

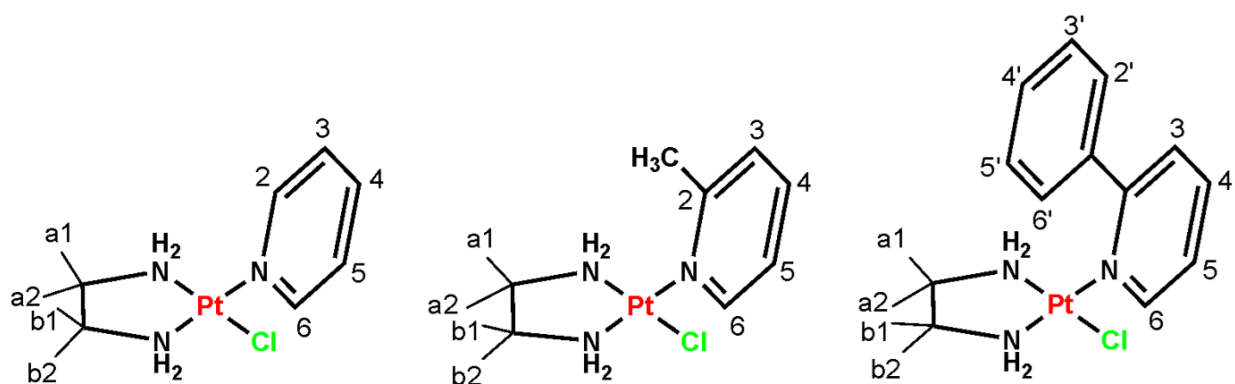


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

## Μονολειτουργικά Κυτταροτοξικά Σύμπλοκα του Pt(II)



Τάγαρη Ευανθία-Βασιλική

Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2024



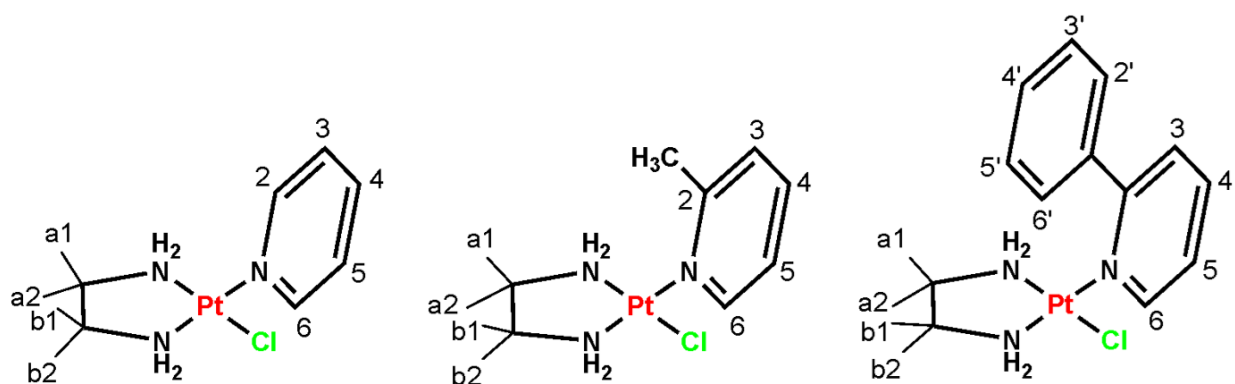


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

## Μονολειτουργικά Κυτταροτοξικά Σύμπλοκα του Pt(II)



Τάγαρη Ευανθία-Βασιλική

Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2024



Ορισμός Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1121/14-06-24

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Αχιλλέας Γαρούφης, Καθηγητής

Μέλη:

Σωτήριος Χατζηκακού, Καθηγητής

Γεράσιμος Μαλανδρίνος, Καθηγητής

Θέμα: «Μονολειτουργικά Κυτταροτοξικά Σύμπλοκα του Pt(II)»

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 04-07-2024

Ο πρόεδρος του Τμήματος Χημείας,  
Πλακατούρας Ιωάννης, Καθηγητής

Η Γραμματέας του Τμήματος Χημείας  
Ξανθή Τουτουζόγλου



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας για την απόκτηση Διπλώματος Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης του Τμήματος Χημείας, πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τη χρονική περίοδο Σεπτέμβριος 2022 – Ιούνιος 2024.

Επιστημονικός υπεύθυνος για την ανάθεση του θέματος, την επίβλεψη όπως και την καθοδήγηση μου ήταν ο καθηγητής Αχιλλέας Γαρούφης, τον οποίο και θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη και την στήριξη που μου έδειξε σε όλες τις επιστημονικές και προσωπικές μου ανησυχίες κατά την διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μου έρευνας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ. Ευαγγελία Σιφναίου για την εκτέλεση των κυτταροτοξικών πειραμάτων υπό την επίβλεψη του καθ. Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής κύριο Ευάγγελο Κωλέττα.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου Δρ. Θεόδωρο Τσώλη και Δρ. Κωνσταντίνο Υψηλάντη, των οποίων οι γνώσεις ήταν αρωγός στην εκπόνηση της διατριβής μου. Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στους συνεργάτες μου στο εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, Αντωνία Γαρυπίδου, και Δημήτριο Θώμο για τις συμβουλές και την παραγωγική μας συνεργασία. Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του τομέα Ανόργανης Χημείας για το καταπληκτικό κλίμα και την αλληλοκατανόηση.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς το Κέντρο NMR και τη Μονάδα Περιβαλλοντικής, Βιολογικής και Βιοχημικής Ανάλυσης, Υψηλής Ανάλυσης, ORBITRAP-LC-MS του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που μου παραχώρησαν πρόσβαση στις εγκαταστάσεις τους.

Ακόμα, δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στους εγκάρδιους φίλους μου Δήμητρα Τσουμάνη και Νίκη Παπανικολάου και ιδιαίτερα στον συνάδελφο μου, Θεμιστοκλή Βενιανάκη, χωρίς τους οποίους δεν θα είχα καταφέρει να διαχειριστώ το άγχος μου κατά την διάρκεια αυτής της απαιτητικής περιόδου.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένειά μου, την μητέρα μου Νεκταρία και τον πατέρα μου Παναγιώτη, για όλες τις θυσίες που έχουν κάνει όλα αυτά τα χρόνια έτσι ώστε να καταφέρω να εκπληρώσω κάθε μου στόχο, γεμίζοντας με πίστη στον εαυτό μου και θάρρος.





## Πίνακας Περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	i
ΣΚΟΠΟΣ.....	vi
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Σύμπλοκα του Pt (II) και αντιμετώπιση του καρκίνου .....	3
1.2. Μονολειτουργικά σύμπλοκα του Pt (II).....	4
1.1.1. Μονολειτουργικά σύμπλοκα του Pt (II) με N-ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες αζώτου.....	5
1.1.1.1. Pyriplatin.....	5
1.1.1.2. Phenanthriplatin .....	8
1.1.1.3. Σύμπλοκα με 1,10-φαινανθρολίνη.....	11
1.1.1.4. Σύμπλοκα με 1,8-ναφθυριδίνη.....	13
1.1.1.5. Σύμπλοκα με υποκατεστημένες κινολίνες .....	14
1.1.1.6. Σύμπλοκα με υποκαταστάτες ημιδαζολίου .....	16
1.1.1.7. Σύμπλοκα με τερπυριδίνες.....	17
1.1.1.8. Σύμπλοκα με ακριδίνη .....	19
1.1.1.9. Σύμπλοκα με μεικτούς δραστικούς υποκαταστάτες .....	21
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	25
2.1. Αντιδραστήρια .....	27
2.2. Φασματοσκοπικές και Αναλυτικές Μέθοδοι .....	27
2.2.1. Φασματοσκοπία NMR .....	27
2.2.2. Φασματοσκοπία μάζας.....	28
2.2.3. Προσδιορισμός σταθεράς ισορροπίας ( $K_{eq}$ ).....	28
2.2.4. Προσδιορισμός σταθεράς υδρόλυσης ( $k$ ).....	28
2.2.5. Ανάλυση διαμόρφωσης σακχάρου .....	29
2.3. Κυτταροτοξικά πειράματα.....	29

2.4.	Συνθέσεις συμπλόκων .....	29
2.4.1.	Σύνθεση του συμπλόκου: Διχλωροαιθυλενοδιάμινο λευκόχρυσος (II) – Pt(en)Cl <sub>2</sub> .....	29
2.4.2.	Σύνθεση του συμπλόκου: Νιτρικός χλωροαιθυλενοδιαμινοπυριδίνη λευκόχρυσος (II) – [Pt(en)(pyridine)Cl](NO <sub>3</sub> ) – (1)NO <sub>3</sub> .....	30
2.4.3.	Σύνθεση του συμπλόκου Νιτρικός χλωροαιθυλενοδιάμινο(2-μεθυλοπυριδίνη) λευκόχρυσος (II) – [Pt(en)(2-methylpyridine)Cl](NO <sub>3</sub> ) – (2)NO <sub>3</sub> .....	30
2.4.4.	Σύνθεση του συμπλόκου Νιτρικός χλωροαιθυλενοδιάμινο(2-φαινυλοπυριδίνη) λευκόχρυσος (II) – [Pt(en)(2-phenylpyridine)Cl]Cl – (3)Cl.....	31
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	33
3.1.	Σύνθεση των συμπλόκων.....	35
3.1.1.	Σύνθεση του Pt(en)Cl <sub>2</sub> .....	35
3.1.2.	Σύνθεση των συμπλόκων (1), (2) και (3).....	35
3.2.	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων .....	37
3.2.1.	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων (1) – (3) με φασματοσκοπία <sup>1</sup> H NMR .....	37
3.2.2.	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων (1) – (3) με φασματοσκοπία μάζας (HR-ESI-MS).....	41
3.3.	Υδρόλυση των συμπλόκων και ισορροπία .....	44
3.3.1.	Υδρόλυση των συμπλόκων (1) και (2).....	44
3.3.2.	Υδρόλυση του συμπλόκου (3).....	50
3.4.	Αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων (1) και (2) με γουανοσίνη (Guo).....	51
3.4.1.	Αλληλεπίδραση του συμπλόκου (1) με γουανοσίνη .....	52
3.4.2.	Αλληλεπίδραση του συμπλόκου (2) με γουανοσίνη .....	56
3.4.3.	Μελέτη διαμόρφωσης σακχάρου .....	62
3.5.	Αλληλεπίδραση του συμπλόκου (3) με 9-μέθυλογουανίνη (9-MeG).....	66
3.6.	Κυτταροτοξική δράση των συμπλόκων (1) – (3) .....	71
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	74
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	79



## ΣΚΟΠΟΣ

Η ανάγκη για αποτελεσματική και εκλεκτική θεραπεία κατά του καρκίνου αποτελεί ένα διαχρονικό πρόβλημα. Στο πλαίσιο αυτό η αναζήτηση νέων κυτταροτοξικών ενώσεων με διαφορετικό μηχανισμό δράσης σε σχέση με τις κλινικά χρησιμοποιούμενες θεραπείες, οι οποίες βρίσκουν ευρεία εφαρμογή, είναι μία σύγχρονη πρόκληση. Παρόλο που η θεραπεία με χημειοθεραπευτικές ενώσεις και συγκεκριμένα συμπλόκων του λευκοχρύσου, όπως το *cisplatin*, είναι γνωστή εδώ και πολλές δεκαετίες, ο σχεδιασμός νέων ενώσεων του λευκοχρύσου με βελτιωμένες ιδιότητες, θεωρείται μία καινοτόμος προσέγγιση στην εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.

