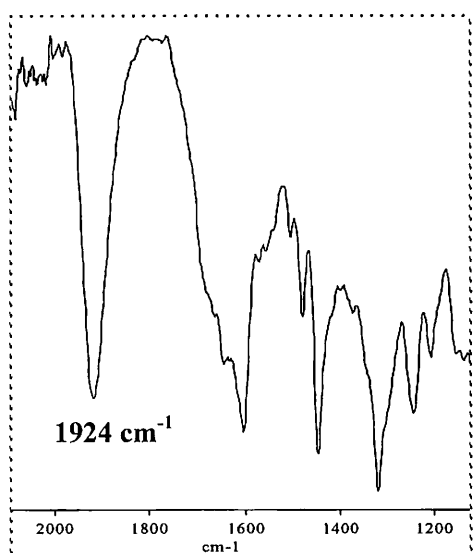
Τα σύμπλοκα (8) και (9) χαρακτηρίστηκαν με διάφορες αναλυτικές και φασματοσκοπικές μεθόδους, όπως φασματοσκοπία υπεριώθρου, υπεριώδους-ορατού, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, φασματομετρία ESI-MS αλλά και MALDI-TOF MS. Η καθαρότητα των συμπλόκων (8) και (9) επιτεύχθηκε με διαδοχικές ανακρυσταλλώσεις και ελέγχθηκε με χρωματογραφικές και αναλυτικές μεθόδους όπως LC-MS και MALDI-TOF-MS. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το MALDI-TOF-MS του νιτρο-συμπλόκου, στο οποίο η κεντρική κορυφή εντοπίζεται σε  $m/z=916$  που αντιστοιχεί στο κατιόν  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2]^+$ , όπως διαπιστώθηκε και από την θεωρητική ισοτοπική κατανομή της ταινίας.



Σχήμα 7.31. MALDI-TOF MS του συμπλόκου (9) στο οποίο φαίνεται η ισοτοπική κατανομή του ρουθηνίου.

Στο φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου (8) η ταινία της δόνησης τάσης του δεσμού N-O παρατηρήθηκε στα  $1924\text{ cm}^{-1}$ , που δείχνει ότι ο τρόπος ένταξης του NO στο ρουθίνιο είναι ως  $\text{NO}^+$ . Η σύζευξη του πεπτιδίου GHK όπως φαίνεται επηρεάζει τη συχνότητα δόνηση του δεσμού  $\nu(\text{NO})$ , η οποία μετατοπίστηκε σε χαμηλότερες συχνότητες περίπου κατά  $31\text{ cm}^{-1}$  σε σχέση με το σύμπλοκο  $\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  που παρουσιάζει, όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 6, συχνότητα δόνηση τάσης  $\nu(\text{NO})=1955\text{ cm}^{-1}$ . Στο αντίστοιχο σύμπλοκο με συζευγμένη αλανίνη η ταινία της δόνησης τάσης του δεσμού N-O παρατηρήθηκε στα  $1949\text{ cm}^{-1}$ .

Στο σύμπλοκο (9) παρατηρήθηκαν οι ταινίες δόνησης τάσης του δεσμού N-O και ειδικότερα η ασύμμετρη  $\nu_{\text{as}}$  στα  $1437\text{ cm}^{-1}$  και η συμμετρική  $\nu_{\text{s}}$  στα  $1263\text{ cm}^{-1}$ . Οι τιμές αυτές διαφέρουν από τις αντίστοιχες τιμές του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ , αλλά και του αντίστοιχου συμπλόκου με συζευγμένη αλανίνη. Οι διαφορές αυτές έχουν να κάνουν τόσο με τη γενικότερη συμμετρία του συμπλόκου όσο και με τον τρόπο ένταξης του υποκατεστημένου διπυριδυλίου στο ρουθίνιο.



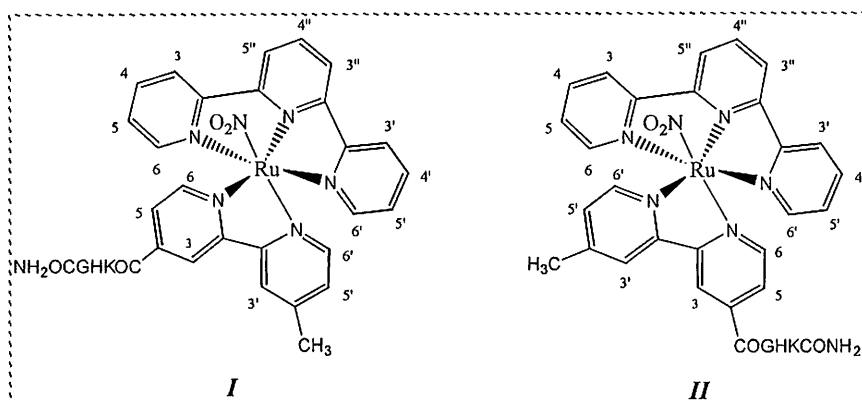
Ο τρόπος αυτός φαίνεται να σχετίζεται με την υποκατάσταση στον ένα πυριδινικό δακτύλιο. Στο σχήμα 7.32. δίνεται τμήμα του φάσματος υπερύθρου του συμπλόκου (8).

Σχήμα 7.32. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου (8) με τη χαρακτηριστική δόνηση τάσης του δεσμού N-O.

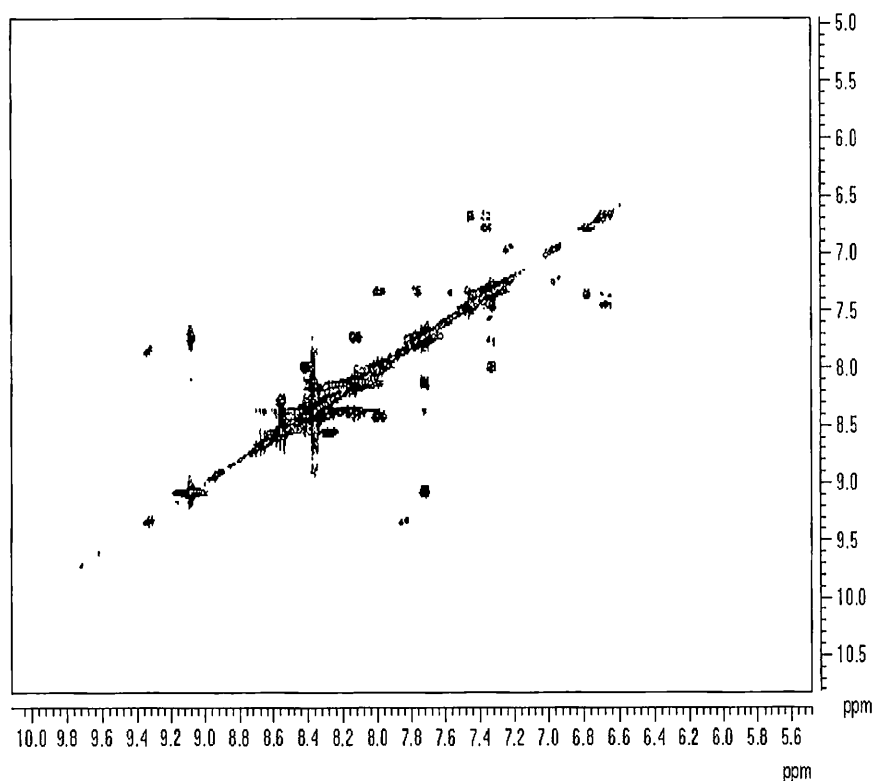
Στο φάσμα NMR του συμπλόκου (9) παρατηρήθηκαν διπλοί συντονισμοί για τα πρωτόνια των υποκαταστατών, επιβεβαιώνοντας και στην περίπτωση αυτή, την ύπαρξη και των δυο ισομερών. Διπλοί συντονισμοί για τους δυο πυριδινικούς δακτυλίους παρατηρήθηκαν ακόμη και στο φάσμα του υποκαταστάτη 4-COGHKCO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>-4'-Mebpy που αντανακλούν τη διαφορετική υποκατάσταση (4-COGHK και 4'-Me) των δυο πυριδινικών δακτυλίων. Οι τιμές στα 9.29 και 9.04 ppm αποδόθηκαν στα πρωτόνια H<sub>6</sub> και H<sub>6'</sub> αντίστοιχα των δυο ισομερών, καθώς μια διασταυρούμενη κορυφή που συσχετίζει τα πρωτόνια της μεθυλομάδας του 4'-μεθυλ-υποκαταστημένου πυριδινικού δακτυλίου και του πρωτονίου H<sub>6'</sub> παρατηρήθηκε στο φάσμα TOCSY. Στον παρακάτω Πίνακα 7.5. παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των δυο ισομερών σε διαλύτη D<sub>2</sub>O.

Πίνακας 7.5. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz) χημικές μετατοπίσεις (δ ως προς το TMS) για τα δυο ισομερή σύμπλοκα (9).

	Ισομερές I	Ισομερές II
4-CO <sub>2</sub> H-4'-		
Mebpy		
H <sub>6</sub>	9.29(d)	8.37 (d)
H <sub>5</sub>	7.79 (d)	7.93 (d)
H <sub>3</sub>	8.32 (s)	7.29 (s)
H <sub>6'</sub>	8.51 (d)	9.04 (d)
H <sub>5'</sub>	8.25 (d)	7.65 (d)
H <sub>3'</sub>	8.21 (s)	8.05 (s)
4-Me	3.02 (s)	2.73 (s)
Terpy		
H <sub>3</sub>	8.31 (d)	8.35 (d)
H <sub>3'</sub>	8.31 (d)	8.35 (d)
H <sub>4</sub>	8.07 (t)	7.93(t)
H <sub>4'</sub>	8.07 (t)	7.93 (t)
H <sub>5,5'</sub>	7.65 (t)	7.27 (t)
H <sub>6,6'</sub>	8.10 (d)	7.96 (d)
H <sub>3''</sub>	7.27 (d)	7.23 (d)
H <sub>4''</sub>	7.73 (m)	7.71 (m)
H <sub>5''</sub>	7.27 (d)	7.23 (d)
GHK		
His-H <sub>2</sub>	8.35 (s)	8.32 (s)
His-H <sub>5</sub>	6.78 (s)	6.75 (s)
α-His	4.70 (d)	4.66 (d)
β-His	3.58 (t)	3.53(t)
α-Gly	3.94 (s)	3.84 (s)
α-Lys	3.50 (d)	3.17 (d)
β-Lys	1.97 (m)	1.60 (m)
γ-Lys	1.47 (m)	1.40 (m)
δ-Lys	2.04 (m)	2.00 (m)
ε-Lys	3.02 (t)	2.96(m)



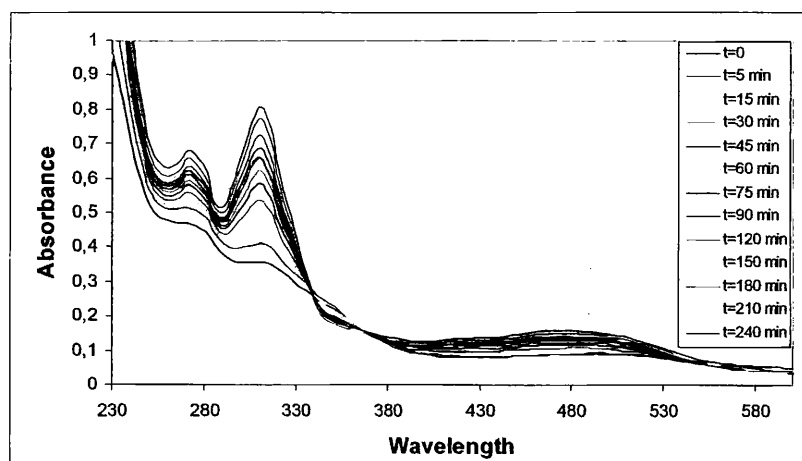
Τμήμα του δισδιάστατου φάσματος του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  δίνεται στο σχήμα 7.33.



Σχήμα 7.33. Τμήμα του δισδιάστατου φάσματος του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ .

### 7.2.2. Φωτοχημεία του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4-COGHKCONH_2-4'-Mebrpy)NO](PF_6)_3$ (**8**)

Η φωτοχημεία του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-COGHKCONH_2-4'-Mebrpy)NO](PF_6)_3$  μελετήθηκε κατά την ακτινοβόληση του με λάμπα υδραργύρου σε διάλυμα ακετονιτριλίου. Κατά την ακτινοβόληση του διαλύματος του συμπλόκου καταγράφηκαν τα φάσματα υπεριώδους-ορατού ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Οι ταινίες του συμπλόκου (**8**) και ειδικά αυτές που αντιστοιχούν στο ενταγμένο NO αλλάζουν και εμφανίζονται καινούργιες που αντιστοιχούν στα προϊόντα της φωτόλυσης.



Σχήμα 7.34. Φάσματα υπεριώδους-ορατού της ακτινοβόλησης του συμπλόκου (**8**).

Οι ταινίες που παρατηρήθηκαν περίπου στα 270 και 310 nm (Σχήμα 7.34.,  $t=0$ ) αντιστοιχούν σε εσωτερικές μεταπτώσεις του υποκαταστάτη τερπυριδίνη και διπυριδίνη  $\pi \rightarrow \pi^*$  (terpy)  $\pi \rightarrow \pi^*$  (brpy) όπως εξάλλου έχει παρατηρηθεί και σε άλλα ανάλογα πολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου<sup>166,264</sup>. Οι ταινίες στην περιοχή 314 και 350 nm αντιστοιχούν στις MLCT μεταπτώσεις  $d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*$  (terpy) και  $d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(NO^+)$ <sup>129,166</sup> (Σχήμα 7.34.,  $t=0$ ). Κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου σε ακετονιτρίλιο (Σχήμα 7.34.), οι ταινίες αυτές μειώνουν την έντασή τους, ενώ εμφανίζονται νέες ταινίες στα 310 και 474 nm που οφείλονται στα προϊόντα της φωτόλυσης, η οποία μετά από ένα χρονικό διάστημα ολοκληρώνεται. Βλέπουμε λοιπόν, ότι η ταινία που αντιστοιχεί στην μετάπτωση  $d_{\pi}(Ru) \rightarrow \pi^*(NO^+)$  αρχίζει με την πάροδο του χρόνου να μειώνεται πιθανόν λόγω απόσπασης της νιτροσουλ-ομάδας από το σύμπλοκο. Μετά το τέλος της ακτινοβόλησης λήφθηκε φάσμα IR στο δείγμα

και διαπιστώθηκε η απουσία της ταινίας στα  $1924\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχεί στην συχνότητα δόνησης τάσης του δεσμού N-O, γεγονός που επιβεβαιώνει την απελευθέρωση του NO από το σύμπλοκο. Ανάλογες μεταβολές παρατηρήθηκαν και στα νιτροσυλ σύμπλοκα *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl, [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> και [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> που μελετήθηκαν στα Κεφάλαια 5, 6 και 7 αντίστοιχα, αλλά και σε ανάλογα σύμπλοκα της βιβλιογραφίας, όπως τα *cis*-[RuCl(NO)](bpy)<sub>2</sub><sup>2+</sup><sup>152,155</sup>, το σύμπλοκο *cis*-[Ru(NO)(PaPy<sub>3</sub>)]<sup>2+</sup><sup>266</sup> και το [RuCl(salen)(NO)]<sup>265</sup>.

### 7.2.3. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) (7) και [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) (9) με DNA

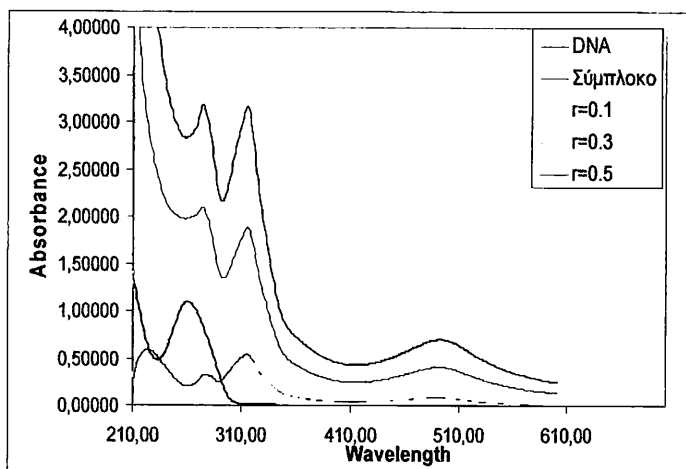
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, εξαιτίας της γνωστής ισορροπίας ανάμεσα στην NO και NO<sub>2</sub> μορφής των συμπλόκων του ρουθηνίου, που σε τιμές pH=7 προσεγγίζει σχεδόν αποκλειστικά την νιτρο μορφή, εκτελέσαμε τα βιολογικά πειράματα με το νιτρο και χλώρο σύμπλοκο και όχι το νιτροσυλ. Έτσι, κατά τη μελέτη των συμπλόκων (7) και (9) εξετάστηκαν οι αλληλεπιδράσεις τους με γραμμικό DNA αλλά και με πλασμιδιακό DNA τύπου pUC9. Κατά τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές μέθοδοι, όπως UV-Vis, <sup>23</sup>Na, <sup>31</sup>P-NMR, φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD), τεχνική ηλεκτροφόρησης κ.α.

#### Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού.

Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση των συμπλόκων του ρουθηνίου με συζευγμένο το πεπτίδιο GHK για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων τους με γραμμικό DNA. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα υπεριώδους-ορατού του χλώρο συμπλόκου [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>), του DNA και του συστήματος (7)-DNA σε διάφορες αναλογίες  $r=[\text{Ru}]/[\text{DNA}]$ . Συγκρίνοντας το πειραματικό φάσμα του συστήματος [Ru]-[DNA] με το φάσμα του συμπλόκου παρατηρείται υποχρωμία στην MLCT ταινία του συμπλόκου (310 nm,  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{terpy})$ ) κατά 11% χωρίς όμως καμιά μετατόπιση

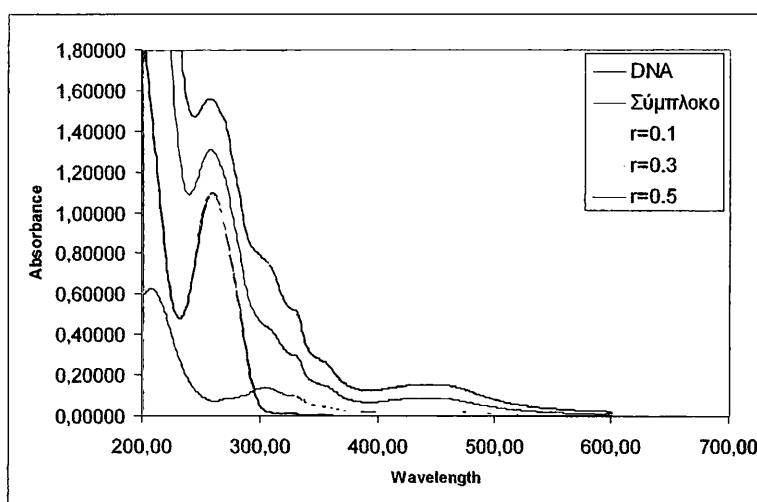
προς το ερυθρό. Στην περίπτωση του ανάλογου συμπλόκου με συζευγμένη αλανίνη παρατηρήθηκε υπερχρωμία με παρόμοια τιμή (~4%) χωρίς και εδώ μετατόπιση προς το ερυθρό. Βλέπουμε λοιπόν ότι τα δυο σύμπλοκα, τα οποία εντάσσονται στις βάσεις του DNA και διαφέρουν μόνο ως προς την υποκατάσταση του 4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebrυ, παρουσιάζουν διαφορές στα φάσματα υπεριώδους-ορατού κατά την αλληλεπίδραση τους με το DNA. Το γεγονός αυτό παραπέμπει στην υπόθεση ότι το συζευγμένο αμινοξύ ή πεπτίδιο αλληλεπιδρά με το DNA και μάλιστα η φύση του επηρεάζει την αλληλεπίδραση αυτή. Στη περίπτωση της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl, το οποίο έχει δυο χλώρια τα οποία μπορούν να υδρολυθούν και να ενταχθούν στο DNA, παρατηρήθηκε πολύ μεγαλύτερη υποχρωμία στην MLCT ταινία του συμπλόκου κατά 24 % αλλά και μικρή μετατόπιση προς το ερυθρό κατά  $\Delta\lambda = 6$  nm.

Όπως φαίνεται και στο σχήμα, η ταινία του DNA στα 260 nm μεταβάλλεται καθώς αυξάνεται η αναλογία  $r$  και συγκεκριμένα όταν η αναλογία είναι 0.3 και στη συνέχεια 0.5 η ταινία μετατοπίζεται στα 269 nm. Είναι πιθανό, καθώς αυξάνεται η αναλογία  $r$  και το σύμπλοκο (7) εντάσσεται όλο και σε περισσότερες βάσεις του DNA, να αλλάζει η γεωμετρία του και έτσι η ταινία του να μετατοπίζεται στα 269 nm. Η πιθανότητα αλληλεπίδρασης με παρεμβολή αποκλείεται και στην περίπτωση του συμπλόκου (7), όπως και σε όλες τις άλλες προηγούμενες περιπτώσεις που εξετάσαμε, αφού δεν παρατηρήθηκε στις ταινίες MLCT υποχρωμία και μετατόπιση προς το ερυθρό<sup>285,286</sup>.



**Σχήμα 7.35.** Φάσματα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (7) σε διάφορες αναλογίες.

Αντίστοιχα μελετήθηκαν και οι αλληλεπιδράσεις του νιτρο συμπλόκου (9) με γραμμικό CT-DNA. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα υπεριώδους-ορατού του συμπλόκου (9), του DNA και του συστήματος συμπλόκου-DNA σε διάφορες αναλογίες  $r$ . Στις ταινίες του συμπλόκου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές και συγκεκριμένα στην MLCT  $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2)$  (440 nm) δεν παρατηρήθηκε υποχρωμία ή μετατόπιση προς το ερυθρό. Μικρές μεταβολές παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση του ανάλογου συμπλόκου με συζευγμένη αλανίνη.



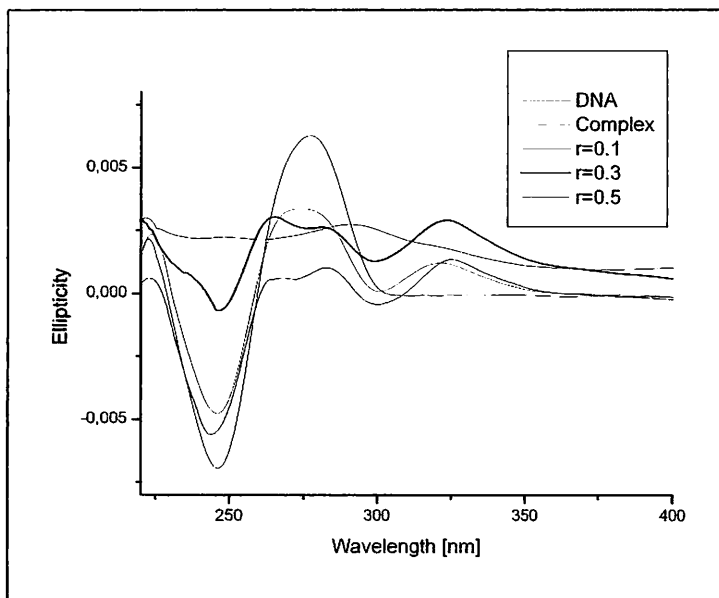
*Σχήμα 7.36. Φάσματα υπεριώδους-ορατού του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (9) σε διάφορες αναλογίες.*

Σε αναλογία  $r = 0.1$  η ταινία του DNA αρχίζει να μετατοπίζεται στα 255 nm, ενώ καθώς η αναλογία συμπλόκου-DNA αυξάνεται η ταινία αυτή βρίσκεται στα 252 nm. Η μετατόπιση της ταινίας αυτής οφείλεται στην αλληλεπίδραση του συμπλόκου (9) με το DNA. Καθώς είναι γνωστό ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δεν προκαλούν τέτοιες μεταβολές, αυτές θα πρέπει να αποδοθούν στο συζευγμένο πεπτιδίο που μπορεί να αλληλεπιδράσει με το DNA με δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις κτλ. Μετατόπιση της ταινίας του DNA παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του συμπλόκου με συζευγμένη αλανίνη και συγκεκριμένα μετατόπιση στα 255 nm. Βλέπουμε λοιπόν, ότι ανάλογα με τη φύση του συζευγμένου μορίου διαφοροποιούνται και οι αλληλεπιδράσεις με το DNA. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι κατά την περίπτωση του ανάλογου συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebrpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ , χωρίς τη σύζευξη αμινοξέων ή πεπτιδίου, δεν παρατηρήθηκε καμιά αλλαγή στην ταινία του DNA.



## Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD).

Οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων (7) και (9) με γραμμικό CT-DNA μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις των δυο συμπλόκων με το DNA διαφέρουν καθώς το χλωρο σύμπλοκο μπορεί να ενταχθεί στις βάσεις του DNA, ενώ στο νιτρο σύμπλοκο δεν υπάρχει αυτή η δυνατότητα και έτσι η αλληλεπίδραση του είναι διαφορετικού τύπου. Τα φάσματα CD καταγράφηκαν κατά την προσθήκη του συμπλόκου (7) στο DNA σε αναλογίες  $r = 0.1$ ,  $r = 0.3$  και  $r = 0.5$  (Σχήμα 7.37.). Κατά την προσθήκη του συμπλόκου (7) και σε αναλογία  $r = 0.1$  παρατηρείται μια σημαντική αλλαγή στις χαρακτηριστικές ταινίες του DNA B-τύπου στα 278 και 245 nm. Οι αλλαγές την θετική ταινία στα 278 nm (UV:  $\lambda_{\max}$  260 nm) μπορεί να εξηγηθεί βάσει της μεταβολής στην συσσώρευση των βάσεων ενώ η μεταβολή στην αρνητική ταινία στα 245 nm μπορεί να συμβαίνει εξαιτίας των αλλαγών που προκαλούνται στην περιέλιξη της έλικας του B-DNA. Όπως αναμενόταν, η ένταξη του συμπλόκου (7) στις βάσεις του DNA επιφέρει σημαντικές μεταβολές στην γεωμετρία του βιολογικού μορίου.

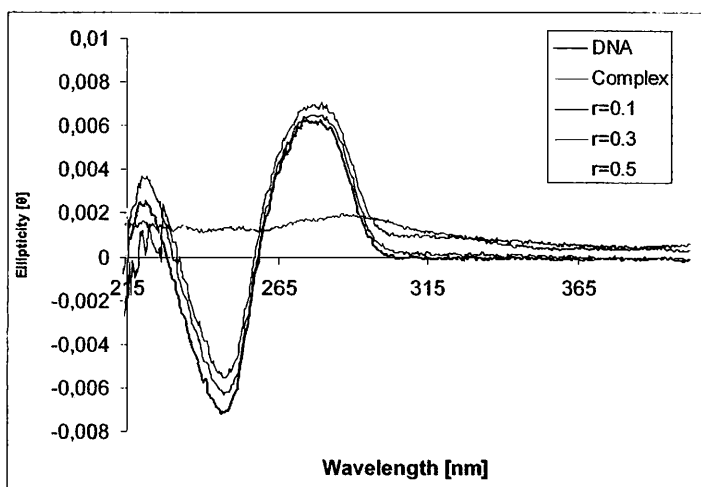


**Σχήμα 7.37.** Φάσμα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (7) σε διάφορες αναλογίες  $r = [Ru]/[DNA]$ .

Καθώς η αναλογία αυξάνεται σε  $r = 0.3$  και  $r = 0.5$  οι αλλαγές αυτές αυξάνονται δείχνοντας ότι το σύμπλοκο συνεχίζει να αλληλεπιδρά με τις βάσεις του DNA. Επίσης μια καινούργια θετική ταινία Cotton εμφανίζεται στα 325 nm,

μετατοπισμένη δηλαδή κατά 30 nm, αφού βρισκόταν στα 295 nm στο σύμπλοκο απουσία του DNA. Η ταινία αυτή είναι πιθανό να οφείλεται στην αλληλεπίδραση του συζευγμένου πεπτιδίου GHK με το DNA. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η παρατήρηση ότι η ταινία στα 245 nm δεν μεταβάλλεται ομαλά και συγκεκριμένα σε αναλογία  $r = 0.1$  και  $0.3$  η ένταση της ταινίας μειώνεται και στη συνέχεια σε αναλογία  $r = 0.5$  αυξάνεται. Αύξηση και μετά μείωση στις ταινίες του DNA έχει παρατηρηθεί στις περιπτώσεις συμπλόκων που εντάσσονται στις βάσεις του DNA, όπως σε σύμπλοκα λευκοχρύσου <sup>292</sup>, ενώ η ανομοιόμορφη αυτή μεταβολή έχει εξηγηθεί βάσει των μεταβολών που επέρχονται στην δευτεροταγή δομή του B-DNA, οι οποίες είναι παρόμοιες με εκείνες που προκαλούν μονοδραστικά σύμπλοκα του λευκοχρύσου <sup>292</sup>. Ανάλογες μεταβολές παρατηρήθηκαν επίσης κατά την αλληλεπίδραση οκταεδρικών *cis*-διχλωρο συμπλόκων του ρουθηνίου με DNA. Αν και τα σύμπλοκα αυτά έχουν δυο δραστικές θέσεις ένταξης στις βάσεις του DNA, φαίνεται ότι δεν είναι δυνατή η διδραστική αλληλεπίδραση τους με το βιολογικό μόριο <sup>54</sup>. Η ένταξη των συμπλόκων NAMI και RAP στο DNA προκάλεσε παρόμοιες μεταβολές στις χαρακτηριστικές ταινίες του στα φάσματα CD <sup>268</sup>. Η μείωση στην ένταση των ταινιών στα φάσματα CD, καθώς αυξάνεται η αναλογία  $r$ , παραπέμπει στο ξετύλιγμα της έλικας του DNA <sup>294,295</sup>. Επίσης, κατά την μελέτη των αλληλεπιδράσεων του συμπλόκου (4) με το DNA, παρατηρήθηκε μια μη ομοιόμορφη μεταβολή της ταινίας στα 245 nm. Συγκεκριμένα, η ένταση της ταινίας αρχικά αυξήθηκε και στη συνέχεια όταν η αναλογία έγινε  $r = 0.5$  η ένταση της μειώθηκε.

Κατά τη προσθήκη του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebrpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  καταγράφηκαν, επίσης, τα φάσματα CD σε συνθήκες ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση του χλωρο συμπλόκου (7). Όπως φαίνεται στο διπλανό σχήμα η προσθήκη του συμπλόκου (9) στο DNA επιφέρει



μεταβολές και τις δυο χαρακτηριστικές ταινίες του DNA B-τύπου στα 278 και 245 nm.

**Σχήμα 7.38.** Φάσμα CD του DNA παρουσία και απουσία του συμπλόκου (9) σε διάφορες αναλογίες  $r = [\text{Ru}]/[\text{DNA}]$ .

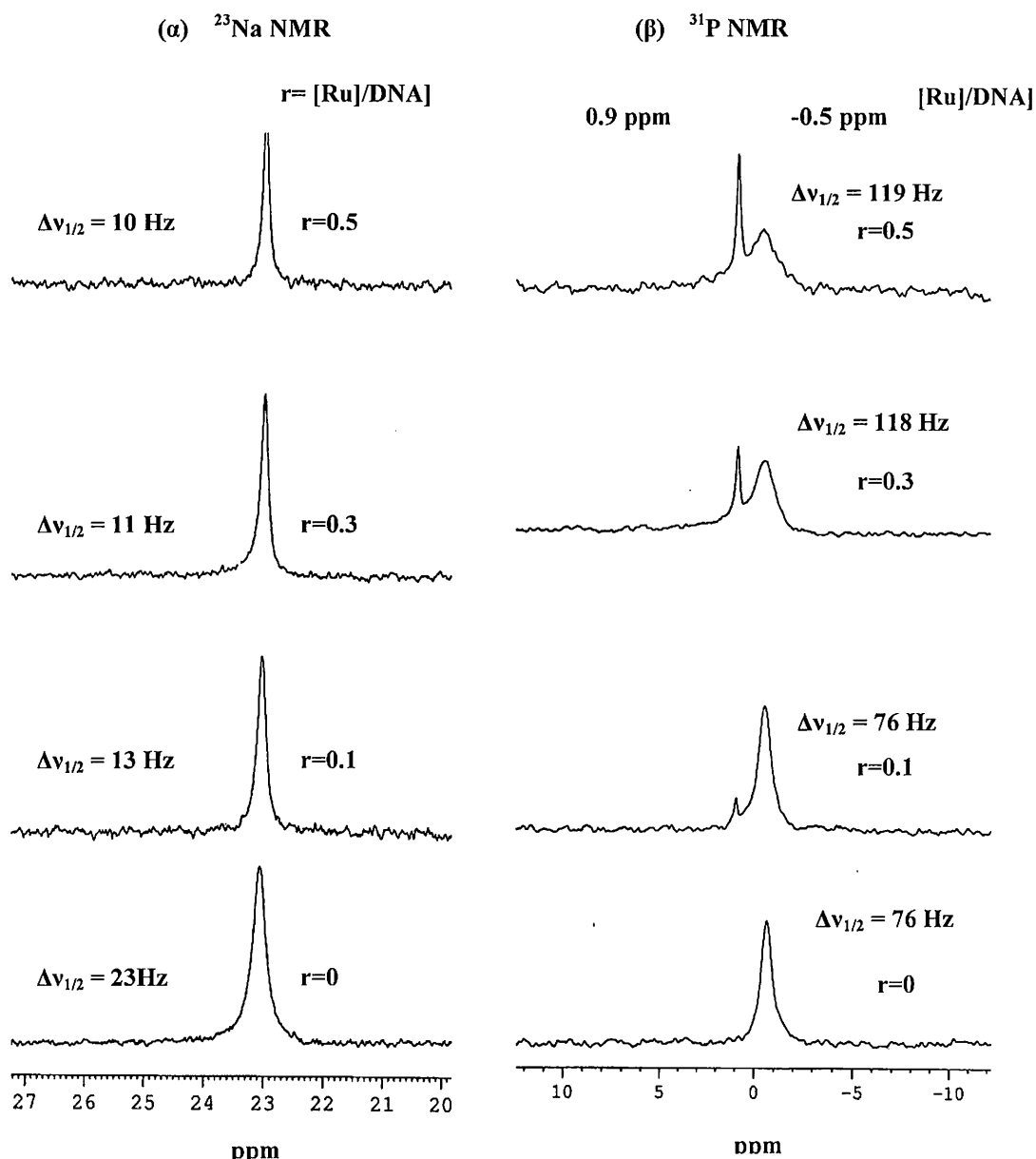
Σε αναλογία  $r = 0.1$  η αλλαγή στην ταινία στα 278 nm είναι σχετικά μικρή, ενώ η αλλαγή στην ταινία στα 245 nm είναι αρκετά σημαντική. Καθώς αυξάνεται η αναλογία  $r$  σε 0.3 και 0.5 οι μεταβολές στις δυο ταινίες γίνονται διαδοχικά και πιο έντονες και μάλιστα η ένταση της θετικής ταινίας αυξάνεται, ενώ η ένταση της αρνητικής μειώνεται δείχνοντας ότι το σύμπλοκο προκαλεί μεταβολές στην συσσώρευση των βάσεων του βιολογικού μορίου αλλά και στην περιέλιξη της έλικας του, αλλάζοντας τον Β-τύπο του. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στη περίπτωση του συμπλόκου αυτού δεν παρατηρήθηκε η νέα ταινία που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του χλωρο συμπλόκου (7). Τα δυο σύμπλοκα αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο αφού το χλωρο σύμπλοκο μπορεί να ενταχθεί στις βάσεις του DNA ενώ το νιτρο όχι.

Στο αντίστοιχο σύμπλοκο (3) χωρίς το πεπτίδιο παρατηρήθηκε μια μείωση στην ένταση της ταινίας στα 278 nm γεγονός που αποδόθηκε στην σχετική αποσυσσώρευση των βάσεων κατά την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του συμπλόκου (3) με το DNA. Αντίθετα στην ένταση της ταινίας στα 245 nm δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή.

#### Φασματοσκοπία $^{23}\text{Na}$ και $^{31}\text{P}$ NMR

Εξαιτίας της μεγάλης ευαισθησίας του πυρήνα  $^{31}\text{P}$  σε δομικές μεταβολές του φωσφορικού σκελετού και στις αλληλεπιδράσεις μεταλλικών συμπλόκων με το NMR DNA<sup>271,272,273</sup>, κατά τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων των συμπλόκων (7) και (9) με γραμμικό CT-DNA χρησιμοποιήθηκαν οι φασματοσκοπίες  $^{31}\text{P}$  NMR αλλά και  $^{23}\text{Na}$  NMR, προκειμένου να διαπιστωθεί η φύση της αλληλεπίδρασης τους με το DNA. Έτσι λοιπόν, δείγματα DNA διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PIPES διατηρώντας την ιονική ισχύ σταθερή, ενώ οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν και για τα δυο σύμπλοκα ήταν  $r = 0.1, 0.3$  και  $0.5$ .

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα  $^{23}\text{Na}$  NMR και  $^{31}\text{P}$  NMR δειγμάτων DNA κατά τη προσθήκη του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  σε διάφορες αναλογίες  $r$ .

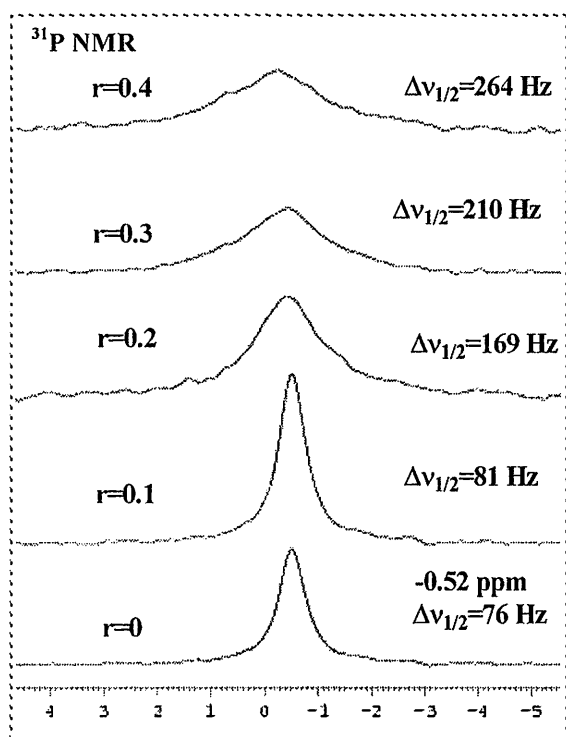


Σχήμα 7.39. Φάσματα  $^{23}\text{Na}$  και  $^{31}\text{P}$  NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (7) σε διάφορες αναλογίες  $r$ .

Αρχικά, κατά την προσθήκη του συμπλόκου (7) στο DNA διαπιστώθηκε ότι αυξάνοντας την αναλογία από  $r = 0.1$  σε  $r = 0.5$  (Σχήμα 7.39.) προκλήθηκε μια μεταβολή στο εύρος της κορυφής του  $^{23}\text{Na}$ . Συγκεκριμένα, από  $\Delta\nu_{1/2} = 23 \text{ Hz}$  που είναι στο ελεύθερο DNA ( $r=0$ ) μεταβάλλεται σε  $\Delta\nu_{1/2}=13 \text{ Hz}$  ( $r=0.1$ ) και  $\Delta\nu_{1/2}=10 \text{ Hz}$  ( $r=0.5$ ). Το θετικά φορτισμένο κατιόν που εντάσσεται στις βάσεις του DNA αντικαθιστά ιόντα  $\text{Na}^+$  που αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες και έτσι

προκαλεί μια μη αντιστρεπτή διαφοροποίηση στο συνολικό φορτίο του πολυανιονικού βιολογικού μορίου. Η μεγαλύτερη διαλέπτυνση παρατηρείται ουσιαστικά όταν αναλογία είναι 0.1, δηλαδή ένα κατιόν συμπλόκου ανά 10 ζεύγη βάσεων DNA ( $r=0.1$ ). Αυτό φαίνεται από το εύρος της διαλέπτυνσης της κορυφής του  $^{23}\text{Na}$  που προκαλείται καθώς αυξάνεται η αναλογία  $r$ , αφού σε αναλογία 0.3 και 0.5 δεν επέρχονται σημαντικές αλλαγές. Παρόμοιες μεταβολές σε πειράματα  $^{23}\text{Na}$ -NMR έχουν παρατηρηθεί κατά τη μελέτη της αλληλεπίδρασης συμπλόκων του λευκοχρύσου, όπως τα *cis*-DDP και *trans*-DDP με το DNA <sup>276</sup>, αλλά και στα σύμπλοκα *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl και [Ru(terpy)(4-COAlaCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>).

Στα πειράματα της φασματοσκοπίας  $^{31}\text{P}$  NMR εμφανίστηκε μια καινούργια κορυφή στα  $\delta$  0.9 ppm ( $\Delta\delta=-1.4$  ppm), η οποία αυξάνεται καθώς η αναλογία Ru/ζεύγος βάσης αυξάνεται. Η νέα αυτή ταινία αντιστοιχεί σε μια νέα μορφή και γεωμετρία του DNA. Από την άλλη μεριά, η αρχική κορυφή καθώς αυξάνεται η αναλογία  $r$  υφίσταται μια σημαντική διαπλάτυνση από  $\Delta\nu_{1/2}=76$  Hz για  $r=0$  σε  $\Delta\nu_{1/2}=119$  Hz για  $r=0.5$ . Και στην περίπτωση αυτή, έχουμε δυο φαινόμενα που συμβαίνουν παράλληλα και μάλιστα το μεν πρώτο είναι κινητικά αργό στην κλίμακα χρόνου του NMR, και γι'αυτό εμφανίζεται μια νέα ταινία μετατοπισμένη κατά ~1.5 ppm σε χαμηλότερα πεδία. Η ταινία αυτή αφορά σε πυρήνες  $^{31}\text{P}$ , όπου το χημικό τους περιβάλλον έχει μικρότερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τους αρχικούς.



Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε στις προηγούμενες περιπτώσεις χωρίς τη σύζευξη, αν και πάλι η διαπλάτυνση είχε ερμηνευτεί όπως παραπάνω, σε μια ενδιάμεση όμως ή σχετικά γρήγορη κινητική. Αυτό φαίνεται στο σχήμα 7.40, όπου κατά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) με το DNA, δεν εμφανίζεται καινούργια ταινία.

Σχήμα 7.40.  $^{31}\text{P}$  NMR φάσμα του DNA κατά τη προσθήκη του συμπλόκου [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) σε διάφορες αναλογίες.

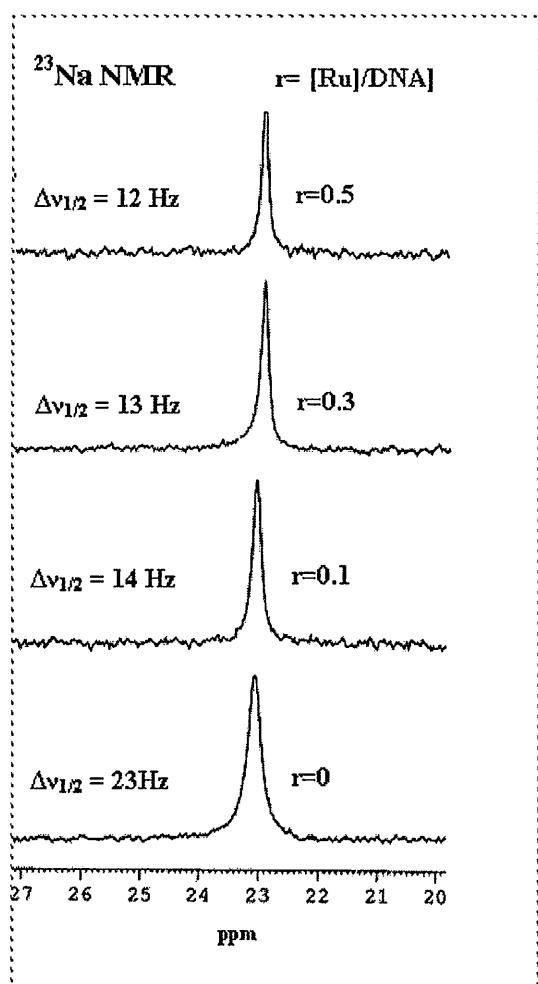
Μια νέα κορυφή παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του αντίστοιχου συμπλόκου με συζευγμένη αλανίνη ( $\Delta\delta = -2.3$  ppm), η οποία και στην περίπτωση αυτή αποδόθηκε στην αλληλεπίδραση του αμινοξέος με το DNA με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με μια αντίδραση αργής κινητικής. Βλέπουμε επίσης, ότι οι χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν κατά τη σύζευξη του πεπτιδίου GHK και της αλανίνης είναι διαφορετικές υποδηλώνοντας ότι τα δυο σύμπλοκα λόγω της διαφορετικότητας της σύζευξης αλληλεπιδρούν με το DNA διαφορετικά.

Είναι λογικό, κατά την ένταξη του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  ή  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  στις βάσεις του DNA να επηρεάζεται το περιβάλλον των φωσφόρων στους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και έτσι να υπάρχουν μη ισοδύναμοι φώσφοροι που δίνουν διαφορετικό σήμα στο φάσμα  $^{31}\text{P-NMR}$ . Η καινούργια ταινία  $^{31}\text{P}$  που εμφανίστηκε στα  $\delta$  0.9 ppm είναι εξαιρετικά λεπτή και συγκεκριμένα παρουσιάζει ένα εύρος  $\Delta\nu_{1/2} = 13$  Hz για  $r = 0.1$  και  $\Delta\nu_{1/2} = 15$  Hz για  $r = 0.5$ , στα όρια του πειραματικού σφάλματος.

Η ένταξη του *cisplatin* στο DNA έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση της κορυφής στο φάσμα  $^{31}\text{P-NMR}$  σε υψηλότερα ppm <sup>273</sup>. Από την άλλη μεριά, η αλληλεπίδραση της ένωσης  $\text{Et}_2\text{SnCl}_2$  με τις φωσφορικές ομάδες των πυριδινικών νουκλεοτιδίων 5'-CMP και 5'-UMP σε όξινο περιβάλλον, προκάλεσε μια σημαντική μεταβολή της χημικής μετατόπισης κατά 2 με 3 ppm της κορυφής του πυρήνα  $^{31}\text{P}$  <sup>274,275</sup>.

Κατά τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου (9) με το DNA χρησιμοποιώντας τις φασματοσκοπίες  $^{31}\text{P}$  NMR και  $^{23}\text{Na}$  NMR καταγράφηκαν τα φάσματα σε αναλογίες  $r = 0.1, 0.3$  και  $0.5$ . Οι συνθήκες των πειραμάτων ήταν οί'ιδες με εκείνες του χλωρο συμπλόκου (7). Στο παρακάτω σχήμα παριστάνονται τα φάσματα  $^{31}\text{P}$  NMR και  $^{23}\text{Na}$  NMR ενώ δίνεται και το εύρος της κάθε ταινίας στο μισό του ύψους της  $\Delta\nu_{1/2}$ .

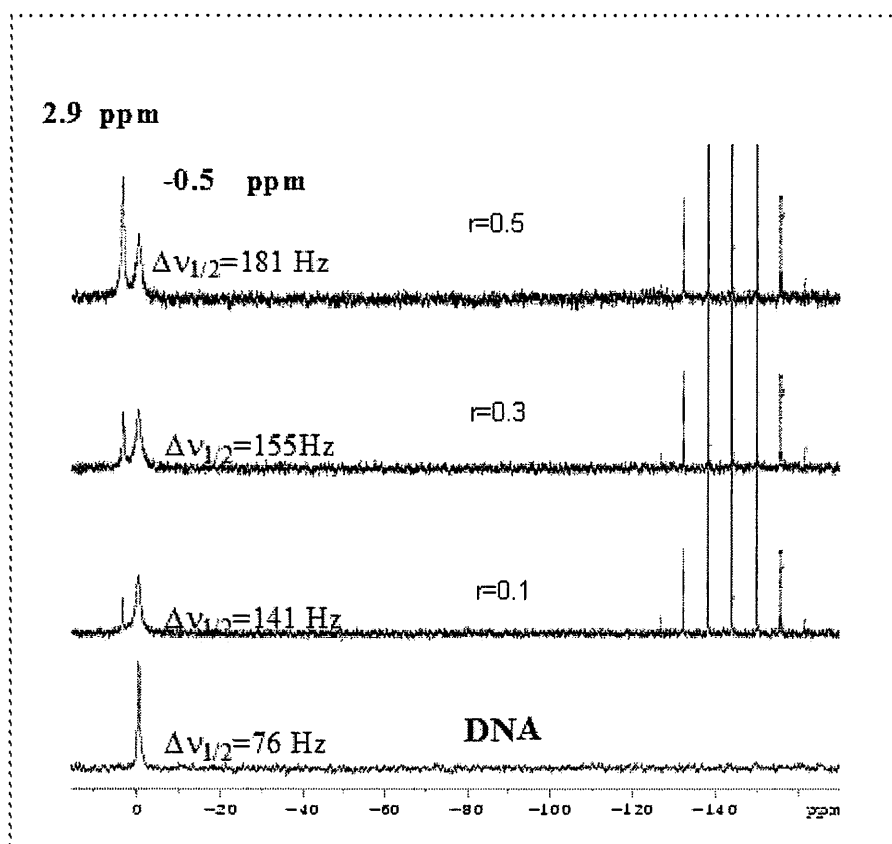
Όπως φαίνεται στο σχήμα 7.41 κατά τη προσθήκη του συμπλόκου (9) στο DNA το εύρος της ταινίας συντονισμού του πυρήνα  $^{23}\text{Na}$  μεταβάλλεται από  $\Delta\nu_{1/2} = 23\text{Hz}$ , σε  $\Delta\nu_{1/2} = 12$  Hz. Βλέπουμε ότι η μεταβολή στο  $\Delta\nu_{1/2}$ , καθώς αυξάνεται η αναλογία πέραν του 0.1 δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική και μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του χλωρο συμπλόκου (7), γεγονός που δείχνει τον διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης των δυο συμπλόκων με το DNA.



Σχήμα 7.41. <sup>23</sup>Na NMR φάσμα του DNA κατά τη προσθήκη του συμπλόκου (9) σε διάφορες αναλογίες.

Το θετικά φορτισμένο σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>HKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebrpy)NO<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) προκαλεί μια μη αντιστρεπτή διαφοροποίηση στο συνολικό φορτίο του πολυανιονικού βιολογικού μορίου κατά την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του με αυτό.

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το φάσμα <sup>31</sup>P NMR του DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου (9) σε διάφορες αναλογίες. Όπως φαίνεται στο σχήμα 7.42, εμφανίστηκε μια καινούργια κορυφή στα δ 2.9 ppm (Δδ = -3.4 ppm), η οποία αυξάνεται καθώς η αναλογία Ru/ζεύγος βάσης αυξάνεται. Από την άλλη μεριά, η αρχική κορυφή στα 0.5 ppm δεν μετατοπίζεται, ενώ καθώς αυξάνεται η αναλογία r υφίσταται μια σημαντική διαπλάτυνση. Κατά τη προσθήκη του συμπλόκου το εύρος Δν<sub>1/2</sub> μεταβάλλεται από Δν<sub>1/2</sub> = 76 Hz για r = 0, σε Δν<sub>1/2</sub> = 141 Hz για r = 0.1 και Δν<sub>1/2</sub> = 181 Hz για r = 0.5 (Σχήμα 7.42.).