Στην παρούσα διατριβή, στόχος μας είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων κατιονικών μονολειτουργικών ενώσεων του λευκοχρύσου(II), του τύπου  $[Pt(en)(L)Cl]^+$ , όπου en = αιθυλενοδιαμίνη και L = N-ετεροκυκλικός αρωματικός υποκαταστάτης. Οι υποκαταστάτες L [πυριδίνη (**1**), 2-μεθυλοπυριδίνη (**2**) και 2-φαίνυλπυριδίνη (**3**)] αποτελούν υποκατεστημένες στην θέση δύο πυριδίνες με αυξανόμενο μέγεθος. Αρχικά, μελετάται η επίδραση του υποκαταστάτη L στην ταχύτητα της αντίδρασης υδρόλυσής των συμπλόκων αυτών, η οποία συνήθως αποτελεί προαπαιτούμενο στάδιο πριν την σύνδεσή τους στις βάσεις του DNA. Επίσης, εξετάζεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA και συγκεκριμένα η δέσμευσή τους στην γουανοσίνη και την 9-μέθυλογουανίνη, όπως και η διαμόρφωση του τμήματος του σακχάρου του νουκλεοσιδίου. Τέλος, η κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων αυτών εξετάζεται στην κυτταρική σειρά καρκίνου του πνεύμονα, A549.

Γενικότερα, σκοπό της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας αποτελεί η σύνθεση και η μελέτη νέων μονολειτουργικών ενώσεων του λευκοχρύσου(II) ως χημειοθεραπευτικά όπως και η συνεισφορά στον προσδιορισμό χαρακτηριστικών, που χρειάζεται να διαθέτουν, για την αποτελεσματική κυτταροτοξική τους δράση.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τρία μονολειτουργικά σύμπλοκα του Pt (II) με τον γενικό τύπο  $[Pt(en)(L)Cl]NO_3$ , όπου η ομάδα en = αιθυλενοδιαμίνη και L = πυριδίνη στο σύμπλοκο (1), την 2-μεθυλοπυριδίνη στο σύμπλοκο (2) και την 2-φαινυλοπυριδίνη στο σύμπλοκο (3). Οι μελέτες υδρόλυσης που πραγματοποιήθηκαν με στόχο τον προσδιορισμό των αντίστοιχων σταθερών για τα σύμπλοκα (1) και (2), έδειξαν ότι η αύξηση του ογκώδους του βοηθητικού υποκαταστάτη L οδηγεί στην μείωση του ρυθμού υδρόλυσης της εκάστοτε ένωσης. Το σύμπλοκο (3) εμφάνισε ξεχωριστή συμπεριφορά, με αποτέλεσμα την αδυναμία προσδιορισμού της σταθεράς υδρόλυσής του. Παρά τις ομοιότητες που εντοπίστηκαν όσον αφορά την κινητική των συμπλόκων (1) και (2) σε υδατικό μέσο με το *phenanthriplatin*, η κυτταροτοξική δράση τους ήταν ελάχιστη εναντίον της κυτταρικής σειράς καρκίνου του πνεύμονα, A549. Για την ίδια καρκινική σειρά, μόνο το σύμπλοκο (3) επέδειξε αξιοσημείωτη κυτταροτοξικότητα με τιμή  $IC_{50} = 41,11 \pm 2,1 \mu M$ . Η μελέτη αλληλεπίδρασης του DNA αποκάλυψε ότι τα σύμπλοκα (1) και (2) συνδέονται με τη νουκλεοβάση, γουανοσίνη, μέσω του N7, με αποτέλεσμα την αύξηση του πληθυσμού της διαμόρφωσης σακχάρου  ${}^3E$  (C3'-endo). Ωστόσο, η στερεοχημική παρεμπόδιση που παρατηρήθηκε μεταξύ της μεθυλικής ομάδας της πυριδίνης και του σακχάρου της γουανοσίνης στο σύμπλοκο (2), επηρέασε σημαντικά την ισορροπία των διαμορφωμένων  ${}^3E$  (C3'-endo) και  ${}^2E$  (C2'-endo). Τέλος, το σύμπλοκο (3) και συγκεκριμένα η σχετική θέση μεταξύ του 9-MeGH8 και του φαινυλικού δακτυλίου της 2-φαινυλοπυριδίνης, υπέδειξε ότι N-ετεροκυκλικοί υποκαταστάτες με εκτεταμένο αρωματικό σύστημα και κατάλληλο προσανατολισμό μπορούν να ενισχύσουν την κυτταροτοξική δράση αυτού του τύπου συμπλόκων.



## ABSTRACT

In this study, three monofunctional Pt(II) complexes with the general formula [Pt(en)(L)Cl]NO<sub>3</sub> were synthesized and characterized, where "en" represents ethylenediamine and "L" corresponds to pyridine in complex (1), 2-methylpyridine in complex (2), and 2-phenylpyridine in complex (3). Hydrolysis studies revealed that increasing the bulkiness of the L substituent decreases the hydrolysis rate for complexes (1) and (2). Complex (3) exhibited distinct behavior, precluding determination of its hydrolysis constant. Despite similarities in the hydrolysis kinetics of complexes (1) and (2) with *phenanthriplatin*, they showed minimal cytotoxic activity against the lung cancer cell line A549, whereas complex (3) demonstrated significant cytotoxicity (IC<sub>50</sub> = 41,11±2,1 μM). DNA binding analysis indicated that complexes (1) and (2) interact with the nucleobase guanosine through N7, increasing the population of the <sup>3</sup>E (C3'-endo) sugar conformation. However, the steric hindrance between the pyridine methyl group and the guanosine sugar in complex (2) notably affects the equilibrium between the <sup>3</sup>E (C3'-endo) and <sup>2</sup>E (C2'-endo) conformations. The cytotoxic efficacy of complex (3) is attributed to the spatial relationship between the 9-MeGH8 and the phenyl ring of 2-phenylpyridine, suggesting that N-heterocyclic substituents with an extended aromatic system and appropriate orientation enhance the cytotoxic activity of these complexes.



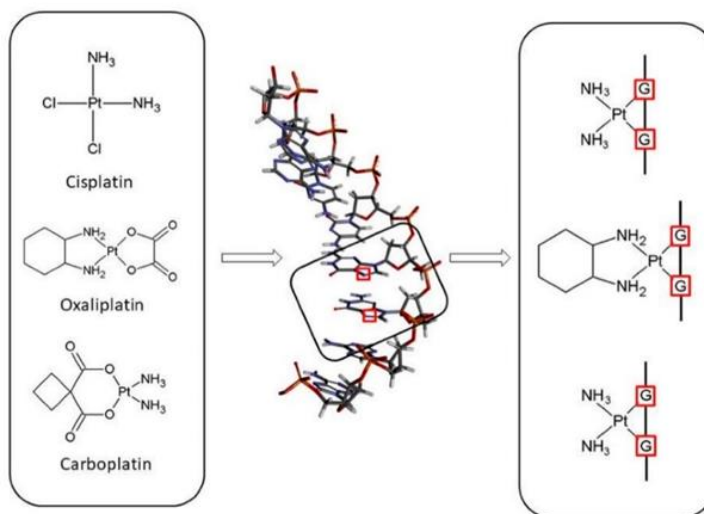


# **1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΙΣΑΓΩΓΗ**



## 1.1. Σύμπλοκα του Pt (II) και αντιμετώπιση του καρκίνου

Ο καρκίνος παραμένει μία από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως, γι' αυτό και η θεραπεία του αποτελεί πρόκληση στην ερευνητική κοινότητα<sup>1</sup>. Παρά την σημαντική πρόοδο όσον αφορά την έγκαιρη ανίχνευση και την στοχευμένη θεραπεία, η πολυπλοκότητα και η ετερογένεια της ασθένειας αυτής απαιτούν περισσότερο εξειδικευμένη προσέγγιση. Η ανακάλυψη της αντικαρκινικής δράσης του *cisplatin*, του πρώτου χημειοθεραπευτικού φαρμάκου με βάση τον λευκόχρυσο την δεκαετία του 1960 από την ομάδα του Rosenberg<sup>2</sup>, έθεσε τις βάσεις για την εξέλιξη των χημειοθεραπευτικών ενώσεων. Τα θυγατρικά δομικά ανάλογα, *carboplatin*<sup>3</sup> και *oxaliplatin*<sup>4</sup>, μοιράζονται έναν κοινό διλειτουργικό μηχανισμό δράσης με το *cisplatin*, σύμφωνα με τον οποίο αφού προηγηθεί η κυτταρική πρόσληψη αυτών και η υδρόλυση – αύξηση του ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα τους, δημιουργούν σταυροδεσμούς (cross-links) με τις πυρηνόφιλες θέσεις των νουκλεϊκών βάσεων του DNA με επικρατέστερη θέση δέσμευσης το N7 της γουανίνης. Οι βλάβες που προκαλούνται, τελικά, στην διπλή έλικα επάγουν έναν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή αλλιώς την απόπτωση<sup>5</sup>. Το μοτίβο αυτό δράσης έχει βρεθεί να είναι αποτελεσματικό σε πλήθος κυτταρικών σειρών καρκίνου και συγκεκριμένα των όρχεων, των ωοθηκών, του τραχήλου της μήτρας όπως, του κεφαλιού, του λαιμού, ακόμα και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα<sup>6,7</sup>.