Σχήμα 7.42.  $^{31}\text{P}$  NMR φάσμα του DNA κατά τη προσθήκη του συμπλόκου (9) σε διάφορες αναλογίες.

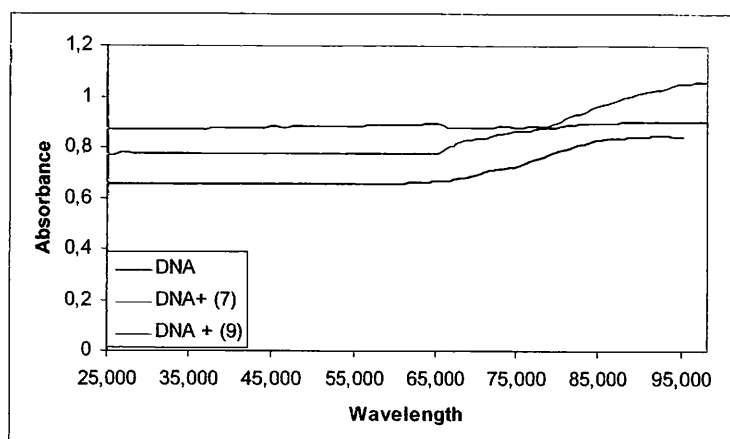
Και στην περίπτωση αυτή, η διαπλάτυνση αυτή, μπορεί να οφείλεται στην αυξανόμενη διασπορά των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων  $^{31}\text{P}$  εξαιτίας των γειτονικών φαινομένων που παρατηρούνται λόγω της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου (9) με το DNA. Η εμφάνιση της νέας ταινίας παραπέμπει σε αργή κινητική, ενδεικτική των αλληλεπιδράσεων μέσω δεσμών υδρογόνου ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Το φαινόμενο αυτό αντανακλά την ιδιαιτερότητα του συμπλόκου αυτού να μην εντάσσεται ομοιοπολικά στο DNA. Έτσι, παρατηρείται ουσιαστικά μόνο το φαινόμενο της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου εξαιτίας του πεπτιδίου με το DNA. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του αντίστοιχου συμπλόκου με συζευγμένη αλανίνη ( $\Delta\delta = -3.88$  ppm), η οποία και στην περίπτωση αυτή αποδόθηκε στην αλληλεπίδραση του αμινοξέος με το DNA με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με μια αντίδραση αργής κινητικής. Βλέπουμε και εδώ, ότι οι χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν κατά τη σύζευξη του πεπτιδίου GHK και της αλανίνης είναι διαφορετικές, υποδηλώνοντας ότι τα δυο σύμπλοκα λόγω της διαφορετικότητας της σύζευξης αλληλεπιδρούν με το DNA διαφορετικά.



Οι τιμές επίσης, της χημικής μετατόπισης καθώς και το εύρος της διαπλάτυνσης που παρατηρήθηκε για τα σύμπλοκα  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  και  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  είναι διαφορετικές υποδηλώνοντας, όπως εξάλλου αναμενόταν, το διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης τους με το DNA. Τα δυο σύμπλοκα επηρεάζουν διαφορετικά το περιβάλλον των φωσφόρων στους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και έτσι υπάρχουν μη ισοδύναμοι φώσφοροι που δίνουν διαφορετικό σήμα στα φάσματα  $^{31}\text{P-NMR}$ . Στο σχήμα 7.42. φαίνεται και το σήμα που δίνει το εξαφθοροφωσφορικό άλας του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$ , ιόντα τα οποία παραμένουν ελεύθερα στο διάλυμα.

### Καμπύλες τήξης του DNA

Κατά την μελέτη των αλληλεπιδράσεων των συμπλόκων (7) και (9) με DNA προσδιορίστηκαν οι καμπύλες τήξης του σε αναλογία  $r = 0.1$ . Είναι γνωστό ότι διάφορες σύμπλοκες ενώσεις είναι δυνατό να προκαλέσουν την σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA και έτσι να μεταβάλλουν το σημείο τήξεως του. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τήξης με σκοπό τον προσδιορισμό της μεταβολής της θερμοκρασίας τήξης του DNA που προκαλεί το σύμπλοκο (7) κατά την ένταξη του στις βάσεις του αλλά και το σύμπλοκο (9). Η θερμοκρασία τήξης του DNA απουσία των συμπλόκων βρέθηκε  $78^\circ\text{C}$  ενώ κατά την προσθήκη του χλωρο συμπλόκου σε αναλογία  $r = 0.1$  η θερμοκρασία τήξης  $\Delta T_m$  ( $T_m(\text{Ru}) - T_m$ ) αυξήθηκε κατά  $7^\circ\text{C}$ . Η μεταβολή αυτή οφείλεται στην αλληλεπίδραση του συμπλόκου του ρουθηνίου με το DNA και την ένταξη του στις βάσεις του, δείχνοντας μια σταθεροποίηση της διπλής έλικας<sup>272</sup>.



Σχήμα 7.43. Καμπύλες τήξης του DNA απουσία και παρουσία των συμπλόκων (7) και (9).

Η τιμή αυτή  $\Delta T_m$  αποκλείει την περίπτωση αλληλεπίδρασης παρεμβολής του συμπλόκου αυτού με το DNA αλλά ακόμη και τη μερική εισαγωγή των δακτυλίων της τερπυριδίνης ανάμεσα στις βάσεις του βιολογικού μορίου. Το πεπτιδίο, επίσης, είναι δυνατόν να αλληλεπιδρά με το βιολογικό μόριο και να προκαλεί μια σταθεροποίηση στην έλικα του DNA.

Το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  με συζευγμένο το αμινοξύ αλανίνη, που επίσης εντάσσεται στις βάσεις του DNA, παρουσίασε  $\Delta T_m = -4^\circ\text{C}$ . Βλέπουμε λοιπόν, ότι η φύση του αμινοξέος ή πεπτιδίου που είναι συζευγμένο στο σύμπλοκο του ρουθηνίου παίζει ρόλο στις αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων με το DNA. Ανάλογη τιμή  $\Delta T_m$  παρατηρήθηκε και στο σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$ , που εξετάστηκε στο κεφάλαιο 5, και συγκεκριμένα με τιμή  $\Delta T_m$  ( $T_m(\text{Ru}) - T_m$ ) =  $-3^\circ\text{C}$ .

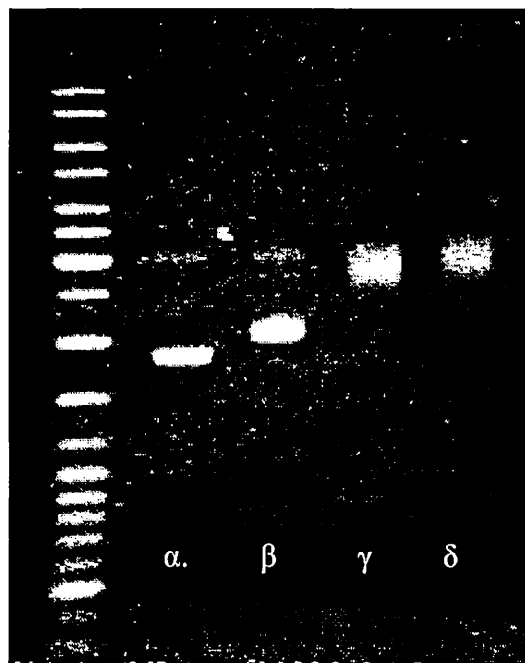
Η θερμοκρασία τήξης του DNA παρουσία του νιτρο συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  σε αναλογία  $r = 0.1$  μεταβλήθηκε κατά  $\Delta T_m$  ( $T_m(\text{Ru}) - T_m$ ) =  $-6^\circ\text{C}$ . Το σύμπλοκο χωρίς το συζευγμένο πεπτιδίο παρουσίασε τιμή  $\Delta T_m = +1^\circ\text{C}$ , ενώ το αντίστοιχο νιτρο-σύμπλοκο με συζευγμένη την αλανίνη  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  παρουσίασε  $\Delta T_m = -1^\circ\text{C}$ . Και οι δυο τιμές βρίσκονται πολύ κοντά στο πειραματικό σφάλμα επιβεβαιώνοντας την ασθενή αλληλεπίδραση των πιο πάνω συμπλόκων με το DNA.

#### Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης

Το αποτέλεσμα του απευθείας δεσμού του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  σε πλασμιδιακό DNA προσδιορίστηκε βάσει της ικανότητας του συμπλόκου να προκαλεί αλλαγές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα της κλειστής μορφής του πλασμιδίου pUC9. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ηλεκτροφόρησης με πηκτή αγαρόζης κατά την προσθήκη του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  σε δείγματα πλασμιδιακού DNA pUC9 σε διάφορες αναλογίες. Το πλασμιδιακό DNA pUC9 στην πηκτή αγαρόζης εμφανίζεται με μια έντονη ταινία που αντιστοιχεί στην κλειστή κυκλική μορφή του και μια άλλη λιγότερο διακριτή μικρή ταινία που αντιστοιχεί στο ποσοστό της χαλαρωμένης του μορφής<sup>281</sup>. Κατά την προσθήκη του συμπλόκου (7) στα δείγματα του DNA προκαλείται μια καθυστέρηση στην κινητικότητα της ταινίας του στην

πηκτή αγαρόζης, αφού κατά την ένταξη του συμπλόκου αυξάνεται το μοριακό βάρος του βιολογικού μορίου.

**Σχήμα 7.44.** Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA (α) pUC9, και με τη προσθήκη του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-COGHKCONH_2-4'-Mebrpy)Cl](PF_6)$  σε αναλογίες (β)  $r = 0.1$ , (γ)  $r = 0.3$ , (δ)  $r = 0.5$  ( $r = [Ru]/[DNA]$ ).



Η μείωση αυτή της κινητικότητας της ταινίας παρατηρήθηκε, όπως φαίνεται και στο σχήμα 7.44., σε αναλογία  $r=0.1$ ,  $r = 0.3$  και  $r = 0.5$  (Ru/ζεύγος βάσης). Όταν η αναλογία αυξάνεται σε  $r=0.3$  (ταινία γ) η ταινία αρχίζει να διευρύνεται και είναι πιθανό το πλασμιδιακό DNA να αρχίζει να υφίσταται ως μονόκλωνο.

Σε αναλογία  $r=0.5$  (ταινία δ) το DNA βρίσκεται με την κλειστή μορφή του αλλά είναι πιθανό κάποιες νουκλεοβάσεις να μην είναι πλέον ταιριασμένες κατάλληλα. Παρόλο αυτά, δεν παρατηρήθηκε καμιά ταινία που να δείχνει ότι το DNA pUC9 βρίσκεται με τη χαλαρωμένη ή γραμμική του μορφή.

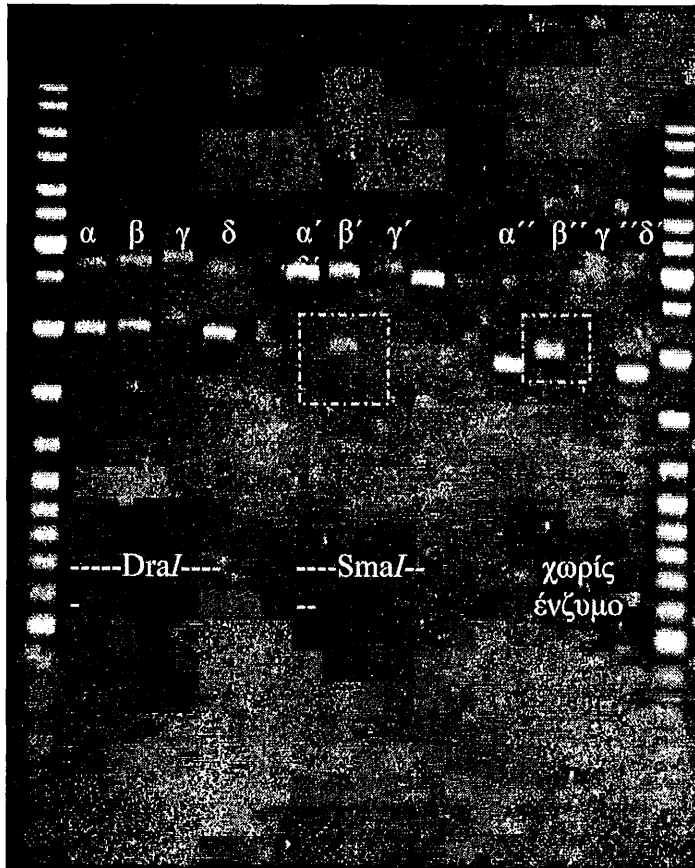
Το ξεδίπλωμα το DNA έχει παρατηρηθεί σε διάφορες περιπτώσεις μεταλλικών συμπλόκων. Για παράδειγμα, κατά την αλληλεπίδραση με απευθείας δεσμό των αντικαρκινικών συμπλόκων του ρουθηνίου  $Na[trans-RuCl_4(DMSO)(Im)]$  (NAMI) και διχλωρο(1,2-προπυλενοδιαμινοτετραοξικό)ρουθίνιο(III) (RAP) με πλασμιδιακό DNA παρατηρήθηκε μια μεταβολή της κινητικότητας των αντίστοιχων ταινιών στην πηκτή της ηλεκτροφόρησης λόγω αλλαγής της κυκλικής διαμόρφωσης του DNA<sup>268</sup>. Σημαντική μείωση στην κινητικότητα των ταινιών του πλασμιδιακού DNA παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης του με το cisplatin

καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου <sup>279</sup> αλλά και στην περίπτωση του συμπλόκου *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl<sub>2</sub>(NO)(terpy)]Cl που μελετήθηκε στο Κεφάλαιο 5.

Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε και η εκλεκτικότητα τους συμπλόκου (7) ως προς τις βάσεις πλασμιδιακού DNA pUC9 και για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δυο περιοριστικά ένζυμα και προσδιορίστηκε η ικανότητα τους να κόβουν το πλασμιδιακό DNA pUC9. Τα δύο ένζυμα διαφέρουν ως προς την αλληλουχία που αναγνωρίζουν και συγκεκριμένα το *DraI* αναγνωρίζει την αλληλουχία –TTTAAA– και το *SmaI* αναγνωρίζει την αλληλουχία –CCCGGG– των βάσεων. Οι αναλογίες συμπλόκου-pUC9 που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αυτό ήταν  $r = 0.1$  και  $r = 0.3$  και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά της υδρόλυσης pUC9 απουσία του συμπλόκου αλλά και με δείγματα χωρίς τη χρήση των δυο ενζύμων.

Κατά τον προσδιορισμό της παρεμπόδισης της δράσης του ενζύμου *SmaI* μια ασθενής ταινία παρατηρήθηκε στην ίδια θέση (ταινία β,  $r=0.1$ ) που υπάρχει και για το δείγμα του πλασμιδιακού DNA χωρίς όμως τη χρήση του ενζύμου *SmaI* (ταινία β',  $r = 0.1$ ). Αυτό δείχνει ότι το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>), που εντάσσεται στις βάσεις του του πλασμιδιακού DNA, δείχνει προτίμηση στις βάσεις γουανίνη και κυτοσίνη. Έτσι, το ένζυμο *SmaI* δεν αναγνωρίζει πλέον την συγκεκριμένη αλληλουχία για να προκαλέσει κόψιμο στο πλασμιδιακό DNA.

Στην αναλογία  $r = 0.1$  οι ταινίες αυτές είναι πιο διακριτές από ότι στην αναλογία  $r = 0.3$ . Αντίθετα, κατά τη χρήση του ενζύμου *DraI*, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία –TTTAAA–, δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμπόδιση στη δράση του στα δείγματα του pUC9 με το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-CO<sub>2</sub>H-4'-Mebpy-Gly-L-His-L-LysCONH<sub>2</sub>)Cl](PF<sub>6</sub>), αφού το ένζυμο προκάλεσε το κόψιμο του πλασμιδιακού DNA στη συγκεκριμένη αλληλουχία (σχήμα 7.45.). Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COGHKCONH<sub>2</sub>-4'-Mebpy)Cl](PF<sub>6</sub>) κατά τη συμπλοκοποίηση του με το πλασμιδιακό DNA pUC9 παρουσιάζει κάποια προτίμηση στις βάσεις γουανίνη και κυτοσίνη παρά στις αδενίνη και θυμίνη. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το πείραμα της ηλεκτροφόρησης κατά την χρήση των δυο περιοριστικών ενζύμων.



Σχήμα 7.45. Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA κατά την υδρόλυση του με τα ένζυμα *DraI* and *SmaI*. (α, α', α'') DNA ( $r = 0.1$ ), (β, β', β'')  $r = 0.1$ , (γ, γ', γ'')  $r = 0.3$ , (δ, δ', δ'') φρέσκο διάλυμα DNA ( $r = [Ru]/[\text{ζευγος βάσης}]$ ). Μέσα στα τετράγωνα υπάρχουν οι ταινίες σε αναλογία  $r = 0.1$ , όπου μια ασθενής ταινία παρατηρήθηκε στη ίδια θέση που υπάρχει και για το δείγμα του πλασμιδιακού DNA χωρίς όμως τη χρήση του ενζύμου *SmaI*.

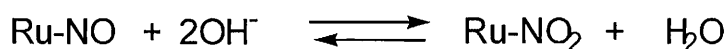
## ***Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ***

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup>**

Στο Κεφάλαιο αυτό θα παρατεθούν αναλυτικά τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρουσίαση των αποτελεσμάτων κατά την εκπόνηση της διατριβής αυτής. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα της σύνθεσης πολυπυριδινικών νιτρο και νιτροσυλο-συμπλόκων του Ru(II), τα οποία χαρακτηρίστηκαν πλήρως με διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές τεχνικές (IR, MS, UV-Vis, NMR, X-ray, στοιχειακή ανάλυση κ.τ.λ). Οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων αυτών με γραμμικό και πλασμιδιακό DNA μελετήθηκαν με διάφορες φασματοσκοπικές (UV-Vis,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{31}\text{P}$ -NMR, CD, καμπύλες τήξης κ.α.) και αναλυτικές τεχνικές (τεχνική ηλεκτροφόρησης, LC-MS). Αξίζει να σημειωθεί ότι σύνθεση χλωρο-πολυπυριδινικών συμπλόκων με συζευγμένα αμινοξέα και πεπτίδια με την τεχνική της στερεάς φάσης παρουσιάστηκε για πρώτη φορά στην διατριβή αυτή. Η τεχνική αυτή που αναπτύχθηκε, κατά τη εργασία αυτή, αποτελεί μια εύχρηστη και γρήγορη τεχνική σύνθεσης συμπλόκων του ρουθηνίου, ενώ μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα μέταλλα και να χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό συνδυαστικών βιβλιοθηκών διαφόρων συμπλόκων ενώσεων.

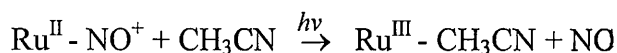
Παρακάτω θα παρατεθούν τα γενικά συμπεράσματα που προκύπτουν από την εργασία αυτή.

1. Σε όλες τις περιπτώσεις των συμπλόκων που συντέθηκαν η ένταξη της νιτροσυλ-ομάδας στο Ru ήταν ως  $\text{NO}^+$ , καθώς η τιμή της δόνησης τάσης του δεσμού N-O βρέθηκε να είναι στην περιοχή  $1860\text{-}1950\text{ cm}^{-1}$ .
2. Η ένταξη του υποκαταστάτη  $4\text{-COXCONH}_2\text{-}4'\text{-Mebpy}$  ( $\text{X} = \text{OH}$ ,  $\text{AlaCONH}_2$ ,  $\text{GHKCONH}_2$ ) στο σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})\text{Cl}_3]$  οδήγησε στη δημιουργία δυο ισομερών θέσης ανάλογα με τον προσανατολισμό της Me του υποκαταστάτη αυτού ως προς το ενταγμένο χλώριο. Τα ισομερή μελετήθηκαν με φασματοσκοπία NMR.
3. Το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-}4'\text{-Mebpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  μελετήθηκε με περίθλαση ακτίνων X, όπου διαπιστώθηκε ότι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα νιτρο ομάδα και την καρβοξυλομάδα διατηρούν μια διμερή μορφή.
4. Σε σχέση με τη σταθερότητα των νιτροσυλο συμπλόκων που συντέθηκαν διαπιστώθηκε ότι αυτά γρήγορα μετατρέπονται στα αντίστοιχα νιτρο παράγωγα τους μέσω της αντίδρασης ισοροπίας



Αν και η παραπάνω ισορροπία εξαρτάται από τη φύση των υποκαταστατών του ρουθηνίου, σε κάθε περίπτωση η μετατροπή αυτή συνέβαινε σε  $\text{pH} < 7$ . Έτσι, τα νιτροσυλο παράγωγα ήταν σταθερά σε όξινα  $\text{pH}$  2-4, ενώ τα νιτρο σε αλκαλικά 7-12. Η παραπάνω διαπίστωση μας οδήγησε να μελετήσουμε μόνο τις αλληλεπιδράσεις των νιτρο παραγώγων με DNA, που γνωρίζαμε ότι ήταν σταθερά σε  $\text{pH} = 7$ .

5. Όλα τα νιτροσυλο σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COXCONH}_2\text{-4'-Mebrpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  ( $\text{X} = \text{OH}, \text{AlaCONH}_2, \text{GHKCONH}_2$ ) σε άνυδρο  $\text{CH}_3\text{CN}$  και απουσία φωτός ήταν σταθερά για μεγάλα χρονικά διαστήματα (μεγαλύτερα των δυο εβδομάδων). Όμως η ακτινοβόληση τους με ορατό φως οδήγησε σε φωτοπροϊόντα, όπου το NO είχε αποδεσμευτεί και αντικατασταθεί από  $\text{CH}_3\text{CN}$ , ενώ το Ru είχε οξειδωθεί σύμφωνα με την αντίδραση:



6. Το σύμπλοκο *cis*-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{terpy})]\text{Cl}$  έδειξε αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δραστηριότητα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές A2780 (φυσιολογικές και ανθεκτικές στο *cisplatin*) με  $\text{IC}_{50} = 0.49 \mu\text{M}$  που αποτελεί την μικρότερη γνωστή τιμή μέχρι σήμερα συμπλόκων του ρουθηνίου για αυτή την κυτταρική σειρά.
7. Οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων που συντέθηκαν με DNA έδειξαν ότι τα μεν χλωρο παράγωγα αντιδρούν με απευθείας δεσμό στις βάσεις του DNA μετά από υδρόλυση του χλωρίου, και μάλιστα με προτίμηση στις βάσεις CG, ενώ σημαντική συνεισφορά στο τελικό αποτέλεσμα έχει και το συζευγμένο αμινοξύ ή πεπτιδίο μέσα από επιπλέον αλληλεπίδραση με το DNA. Τα νιτρο παράγωγα παρουσιάζουν τις αλληλεπιδράσεις του συζευγμένου αμινοξέος ή πεπτιδίου (υδρόφοβες, δεσμοί υδρογόνου κ.τ.λ) μαζί με ηλεκτροστατικής φύσης αλληλεπιδράσεις, ενώ φαίνεται ότι η νιτρο ομάδα παραμένει ισχυρά συνδεδεμένη στο ρουθίνιο.
8. Η νουκλεολυτική δραστηριότητα των συμπλόκων μελετήθηκε στην περίπτωση του συμπλόκου (3), όπου διαπιστώθηκε κόψιμο της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA κατά την ακτινοβόληση του δείγματος DNA-συμπλόκου. Η φωτονουκλεολυτική αυτή δραστηριότητα σχετίζεται με τη δημιουργία *in situ* σωματιδίων υπεύθυνων για την διάσπαση, καθώς η αλληλεπίδραση ακτινοβολημένου συμπλόκου με DNA δεν επιφέρει κόψιμο της αλυσίδας.



---

## Περίληψη

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν διάφορα πολυπυριδινικά σύμπλοκα του Ru(II), τα οποία χαρακτηρίστηκαν πλήρως με διάφορες φασματοσκοπικές (IR, 1D και 2D-NMR, UV-Vis) και αναλυτικές τεχνικές. Οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων αυτών με γραμμικό και πλασμιδιακό DNA μελετήθηκαν με διάφορες τεχνικές και διαπιστώθηκε σε κάθε περίπτωση η φύση των αλληλεπιδράσεων με το DNA. Η ισορροπία μεταξύ των νιτροσυλ και νιτρο συμπλόκων του Ru(II) εξαρτάται από το pH και για αυτό το λόγο μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των νιτρο παραγώγων με DNA, τα οποία ήταν σταθερά σε pH = 7. Όλα τα νιτροσυλο σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν ακτινοβολήθηκαν με ορατό φως και διαπιστώθηκε η αποδέσμευση του NO και ο σχηματισμός φωτοπροϊόντων. Η νουκλεολυτική δραστηριότητα των συμπλόκων μελετήθηκε στην περίπτωση του συμπλόκου (3), όπου διαπιστώθηκε κόψιμο της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA κατά την ακτινοβολήση του δείγματος DNA-συμπλόκου. Η δραστηριότητα αυτή σχετίζεται με τη δημιουργία *in situ* σωματιδίων υπεύθυνων για την διάσπαση, καθώς η αλληλεπίδραση ακτινοβολημένου συμπλόκου με DNA δεν επιφέρει κόψιμο της αλυσίδας. Κατά την μελέτη των αλληλεπιδράσεων των συμπλόκων με συζευγμένο το αμινοξύ αλανίνη ή το πεπτίδιο GHK διαπιστώθηκε ότι το συζευγμένο αμινοξύ ή πεπτίδιο συνεισφέρει στην αλληλεπίδραση με το DNA, και μάλιστα η αλληλεπίδραση διαφοροποιείται από την φύση της σύζευξης. Τέλος, η σύνθεση χλωρο-πολυπυριδινικών συμπλόκων με συζευγμένα αμινοξέα και πεπτίδια, με την τεχνική της στερεάς φάσης, παρουσιάστηκε για πρώτη φορά στην διατριβή αυτή και αποτελεί μια νέα εύχρηστη και γρήγορη τεχνική σύνθεσης συμπλόκων, ενώ μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα μέταλλα.

---

## *Abstract*

Several polypyridine ruthenium complexes were synthesized and fully characterized with various spectroscopic (IR, 1D και 2D-NMR, UV-Vis) and analytical techniques. The interactions of the complexes with linear and plasmid DNA were studied using several techniques. The equilibrium between the nitrosyl and nitro species depends on the pH of the reaction. At pH =7 only the nitro complexes were present and for this reason the interactions of these complexes with DNA were studied. The photorelease of the NO from the nitrosyl complexes upon irradiation with a mercury lamp was studied. The influence of the irradiation to adduct (complex **(3)**-DNA), was also studied and the results showed DNA cleavage. The conjugation of alanine and the peptide GHK was achieved via solid phase synthesis that is reported for the first time here. The study of the interactions of the complexes with DNA showed that the conjugated moiety of the complex interacts with the biological molecule. The nature of the conjugated molecule plays an important role in this interaction.

## Βιβλιογραφία

1. B. Rosenberg; L. Van Camp; J. E. Trosko, *Nature*, **1969**, 222, 385.
2. B. Rosenberg; L. Van Camp; T. Krigas, *Nature*, **1965**, 205, 698.
3. E. Wong; C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2451.
4. B. K. e. Keppler, *Metal complexes in Cancer chemotherapy*. VCH, Weinheim, **1993**.
5. I. Haiduc; C. Silvestru, *Coord. Chem. Rev.*, **1990**, 99, 253.
6. M. Gielen, *Metal Based Drugs*, **1994**, 1, 213.
7. M. Gielen, *Metal Based Drugs*, **1995**, 2, 99.
8. P. J. Sadler; R. A. Sue, *Metal Based Drugs*, **1994**, 1, 107.
9. M. J. Clarke, *Metal complexes in Cancer chemotherapy*. Ed. Keppler, B. K., VCH, Weinheim, Germany, **1993**, 129 and references therein.
10. B. K. e. Keppler, *Prog. Clin. Biochem. Med.*, **1989**, 10, 41.
11. G. Mestroni; E. Alessio; G. Sava; S. Pacor; M. Collucia; A. Boccarelli, *Metal Based Drugs*, **1994**, 1, 41.
12. M. J. Clarke, *Oncological implications in the chemistry of ruthenium*. In : Sigel H. (ed). *Metal ions in biological systems*. Marcel Dekker, New York,, **1980**, 231.
13. G. Sava; S. Zorzet; T. Giralidi; G. Mestroni; G. Zassinovlch, *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*, **1984**, 20, 841.
14. B. K. Keppler; W. Rupp, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1986**, 111, 166.
15. E. Alessio; G. Mestroni; G. Nardin; W. M. Attia; M. Calligaris; G. Sava; S. Zorzet, *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 4099.
16. G. Sava; S. Pacor; G. Mestroni; E. Alessio, *Clin. Exp. Metastasis*, **1992**, 10, 273.
17. S. P. Fricker, *Platinum Metal Rev.*, **1995**, 39, 150.
18. P. M. Vanvliet; S. M. S. Toekimin; J. G. Haasnoot; J. Reedijk; O. Novakova; O. Vrana; V. Brabec, *Inorg. Chim. Acta*, **1995**, 231, 57.
19. O. Novakova; J. Kasparkova; O. Vrana; P. M. Vanvliet; J. Reedijk; V. Brabec, *Biochemistry*, **1995**, 34, 12369.
20. J. Vilaplana; M. A. Romero; M. Quiros; J. M. Salas; F. Gonzalez-Vilchez, *Metal Based Drugs*, **1995**, 2, 211.
21. M. J. Clarke; V. M. Bailey; P. E. Doan; C. D. Hiller; K. J. LaChanceGalang; H. Daghljan; S. Mandal; C. M. Bastos, *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 4896.
22. J. R. Durig; J. Danneman; W. D. Behnke; E. E. Mercer, *Chem.-Biol. Interact.*, **1976**, 13, 287.
23. A. D. Kelman; M. J. Clarke; S. D. Edmonds; H. J. Peresle, *J. Clin. Hematol. Oncol.*, **1977**, 7, 287.
24. B. K. Keppler, *New J. Chem.*, **1990**, 14, 389.
25. B. K. Keppler, **1995**, 154.
26. O. M. N. Dhuhghaill; W. R. Hagen; B. K. Keppler; K. G. Lipponer; P. J. Sadler, *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.*, **1994**, 3305.
27. E. Holler; W. Schaller; B. Keppler, *Drug Res.*, **1991**, 41-2, 1065.
28. F. Kratz; M. Hartmann; B. Keppler; L. Messori, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 2581.
29. T. Giralidi; G. Sava; G. Bertoli; G. Mestroni; G. Zassinovlch, *Cancer Res.*, **1977**, 37, 2662.

30. A. Nassi; E. Alessio; G. Mestroni; F. Loseto; D. Giordano; M. Coluccia, *Anticancer Res.*, **1990**, 10, 1411.
31. A. Mercer; J. Trotter, *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.*, **1975**, 2480.
32. I. P. Evans; A. Spencer; Wilkinso.G, *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.*, **1973**, 204.
33. B. R. James; E. Ochiai; G. I. Rempel, *Inorganic & Nuclear Chemistry Letters*, **1971**, 7, 781.
34. G. Mestroni; E. Alessio; M. Calligaris; W. H. Attia; F. Quadrifoglio; S. Cauci; G. Sava; S. Zorzet; S. Pacor; C. Monti-Bragadin; M. Tamaro; L. Dolzani, *Prog. Clin. Biochem. Med.*, **1989**, 10, 71.
35. G. Sava; A. Bergamo, *Current Topics in Pharmacology*, **1997**, 3, 207.
36. G. Sava; I. Capozzi; K. Clerici; G. Gagliardi; E. Alessio; G. Mestroni, *Clin. Exp. Metastasis*, **1998**, 16, 371.
37. G. Sava; K. Clerici; I. Capozzi; M. Cocchietto; R. Gagliardi; E. Alessio; G. Mestroni; A. Perbellini, *Anti-Cancer Drugs*, **1999**, 10, 129.
38. G. Sava; A. Bergamo, *Anticancer Res.*, **1999**, 19, 1117.
39. G. Sava; R. Gagliardi; A. Bergamo; E. Alessio; G. Mestroni, *Anticancer Res.*, **1999**, 19, 969.
40. G. Sava; A. Bergamo; S. Zorzet; B. Gava; C. Casarsa; M. Cocchietto; A. Furlani; V. Scarcia; B. Serli; E. Iengo; E. Alessio; G. Mestroni, *Eur. J. Cancer*, **2002**, 38, 427.
41. A. Bergamo; R. Gagliardi; V. Scarcia; A. Furlani; E. Alessio; G. Mestroni; G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, 289, 559.
42. G. Sava; E. Alessio; A. Bergamo; G. Mestroni, *Topics in Biological Inorganic Chemistry*, **1999**, 1, 143.
43. M. Bouma; B. Nuijen; M. T. Jansen; G. Sava; A. Flaibani; A. Bult; J. H. Beijnen, *Int. J. Pharm.*, **2002**, 248, 239.
44. M. Eriksson; M. Leijon; C. Hiort; B. Norden; A. Graslund, *Biochemistry*, **1994**, 33, 5031.
45. S. Satyanarayana; J. C. Dabrowiak; J. B. Chaires, *Biochemistry*, **1993**, 32, 2573.
46. N. Grover; N. Gupta; P. Singh; H. H. Thorp, *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 2014.
47. J. K. Barton, *Science*, **1986**, 233, 727.
48. N. Grover; T. W. Welch; T. A. Fairley; M. Cory; H. H. Thorp, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 3544.
49. G. A. Neyhart; N. Grover; S. R. Smith; W. A. Kalsbeck; T. A. Fairley; M. Cory; H. H. Thorp, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 4423.
50. N. Gupta; N. Grover; G. A. Neyhart; P. Singh; H. H. Thorp, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 310.
51. N. Gupta; N. Grover; G. A. Neyhart; W. G. Liang; P. Singh; H. H. Thorp, *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.*, **1992**, 31, 1048.
52. J. K. Barton; E. Lolis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 708.
53. B. A. Moyer; T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **1981**, 20, 436.
54. P. M. Vanvliet; J. G. Haasnoot; J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 1934.
55. N. Grover; N. Gupta; H. H. Thorp, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3390.
56. F. P. Dwyer; E. Mayhew; E. M. F. Roe; A. Shulman, *Br. J. Cancer*, **1965**, 19, 195.
57. A. Shulman; G. M. Laycock; T. R. Bradley, *Chem.-Biol. Interact.*, **1977**, 16, 89.
58. C. Hiort; B. Norden; A. Rodger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1971.
59. J. Shack; R. J. Jenkins; J. M. Thompsett, *J. Biol. Chem.*, **1953**, 203, 373.

60. G. L. Eichhorn; Y. A. Shin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 90, 7323.
61. A. Dkhissi; P. Soulard; A. Perrin; N. Lacome, *J. Mol. Spectrosc.*, **1997**, 183, 12.
62. E. Forte; H. Vandenberg, *Chem. Phys.*, **1978**, 30, 325.
63. A. R. W. McKellar; J. K. G. Watson; B. J. Howard, *Mol. Phys.*, **1995**, 86, 273.
64. C. E. Dinerman; G. E. Ewing, *J. Chem. Phys.*, **1970**, 53, 626.
65. J. Billingsley; A. B. Callear, *Trans. Faraday Soc.*, **1970**, 67, 589.
66. J. A. Gally; P. R. Montague; G. N. Reeke; G. M. Edelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1990**, 87, 3547.
67. J. N. Armor, *J. Chem. Eng. Data*, **1974**, 19, 84.
68. J. R. Lancaster, Jr. *Nitric Oxide, Biol. Chem.*, **1997**, 1, 18.
69. P. Natalis; J. E. Collin; J. Delwiche; G. Caprace; M. J. Hubin, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, **1979**, 17, 421.
70. K. Y. Lee; D. J. Kuchynka; J. K. Kochi, *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 4196.
71. D. M. Stanbury, *Adv. Inorg. Chem.*, **1989**, 33, 69.
72. M. D. Bartberger; W. Liu; E. Ford; K. M. Miranda; C. Switzer; J. M. Fukuto; P. J. Farmer; D. A. Wink; K. N. Houk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2002**, 99, 10958.
73. M. W. Wong; R. H. Nobes; W. J. Bouma; L. Radom, *J. Chem. Phys.*, **1989**, 91, 2971.
74. M. W. Siegel; R. J. Celotta; J. L. Hall; J. Levine; R. A. Bennett, *Phys. Rev.*, **1972**, 6, 607.
75. D. Teillet-Billy, *J. Phys.*, **1977**, 10B, L111.
76. J. Lee; L. Chen; A. H. West; G. B. Richter-Addo, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 1019.
77. D. E. Koshland, *Science*, **1992**, 258, 1861.
78. E. Culotta; D. E. Koshland jr, *Science*, **1992**, 258, 1862.
79. A. Calver; J. Collier; P. Vallance, *Exp. Physiol.*, **1993**, 78, 303.
80. L. J. Ignarro, *Hypertension*, **1990**, 16, 477.
81. L. J. Ignarro, *Biochem. Pharmacol.*, **1991**, 41, 485.
82. S. H. Snyder; D. S. Brecht, *Sci. Am.*, **1992**, 266, 68.
83. D. J. Stuehr; C. F. Nathan, *J. Exp. Med.*, **1989**, 169, 1543.
84. Y. Henry; C. Ducrocq; J. C. Drapier; D. Servent; C. Pellat; A. Guissani, *Eur. Biophys. J.*, **1991**, 20, 1.
85. D. S. Brecht; P. M. Hwang; C. E. Glatt; C. Lowenstein; R. R. Reed; S. H. Snyder, *Nature*, **1991**, 351, 714.
86. K. A. White; M. A. Marletta, *Biochemistry*, **1992**, 31, 6627.
87. D. J. Stuehr; O. W. Griffith, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **1992**, 65, 287.
88. T. D. Porter; M. J. Coon, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 13469.
89. J. M. Fukuto; G. C. Wallace; R. Hsieh; G. Chaudhuri, *Biochem. Pharmacol.*, **1992**, 43, 607.
90. E. Rinden; M. M. Maricq; J. J. Grabowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 1203.
91. R. W. Ye; I. Torosuares; J. M. Tiedje; B. A. Averill, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 12848.
92. J. S. Stamler; D. I. Simon; J. A. Osborne; M. E. Mullins; O. Jaraki; T. Michel; D. J. Singel; J. Loscalzo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1992**, 89, 444.
93. H. Kosaka; J. S. Wishnok; M. Miwa; C. D. Leaf; S. R. Tannenbaum, *Carcinogenesis*, **1989**, 10, 563.

94. C. H. Kim; T. C. Hollocher, *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 2092.
95. R. S. Wade; C. E. Castro, *Chem. Res. Toxicol.*, **1990**, 3, 289.
96. B. Mayer; M. John; B. Heinzl; E. R. Werner; H. Wachter; G. Schultz; E. Bohme, *FEBS Lett.*, **1991**, 288, 187.
97. R. Radi; J. S. Beckman; K. M. Bush; B. A. Freeman, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 4244.
98. M. Lepoivre; F. Fieschi; J. Coves; L. Thelander; M. Fontecave, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1991**, 179, 442.
99. N. V. Blough; G. C. Zafiriou, *Inorg. Chem.*, **1985**, 24, 3502.
100. M. P. Doyle; J. W. Hoekstra, *J. Inorg. Biochem.*, **1981**, 14, 351.
101. V. S. Sharma; R. A. Isaacson; M. E. John; M. R. Waterman; M. Chevion, *Biochemistry*, **1983**, 22, 3897.
102. J. R. Lancaster; J. B. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1990**, 87, 1223.
103. A. F. Vanin, *Biokhimiya*, **1967**, 32, 277.
104. J. C. Woolum; E. Tiezzi; B. Commoner, *Biochim. Biophys. Acta*, **1968**, 1160, 311.
105. N. G. Connelly, *Inorg. Chim. Acta Rev.*, **1972**, 6, 47.
106. J. A. McCleverty, *Chem. Rev.*, **1979**, 79, 53.
107. J. Enemark; R. Feltham, *Coord. Chem. Rev.*, **1974**, 13, 339.
108. F. Bottomly; W. V. F. Brooks; S. G. Clarkson; S. B. Tong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1973**, 919.
109. J. H. Ridd, *Adv. Phys. Org. Chem.*, **1978**, 16, 1.
110. S. Oae; K. Shinham, *Org. Prep. Proced. Int.*, **1983**, 15, 165.
111. D. A. Wink; K. S. Kasprzak; C. M. Maragos; R. K. Elespuru; M. Misra; T. M. Dunams; T. A. Cebula; W. H. Koch; A. W. Andrews; J. S. Allen; L. K. Keefer, *Science*, **1991**, 254, 1001.
112. J. S. Stamler; O. Jarak; J. Osborne; D. I. Simon; J. Keaney; J. Vita; D. Singel; C. R. Valeri; J. Loscalzo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1992**, 89, 7674.
113. D. A. Bazylinski; T. C. Hollocher, *Inorg. Chem.*, **1985**, 24, 4285.
114. M. P. Doyle; S. N. Mahapatro; R. D. Broene; J. K. Guy, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 593.
115. T. Turk; T. C. Hollocher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, 183, 983.
116. B. A. Frenz; J. A. Ibers, *MTP Int. Rev. Sci. Phys. Chem. Ser. One*, **1972**, 11, 33.
117. R. D. Feltham; W. Silverthorn; G. McPherson, *Inorg. Chem.*, **1969**, 8, 344.
118. R. Hoffmann; M. M. L. Chen; M. Elian; A. R. Rossi; D. M. P. Mingos, *Inorg. Chem.*, **1974**, 13, 2666.
119. G. B. Richter-Addo; P. Legzdins; J. Burstyn, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 857.
120. J. Mason; L. F. Larkworthy; E. A. Moore, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 913.
121. G. Stochel; A. Wanat; E. Kulis; Z. Stasicka, *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 171, 203.
122. G. Schmid; U. Neumann; B. Bunsenges, *Phys. Chem*, **1966**, 70, 1165.
123. D. R. Lang; J. A. Davis; L. G. F. Lopes; A. A. Ferro; L. C. G. Vaseoncellos; D. W. Franco; E. Tfouni; A. Wieraszko; M. J. Clarke, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 2294.
124. E. Tfouni; M. Krieger; B. R. McGarvey; D. W. Franco, *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, 236, 57.
125. N. Bettache; T. Carter; J. E. T. Corrie; D. Ogden; D. R. Trentham, *Meth. Enzymol.*, **1996**, 268, 266.
126. T. D. Carter; N. Bettache; D. Ogden, *Br. J. Pharmacol.*, **1997**, 122, 971.

127. J. M. Sloeik; R. E. Shepherd, *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 311, 80.
128. A. B. P. Lever, *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 1271.
129. R. W. Callahan; T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **1977**, 16, 574.
130. D. Ooyama; N. Nagao; H. Nagao; Y. Miura; A. Hasegawa; K. Ando; F. S. Howell; M. Mukaida; K. Tanaka, *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 6024.
131. H. Tomizawa; K. Harada; E. Miki; K. Mizumachi; T. Ishimori; A. Urushiyama; M. Nakahara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1993**, 66, 1658.
132. W. Odenkirk; A. L. Rheingold; B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 6392.
133. A. A. Batista; C. Pereira; S. L. Queiroz; L. A. A. deOliveira; R. H. D. Santos; M. T. D. Gambardella, *Polyhedron*, **1997**, 16, 927.
134. C. T. Page; J. E. Fergusson, *Aust. J. Chem.*, **1983**, 36, 855.
135. D. H. F. Souza; G. Oliva; A. Teixeira; A. A. Batista, *Polyhedron*, **1995**, 14, 1031.
136. A. Domenicano; A. Vaciago; L. Zambonelli; P. L. Loader; L. M. Venanzi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1966**, 476.
137. H. Tomizawa; E. Miki; K. Mizumachi; T. Ishimori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1994**, 67, 1809.
138. G. A. Heath; R. L. Martin, *Aust. J. Chem.*, **1970**, 23, 2297.
139. J. V. Dubrawski; R. D. Feltham, *Inorg. Chem.*, **1980**, 19, 355.
140. D. W. Franco, *Inorganica Chimica Acta-Articles*, **1981**, 48, 1.
141. D. W. Franco; H. Taube, *Inorg. Chem.*, **1978**, 17, 571.
142. A. Wieraszko; M. J. Clarke; D. R. Lang; L. G. F. Lopes; D. W. Franco, *Life Sci.*, **2001**, 68, 1535.
143. C. F. Works; P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7592.
144. K. M. Miranda; X. H. Bu; I. Lorkovic; P. C. Ford, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 4838.
145. I. M. Lorkovic; K. M. Miranda; B. Lee; S. Bernhard; J. R. Schoonover; P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 11674.
146. Y. Chen; F. T. Lin; R. E. Shepherd, *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 973.
147. J. M. Slocik; M. S. Ward; K. V. Somayajula; R. E. Shepherd, *Transit. Met. Chem.*, **2001**, 26, 351.
148. J. N. Armor; H. A. Seheidegger; H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 5928.
149. J. N. Armor; S. D. Pell, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 7625.
150. M. Haukka; T. Venalainen; M. Ahlgren; T. A. Pakkanen, *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 2931.
151. P. Homanen; M. Haukka; M. Ahlgren; T. A. Pakkanen, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 3794.
152. M. G. Sauaia; F. D. Oliveira; A. C. Tedesco; R. S. da Silva, *Inorg. Chim. Acta*, **2003**, 355, 191.
153. D. Ooyama; Y. Miura; Y. Kanazawa; F. S. Howell; N. Nagao; M. Mukaida; H. Nagao; K. Tanaka, *Inorg. Chim. Acta*, **1995**, 237, 47.
154. A. Y. Ershov; A. D. Shashko; O. V. Sizova; N. V. Ivanova, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2002**, 72, 1327.
155. V. Togniolo; R. S. da Silva; A. C. Tedesco, *Inorg. Chim. Acta*, **2001**, 316, 7.
156. O. V. Sizova; V. V. Sizov; A. Y. Ershov; A. B. Nikol'skii; V. L. Baranovskii; A. D. Shashko, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2001**, 71, 995.
157. H. Nagao; D. Ooyama; T. Hirano; H. Naoi; M. Shimada; S. Sasaki; N. Nagao; M. Mukaida; T. Oi, *Inorg. Chim. Acta*, **2001**, 320, 60.

158. T. Hirano; K. Ueda; M. Mukaida; H. Nagao; T. Oi, *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.*, **2001**, 2341.
159. H. Nagao; N. Nagao; D. Ooyama; Y. Sato; T. Oosawa; H. Kuroda; F. S. Howell; M. Mukaida, *Chem. Lett.*, **1998**, 473.
160. H. Nagao; K. Ito; N. Tsuboya; D. Ooyama; N. Nagao; F. S. Howell; M. Mukaida, *Inorg. Chim. Acta*, **1999**, 290, 113.
161. H. Nagao; N. Nagao; Y. Yukawa; D. Ooyama; Y. Sato; T. Oosawa; H. Kuroda; F. S. Howell; M. Mukaida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1999**, 72, 1273.
162. D. Ooyama; H. Nagao; K. Ito; N. Nagao; F. S. Howell; M. Mukaida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1997**, 70, 2141.
163. M. Mukaida; Y. Sato; H. Kato; M. Mori; D. Ooyama; H. Nagao; F. S. Howell, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2000**, 73, 85.
164. S. A. Adeyemi; T. J. Meyer; F. J. Miller, *Inorg. Chem.*, **1972**, 11, 994.
165. A. Dovletoglou; S. A. Adeyemi; T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 4120.
166. D. W. Pipes; T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 2466.
167. N. Chanda; S. M. Mobin; V. G. Puranik; A. Datta; M. Niemeyer; G. K. Lahiri, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 1056.
168. H. Hadadzadeh; M. C. DeRosa; G. P. A. Yap; A. R. Rezvani; R. J. Crutchley, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 6521.
169. Z. Diwu, *Photochem. Photobiol.*, **1995**, 61, 529.
170. R. Bonnett, *Chem. Soc. Rev.*, **1995**, 24, 19.
171. I. M. Schmitt; S. Chimenti; F. P. Gasparro, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1995**, 27, 101.
172. B. Aveline; T. Hasan; R. W. Redmond, *Photochem. Photobiol.*, **1994**, 59, 328.
173. B. A. Goff; R. Bachor; N. Kollias; T. Hasan, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1992**, 15, 239.
174. S. G. Bown, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 6, 1.
175. R. Bonnett; A. N. Nizhnik; S. G. White; M. C. Berenbaum, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 6, 29.
176. J. C. Maziere; R. Santus; P. Morliere; J. P. Reyftmann; C. Candide; L. Mora; S. Salmon; C. Maziere; S. Gatt; L. Dubertret, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 6, 61.
177. D. Brault, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 6, 79.
178. D. Kessel; V. Schulz, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 6, 87.
179. G. Jori; J. D. Spikes, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **1990**, 6, 93.
180. S. Burney; J. L. Caulfield; J. C. Niles; J. S. Wishnok; S. R. Tannenbaum, *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **1999**, 424, 37.
181. S. Moncada; R. M. J. Palmer; E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.*, **1991**, 43, 109.
182. M. A. Marletta, *Chem. Res. Toxicol.*, **1988**, 1, 249.
183. M. A. Marletta; P. S. Yoon; R. Iyengar; C. D. Leaf; J. S. Wishnok, *Biochemistry*, **1988**, 27, 8706.
184. J. B. Hibbs; R. R. Taintor; Z. Vavrin; E. M. Rachlin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 157, 87.
185. J. MacMicking; Q. W. Xie; C. Nathan, *Annu. Rev. Immunol.*, **1997**, 15, 323.
186. H. Ohshima; H. Bartsch, *Mutation Research*, **1994**, 305, 253.
187. L. C. Green; P. L. Skipper; R. J. Turesky; M. S. Bryant; S. R. Tannenbaum, *Cancer Res.*, **1984**, 44, 4254.
188. M. N. Routledge; D. A. Wink; L. K. Keefer; A. Dipple, *Carcinogenesis*, **1993**, 14, 1251.