**Εικόνα 1.1:** Απεικονίσεις των διλειτουργικών συμπλόκων *cisplatin*, *carboplatin* και *oxaliplatin* και του τρόπου αλληλεπίδρασής τους με το DNA<sup>8</sup>.

Η αντικαρκινική δράση αυτού του μοντέλου ενώσεων, όμως, δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε όλο το φάσμα των κρουσμάτων καρκίνου, καθώς σε συγκεκριμένους τύπους οι ενδοκυτταριοί μηχανισμοί που αναπτύσσονται είναι ικανοί να αντισταθούν στις αλλαγές που προκαλούν τα τοξικά αυτά σύμπλοκα, συνεχίζοντας κανονικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Στους μηχανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται η απενεργοποίηση των ενώσεων από ενδοκυτταρικές θειόλες, όπως η γλουταθειόνη (GSH), και η βελτιωμένη επιδιόρθωση των βλαβών, που προκαλούν τα προϊόντα προσθήκης του DNA με τα εκάστοτε σύμπλοκα, από τα επιδιορθωτικά ένζυμα<sup>9</sup>. Σε συνέχεια του περιορισμού της χρήσης των διλειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II), καθοριστικές είναι οι παρενέργειες τις οποίες αυτά προκαλούν. Συγκεκριμένα, η απουσία εκλεκτικής δράσης μόνο στα κύτταρα των όγκων, έχει συνδεθεί με τοξικότητα σε υγιείς ιστούς όπως νεφροτοξικότητα, νευροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα ακόμα και μυελοκαταστολή<sup>10</sup>. Οι παραπάνω παρατηρήσεις αποτελούν ικανή και αναγκαία συνθήκη για την αναζήτηση και ανάπτυξη νέων ενώσεων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης σε σχέση με τις υπάρχουσες κλινικές θεραπείες.

## 1.2. Μονολειτουργικά σύμπλοκα του Pt (II)

Προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι προκλήσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, η ανάπτυξη νέων συμπλόκων λευκοχρύσου (II) με μη κλασικούς μηχανισμούς δράσης αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο ερευνητικό πεδίο για την θεραπεία του καρκίνου. Ανάμεσα σε πολυποίκιλες ενώσεις, τα μονολειτουργικά σύμπλοκα λευκοχρύσου (II) ξεχωρίζουν ως μία καινοτόμος προσέγγιση στην εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων με βάση τον λευκόχρυσο. Οι κατιονικές αυτές ενώσεις περιγράφονται από τον γενικό τύπο  $cis-[Pt(3A)Cl]^+$ , όπου ο υποκαταστάτης A αποδίδεται στην αμμωνία ή σε κάποια αμίνη και το χλώριο,  $Cl^-$ , αποτελεί τον μοναδικό ευκίνητο υποκαταστάτη. Σε αντίθεση με τα παραδοσιακά διλειτουργικά σύμπλοκα λευκοχρύσου που προκαλούν εκτεταμένες βλάβες στο DNA λόγω του τρόπου σύνδεσης τους σε αυτό, οι μονολειτουργικές ενώσεις λευκοχρύσου σχηματίζουν έναν μόνο δεσμό με τις πυρηνόφιλες θέσεις των αζωτούχων βάσεων καθιστώντας τις βλάβες που προκαλούνται περισσότερο εντοπισμένες<sup>11</sup>.

Παρόλο που τα αρχικά πρωτότυπα μονολειτουργικά σύμπλοκα  $[Pt(NH_3)_3Cl]^+$  και  $[Pt(dien)Cl]^+$  είχαν χαρακτηριστεί ως αδρανή έναντι των καρκινικών κυττάρων καθώς δεν τηρούσαν τις έως τότε συμβατικές σχέσεις δομής-δραστηκότητας (SARs)<sup>12-14</sup> μία μελέτη του Hollis και των συνεργατών του στα τέλη της δεκαετίας του 1980, έδειξε πως μία συγκεκριμένη κατηγορία

μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II) του τύπου  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{L})\text{Cl}]^+$ , όπου το L αντιπροσωπεύει έναν υποκαταστάτη δότη αζώτου, εμφανίζει αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε μοντέλα ποντικών με λευχαιμία L1210 και P388. Η ανακάλυψη αυτή ήταν καθοριστικής σημασίας, καθώς απέδειξε πως τα μονολειτουργικά σύμπλοκα λευκοχρύσου μπορούσαν πράγματι να έχουν αντικαρκινική δράση, αμφισβητώντας την προηγουμένως διαδεδομένη πεποίθηση ότι μόνο ουδέτερα, τετραγωνικά επίπεδα σύμπλοκα λευκοχρύσου, με *cis*- διαμόρφωση για τους αδρανείς υποκαταστάτες του, όπως το *cisplatin*, ήταν αποτελεσματικά<sup>15</sup>. Ωστόσο, η αναζωπύρωση του ενδιαφέροντος για τον σχεδιασμό ανάλογων ενώσεων προέκυψε από την ανακάλυψη της κρίσιμης συμμετοχής των Μεταφορέων Οργανικών Κατιόντων (OCTs) στην κυτταρική πρόσληψη του *oxaliplatin*, η οποία όμως στερείται εγγενών κατιονικών ιδιοτήτων. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε την ερευνητική κοινότητα στον σχεδιασμό νέων κατιονικών συμπλόκων λευκοχρύσου με οργανικούς υποκαταστάτες για την αύξηση της πιθανότητας πρόσληψης τους από αυτού του τύπου τις μεμβρανικές πρωτεΐνες, ιδιαίτερα όπου αυτές υπερεκφράζονται, όπως συμβαίνει στον καρκίνο του παχέος εντέρου<sup>16</sup>.

### 1.1.1. Μονολειτουργικά σύμπλοκα του Pt (II) με N-ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες αζώτου

#### 1.1.1.1. Pyriplatin

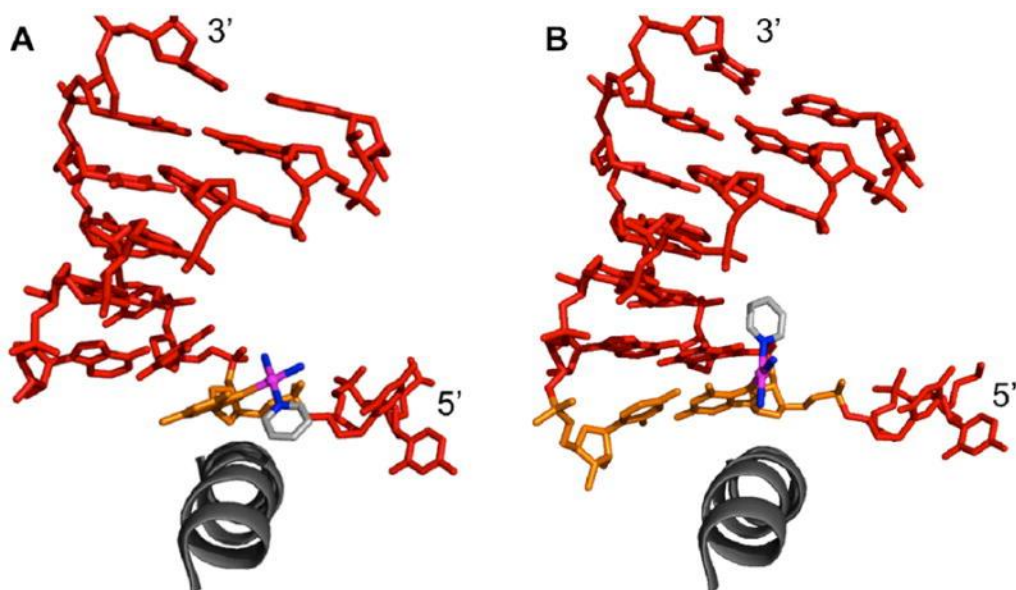
Το *pyriplatin* με χημικό τύπο  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N1-pyridine})\text{Cl}]^+$  συγκαταλέγεται ανάμεσα στα σύμπλοκα τα οποία αναπτύχθηκαν πρώτη φορά από τον Hollis και του συνεργάτες του<sup>15</sup>, αλλά το μοτίβο δράσης τους διερευνήθηκε αρκετά χρόνια αργότερα. Σε αντίθεση με το *cisplatin*, το *pyriplatin* διαθέτει μόνο έναν ευκίνητο χλωριούχο υποκαταστάτη και έχει την δυνατότητα να σχηματίζει μονολειτουργικά προϊόντα προσθήκης με το DNA όταν συνδέεται στο N7 του υπολείμματος γουανίνης της κύριας άλακας. Αν και αυτός ο τύπος αλλοίωσης του DNA επιδιορθώνεται από τους μηχανισμούς NER (Nucleotide Excision Repair), η διαδικασία που ακολουθείται είναι λιγότερο αποτελεσματική σε σχέση με την αντίστοιχη για τις βλάβες που προκαλούνται από διλειτουργικά προϊόντα προσθήκης<sup>17</sup>.

Πιο συγκεκριμένα, το *pyriplatin* διαφέρει από τους παραδοσιακούς αντικαρκινικούς παράγοντες, καθώς το θετικό του φορτίο σε συνδυασμό με τον οργανικό υποκαταστάτη πυριδίνη, καθιστούν το σύμπλοκο εξαιρετικό υπόστρωμα για τους Μεταφορείς Οργανικών Κατιόντων OCT1 και

OCT2. Ιδιαίτερα σε κύτταρα στα οποία υπερεκφράζονται αυτοί οι μεταφορείς, η ευαισθησία στο *pyriplatin* είναι αυξημένη, σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν συμβαίνει υπερέκφραση αυτών. Συγκρίνοντας την κυτταροτοξική του δράση, το *pyriplatin* εμφάνισε μεγαλύτερη δραστηριότητα (87-137 φορές) από το *oxaliplatin* (12-53 φορές), το οποίο επίσης προσδένεται στους ίδιους μεταφορείς, σε κύτταρα OCT(+)<sup>17</sup>. Εκτενέστερη μελέτη του κυτταροτοξικού προφίλ του *pyriplatin* σε ένα πάνελ καλά χαρακτηρισμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών, έδειξε πως οι τιμές του για το IC<sub>50</sub> είναι 16 έως 270 φορές υψηλότερες από αυτές του *cisplatin* και του *oxaliplatin*, υποδεικνύοντας την μικρότερη ισχύ του ως αντικαρκινικός παράγοντας. Παρολαυτά, το *pyriplatin* είναι περισσότερο δραστικό σε κύτταρα όγκων στα οποία τα κλασικά διλειτουργικά φάρμακα δεν είναι τόσο αποτελεσματικά (HCT-116, HOP-92, HOP-62 και OVCAR-3). Η διαπίστωση αυτή χαρακτηρίζει την μοναδικότητα του μηχανισμού δράσης του *pyriplatin*, η οποία επίσης ενισχύεται από την ικανότητα του να λειτουργεί συνεργατικά με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα όπως το *cisplatin*<sup>18</sup>.