189. J. Zhang; V. L. Dawson; T. M. Dawson; S. H. Snyder, *Science*, **1994**, 263, 687.
190. S. Tamir; R. S. Lewis; T. D. Walker; W. M. Deen; J. S. Wishnok; S. R. Tannenbaum, *Chem. Res. Toxicol.*, **1993**, 6, 895.
191. R. S. Lewis; S. R. Tannenbaum; W. M. Deen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 3933.
192. L. A. Loeb; B. D. Preston, *Annu. Rev. Genet.*, **1986**, 20, 201.
193. T. Nguyen; D. Brunson; C. E. Crespi; B. W. Penman; J. S. Wishnok; S. R. Tannenbaum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1992**, 89, 3030.
194. A. Gal; S. Tamir; S. R. Tannenbaum; G. N. Wogan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1996**, 93, 11499.
195. R. S. Lewis; S. Tamir; S. R. Tannenbaum; W. M. Deen, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 29350.
196. T. Derojaswalker; S. Tamir; H. Ji; J. S. Wishnok; S. R. Tannenbaum, *Chem. Res. Toxicol.*, **1995**, 8, 473.
197. J. Rubio; V. Yermilov; H. Ohshima, *The Biology of Nitric Oxide, Portland Press proceedings, London*, **1996**, 34.
198. P. M. Cullis; M. E. Malone; L. A. MersonDavies, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 2775.
199. J. S. Beckman, *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9, 836.
200. L. J. Kennedy; K. Moore; J. L. Caulfield; S. R. Tannenbaum; P. C. Dedon, *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**, 10, 386.
201. V. Yermilov; J. Rubio; H. Ohshima, *FEBS Lett.*, **1995**, 376, 207.
202. T. Douki; J. Cadet, *Free Radic. Res.*, **1996**, 24, 369.
203. T. Douki; J. Cadet; B. N. Ames, *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9, 3.
204. C. J. Ziegler; A. P. Silverman; S. J. Lippard, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2000**, 5, 774.
205. G. Lowe, *Chem. Soc. Rev.*, **1995**, 24, 309.
206. P. Balkenhohl; C. vondenBusscheHunnefeld; A. Lansky; C. Zechel, *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.*, **1996**, 35, 2289.
207. K. S. Lam; S. E. Salmon; E. M. Hersh; V. J. Hruby; W. M. Kazmierski; R. J. Knapp, *Nature*, **1991**, 354, 82.
208. R. A. Houghten; C. Pinilla; S. E. Blondelle; J. R. Appel; C. T. Dooley; J. H. Cuervo, *Nature*, **1991**, 354, 84.
209. A. Furka; F. Sebestyen; M. Asgedom; G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**, 37, 487.
210. K. E. Sandman; P. Fuhrmann; S. J. Lippard, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1998**, 3, 74.
211. K. E. Sandman; S. S. Marla; G. Zlokarnik; S. J. Lippard, *Chem. Biol.*, **1999**, 6, 541.
212. C. J. Ziegler; K. E. Sandman; C. H. Liang; S. J. Lippard, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1999**, 4, 402.
213. R. B. Merifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149.
214. G. Barany; N. Kneibcordnier; D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1987**, 30, 705.
215. C. L. Kingsbury; S. J. Mehrman; J. M. Takacs, *Curr. Org. Chem.*, **1999**, 3, 497.
216. J. H. Rigby; M. A. Kondratenko, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 1829.
217. X. Z. Zhu; B. E. Blough; F. I. Carroll, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 9219.
218. A. C. Comely; S. E. Gibson; N. J. Hales, *Chem. Commun.*, **1999**, 2075.

219. S. V. Ley; A. Massi; F. Rodriguez; D. C. Horwell; R. A. Lewthwaite; M. C. Pritchard; A. M. Reid, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2001**, 40, 1053.
220. T. R. Boussie; V. Murphy; K. A. Hall; C. Coutard; C. Dales; M. Petro; E. Carlson; H. W. Turner; T. S. Powers, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 11699.
221. K. Kaljuste; J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 9327.
222. B. Jandeleit; D. J. Schaefer; T. S. Powers; H. W. Turner; W. H. Weinberg, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **1999**, 38, 2495.
223. M. B. Francis; E. N. Jacobsen, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **1999**, 38, 937.
224. A. J. Brouwer; H. J. van der Linden; R. M. J. Liskamp, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 1750.
225. M. T. Reetz, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2001**, 40, 284.
226. E. Lindner; T. Schneller; F. Auer; H. A. Mayer, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **1999**, 38, 2155.
227. L. Canali; E. Cowan; H. Deleuze; C. L. Gibson; D. C. Sherrington, *Chem. Commun.*, **1998**, 2561.
228. S. R. Gilbertson; X. F. Wang; G. S. Hoge; C. A. Klug; J. Schaefer, *Organometallics*, **1996**, 15, 4678.
229. A. E. Beilstein; M. T. Tierney; M. W. Grinstaff, *Comments Inorganic Chem.*, **2000**, 22, 105.
230. J. Schliepe; U. Berghoff; B. Lippert; D. Cech, *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.*, **1996**, 35, 646.
231. R. Manchanda; S. U. Dunham; S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 5144.
232. C. O. Pabo; R. T. Sauer, *Annu. Rev. Biochem.*, **1992**, 61, 1053.
233. T. A. Steitz, *Q. Rev. Biophys.*, **1990**, 23, 205.
234. D. S. Sigman; A. Mazumder; D. M. Perrin, *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 2295.
235. S. L. Grokhovskii; V. A. Nikolaev; V. E. Zubarev; A. N. Surovaya; A. L. Zhuze; B. K. Chernov; N. Y. Sidorova; A. S. Zasedatelev; G. V. Gurskii, *Mol. Biol.*, **1992**, 26, 839.
236. M. S. Robillard; N. P. Davies; G. A. van der Marel; J. H. van Boom; J. Reedijk; V. Murray, *J. Inorg. Biochem.*, **2003**, 96, 331.
237. M. S. Robillard; M. Bacac; H. van den Elst; A. Flamigni; G. A. van der Marel; J. H. van Boom; J. Reedijk, *J. Comb. Chem.*, **2003**, 5, 821.
238. S. van Zutphen; M. S. Robillard; G. A. van der Marel; H. S. Overkleef; H. den Dulk; J. Brouwer; J. Reedijk, *Chem. Commun.*, **2003**, 634.
239. M. S. Robillard; A. Valentijn; N. J. Meeuwenoord; G. A. van der Marel; J. H. van Boom; J. Reedijk, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2000**, 39, 3096.
240. I. Ortmans; C. Moucheron; A. Kirsch-De Mesmaeker, *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 168, 233.
241. M. Eriksson; M. Leijon; C. Hiort; B. Norden; A. Graslund, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 4933.
242. F. M. Foley; F. R. Keene; J. G. Collins, *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.*, **2001**, 2968.
243. C. M. Dupureur; J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 33.
244. J. G. Collins; A. D. Sleeman; J. R. Aldrich-Wright; I. Greguric; T. W. Hambley, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 3133.
245. B. M. Peek; G. T. Ross; S. W. Edwards; G. J. Meyer; T. J. Meyer; B. W. Erickson, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**, 38, 114.
246. K. D. Copeland; A. M. K. Lueras; E. D. A. Stemp; J. K. Barton, *Biochemistry*, **2002**, 41, 12785.

247. H. A. Wagenknecht; E. D. A. Stemp; J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 1.
248. A. Myari; N. Hadjiliadis; A. Garoufis, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**, 1427.
249. C. A. Hastings; J. K. Barton, *Biochemistry*, **1999**, 38, 10042.
250. N. Y. Sardesai; K. Zimmermann; J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 7502.
251. K. D. Copeland; M. P. Fitzsimons; R. P. Houser; J. K. Barton, *Biochemistry*, **2002**, 41, 343.
252. R. C. Lasey; S. S. Banerji; M. Y. Ogawa, *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 300, 822.
253. A. Y. Kornilova; J. F. Wlshart; W. Z. Xiao; R. C. Lasey; A. Fedorova; Y. K. Shin; M. Y. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7999.
254. A. Fedorova; A. Chaudhari; M. Y. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 357.
255. A. Fedorova; M. Y. Ogawa, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 150.
256. W. D. Wilson; F. A. Tanius; M. Fernandez-Saiz; C. T. Rigl, in K. R. Fox (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, **1997**, 90, Humana.
257. H. Tada; O. Shiho; K. Kuroshima; M. Koyama; K. Tsukamoto, *J. Immunol. Methods*, **1986**, 93, 157.
258. J. M. Fletcher; I. L. Jenkins; F. M. Lever; F. S. Martin; A. R. Powell; R. Todd, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1955**, 1, 378.
259. N. N. Nevskii; N. M. Sinitsyn; A. A. Svetlov, *Zhurnal Neorg. Khimii*, **1990**, 35, 1159.
260. G. B. Richter-Addo; P. Legzdins, *Metal Nitrosyls*; Oxford University Press: New York, **1992**.
261. J. R. During; W. A. McAllister; J. N. Willis; E. E. Mercer, *Spectrochim. Acta*, **1966**, 22, 1091.
262. J. B. Godwin; T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **1971**, 10, 471.
263. H. Nagao; H. Nishimura; H. Funato; Y. Ichikawa; F. S. Howell; M. Mukaida; H. Kakihana, *Inorg. Chem.*, **1989**, 28, 3955.
264. G. M. Bryant; Fergusso, J. E.; H. K. J. Powell, *Aust. J. Chem.*, **1971**, 24, 257.
265. J. Bordini; D. L. Hughes; J. D. D. Neto; C. J. da Cunha, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 5410.
266. A. K. Patra; P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 7363.
267. A. C. G. Hotze; M. Bacae; A. H. Velders; B. A. J. Jansen; H. Kooijman; A. L. Spek; J. G. Haasnoot; J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 1743.
268. E. Gallori; C. Vettori; E. Alessio; F. G. Vilchez; R. Vilaplana; P. Orioli; A. Casini; L. Messori, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2000**, 376, 156.
269. V. Brabec; V. Kleinwachter; J. L. Butour; N. P. Johnson, *Biophys. Chem.*, **1990**, 35, 129.
270. T. R. Krugh; M. E. Nuss, *Biological Applications of Magnetic Resonance (Shulman, R. G., ed.) Academic Press, New York*, **1979**, 113.
271. D. G. Gorenstein, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1981**, 10, 355.
272. W. D. Wilson; R. L. Jones, *Advances in Pharmacology and Chemotherapy*, **1981**, 18, 177.
273. W. D. Wilson; B. L. Heyl; R. Reddy; L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.*, **1982**, 21, 2527.
274. Z. Yang; T. Bakas; A. Sanchez-Diaz; C. Charalampopoulos; J. Tsangaris; N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, 72, 133.
275. L. Ghys; M. Biesemans; M. Gielen; A. Garoufis; N. Hadjiliadis; R. Willem; J. C. Martins, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 513.
276. G. Mallet; S. Ansiss; D. Vasilescu, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1998**, 16, 21.

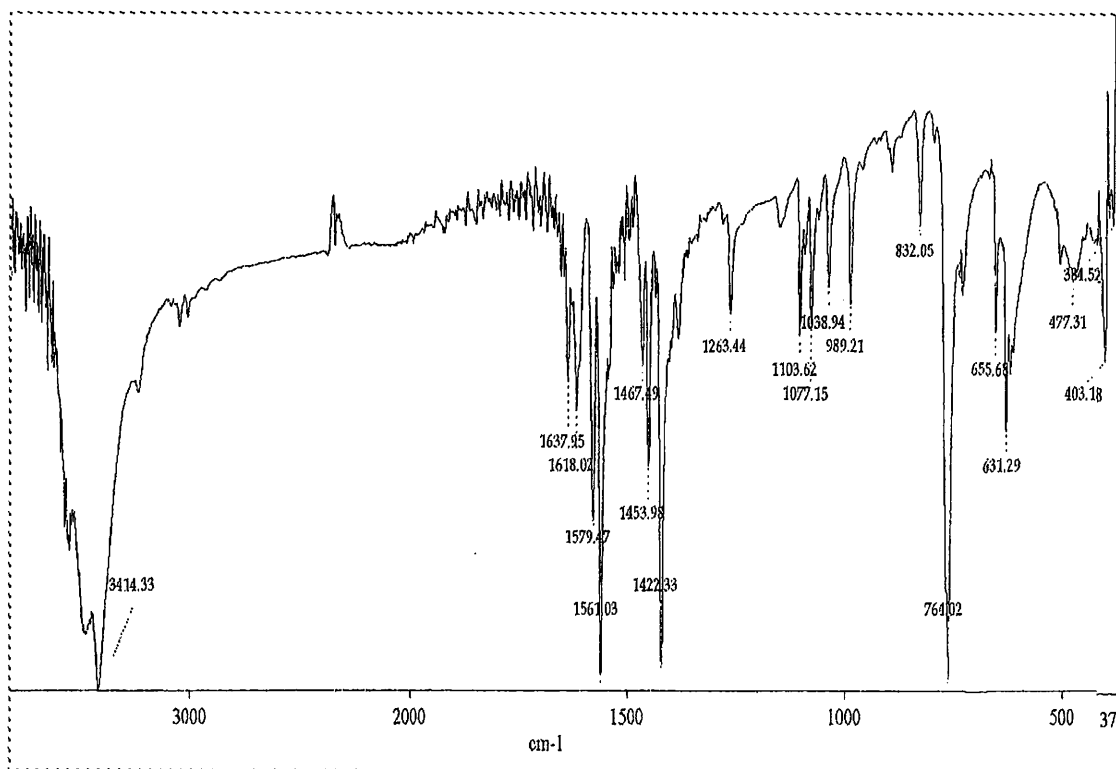
277. E. Tselepikalouli; N. Katsaros, *J. Inorg. Biochem.*, **1989**, 37, 271.
278. R. B. Nair; E. S. Teng; S. L. Kirkland; C. J. Murphy, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 139.
279. S. E. Sherman; S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 1153.
280. G. L. Cohen; W. R. Bauer; J. K. Barton; S. J. Lippard, *Science*, **1979**, 203, 1014.
281. M. Mottes; G. Grandi; V. Sgaramella; U. Canosi; G. Morelli; T. A. Trautner, *Mol. Gen. Genet.*, **1979**, 174, 281.
282. B. P. Sullivan; J. M. Calvert; T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **1980**, 19, 1404.
283. C. M. Hartshorn; K. A. Maxwell; P. S. White; J. M. DeSimone; T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 601.
284. R. M. Carlos; D. R. Cardoso; E. E. Castellano; R. Z. Osti; A. J. Camargo; L. G. Macedo; D. W. Franco, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 2546.
285. A. M. Pyle; J. P. Rehmann; R. Meshoyrer; C. V. Kumar; N. J. Turro; J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 3051.
286. C. Hiort; P. Lincoln; B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3448.
287. P. J. Barnard; R. S. Vagg, *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, 99, 1009.
288. M. J. Carvlin; N. Dattagupta; R. J. Fiel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1982**, 108, 66.
289. Z. X. Wang; D. J. Liu; S. J. Dong, *Biophys. Chem.*, **2000**, 87, 179.
290. R. L. Jones; W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 7776.
291. L. Messori; A. Casini; D. Vullo; S. G. Haroutiunian; E. B. Dalian; P. Orioli, *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 303, 283.
292. J. P. Macquet; J. L. Butour, *Eur. J. Biochem.*, **1978**, 83, 375.
293. S. M. Zakeeruddin; M. K. Nazeeruddin; P. Pechy; F. P. Rotzinger; R. HumphryBaker; K. Kalyanasundaram; M. Gratzel; V. Shklover; T. Haibach, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 5937.
294. M. J. Clarke; B. Jansen; K. A. Marx; R. Kruger, *Inorganica Chimica Acta-Bioinorganic Chemistry*, **1986**, 124, 13.
295. K. Akdi; R. A. Vilaplana; S. Kamah; J. A. R. Navarro; J. M. Salas; F. Gonzalez-Vilchez, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 90, 51.
296. J. Kypr; V. Sklenar; M. Vorlickova, *Biopolymers*, **1986**, 25, 1803.
297. D. G. Gorenstein, *Meth. Enzymol.*, **1992**, 211, 254.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι**

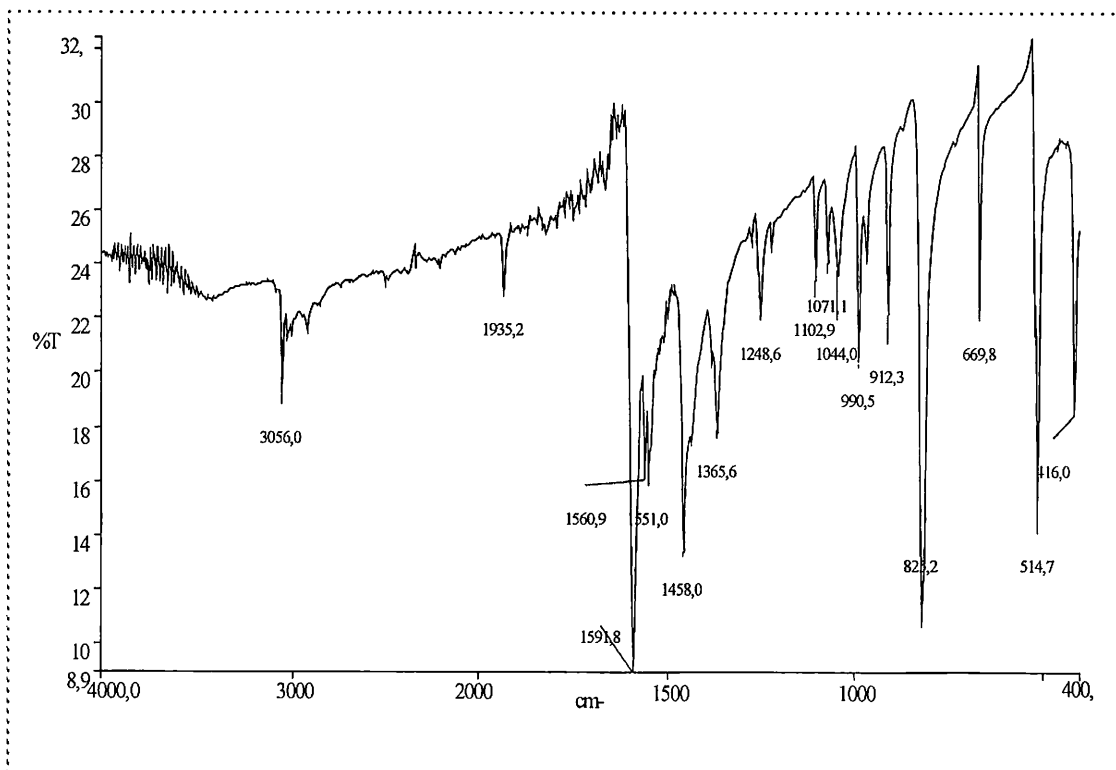
---

ΠΑΡΑΘΕΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ

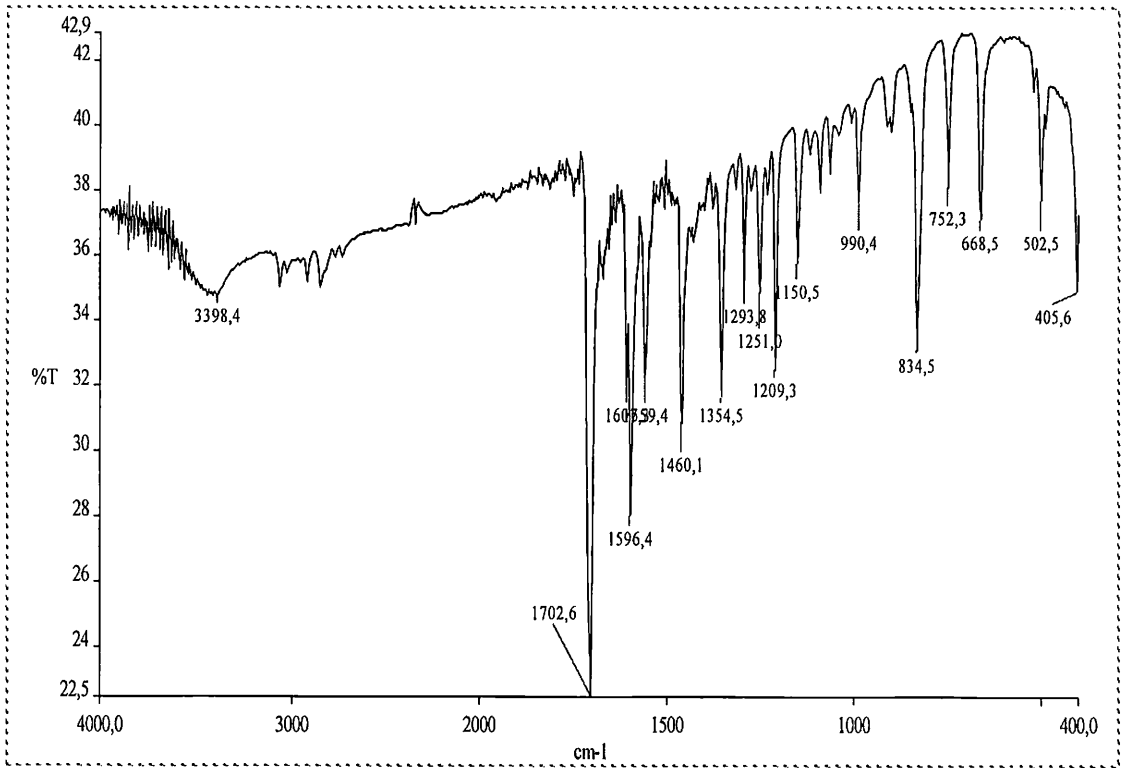
---



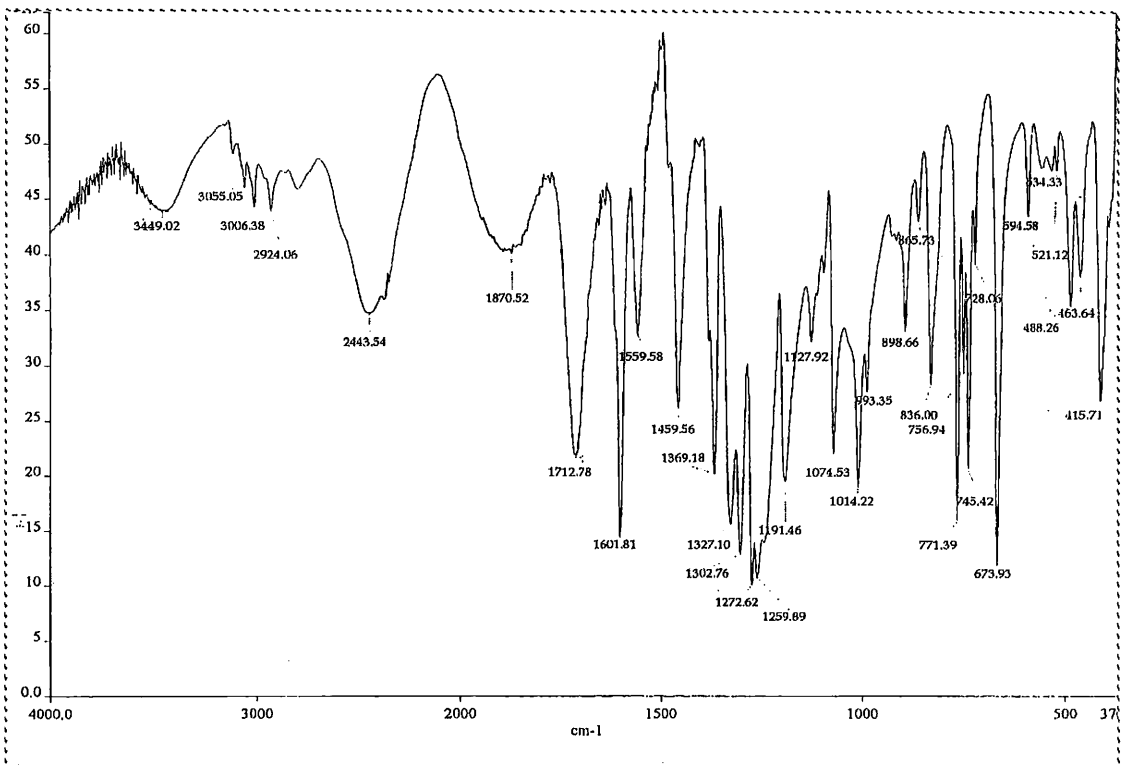
Σχήμα Π.1.1. Φάσμα IR του υποκαταστάτη 2,2':6',2''-τερπυρίδη.



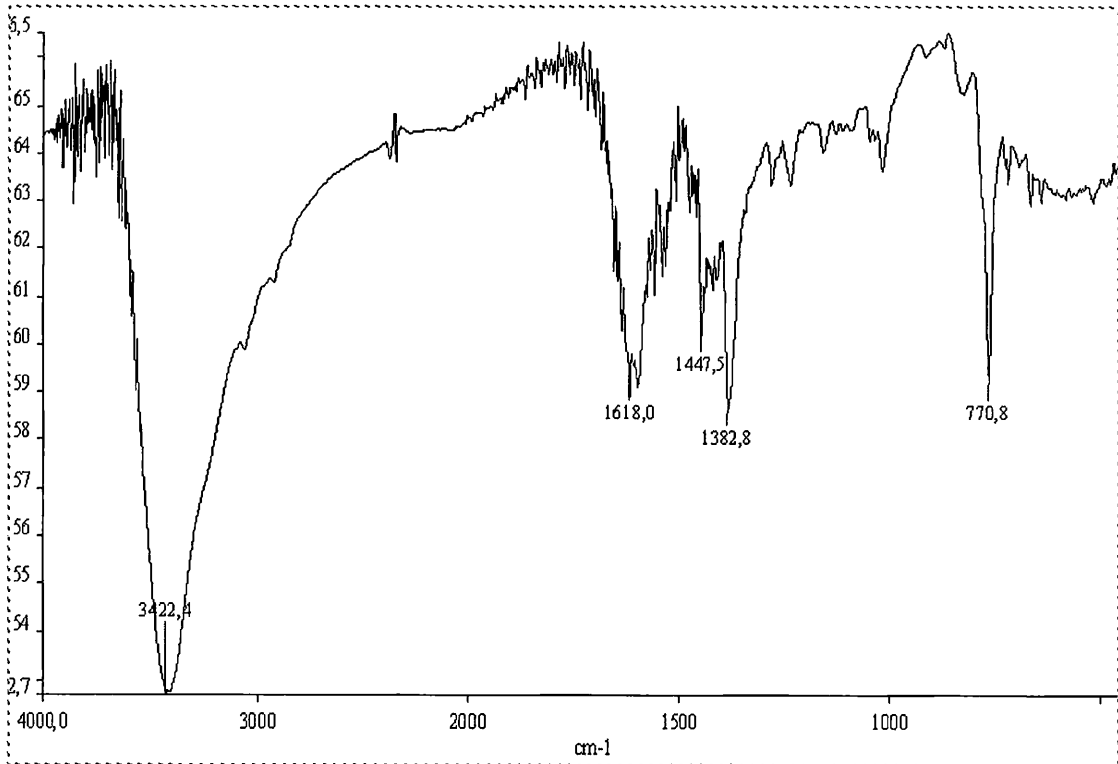
Σχήμα Π.1.2. Φάσμα IR του υποκαταστάτη 4,4'-διμεθολ-2,2'-διπυρίδη.



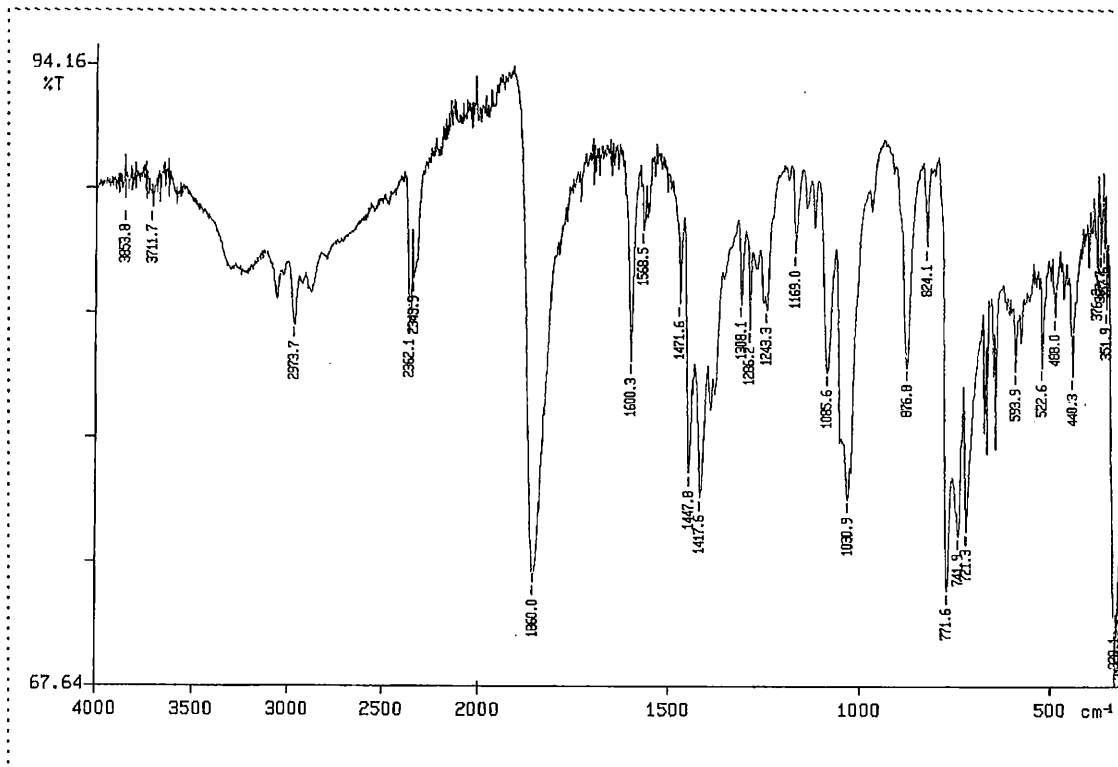
Σχήμα Π.1.3. Φάσμα IR του υποκαταστάτη 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυαλδεύδη.



Σχήμα Π.1.4. Φάσμα IR του υποκαταστάτη 4'-μεθυλ-4-καρβοξυ-διπυριδίνη.

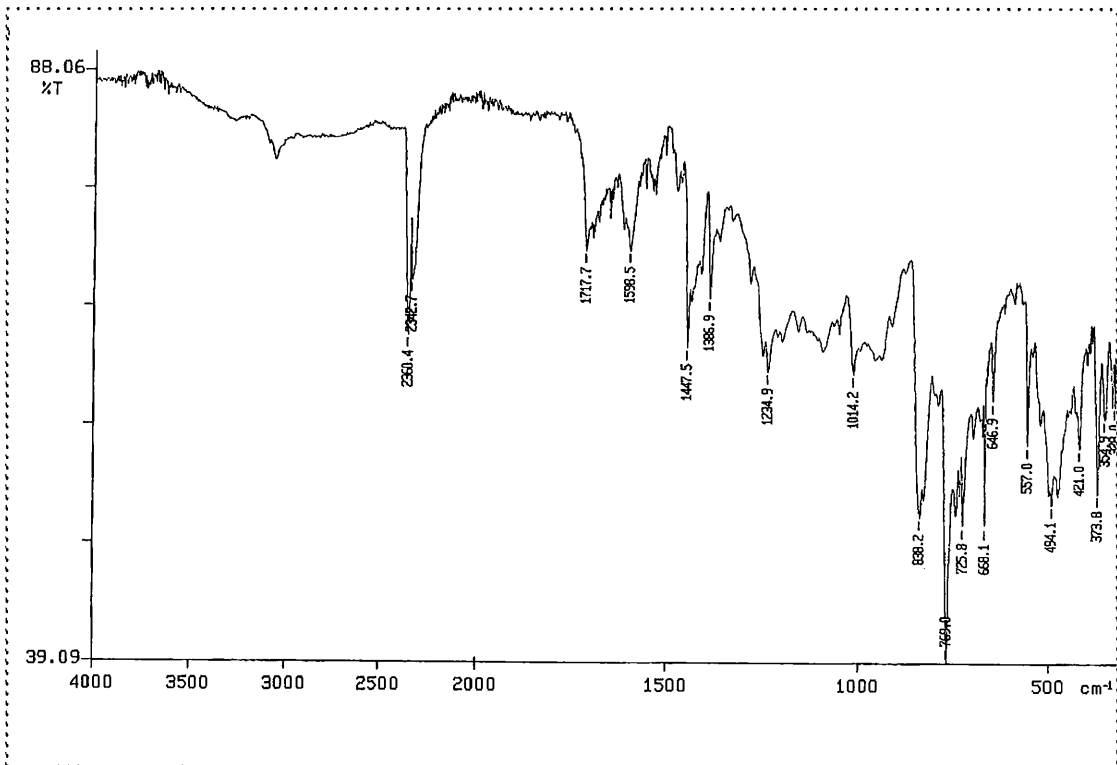


Σχήμα Π.1.5. Φάσμα IR του συμπλόκου  $[Ru(terpy)Cl_3]$ .

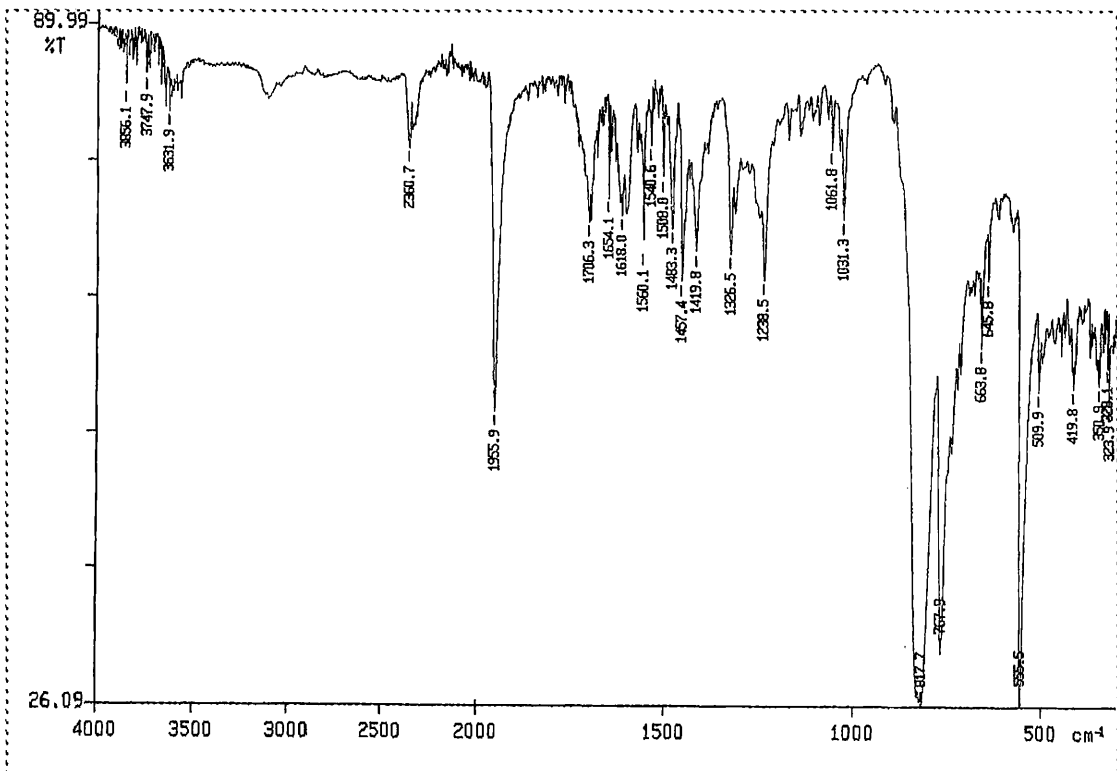


Σχήμα Π.1.6. Φάσμα IR του συμπλόκου  $cis-(Cl,Cl)-[RuCl_2(NO)(terpy)]Cl$ .

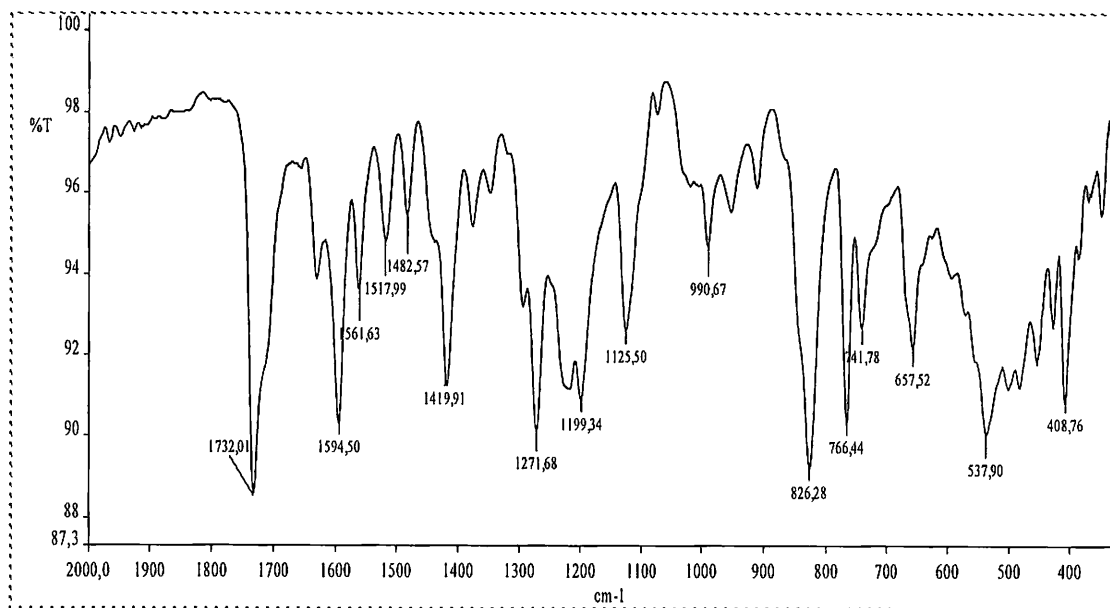




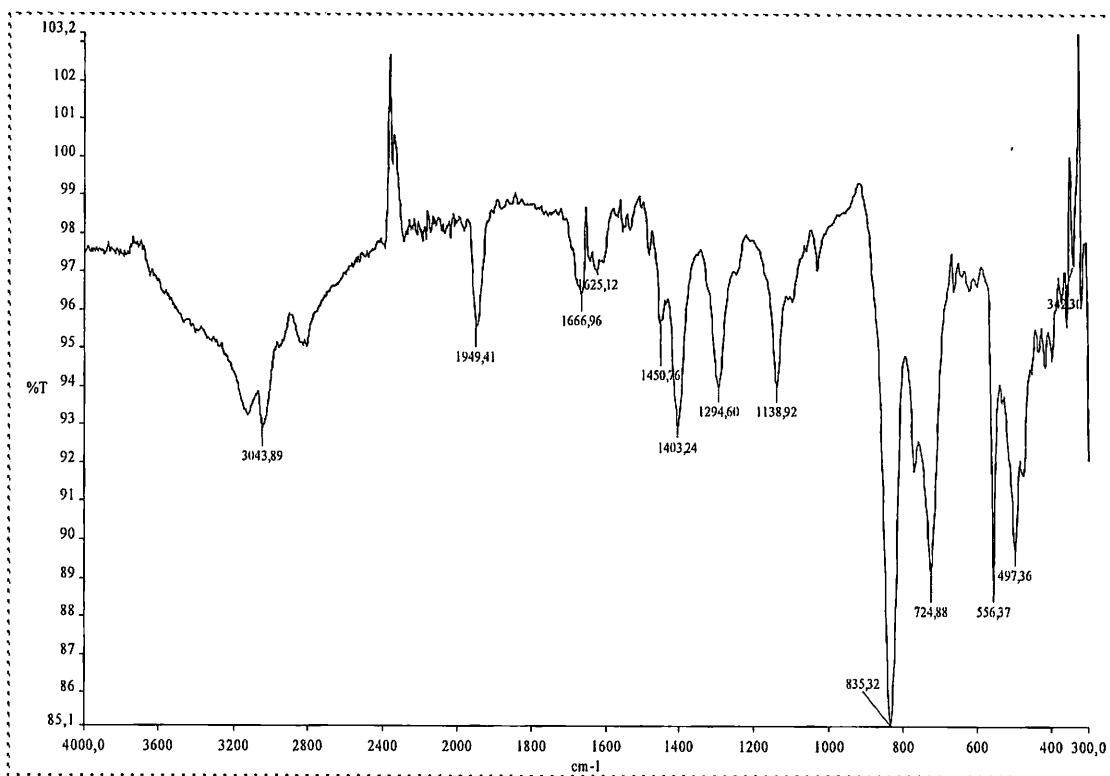
Σχήμα Π.1.7. Φάσμα IR του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)Cl](PF_6)$ .



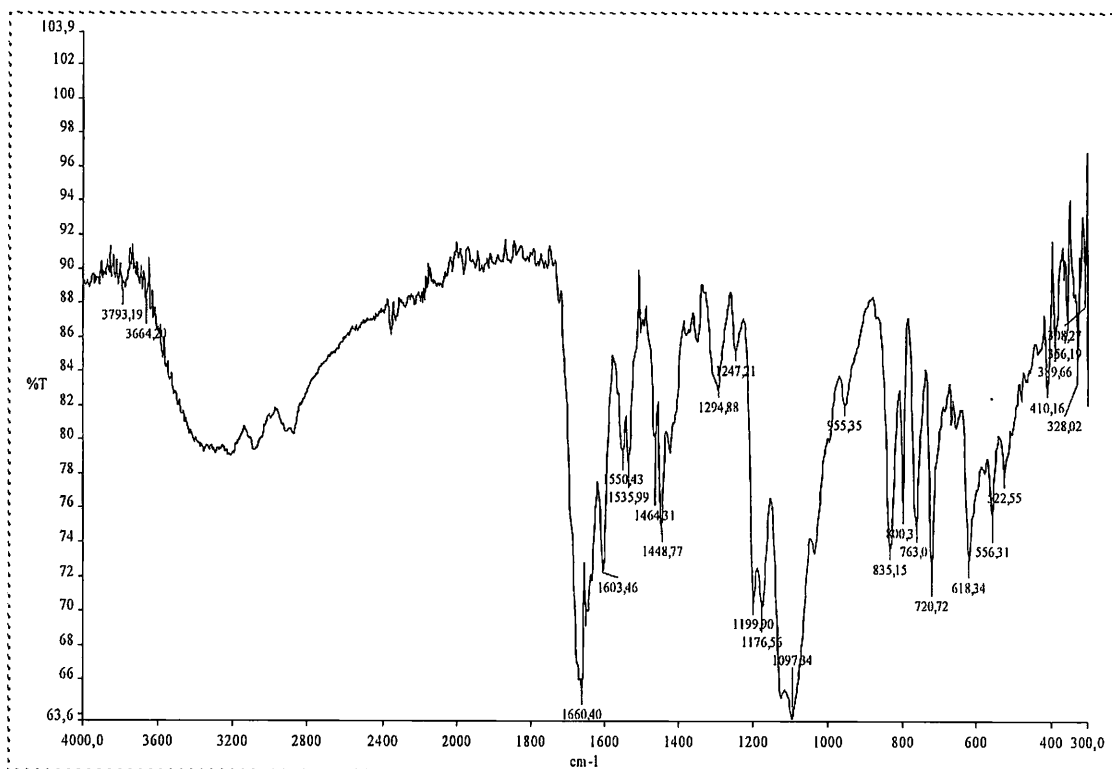
Σχήμα Π.1.8. Φάσμα IR του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy)NO](PF_6)_3$ .



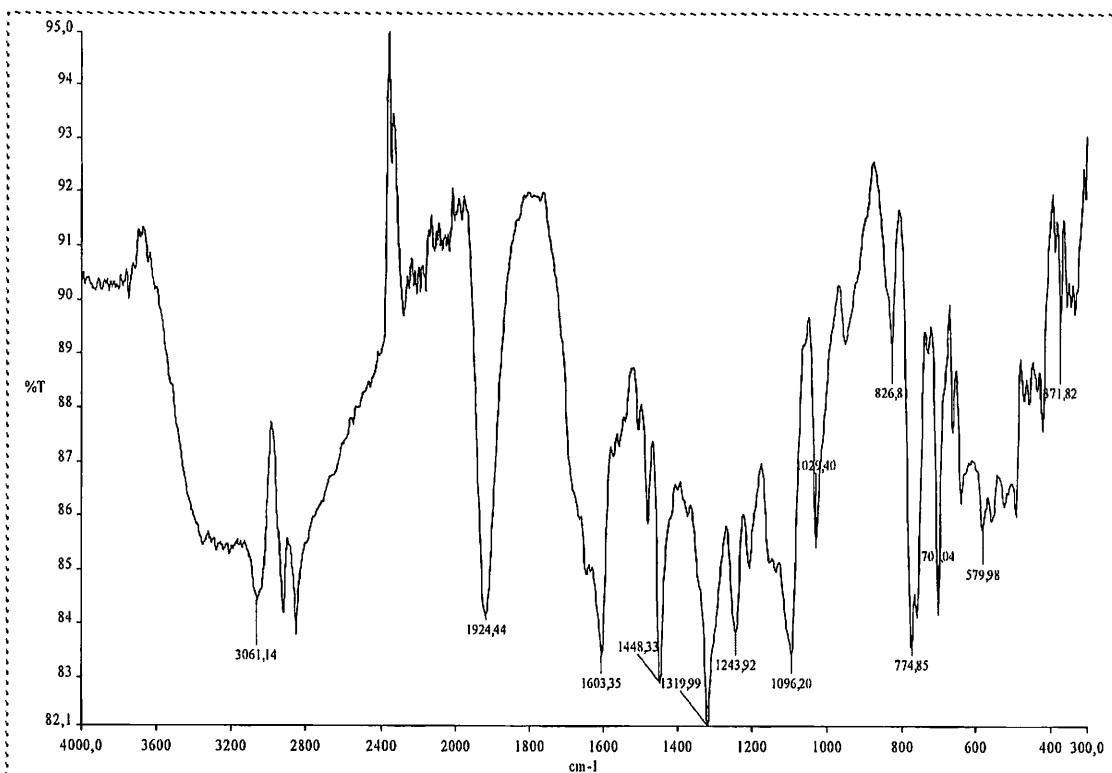
Σχήμα Π.1.9. Φάσμα IR του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebrpy)NO_2](PF_6)$ .



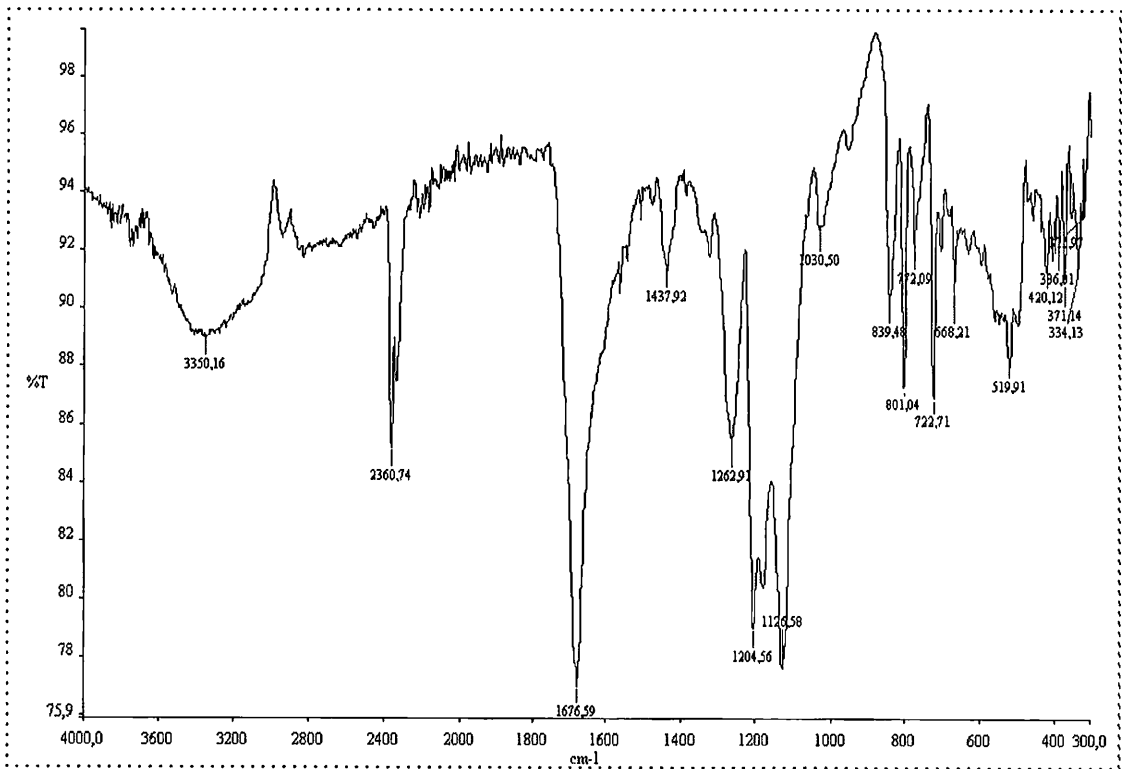
Σχήμα Π.1.10. Φάσμα IR του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebrpy-AlaCONH_2)NO](PF_6)_3$ .



Σχήμα Π.1.11. Φάσμα IR του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy-AlaCONH_2)NO_2](PF_6)_3$ .



Σχήμα Π.1.12. Φάσμα IR του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebpy-Gly-L-His-L-LysCONH_2)NO](PF_6)_3$ .



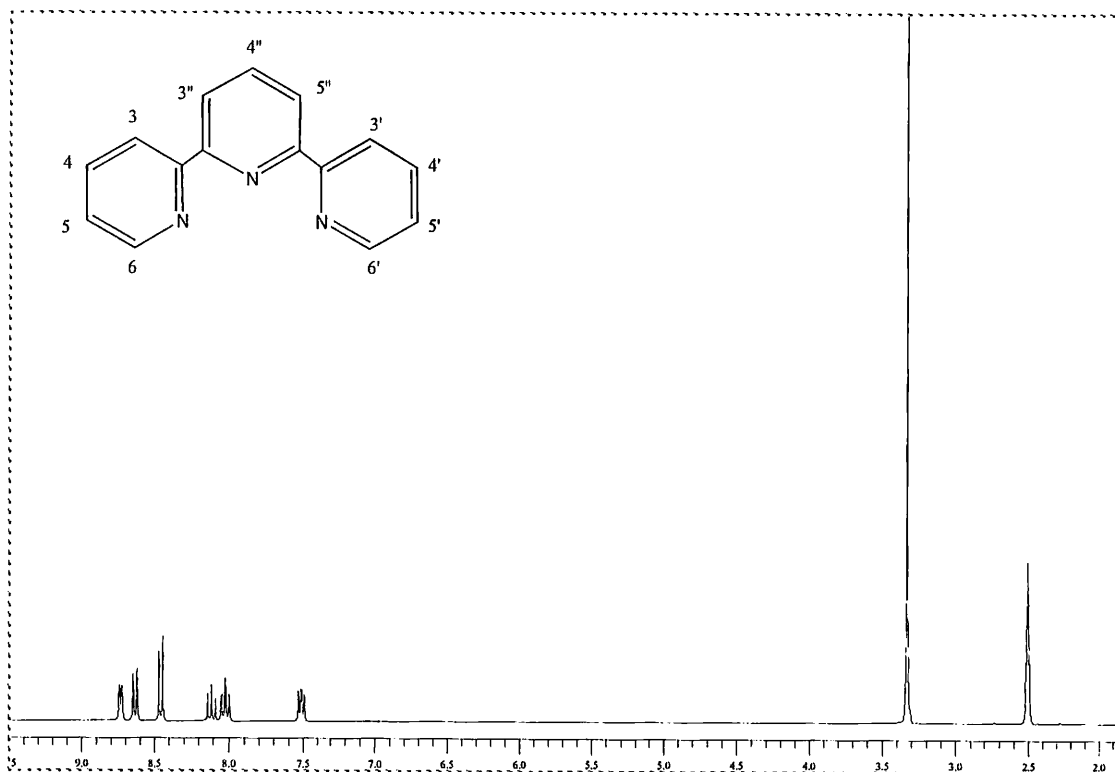
Σχήμα Π.1.13. Φάσμα IR του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-CO_2H-4'-Mebrp-Gly-L-His-L-LysCONH_2)NO_2](PF_6)$ .