Προκειμένου να εξακριβωθεί ο μηχανισμός που διέπει την ικανότητα του *pyriplatin* να αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, οι ερευνητές μελέτησαν την κρυσταλλική δομή ενός ειδικά πλατινωμένου από το *pyriplatin* δωδεκαμερούς DNA στην θέση του N7 ενός κεντρικού υπολείμματος γουανοσίνης. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε πως η διαμόρφωση του δωδεκαμερούς παραμένει στην B-μορφή, ενώ παράλληλα η πλατινωμένη γουανίνη εξακολουθεί να είναι πλήρως συνδεδεμένη με την κυτοσίνη του απέναντι κλώνου<sup>17</sup>. Μελέτη της επίδρασης αυτού του προϊόντος προσθήκης στο στάδιο της μεταγραφής, αποκάλυψε πως, παρά την ασήμαντη παραμόρφωση που αυτό προκαλεί στην διπλή έλικα του DNA, η τελευταία είναι ικανή να οδηγήσει σε αναστολή της προόδου της RNA πολυμεράσης II (pol II) σε μία μετά-μεταφραστική κατάσταση στο σημείο που εντοπίζεται το πλατινωμένο υπόλειμμα γουανοσίνης. Το τελευταίο εντοπίζεται ακριβώς πάνω από την γέφυρα – έλικα του ενζύμου, επιδρώντας σημαντικά στο ενεργό κέντρο του και συνεπώς στην πρόοδο της μεταγραφής. Τα δεδομένα όμως βρέθηκαν διαφορετικά κατά την επίλυση της κρυσταλλικής δομής του ίδιου μοντέλου κατά την αντικατάσταση της κυτοσίνης του απέναντι κλώνου με το CMP (Cytosine Mono Phosphate). Στην περίπτωση αυτή, παρόλο που εξακολουθούσαν να υπάρχουν οι δεσμοί υδρογόνου σύμφωνα με το μοντέλο Watson και Crick ανάμεσα στο CMP και την πλατινωμένη γουανίνη, η pol II παρατηρήθηκε να βρίσκεται ακινητοποιημένη στο προηγούμενο νουκλεοτίδιο. Αιτία αυτού του φαινομένου βρέθηκε πως είναι η δυνατότητα ελεύθερης περιστροφής, γύρω από τον δεσμό Pt-Npy, του *cis-*

$[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{pyridine})]^{2+}$  η οποία στην περίπτωση του CMP παρεμποδίζεται λόγω της φωσφορικής ομάδας του CMP. Η παρατήρηση αυτή επαληθεύει επίσης τον λόγο που τα πρώτα μονολειτουργικά σύμπλοκα λευκοχρύσου  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}]^+$  και  $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$  είναι αδρανή απέναντι στα καρκινικά κύτταρα καθώς δεν διαθέτουν ογκώδεις υποκαταστάτες<sup>19</sup>.



**Εικόνα 1.2:** Απεικονίσεις των κρυσταλλικών δομών μεταγραφής της διπλής έλικας του DNA από την RNA πολυμεράση II η οποία έχει σταματήσει στο προϊόν προσθήκης του *pyriplatin*. (A) Η θέση προσθήκης απέναντι από την πλατινωμένη γουανίνη είναι κενή και ο δακτύλιος της πυριδίνης κατευθύνεται προς το 5' άκρο του πλατινωμένου κλώνου. (B) Η θέση προσθήκης καταλαμβάνεται από το CMP με τον δακτύλιο της πυριδίνης να είναι στραμμένος στο 3' άκρο του πλατινωμένου κλώνου<sup>11</sup>.

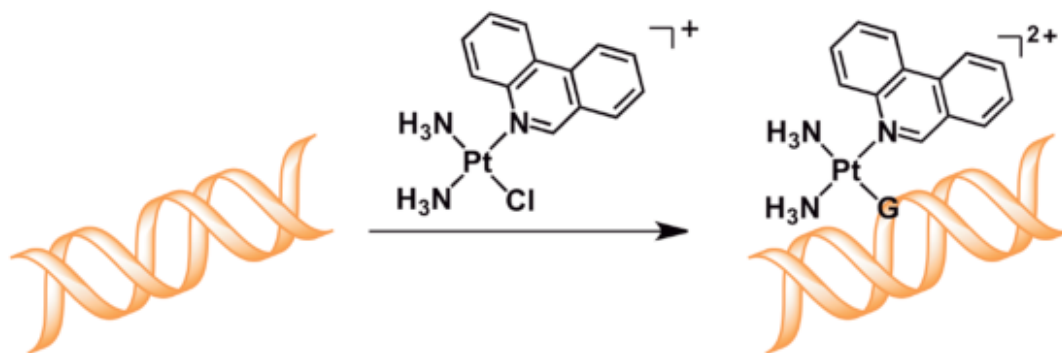
Τέλος, πέρα από την ικανότητά του μονολειτουργικού αυτού συμπλόκου να δεσμεύεται εκλεκτικά στο DNA παρεμποδίζοντας κατά αυτό τον τρόπο την επιμήκυνση των μεταγραφόμενων κλώνων από την RNA πολυμεράση II, εξίσου σημαντική είναι και η παρατήρηση της σχετικά μεγαλύτερης βιοδιαθεσιμότητάς του. Η ικανότητα του *pyriplatin*, δηλαδή, να αποφεύγει την απενεργοποίηση του από την GSH και άλλα κυτταρικά πυρηνόφιλα όπως οι μεταλλοθειονίνες, αυξάνουν το ποσοστό του μέσα στο κύτταρο. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην σχετική θέση της πυριδίνης, η οποία προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά να είναι κάθετη στο επίπεδο της σφαίρας ένταξης του λευκοχρύσου. Η διαμόρφωση αυτή προστατεύει αξονικά τον λευκόχρυσο από την υδρόλυση του και την εν συνεχεία πρόωρη απενεργοποίηση του<sup>20</sup>.



### 1.1.1.2. Phenanthriplatin

Το *phenanthriplatin* με χημικό τύπο  $cis-[Pt(NH_3)_2(phenanthridine)Cl]^+$  ανήκει στην κατηγορία των κατιονικών μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II) και αναπτύχθηκε στο πλαίσιο βελτίωσης της κυτταροτοξικότητας αυτού του τύπου ενώσεων από τον Lippard και την ομάδα του. Συγκεκριμένα, οι δομικές προϋποθέσεις οι οποίες είχαν ήδη εξακριβωθεί από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα του *pyriplatin*, έθεσαν τις βάσεις για τον σχεδιασμό μίας σειράς συμπλόκων του τύπου  $cis-[Pt(NH_3)_2(Am)Cl]^+$  με το Am να αντιπροσωπεύει N-ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες διαφορετικού μεγέθους. Από το σύνολο των ενώσεων που συντέθηκαν, το *phenanthriplatin*, όπου το Am αντιπροσωπεύει τον υποκαταστάτη φαινανθριδίνη, ξεχώρισε ως η ισχυρότερη κυτταροτοξική ένωση με τιμές  $IC_{50}$  7 – 40 φορές μικρότερες από αυτές του *cisplatin* ή του *oxaliplatin* σε μία σειρά ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών<sup>20</sup>.

Το πλεονέκτημα του *phenanthriplatin* σε σύγκριση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα που αναπτύχθηκαν είναι το εκτεταμένο αρωματικό σύστημα που διαθέτει και βρίσκεται κάθετα στο επίπεδο του συμπλόκου. Ο υδρόφοβος χαρακτήρας του αρωματικού υποκαταστάτη της φαινανθριδίνης αυξάνει την κυτταρική πρόσληψη του συμπλόκου μέσω της πλασματικής μεμβράνης σε σχέση με το *cisplatin* και το *pyriplatin*. Παρόλο όμως που η συνολική πρόσληψη τους διαφέρει, η ποσότητα που τελικώς συνδέεται με το DNA του πυρήνα είναι παρόμοια και για τα τρία σύμπλοκα<sup>20</sup>. Αφού προηγηθεί η ενδοκυττάρια υδρόλυση του συμπλόκου, η οποία ολοκληρώνεται σε διάστημα μίας ώρας στους 37°C ( $K_{eq} = 0,1$  mM), το N7 της γουανίνης είναι η προτιμότερη θέση δέσμευσης στο DNA για το *phenanthriplatin* ως το περισσότερο πυρηνόφιλο άτομο<sup>20</sup>. Τα ποσοστά όμως δέσμευσης του *phenanthriplatin* στα υπόλοιπα άτομα αζώτου, όπως το N1 και το N7 της αδεΐνης, δεν είναι αμελητέα. Η ιδιότητα αυτή του μονολειτουργικού αυτού συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα το διαφορετικό φάσμα δράσης του, σε σχέση με το *cisplatin*<sup>21</sup>.



**Εικόνα 1.3:** Απεικόνιση της κύριας αλληλεπίδρασης του συμπλόκου *phenanthriplatin* με το πυρηνικό DNA<sup>22</sup>.

Εκτός όμως από την δημιουργία των μη αναστρέψιμων δεσμών ένταξης του *phenanthriplatin* στο DNA, η παρεμβολή του σε αυτό έχει εξίσου σημαντικό ρόλο στην τελική του δράση. Παρόλο που η μελέτη του Lippard και της ομάδας του έδειξε μη ανταγωνιστική σχέση ανάμεσα στο σύμπλοκο αυτό και τον γνωστό παράγοντα παρεμβολής στο DNA, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)<sup>20</sup>, αρκετά χρόνια αργότερα το *phenanthriplatin* αποδείχθηκε πως μιμείται την δράση του [Pt(terpy)Cl]<sup>+</sup>. Στην περίπτωση αυτή το σύμπλοκο παρεμβάλλεται ταχέως ανάμεσα στις βάσεις του DNA μέσω του τμήματος της φαινανθριδίνης. Η συνθήκη αυτή προάγει στην συνέχεια την πλατινίωση των βάσεων του DNA που βρίσκονται πλησίον, η οποία ακολουθεί μία πιο αργή κινητική<sup>23</sup>.

Όπως συμβαίνει και στο *pyriplatin*, ο ογκώδης υποκαταστάτης της φαινανθριδίνης είναι προσανατολισμένος κάθετα στην σφαίρα ένταξης του λευκοχρύσου, συνεισφέροντας κατά αυτό τον τρόπο στην στερεοχημική παρεμπόδιση της προόδου της RNA πολυμεράσης II κατά το στάδιο της μεταγραφής. Ειδικότερα ένα προϊόν προσθήκης *phenanthriplatin*-DNA μειώνει την ολική πιστότητα μεταγραφής κατά ~ 1200 έως 5000 φορές. Αφού προηγηθεί μία ταχεία, χωρίς σφάλματα, προσθήκη του πρώτου νουκλεοτιδίου απέναντι από την θέση βλάβης του DNA, ακολουθεί μία αργή και επιρρεπής σε σφάλματα προσθήκη του επόμενου νουκλεοτιδίου κατά την επέκταση του κλώνου RNA ενεργοποιώντας μηχανισμούς επιδιόρθωσης ή απόπτωσης<sup>22</sup>.

Το μέγεθος του υποκαταστάτη φαινανθριδίνης, στην περίπτωση του *phenanthriplatin*, είναι εξαιρετικά σημαντικός παράγοντας για την βιολογική του δράση, η ασυμμετρία όμως αυτού του τμήματος στο επίπεδο ένταξης του λευκοχρύσου προσδίδει χαρακτηριστικά χειρομορφίας στο μόριο. Τα δύο εναντιομερή ωστόσο, είναι αλληλομετατρέψιμα λόγω περιστροφής γύρω από τον δεσμό Pt-N<sub>ph</sub> και βρίσκονται σε μία ταχεία ισορροπία μεταξύ τους. Όταν όμως το σύμπλοκο

εντάσσεται σε νουκλεοβάσεις, όπως η 9-άλκυλογουανίνη, το εναντιομερές που προτιμάται, τόσο σε διάλυμα όσο και σε στερεή κατάσταση, είναι εκείνο στο οποίο τα πρωτόνια H8Guo και H6Phenanthridine βρίσκονται στην ίδια πλευρά του επιπέδου του λευκοχρύσου. Το φαινόμενο αυτό βασίζεται στον δεσμό υδρογόνου ο οποίος αναπτύσσεται ανάμεσα στο καρβονύλιο της 6<sup>ης</sup> θέσης της γουανίνης και της ενταγμένης *cis*- αμίνης, με αποτέλεσμα την προτίμηση ενός συγκεκριμένου προσανατολισμού της φαινανθριδίνης<sup>24</sup>. Η σχετική θέση *cis*- των ενταγμένων αμμωνιών στο μόριο του *phenanthriplatin* έχει επίσης σημαντικό αντίκτυπο στην αντικαρκινική δράση του συμπλόκου, καθώς το *trans*- ισομερές του αποδείχτηκε πως είναι λιγότερο κυτταροτοξικό και δεν ακολουθεί τον ίδιο μηχανισμό δράσης<sup>25</sup>.

Τα χαρακτηριστικά του υποκαταστάτη, φαινανθριδίνη, εξυπηρετούν επίσης την μεγαλύτερη προστασία του συμπλόκου από τα πυρηνόφιλα που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και έχουν ανασταλτική δράση προς αυτό. Μελέτη της αντίδρασης του *phenanthriplatin* και του *pyriplatin* με N-acetyl-methionine, που χρησιμοποιείται ως μοντέλο για την GSH, έδειξε πως το σύμπλοκο είναι σχετικά αδρανές και δεν αντιδρά με το άτομο του θείου της ένωσης. Η παραπάνω αντίδραση θα απενεργοποιούσε το φάρμακο λόγω του σχηματισμού αδρανών μεταβολιτών λευκοχρύσου. Αναφορικά με την ταχύτητα της αντίδρασης αυτής για τα δύο μονολειτουργικά σύμπλοκα, το *pyriplatin* αντέδρασε δέκα φορές γρηγορότερα, υποδεικνύοντας έτσι μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση ανάμεσα στον όγκο του υποκαταστάτη και την απενεργοποίηση του δυναμικού των συμπλόκων<sup>20</sup>.

Ο μηχανισμός όμως του *phenanthriplatin* δεν περιορίζεται μόνο στην αναστολή της pol II, αλλά έχει βρεθεί πως έχει επίδραση και στην ομαλή διεξαγωγή της αντιγραφής. Αναλυτικότερα βλάβες που προκαλούνται από το *phenanthriplatin* στο DNA είναι ικανές να αναστείλουν αποτελεσματικά τις DNA πολυμεράσες  $\nu$ ,  $\zeta$  και  $\kappa$ , όπως και το θραύσμα *Klenow*. Σε αντίθεση με δεδομένα που έχουν προκύψει από προσβεβλημένο DNA από *cisplatin*, όλες οι παραπάνω πολυμεράσες είναι ικανές να εισάγουν μόνο μία βάση απέναντι από μία βλάβη που έχει προκληθεί από το *phenanthriplatin* και να σταματήσουν αμέσως μετά. Η DNA πολυμεράση  $\eta$ , όμως, είναι ικανή να παρακάμψει πλήρως το προϊόν προσθήκης, αν και με χαμηλή απόδοση. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα ακτινών X του ενζύμου, DNA πολυμεράση  $\eta$ , σε ένα ειδικά πλατινωμένο DNA, τόσο κατά την εισαγωγή όσο και κατά την επέκταση των κλώνων, αποκαλύπτουν πως το *phenanthriplatin* αναστέλλει με διαφορετικό τρόπο το συγκεκριμένο

ένζυμο σε σχέση με τα κλασικά διλειτουργικά φάρμακα λευκοχρύσου. Παρόλο που η υπερέκφραση του ενζύμου αυτού έχει βρεθεί πως λειτουργεί ως μηχανισμός αντίστασης στην θεραπεία με *cisplatin* και *oxaliplatin*, το *phenanthriplatin* είναι αποτελεσματικό τόσο σε καρκινικά κύτταρα που δεν φέρουν το ένζυμο  $\eta$  (-) όσο και σε αυτά που το φέρουν  $\eta$  (+)<sup>26</sup>.

Οι οδοί που έχουν ως αποτέλεσμα τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων δεν περιορίζονται μόνο σε μία εξαρτώμενη από τις βλάβες στο DNA διαδικασία. Αναλυτικότερα, ενώσεις ικανές να καταστέλλουν την τοποϊσομεράση II (Top2), ένα βασικό ένζυμο που διασπά το δίκλωνο DNA, μπορούν να χρησιμεύσουν ως ισχυροί αντικαρκινικοί παράγοντες. Το *phenanthriplatin* αποδείχτηκε πως δρα ως αναστολέας της Top2, εκτός από τον γνωστό μηχανισμό δράσης του, δεσμεύοντας θέσεις στο DNA<sup>27</sup>. Επιπλέον, όπως συμβαίνει και στο *oxaliplatin*, η προσθήκη του *phenanthriplatin* σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να προκαλέσει στρες στη βιογένεση των ριβοσωμάτων. Παρακολούθηση της σύνθεσης rRNA έδειξε πως μετά την επώαση των κυττάρων με τις κυτταροτοξικές αυτές ενώσεις, ο πληθυσμός των προ- rRNA μειώθηκε μέσα σε μισή ώρα σε ποσοστό 50% . Κάτι ανάλογο δεν έχει εντοπιστεί να συμβαίνει σε θεραπεία με *cisplatin*<sup>28</sup>. Τέλος, το *phenanthriplatin* μπορεί να συνδεθεί σε έναν κλώνο DNA και να εμποδίσει την μεταγραφή των γονιδίων. Κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα A549 και κύτταρα πνευμονικών ινοβλαστών IMR90, υποβλήθηκαν σε αγωγή με *cisplatin* και *phenanthriplatin*, με το τελευταίο να ρυθμίζει γονίδια τα οποία σηματοδοτούν τον παράγοντα p53 που ελέγχει την απόπτωση. Σε αντίθεση με το *cisplatin*, το *phenanthriplatin* επηρέασε γονίδια τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό σκελετό, τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των κυττάρων<sup>29</sup>.

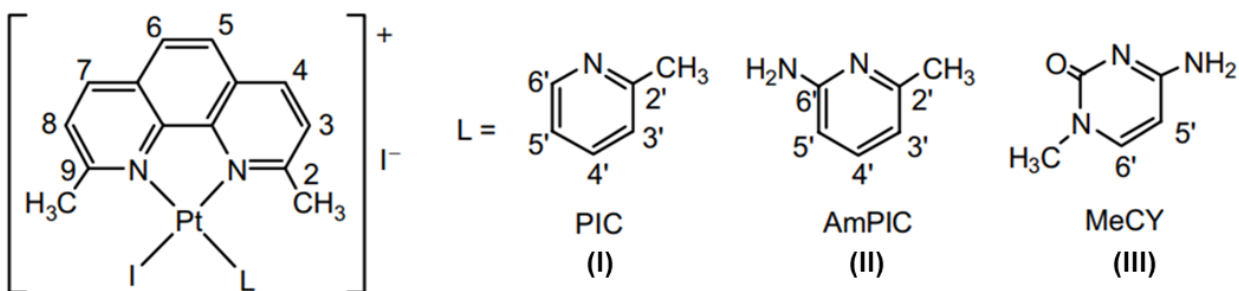
### 1.1.1.3. Σύμπλοκα με 1,10-φαινανθρολίνη

Ο Margiotta και η ερευνητική του ομάδα, στο πλαίσιο βελτίωσης των ιδιοτήτων των μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου με κατιονικό φορτίο, συνέθεσαν και μελέτησαν ενώσεις με τρεις σταθερούς υποκαταστάτες δότες αζώτου και μίας καλώς αποχωρούσα ομάδα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μονολειτουργικών υδατοδιαλυτών ενώσεων με γενικό τύπο  $[PtA_2LI]^+$  όπου το A<sub>2</sub> συμβολίζει την 2,9-διμεθυλ-1,10-φαινανθρολίνη (Me<sub>2</sub>phen) και το L τους υποκαταστάτες 2-πικολίνη (PIC) για το σύμπλοκο (I), 6-άμινο-2-πικολίνη (AmPIC) για το σύμπλοκο (II) και 1-μέθυλ-κυτοσίνη (MeCY) για το σύμπλοκο (III)<sup>30</sup>.