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II**

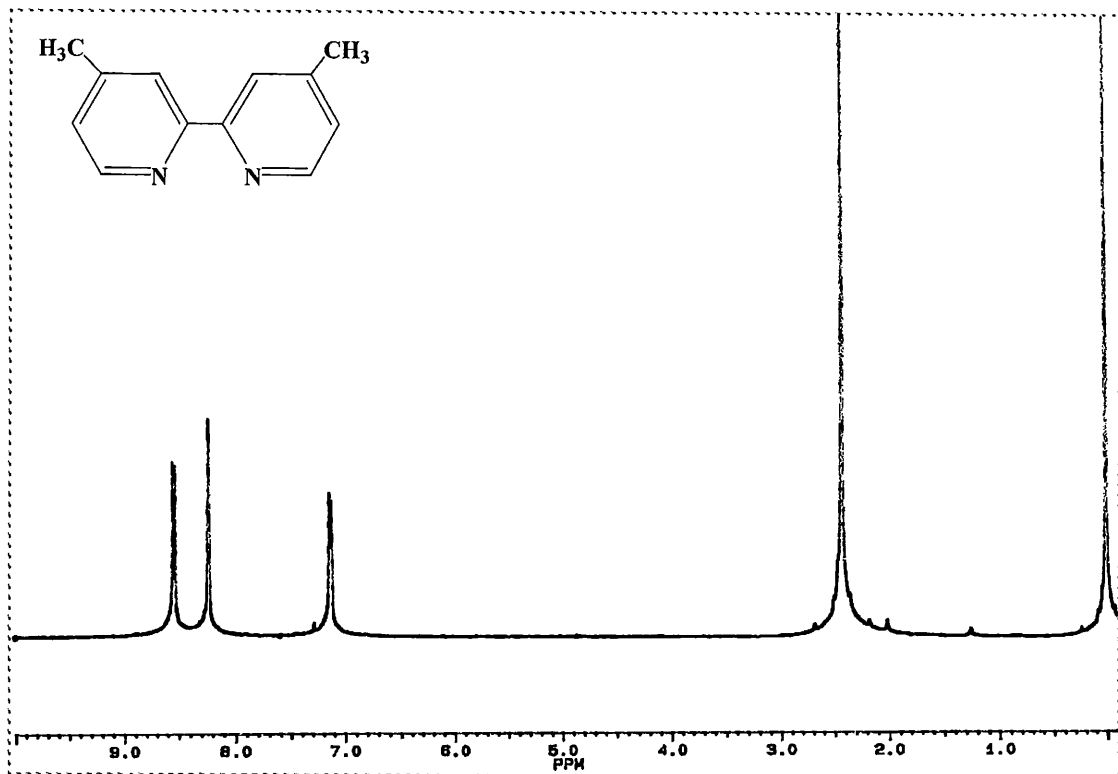
---

ΠΑΡΑΘΕΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ  
ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

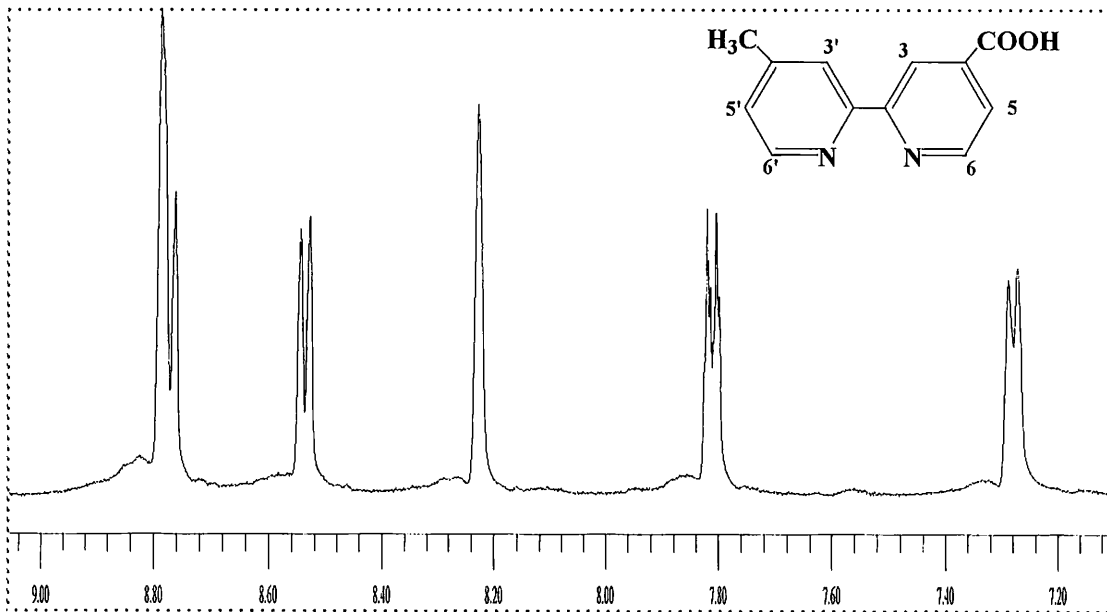
---



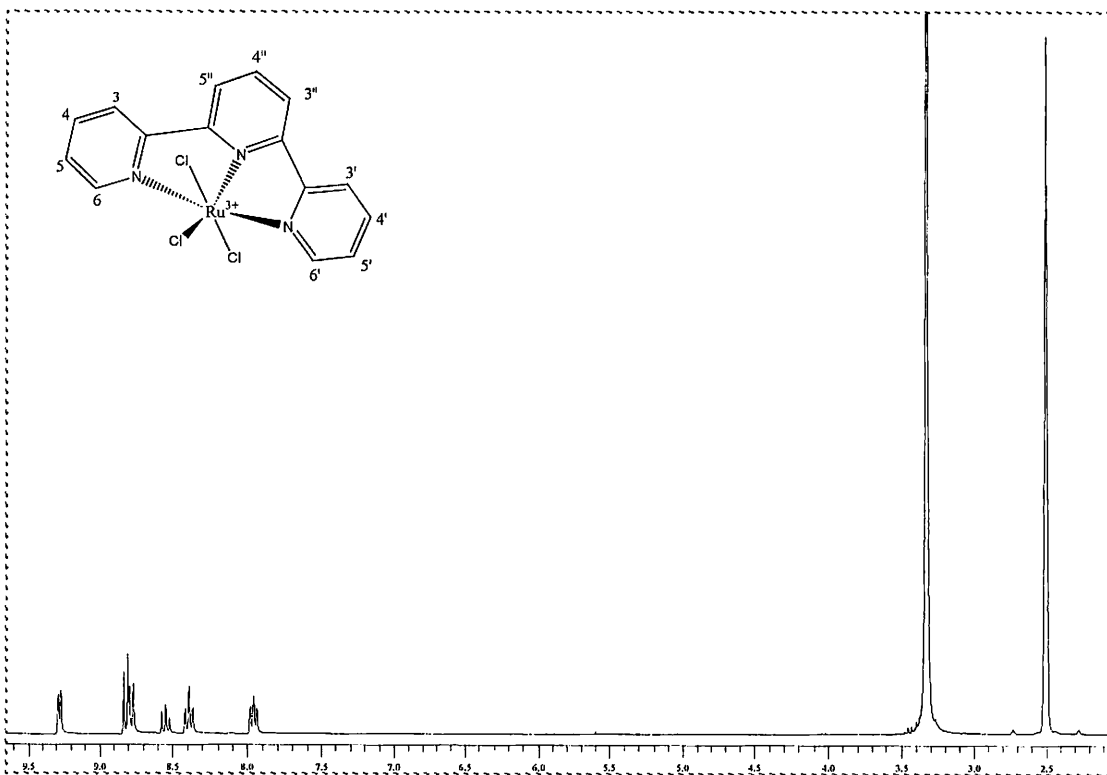
Σχήμα Π.2.1. Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του υποκαταστάτη 2,2':6',2''-τερπυριδίνη σε dmsO-d<sub>6</sub>.



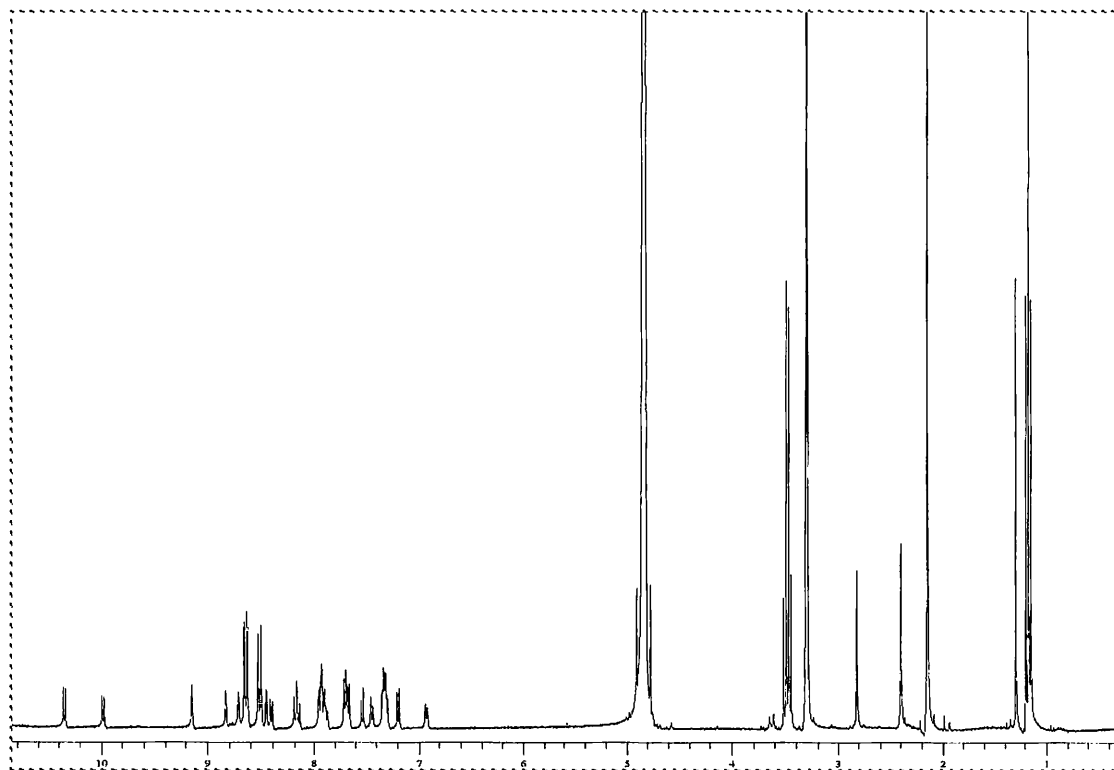
Σχήμα Π.2.2. Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του υποκαταστάτη 4,4'-διμεθυλ-διπυριδίνη σε dmsO-d<sub>6</sub>.



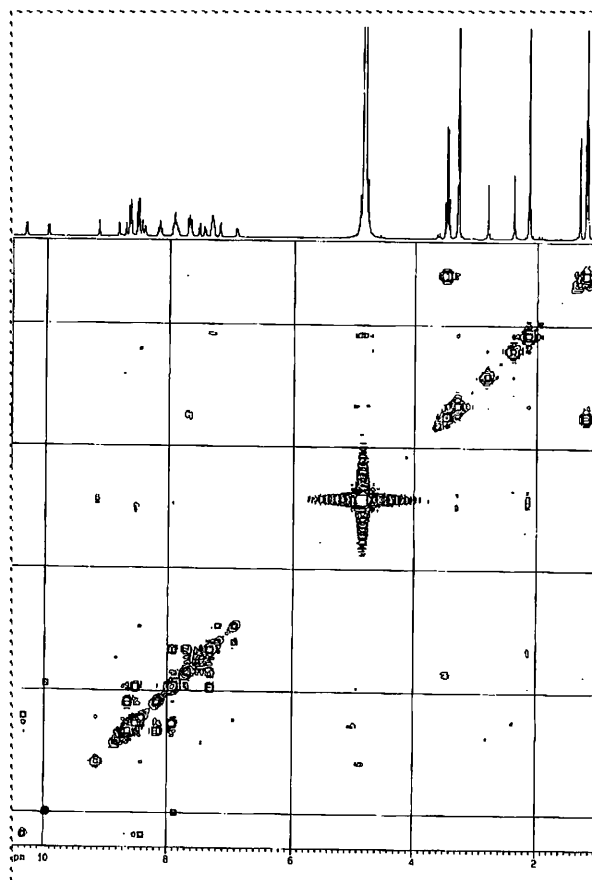
Σχήμα Π.2.3. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του υποκαταστάτη 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυλικό οξύ σε  $\text{dms0-d}_6$ .



Σχήμα Π.2.4. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpyCl}_3)]$  σε  $\text{dms0-d}_6$ .

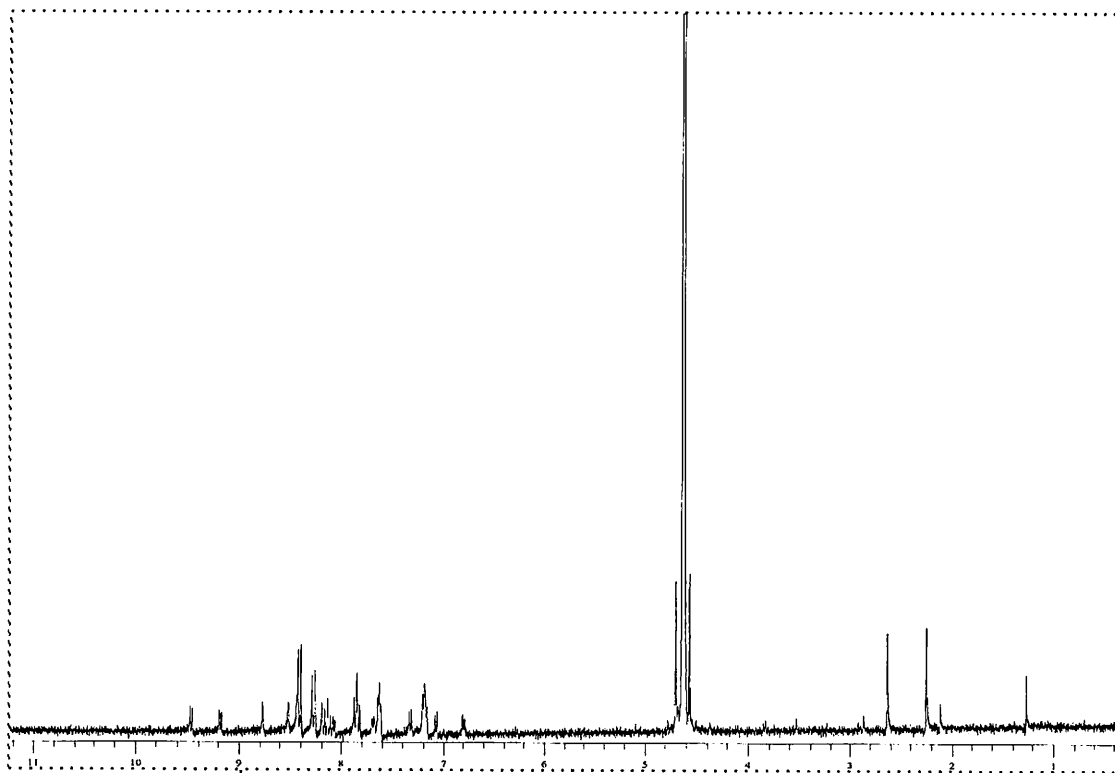


Σχήμα Π.2.5. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebrg})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  σε μεθανόλη.

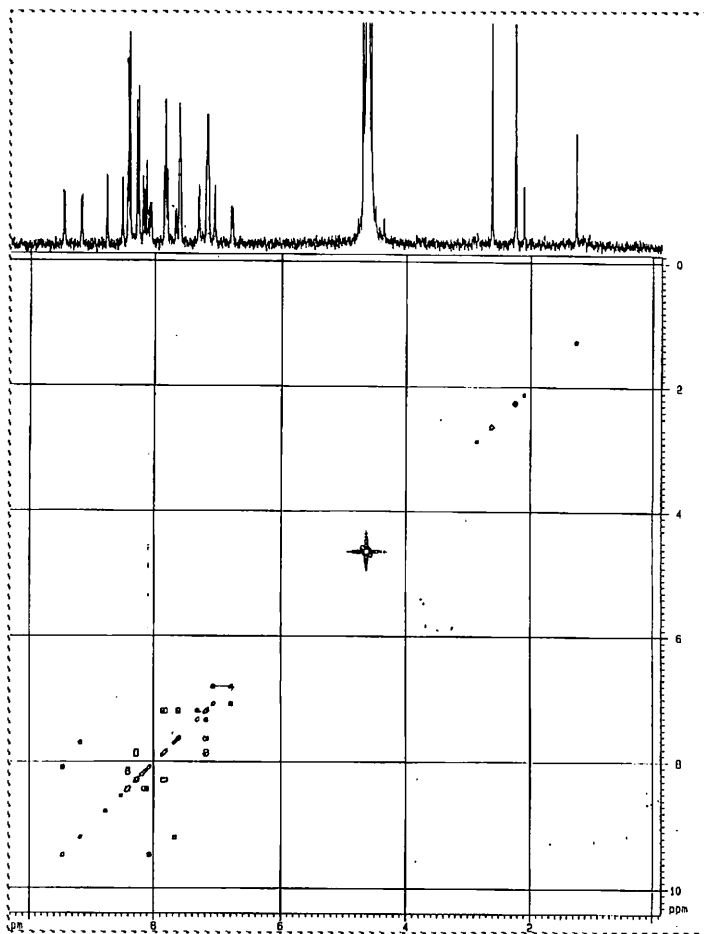


Σχήμα Π.2.6. Φάσμα 2D-NMR του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebrg})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  σε μεθανόλη.

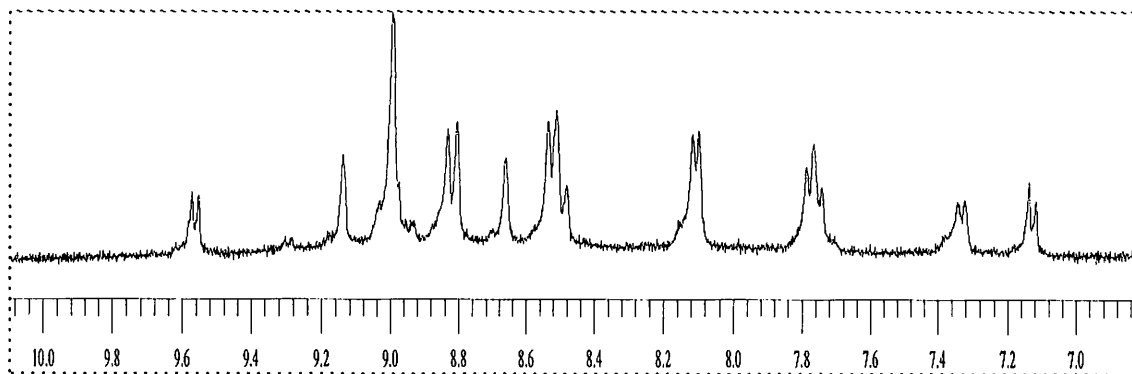




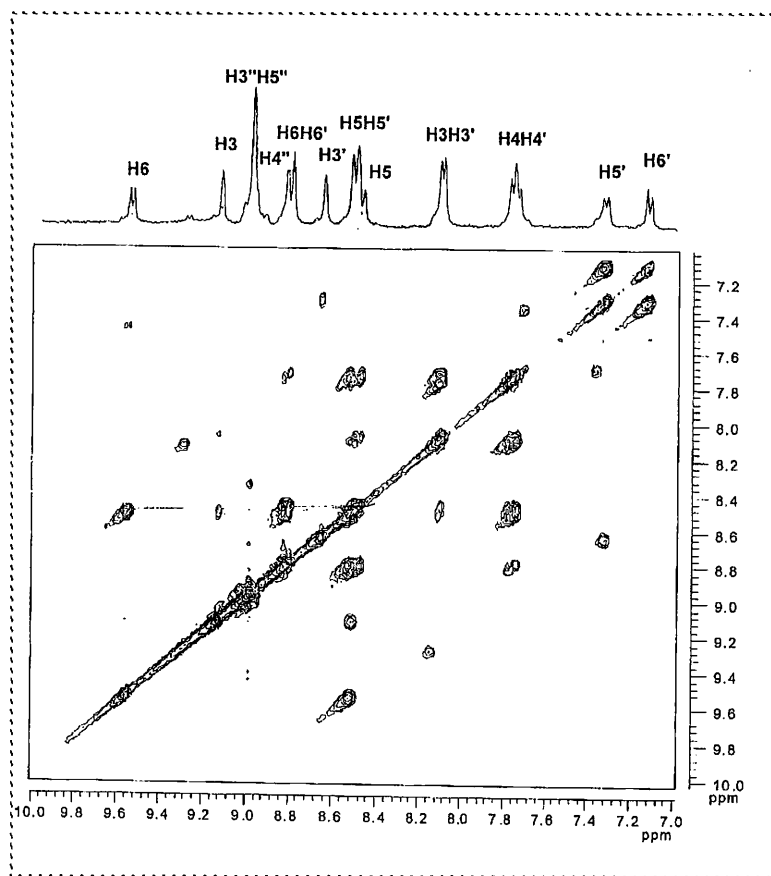
Σχήμα Π.2.7. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebrpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  σε  $\text{D}_2\text{O}$ .



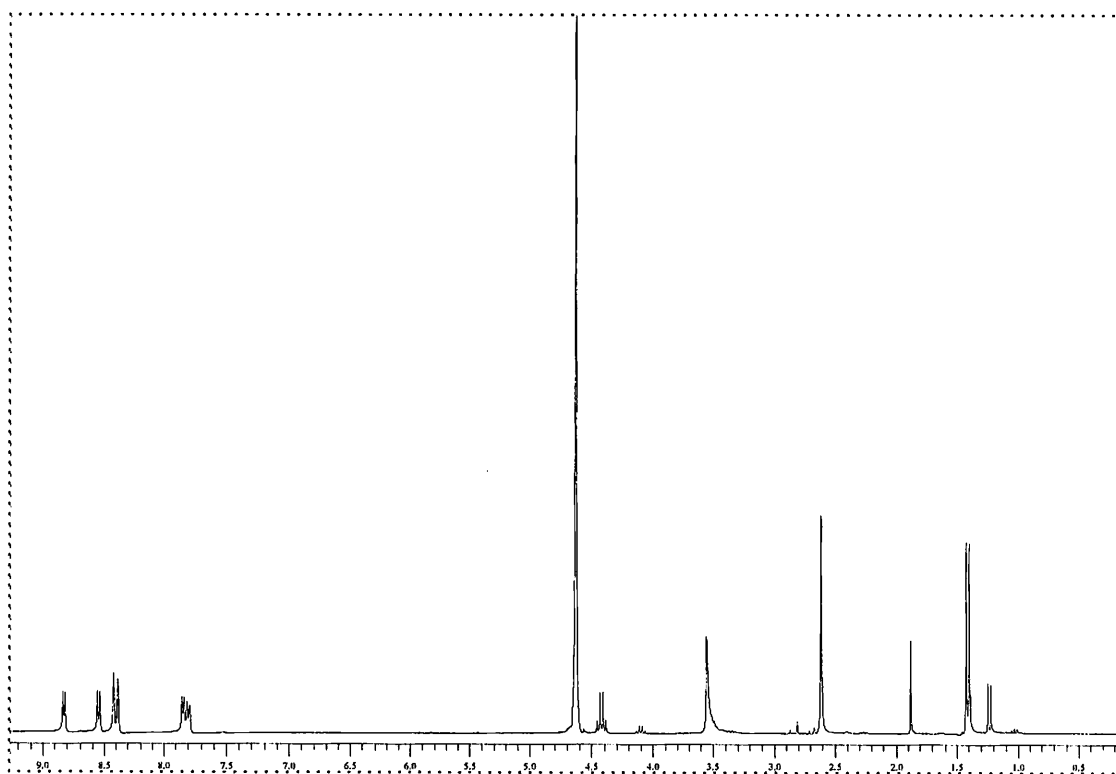
Σχήμα Π.2.8. Φάσμα  $2\text{D-NMR}$  του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebrpy})\text{NO}_2](\text{PF}_6)$  σε  $\text{D}_2\text{O}$ .



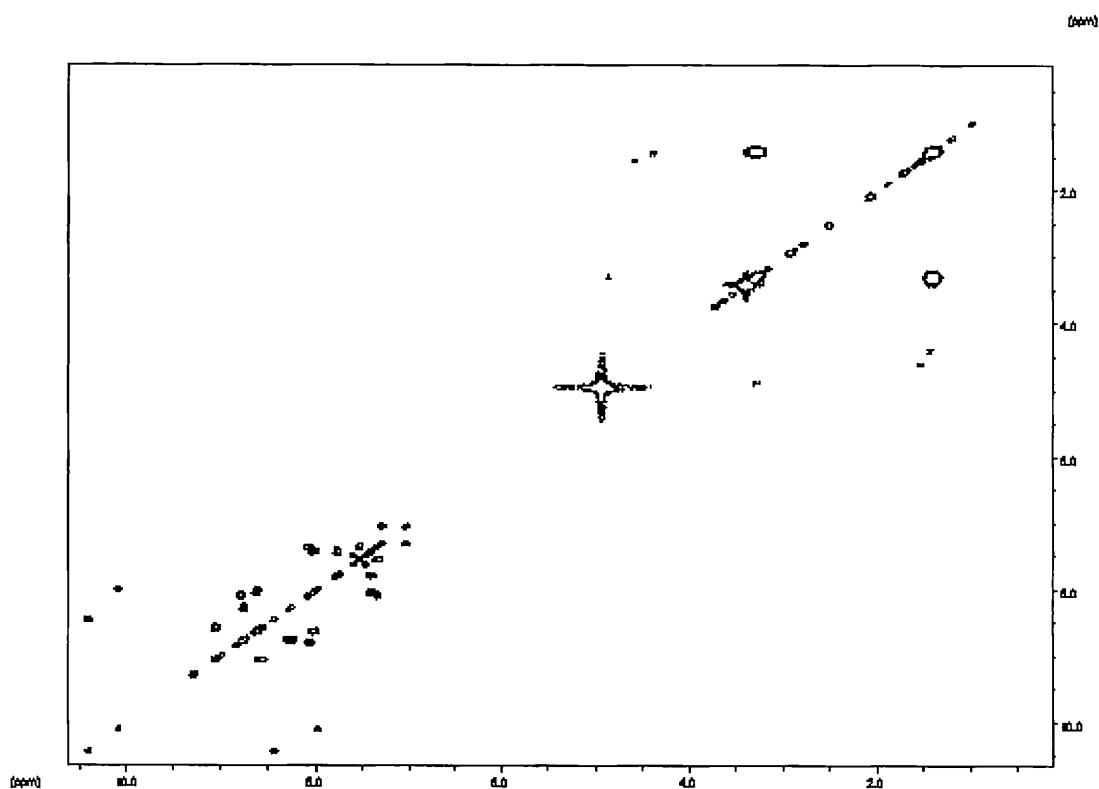
Σχήμα Π.2.9. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  σε  $\text{D}_2\text{O}$  pH 3.4.