Κρυσταλλογραφική ανάλυση ακτινών X του  $[Pt(Me_2phen)(AmPIC)I]I$  (II) αποκάλυψε πώς το τμήμα του επιπέδου της φαινανθρολίνης υφίσταται μία παραμόρφωση σαν τόξο, υιοθετώντας μία

κυρτή κλίση σε σχέση με το επίπεδο του λευκοχρύσου, λόγω στερικών φαινομένων. Ο Pt(II) φαίνεται να είναι πλούσιος ηλεκτρονικά από τις δύο *ortho*- μεθυλομάδες της φαινανθρολίνης όσο και από το πλούσιο ηλεκτρονικά περιβάλλον του αρωματικού δακτυλίου της πυριδίνης. Ομοίως και στο σύμπλοκο με την 1-μέθυλ-κυτοσίνη, οι δύο *ortho*- μεθυλομάδες της φαινανθρολίνης και ο πυριμιδινικός δακτύλιος της κυτοσίνης προστατεύουν αποτελεσματικά το μεταλλικό κέντρο του λευκοχρύσου, επιβραδύνοντας τις αντιδράσεις του με πυρηνόφιλες ενώσεις που βρίσκονται σε εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια υγρά<sup>30</sup>.

Η κυτταροτοξική δράση της περισσότερο υδατοδιαλυτής ένωσης (III) μελετήθηκε *in vitro* και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη για το *cisplatin* σε μια ομάδα έντεκα κυτταρικών σειρών ανθρώπινων όγκων, συμπεριλαμβανομένου του πνεύμονα, τον καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και των ωοθηκών. Στο σύνολο των τελευταίων περιλαμβάνονταν και καρκινικά κύτταρα ωοθηκών με εγγενή (SKOV-3) ή επίκτητη (A2780<sup>cisR</sup>, 41M<sup>cisR</sup>) αντοχή στο *cisplatin*. Η μέση τιμή για το IC<sub>50</sub> του υπό εξέταση συμπλόκου υπολογίστηκε στα 1,1 μM, η οποία είναι χαμηλότερη από την μέση τιμή του *cisplatin* ίση με 3,8 μM. Ενώ το σύμπλοκο (III) ήταν λιγότερο δραστικό από το *cisplatin* έναντι των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα H460, ήταν εξίσου ή πιο δραστικό έναντι άλλων κυτταρικών σειρών, εμφανίζοντας κυρίως μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων COLO205, HCT116, KM12, MDA και SKOV-3. Η ανάλυση κατάταξης Spearman έδειξε μια αδύναμη συσχέτιση μεταξύ των προφίλ δραστικότητας ανάμεσα στο σύμπλοκο (III) και το *cisplatin*, υποδηλώνοντας διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Η ένωση αυτή φαίνεται να ξεπερνά πλήρως την επίκτητη αντίσταση στο *cisplatin* που προκύπτει είτε από μειωμένη πρόσληψή του είτε από έναν πολυπαραγοντικό μηχανισμό έκφρασης της αντικαρκινικής του δράσης<sup>30</sup>.



**Εικόνα 1.4:** Απεικόνιση των υδατοδιαλυτών μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II) του τύπου  $[Pt(Me_2phen)(L)I]^+$ <sup>30</sup>.

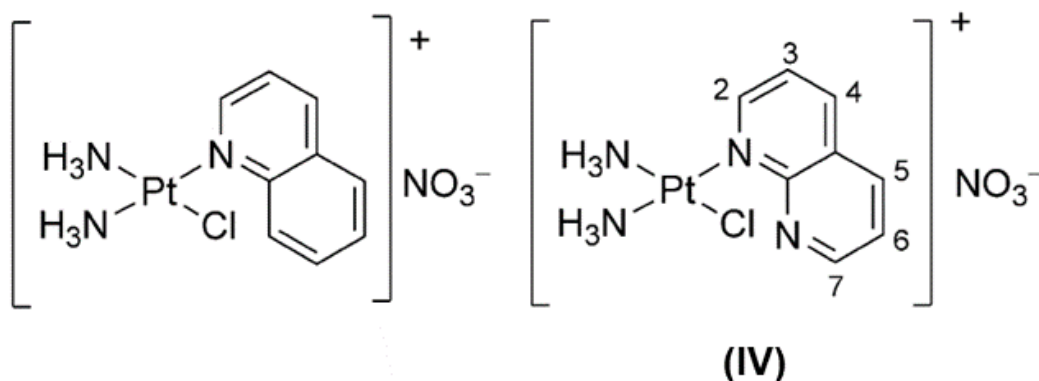
#### 1.1.1.4. Σύμπλοκα με 1,8-ναφθυριδίνη

Σε μία εργασία που δημοσιεύτηκε επίσης από τον Margiotta και τους συνεργάτες του, διερευνάται η δυνατότητα ενίσχυσης του ρόλου του N,N'-αρωματικού υποκαταστάτη σε μονολειτουργικές ενώσεις λευκοχρύσου (II) του τύπου που προτάθηκε από τον Hollis<sup>15</sup>. Στην προκειμένη περίπτωση, ο ετεροκυκλικός αρωματικός υποκαταστάτης θα μπορούσε να έχει την δυνατότητα να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου, όπως για παράδειγμα ο υποκαταστάτης 1,8-ναφθυριδίνη (naph) στο σύμπλοκο *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(naph)Cl]NO<sub>3</sub> (IV). Η 1,8-ναφθυριδίνη έχει τυπικά μονοδοντική δράση, με το δεύτερο άτομο αζώτου του να μπορεί να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου, ανάλογα με την κατάσταση πρωτονίωσής του. Ο σχηματισμός ενός τέτοιου δεσμού θα μπορούσε να είναι κρίσιμος αναφορικά με την αλληλεπίδρασή του με το DNA και τις πρωτεΐνες<sup>31</sup>.

Το πρώτο βήμα στον μηχανισμό δράσης των φαρμάκων με βάση τον λευκόχρυσο είναι η υδρόλυσή τους στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, καθιστώντας τα κατά αυτόν τον τρόπο πιο δραστικά προς το DNA και άλλους ενδοκυτταρικούς στόχους. Για το σύμπλοκο (IV) η υδρόλυση ολοκληρώθηκε σε περίπου 100 λεπτά στους 37°C με σταθερά ισορροπίας 0,25 mM<sup>31</sup>. Οι πειραματικές αυτές τιμές συνάδουν με τις αντίστοιχες σταθερές για το *pyriplatin* και το *phenanthriplatin*<sup>20</sup>. Σε συνέχεια μελέτης της δράσης αυτού του συμπλόκου με το 5'-GMP επιβεβαιώθηκε ο μονολειτουργικός τρόπος δέσμευσης του στο DNA, επίσης παρόμοιος με αυτόν για το *pyriplatin* και το *phenanthriplatin*, χωρίς να παρατηρείται εκτόπιση κάποιου από τους υποκαταστάτες του. Αντιθέτως, κατά την αντίδρασή του με το GSH, οι υποκαταστάτες αμμωνίας και ναφθυριδίνης, απομακρύνονται από την σφαίρα ένταξης του λευκοχρύσου, κάτι που δεν συμβαίνει στα παραπάνω πρότυπα μονολειτουργικά σύμπλοκα<sup>31</sup>.

Η ανασταλτική δράση της ένωσης στην ανάπτυξη των όγκων αξιολογήθηκε έναντι μιας ομάδας καρκινικών κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος (A375), του τραχήλου της μήτρας (A431), του παγκρέατος (BxPC3), του πνεύμονα (A549), και διάφορους καρκίνους του παχέος εντέρου (HCT-15, DLD1, LoVo και LoVo-OXP). Συγκρίνοντας την κυτταροτοξική της δράση με τα κλασικά διλειτουργικά φάρμακα, η ένωση βρέθηκε να έχει παρόμοια κυτταροτοξικότητα με το *oxaliplatin*, και υψηλότερη σε σχέση με το *cisplatin*. Αναφορικά με την κυτταροτοξική δράση του (IV) σε σύγκριση με το σύμπλοκο (III) που αναφέρθηκε προηγουμένως, προσδιορίστηκε πως το τελευταίο ήταν περισσότερο αποτελεσματικό σε διάφορες

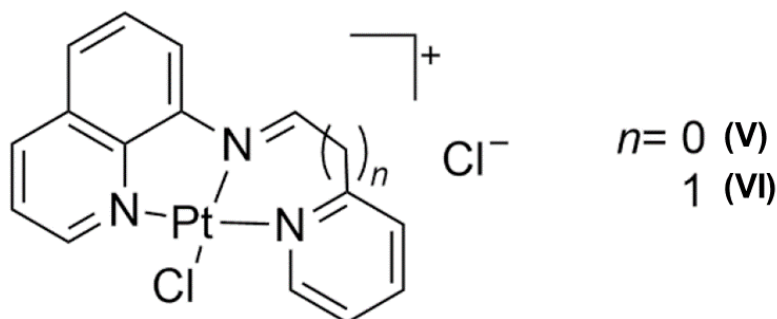
κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου και ειδικά στην ανθεκτική στο *oxaliplatin* κυτταρική σειρά LoVo-OXP. Παρολαυτά, κανένα από τα δύο σύμπλοκα δεν εμφάνισε αντίσταση στην ίδια κυτταρική σειρά, υποδηλώνοντας τους διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης τους. Η παρουσία των υδρόφοβων υποκαταστατών 1,8-ναφθυριδίνης και 1-μέθυλ-κυτοσίνης συνεισφέρει στην μεγαλύτερη πρόσληψη των μονολειτουργικών αυτών συμπλόκων από τα κύτταρα LoVo, ενώ η μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης του συμπλόκου με την 1-μεθυλ-κυτοσίνη στο DNA αντανακλάται στην *in vitro* κυτταροτοξική δράση του<sup>31</sup>. Τέλος, σε σύγκριση με την ανάλογη ένωση *quinorlatin*, όπου στην θέση του υποκαταστάτη 1,8-ναφθυριδίνης υπάρχει η κινολίνη<sup>20</sup>, το σύμπλοκο (IV) βρέθηκε περισσότερο κυτταροτοξικό, επισημαίνοντας ότι η ενσωμάτωση ενός ετεροκυκλικού υποκαταστάτη με ένα επιπλέον άτομο αζώτου, ικανού να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου, ενισχύει την αντικαρκινική του δράση αναστέλλοντας αποτελεσματικότερα την RNA πολυμεράση<sup>31</sup>.