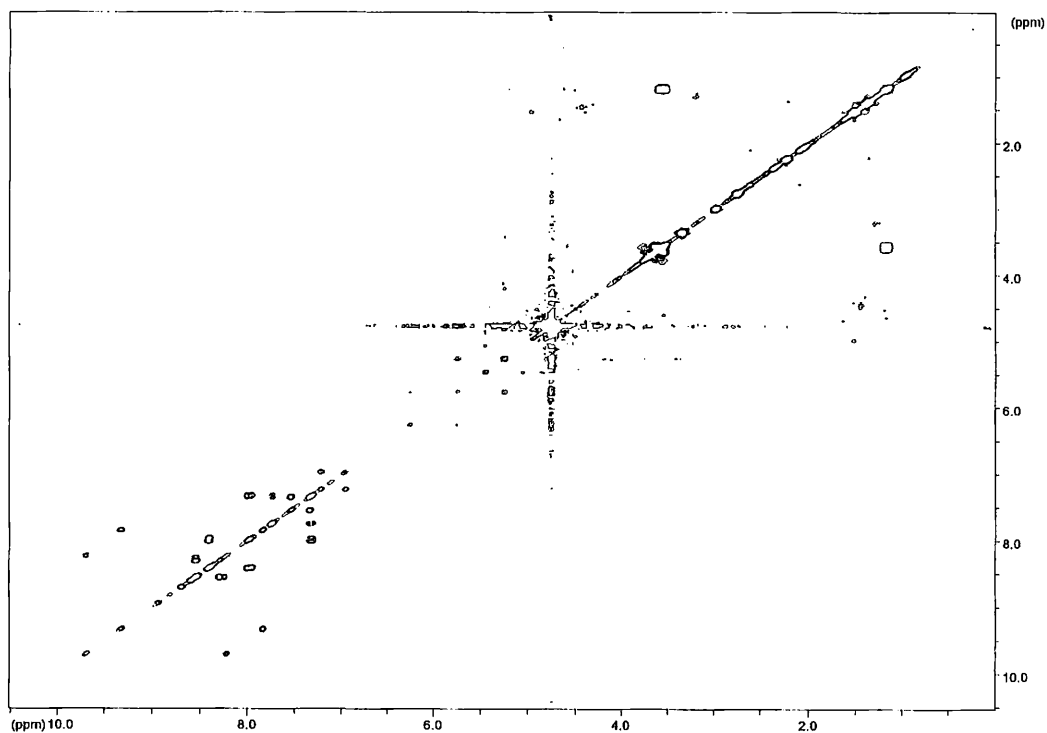
Σχήμα Π.2.10. Φάσμα 2D-NMR του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-CO}_2\text{H-4}'\text{-Mebpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$  σε  $\text{D}_2\text{O}$  pH 3.4.



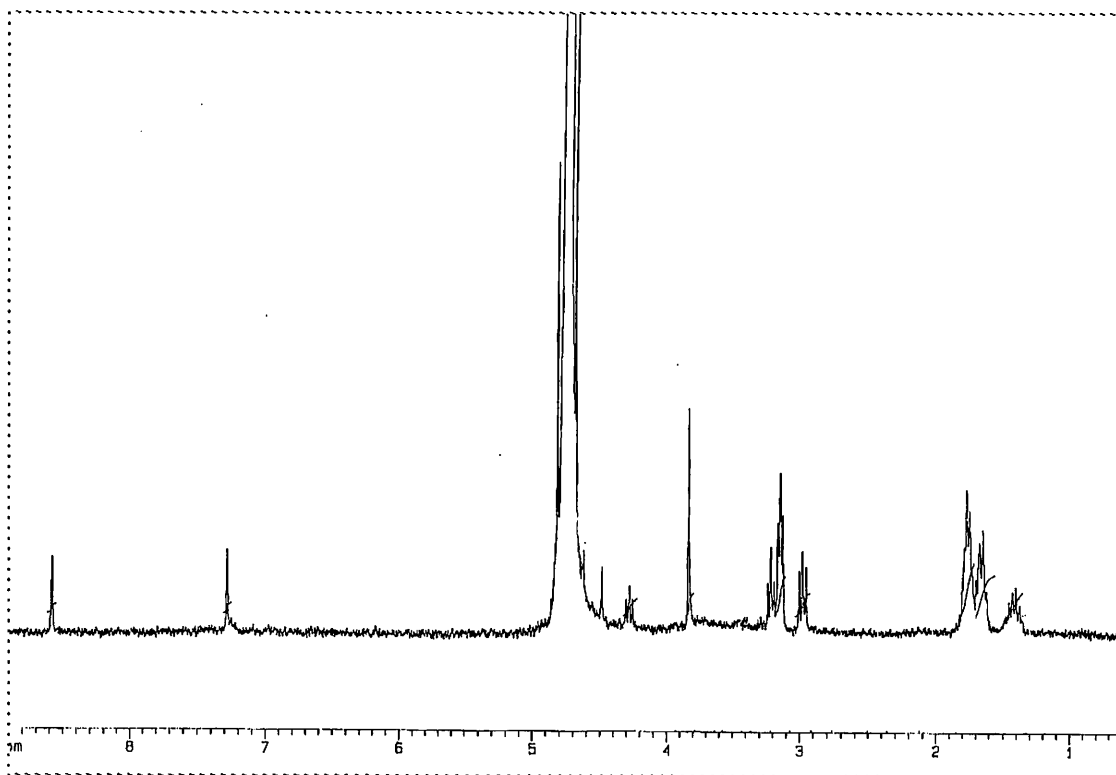
Σχήμα Π.2.11. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του υποκαταστάτη  $4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy}$  σε  $\text{D}_2\text{O}$ .



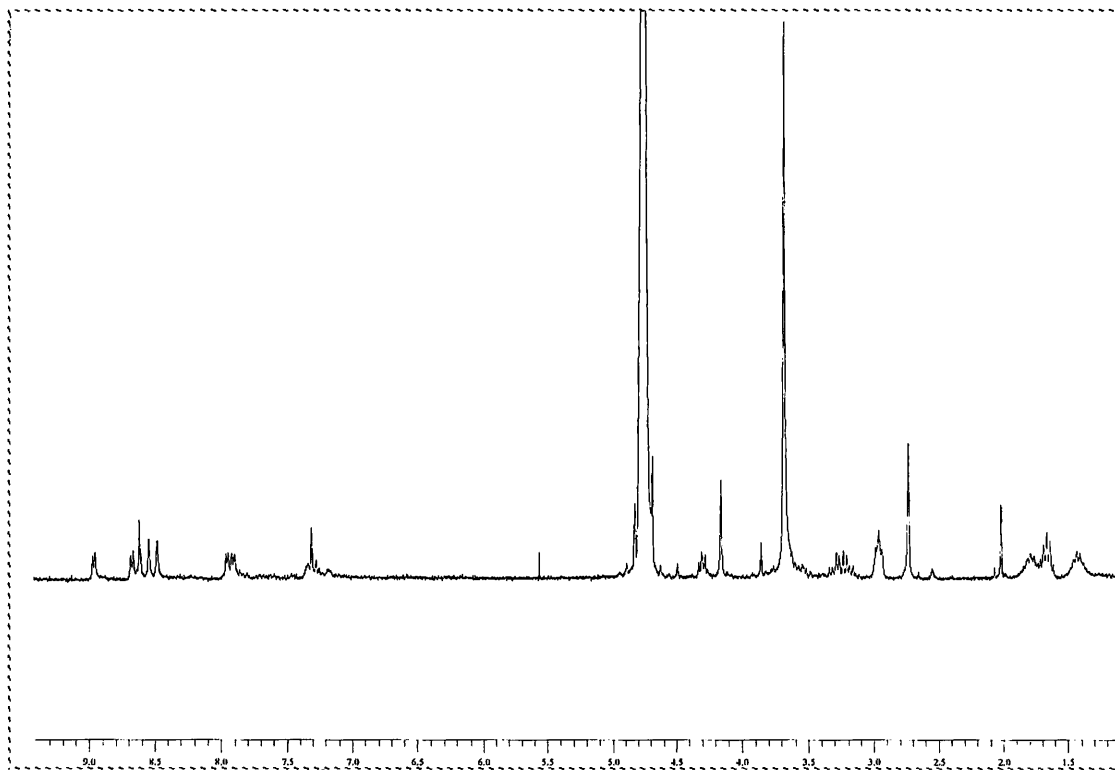
Σχήμα Π.2.12. Φάσμα  $2\text{D-NMR}$  του συμπλόκου  $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COAlaCONH}_2\text{-4'-Mebpy})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  σε μεθανόλη.



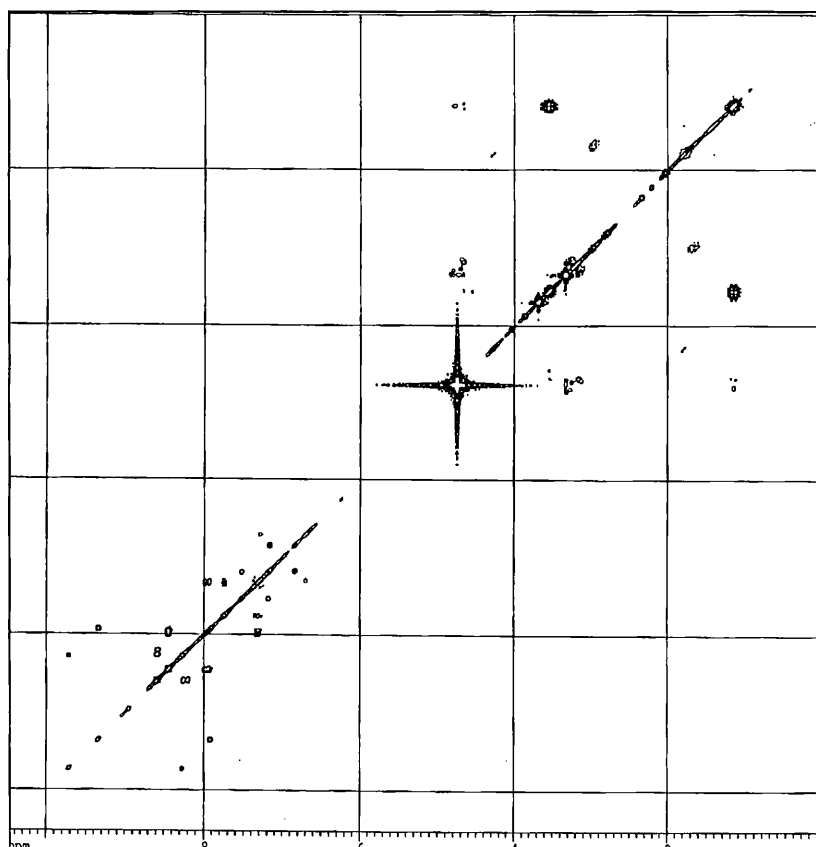
Σχήμα Π.2.13. Φάσμα 2D-NMR του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-COAlaCONH_2-4'-Mebrpy)NO_2](PF_6)$  σε  $D_2O$ .



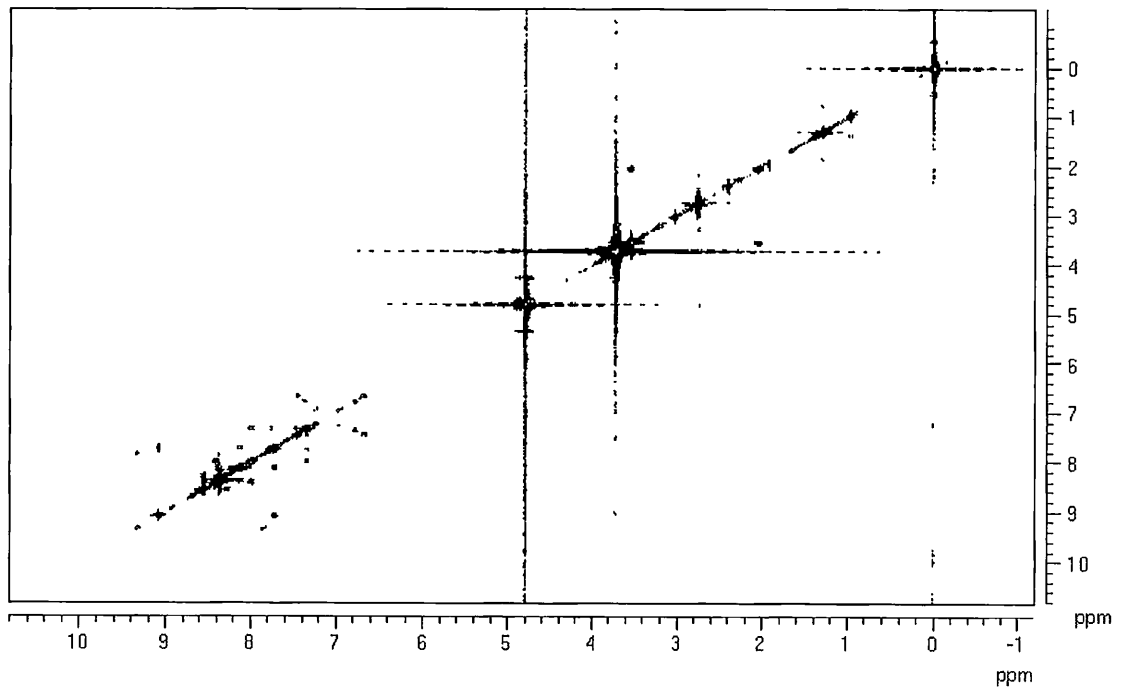
Σχήμα Π.2.14 Φάσμα  $^1H$ -NMR του πεπτιδίου GHK σε  $D_2O$ .



Σχήμα Π.2.15. Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του υποκαταστάτη 4-CO<sub>2</sub>H-KCONH<sub>2</sub>-4'-MeBr σε D<sub>2</sub>O.



Σχήμα Π.2.16.  
Φάσμα 2D-NMR του  
συμπλόκου  
[Ru(terpy)(4-  
CO<sub>2</sub>H-KCONH<sub>2</sub>-4'-  
MeBr)Cl](PF<sub>6</sub>) σε  
μεθανόλη.



Σχήμα Π.2.17. Φάσμα 2D-NMR του συμπλόκου  $[Ru(terpy)(4-COGHKCONH_2-4'-Meipy)NO_2](PF_6)$  σε  $D_2O$

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ**

---

ΠΑΡΑΘΕΣΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΩΝ  
ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

---

Πίνακας Π.3.1. Μήκη δεσμών της κρυσταλλικής δομής  $C_{27}H_{20}N_6O_4Ru$  7.5 ( $H_2O$ ).

Άτομα A	B	Απόσταση δεσμού	Άτομα A	B	Απόσταση δεσμού
Ru1	N41	1.967	C12	H12	0.950
Ru1	N61	2.029	C12	N11	1.350
Ru1	N51	2.065	C12	C13	1.381
Ru1	N21	2.071	C13	H13	0.951
Ru1	N31	2.078	C13	C14	1.381
Ru1	N11	2.096	C13	C12	1.381
O1	H1A	0.930	C14	C13	1.381
O1	H1B	1.019	C14	C15	1.394
O2	H2A	0.911	C14	C17	1.505
O2	H2B	0.991	C15	H15	0.949
O3	H3B	0.921	C15	C16	1.382
O3	H3A	0.971	C15	C14	1.394
O4	H4B	0.933	C16	N11	1.363
O4	H4A	0.952	C16	C15	1.382
O5	H5B	0.945	C16	C26	1.477
O5	H5A	1.020	C17	H17F	0.979
O6	H6A	0.950	C17	H17B	0.980
O6	H6B	1.056	C17	H17D	0.980
O7	H7A	0.962	C17	H17E	0.980
O7	H7B	1.015	C17	H17A	0.980
O8	H8A	0.996	C17	H17C	0.980
O8	H8B	1.021	C17	C14	1.505
O28	C27	1.264	C22	H22	0.950
O29	C27	1.248	C22	N21	1.349
O62	N61	1.261	C22	C23	1.381
O63	N61	1.249	C23	H23	0.950
N11	C12	1.350	C23	C22	1.381
N11	C16	1.363	C23	C24	1.388
N11	Ru1	2.096	C24	C25	1.388
N21	C22	1.349	C24	C23	1.388
N21	C26	1.358	C24	C27	1.519
N21	Ru1	2.071	C25	H25	0.950
N31	C36	1.339	C25	C24	1.388
N31	C32	1.373	C25	C26	1.389
N31	Ru1	2.078	C26	N21	1.358
N41	C46	1.353	C26	C25	1.389
N41	C42	1.354	C26	C16	1.477
N41	Ru1	1.967	C27	O29	1.248
N51	C56	1.344	C27	O28	1.264
N51	C52	1.369	C27	C24	1.519
N51	Ru1	2.065	C32	N31	1.373
N61	O63	1.249	C32	C33	1.379
N61	O62	1.261	C32	C42	1.483



N61	Ru1	2.029	C33	H33	0.949
C33	C34	1.390	H6A	O6	0.950
C34	H34	0.950	H6B	O6	1.056
C34	C35	1.382	H7A	O7	0.962
C34	C33	1.390	H7B	O7	1.015
C35	H35	0.951	H8A	O8	0.996
C35	C34	1.382	H8B	O8	1.021
C35	C36	1.384	H12	C12	0.950
C36	H36	0.950	H13	C13	0.951
C36	N31	1.339	H15	C15	0.949
C36	C35	1.384	H17A	C17	0.980
C42	N41	1.354	H17B	C17	0.980
C42	C43	1.390	H17C	C17	0.980
C42	C32	1.483	H17D	C17	0.980
C43	H43	0.950	H17E	C17	0.980
C43	C44	1.388	H17F	C17	0.979
C43	C42	1.390	H22	C22	0.950
C44	H44	0.950	H23	C23	0.950
C44	C43	1.388	H25	C25	0.950
C44	C45	1.392	H33	C33	0.949
C45	H45	0.950	H34	C34	0.950
C45	C46	1.387	H35	C35	0.951
C45	C44	1.392	H36	C36	0.950
C46	N41	1.353	H43	C43	0.950
C46	C45	1.387	H44	C44	0.950
C46	C52	1.484	H45	C45	0.950
C52	N51	1.369	H53	C53	0.949
C52	C53	1.385	H54	C54	0.951
C52	C46	1.484	H55	C55	0.950
C53	H53	0.949	H56	C56	0.950
C53	C54	1.383	H5A	O5	1.020
C53	C52	1.385	H3A	O3	0.971
C54	H54	0.951	H4B	O4	0.933
C54	C53	1.383	H1A	O1	0.930
C54	C55	1.384	H1B	O1	1.019
C55	H55	0.950	H2A	O2	0.911
C55	C56	1.381	H2B	O2	0.991
C55	C54	1.384			
C56	H56	0.950			
C56	N51	1.344			
C56	C55	1.381			

Πίνακας Π.3.2. Γωνίες της κρυσταλλικής δομής  $C_{27}H_{20}N_6O_4Ru$  7.5 ( $H_2O$ ).

Ατομα A	B	Γ	Γωνία δεσμού	Ατομα A	B	Γ	Γωνία δεσμού
N41	Ru1	N61	88.63	H13	C13	C12	119.77
N41	Ru1	N51	79.90	C14	C13	C12	120.37
N41	Ru1	N21	96.02	C13	C14	C15	116.94
N41	Ru1	N31	79.48	C13	C14	C17	122.74
N41	Ru1	N11	174.05	C15	C14	C17	120.33
N61	Ru1	N51	89.85	H15	C15	C16	119.71
N61	Ru1	N21	175.34	H15	C15	C14	119.80
N61	Ru1	N31	91.43	C16	C15	C14	120.50
N61	Ru1	N11	97.10	N11	C16	C15	122.21
N51	Ru1	N21	90.64	N11	C16	C26	114.92
N51	Ru1	N31	159.30	C15	C16	C26	122.85
N51	Ru1	N11	98.47	H17F	C17	H17B	39.37
N21	Ru1	N31	89.76	H17F	C17	H17D	109.47
N21	Ru1	N11	78.24	H17F	C17	H17E	109.56
N31	Ru1	N11	101.87	H17F	C17	H17A	72.89
H1A	O1	H1B	100.60	H17F	C17	H17C	137.25
H2A	O2	H2B	105.67	H17F	C17	C14	109.43
H3B	O3	H3A	100.00	H17B	C17	H17D	72.91
H4B	O4	H4A	103.60	H17B	C17	H17E	137.28
H5B	O5	H5A	118.35	H17B	C17	H17A	109.46
H6A	O6	H6B	97.54	H17B	C17	H17C	109.52
H7A	O7	H7B	112.55	H17B	C17	C14	109.41
H8A	O8	H8B	90.36	H17D	C17	H17E	109.49
C12	N11	C16	116.89	H17D	C17	H17A	137.26
C12	N11	Ru1	127.94	H17D	C17	H17C	39.42
C16	N11	Ru1	115.06	H17D	C17	C14	109.43
C22	N21	C26	117.80	H17E	C17	H17A	39.46
C22	N21	Ru1	126.18	H17E	C17	H17C	72.87
C26	N21	Ru1	116.02	H17E	C17	C14	109.45
C36	N31	C32	118.21	H17A	C17	H17C	109.50
C36	N31	Ru1	128.16	H17A	C17	C14	109.48
C32	N31	Ru1	113.49	H17C	C17	C14	109.45
C46	N41	C42	122.21	H22	C22	N21	118.45
C46	N41	Ru1	118.58	H22	C22	C23	118.38
C42	N41	Ru1	119.19	N21	C22	C23	123.17
C56	N51	C52	118.21	H23	C23	C22	120.32
C56	N51	Ru1	128.30	H23	C23	C24	120.31
C52	N51	Ru1	113.43	C22	C23	C24	119.37
O63	N61	O62	116.69	C25	C24	C23	117.74
O63	N61	Ru1	122.77	C25	C24	C27	119.01
O62	N61	Ru1	120.54	C23	C24	C27	123.22
H12	C12	N11	118.51	H25	C25	C24	119.79
H12	C12	C13	118.43	H25	C25	C26	119.72
N11	C12	C13	123.07	C24	C25	C26	120.49
H13	C13	C14	119.85	N21	C26	C25	121.42

H13	C13	C12	119.77	N31	C32	C33	121.50
C14	C13	C12	120.37	N31	C32	C42	114.80
C13	C14	C15	116.94	C33	C32	C42	123.69
C13	C14	C17	122.74	H33	C33	C32	120.27
C15	C14	C17	120.33	H33	C33	C34	120.21
H15	C15	C16	119.71	C32	C33	C34	119.52
H15	C15	C14	119.80	H34	C34	C35	120.63
C16	C15	C14	120.50	H34	C34	C33	120.51
N11	C16	C15	122.21	C35	C34	C33	118.86
N11	C16	C26	114.92	H35	C35	C34	120.41
C15	C16	C26	122.85	H35	C35	C36	120.46
H17F	C17	H17B	39.37	C34	C35	C36	119.13
H17F	C17	H17D	109.47	H36	C36	N31	118.67
H17F	C17	H17E	109.56	H36	C36	C35	118.59
H17F	C17	H17A	72.89	N31	C36	C35	122.74
H17F	C17	H17C	137.25	N41	C42	C43	119.57
H17F	C17	C14	109.43	N41	C42	C32	112.87
H17B	C17	H17D	72.91	C43	C42	C32	127.57
H17B	C17	H17E	137.28	H43	C43	C44	120.53
H17B	C17	H17A	109.46	H43	C43	C42	120.50
H17B	C17	H17C	109.52	C44	C43	C42	118.98
H17B	C17	C14	109.41	H44	C44	C43	119.67
H17D	C17	H17E	109.49	H44	C44	C45	119.80
H17D	C17	H17A	137.26	C43	C44	C45	120.54
H17D	C17	H17C	39.42	H45	C45	C46	120.68
H17D	C17	C14	109.43	H45	C45	C44	120.69
H17E	C17	H17A	39.46	C46	C45	C44	118.63
H17E	C17	H17C	72.87	N41	C46	C45	119.98
H17E	C17	C14	109.45	N41	C46	C52	112.82
H17A	C17	H17C	109.50	C45	C46	C52	127.18
H17A	C17	C14	109.48	N51	C52	C53	121.42
H17C	C17	C14	109.45	N51	C52	C46	115.00
H22	C22	N21	118.45	C53	C52	C46	123.56
H22	C22	C23	118.38	H53	C53	C54	120.18
N21	C22	C23	123.17	H53	C53	C52	120.03
H23	C23	C22	120.32	C54	C53	C52	119.79
H23	C23	C24	120.31	H54	C54	C53	120.72
C22	C23	C24	119.37	H54	C54	C55	120.79
C25	C24	C23	117.74	C53	C54	C55	118.49
C25	C24	C27	119.01	H55	C55	C56	120.17
C23	C24	C27	123.22	H55	C55	C54	120.19
H25	C25	C24	119.79	C56	C55	C54	119.64
H25	C25	C26	119.72	H56	C56	N51	118.79
C24	C25	C26	120.49	H56	C56	C55	118.81
N21	C26	C25	121.42	N51	C56	C55	122.40
N21	C26	C16	115.19				
C25	C26	C16	123.29				
O29	C27	O28	126.44				
O29	C27	C24	116.64				
O28	C27	C24	116.92				