**Εικόνα 1.5:** Απεικόνιση των κατιονικών μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II) του τύπου  $[Pt(NH_3)_2(L)Cl]NO_3$ , όπου  $L =$  κινολίνη (αριστερά) και  $L = 1,8$ -ναφθυριδίνη (δεξιά)<sup>31</sup>.

#### 1.1.1.5. Σύμπλοκα με υποκατεστημένες κινολίνες

Η σύνθεση μεταλλικών συμπλόκων με βιολογικά ενεργούς υποκαταστάτες είναι μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων, καθώς η ένταξη τους στο κεντρικό μεταλλοϊόν μπορεί να μεταβάλει σημαντικά τις χημικές και φυσικές τους ιδιότητες. Στο πλαίσιο αυτό, ο Wang και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν δύο μονολειτουργικά σύμπλοκα λευκοχρύσου με υποκατεστημένα στην θέση οκτώ παράγωγα κινολίνης, τα οποία παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.7**<sup>32</sup>.



**Εικόνα 1.7:** Απεικόνιση των κατιονικών μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II) με 8-υποκατεστημένες κινολίνες<sup>32</sup>.

Η *in vitro* και *in vivo* αντικαρκινική δράση των συμπλόκων (V) και (VI), όπως και ο μηχανισμός δράσης τους, μελετήθηκε εκτεταμένα. Συγκεκριμένα, η κυτταροτοξικότητα τους αξιολογήθηκε έναντι μίας ομάδας καρκινικών κυτταρικών σειρών SKOV-3, CT-26, BeL-704 και MGC-803, με το σύμπλοκο (V), να είναι περισσότερο αποτελεσματικό στις περισσότερες από αυτές. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί η μειωμένη τοξικότητά του έναντι στα υγιή κύτταρα ανθρώπινου ήπατος, HL-7702, γεγονός που υποδεικνύει μια κάποια εκλεκτικότητα για τα καρκινικά κύτταρα. Σε σχέση με το *cisplatin*, το (V) εμφανίζει καλύτερη κυτταροτοξικότητα και μεγαλύτερη εκλεκτικότητα. Ακόμα, και η *in vivo* μελέτη του συμπλόκου (V) επιβεβαίωσε το ξεχωριστό φάσμα δράσης του, με την κυτταροτοξική του δράση να είναι μεγαλύτερη σε μοντέλα ποντικών Kunming (KM) με ετερογενές γενετικό υπόβαθρο, ενώ η ανεπιθύμητη τοξικότητά του σαφώς μικρότερη σε σχέση με το *cisplatin*<sup>32</sup>.

Αντικαρκινικές ενώσεις ικανές να προκαλέσουν τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων με πολλαπλούς τρόπους, όπως η απόπτωση αλλά και ο αυτοφαγικός θάνατος (αποικοδόμηση του κυττάρου με σκοπό την αφαίρεση δυσλειτουργικών συστατικών του), χαρακτηρίζονται ως πολλά υποσχόμενοι για την χημειοθεραπεία του καρκίνου. Αφού βρέθηκε πως το σύμπλοκο (V) είναι το πιο κυτταροτοξικό από αυτά που μελετήθηκαν, διερευνήθηκε ο μηχανισμός δράσης του σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα, A549. Συγκεκριμένα, η συσσώρευση του συμπλόκου αυτού εντοπίστηκε κυρίως στα μιτοχόνδρια και όχι στο πυρηνικό DNA, προκαλώντας την εξάντληση του ATP, την απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, τη σημαντική απελευθέρωση ROS και Ca<sup>2+</sup> και την αναστολή της δράσης του ενζύμου αναγωγή θειορεδοξίνης, TrxR. Τα παραπάνω πυροδότησαν μία απόκριση το στρες του ενδοπλασματικού



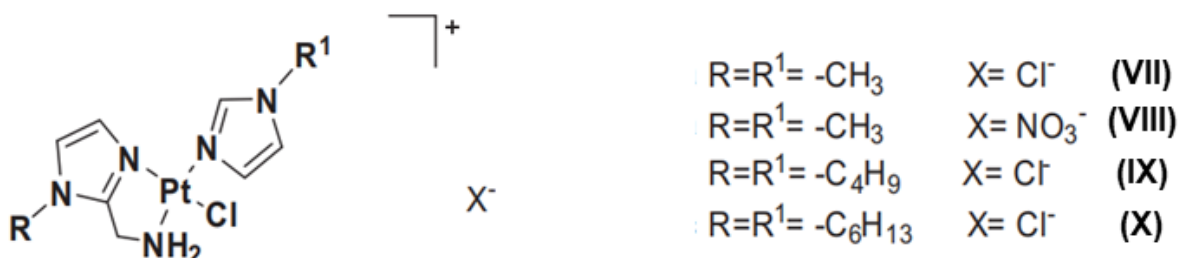
δικτύου (ER), με αποτέλεσμα την επαγωγή απόπτωσης, συναρτώμενη από την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Επιπλέον, το σύμπλοκο αυτό διέγειρε την αυτοφαγία των κυττάρων A549. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν τον διττό τρόπο δράσης του μονολειτουργικού αυτού συμπλόκου, ενισχύοντας τις αντικαρκινικές δυνατότητες των χημειοθεραπευτικών ενώσεων με βάση τον λευκόχρυσο<sup>32</sup>.

#### 1.1.1.6. Σύμπλοκα με υποκαταστάτες ημιδαζολίου

Μία νέα σειρά κατιονικών μονολειτουργικών ενώσεων λευκοχρύσου (II) που φέρουν ημιδαζολικούς υποκαταστάτες αναπτύχθηκε από την Rimoldi και τους συνεργάτες της. Τα σύμπλοκα αυτά με χημικό τύπο  $[Pt(N-N')N'Cl]X$  (όπου  $N-N' = N$ -αλκυλο-υποκατεστημένο αμινομεθυλιμιδαζόλιο,  $N' = N$ -άλκυλο-υποκατεστημένο ιμιδαζόλιου με την ίδια αλκυλομάδα του  $N-N'$ , και  $X =$  αντισταθμιστικό ιόν), παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.6**<sup>33</sup>. Μεταξύ αυτών των συμπλόκων (VII)–(X), η ένωση η οποία φέρει την έξυλ-ομάδα ( $-C_6H_{13}$ ) έδειξε ισχυρή κυτταροτοξική δράση στην ανθεκτική σε θεραπεία με *cisplatin*, κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MDA-MB-231, με τιμή  $IC_{50}$  ίση με 61,9  $\mu M$ . Η σημαντική κυτταροτοξική δράση του (X) επεκτάθηκε και στην κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου DLD-1 ( $IC_{50} = 57,4 \mu M$ ), όπως και στην κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF-7 ( $IC_{50} = 79.9 \mu M$ ), οι οποίες και οι δύο ανταποκρίνονται ελάχιστα στην θεραπεία με *cisplatin*<sup>33</sup>. Επιπλέον, αντικαρκινικές ιδιότητες του (X) διερευνήθηκαν *in vitro* έναντι τριών επιθετικών, μη θεραπεύσιμων ακόμη όγκων και συγκεκριμένα του κακοήθους μεσοθηλιώματος (NCI-H28), του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος (U87 MG) και του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος (CFPAC-1). Τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή και μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με το *cisplatin* έναντι τόσο του NCI-H28 (19,37  $\mu M$  έναντι 34,66  $\mu M$  για το *cisplatin*) όσο και του U87 MG (19,85  $\mu M$  έναντι 54,14  $\mu M$  για το *cisplatin*)<sup>34</sup>.

Μελέτη του μηχανισμού δράσης της πιο δραστηκής ένωσης, έδειξαν μία πρωτότυπη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά. Αναλυτικότερα, η κυτταρική πρόσληψη του συμπλόκου αυτού δεν έγινε με την συνεισφορά των κυτταρικών μεταφορέων CTR-1 (Copper Transporter I), ATP-7a και ATP7b (Copper Transporting ATPases) όπως στην περίπτωση του *cisplatin*. Επιπρόσθετα, το πυρηνικό DNA φαίνεται πως δεν αποτελεί στόχο του μονολειτουργικού αυτού συμπλόκου, απόδειξη του οποίου είναι η απουσία σημαντικής επαγωγής του αποπτωτικού παράγοντα p53 ακόμα και μετά από 24 ώρες επώασης με αυτό. Ο διαφορετικός μηχανισμός δράσης ανάμεσα στο

σύμπλοκο (X) και το *cisplatin* επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου, με την φάση G2/M να επηρεάζεται περισσότερο σε σχέση με την φάση S, υποδηλώνοντας έτσι την ενεργοποίηση μίας μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού ανεξάρτητης από την p53<sup>33</sup>.



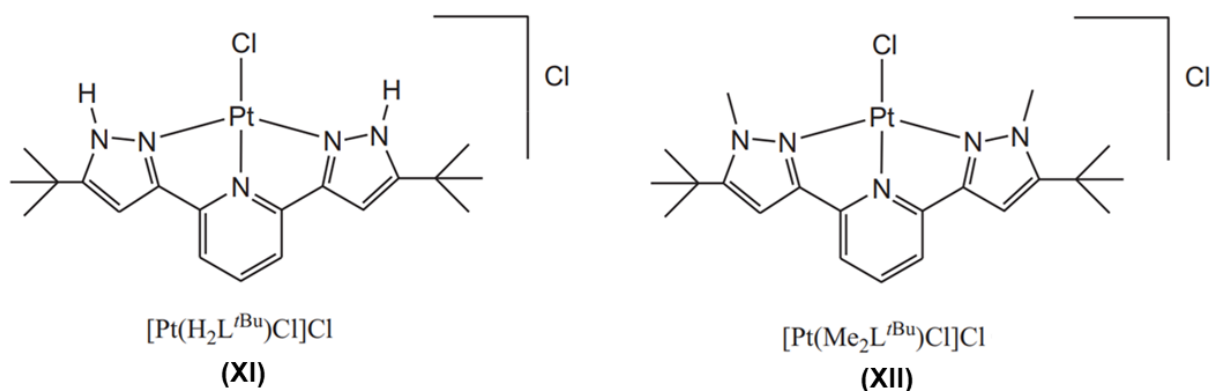
**Εικόνα 1.6:** Απεικόνιση των κατιονικών μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II) του τύπου [Pt(N-N')N'Cl]X<sup>33</sup>.

#### 1.1.1.7. Σύμπλοκα με τερπυριδίνες

Μελέτη του Lippard και των συνεργατών του αναφορικά με τον τρόπο αλληλεπίδρασης των μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II) με ενταγμένες τερπυριδίνες με το DNA<sup>35</sup>, έθεσε τις βάσεις για την εξερεύνηση αυτού του μοντέλου ενώσεων ως πιθανές χημειοθεραπευτικές ενώσεις. Τα κατιονικά αυτά σύμπλοκα περιγράφονται από τον χημικό τύπο {Pt(Yterpy)X}<sup>n+</sup> όπου το X αντιπροσωπεύει τον μοναδικό ευκίνητο υποκαταστάτη του λευκοχρύσου, το Y αναφέρεται σε υποκαταστάτες που βρίσκονται πάνω στην τερπυριδίνη και το n αποδίδεται στο φορτίο του συμπλόκου. Η χημική συμπεριφορά των συμπλόκων [Pt(Yterpy)X]<sup>+</sup> επηρεάζεται κυρίως από δύο εγγενείς ιδιότητες. Η πρώτη αφορά την δυνατότητα αντικατάστασης της καλώς αποχωρούσας ομάδας X από κάποιο πυρηνόφιλο, ενώ η δεύτερη αναφέρεται στην τάση του τερπυριδινικού δακτυλίου να «στοιβάζεται» με άλλα αρωματικά συστήματα. Παρά τις κοινές αυτές ιδιότητές τους, οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν ποικιλομορφία όσον αφορά το φορτίο, την υδατοδιαλυτότητα, όπως και την τάση τους να αντιδρούν τόσο στο εξωκυττάριο όσο και στο ενδοκυττάριο περιβάλλον τους. Ακόμη υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης των ιδιοτήτων τους τροποποιώντας τόσο τις υποκαταστάσεις (Y) της τερπυριδίνης, όσο και την ευκίνητη ομάδα X<sup>36</sup>.

Παρόλο που η πρότυπη ένωση [Pt(terpy)Cl]<sup>+</sup> έχει μικρότερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με το *cisplatin*, μία πρόσφατη εργασία απέδειξε όχι μόνο μία ικανοποιητική κυτταροτοξική δράση των νέων συμπλόκων που συντέθηκαν έναντι μίας ομάδας όγκων, αλλά και έναν μοναδικό μηχανισμό

δράσης ο οποίος οδηγεί τελικά στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Τα σύμπλοκα αυτά περιγράφονται από τους χημικούς τύπους  $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}})\text{Cl}]\text{Cl}$  (**XI**) και  $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{L}^{\text{tBu}})\text{Cl}]\text{Cl}$  (**XII**), όπου η ομάδα  $\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}}$  συμβολίζει την 2,6-δισ(5-(τριτ-βουτυλ)-1*H*-πυραζολ-3-υλ)πυριδίνη, ενώ η ομάδα  $\text{Me}_2\text{L}^{\text{tBu}}$  την 2,6-δισ(5-(τριτ-βουτυλ)-1-μεθυλ-1*H*-πυραζολ-3-υλ)πυριδίνη, και η δομή τους παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.8**<sup>37</sup>.



**Εικόνα 1.8:** Απεικόνιση των κατιονικών μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II) με υποκατεστημένες τερπυριδίνες<sup>37</sup>.

Μελέτη της αντίδρασης των συμπλόκων (**XI**) και (**XII**) προς την θειουρία (Tu), την L-μεθειονίνη (L-Met), την L-κυστεΐνη (L-Cys) και την 5'-μονοφωσφορική γουανοσίνη (5'-GMP), έδειξε πως το σύμπλοκο που περιέχει τον υποκαταστάτη  $\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}}$  είναι περισσότερο δραστικό. Η σειρά δραστηριότητας περιγράφεται από την σχέση  $\text{Tu} > \text{L-Cys} > \text{L-Met} > 5'\text{-GMP}$ . Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων με CT-DNA (Calf-Thymus DNA) και αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) μελετήθηκε με φασματοσκοπία UV-Vis και φθορισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να συνδεθούν στο DNA εμφανίζοντας υψηλές σταθερές δέσμευσης  $K_b$  της τάξης του  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . Επιπλέον, μελέτη της ικανότητας παρεμβολής των συμπλόκων σε σχέση με το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), αποκάλυψε πως τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να αντικαταστήσουν το ήδη συνδεδεμένο στο DNA, EtBr<sup>37</sup>.

Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του τραχήλου της μήτρας HeLa και του παγκρέατος PANC-1, συμφώνησαν με τις μελέτες του μηχανισμού και για τα δύο σύμπλοκα, με το (**XI**) να εμφανίζει καλύτερη αντικαρκινική δράση. Συνολικά, και τα δύο σύμπλοκα ασκούν μέτρια προς υψηλή εκλεκτική κυτταροτοξικότητα προς τους όγκους, η οποία

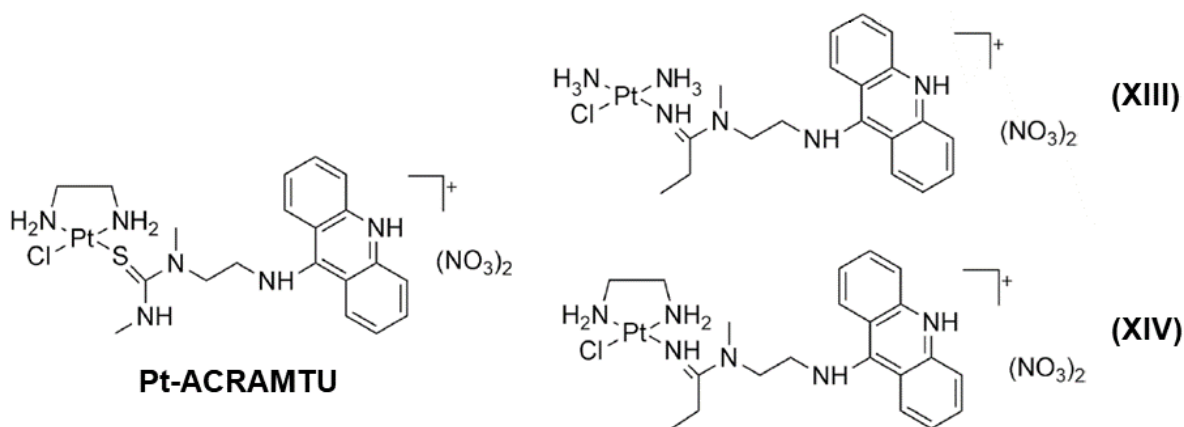
προκαλείται τόσο μέσω απόπτωσης και όσο και μέσω αυτοφαγίας. Τέλος, η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των ενώσεων αυτών επεσήμανε την διαφορά στην συσσώρευση των κυττάρων ανάλογα με την καρκινική σειρά που εξετάζεται. Συγκεκριμένα, επώαση της ένωσης (XI) στην κυτταρική σειρά HeLa οδήγησε σε μείωση των κυττάρων στην φάση S, ενώ στην PANC-1 στην φάση G2/M. Για το (XII), η συνολική μείωση του ποσοστού των καρκινικών κυττάρων ήταν ελάχιστη και χωρίς να επηρεάζεται κυρίως κάποια φάση και στις δύο υπό εξέταση κυτταρικές σειρές<sup>37</sup>.

#### 1.1.1.8. Σύμπλοκα με ακριδίνη

Η ευρέως αποδεκτή προσέγγιση που αφορά την διαχείριση της εγγενούς αντίστασης των όγκων στα κλινικά φάρμακα λευκοχρύσου, περιλαμβάνει το σχεδιασμό αντικαρκινικών ενώσεων που καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα με διαφορετικούς τρόπους από τις κλασικές διλειειτουργικές ενώσεις του. Στο πλαίσιο αυτό η ερευνητική ομάδα της Martins<sup>38</sup>, εκμεταλλεύτηκε τόσο τις ιδιότητες των συμπλόκων με λευκόχρυσο όσο και της ένωσης της ακριδίνης και ανέπτυξε το πρωτότυπο υβριδικό σύμπλοκο λευκοχρύσου-ακριδινυλθειουρίας, το οποίο περιγράφεται από τον χημικό τύπο  $[Pt(en)(ACRAMTU-S)Cl](NO_3)_2$  και συμβολίζεται ως "PT-ACRAMTU". Σε αντίθεση με το γνωστό κυτταροτοξικό φάρμακο *cisplatin*, η ένωση αυτή αλληλεπιδρά με το DNA μέσω ενός διπλού μηχανισμού ο οποίος περιλαμβάνει τόσο την μονολειειτουργική ένταξη του λευκοχρύσου στην γουανίνη (80%) και στην αδενίνη (20%), όσο και την παρεμβολή του τμήματος ακριδίνης μεταξύ των ζευγών βάσεων δίπλα στις πλατινωμένες θέσεις<sup>39</sup>. Αυτά τα προϊόντα προσθήκης προκαλούν δομικές μεταβολές στο DNA που δεν είναι οι ίδιες με εκείνες του *cisplatin*. Παρά την διφορτιακή φύση του, το σύμπλοκο αυτό δημιουργεί μονολειειτουργικά προϊόντα προσθήκης στο DNA, εμφανίζοντας ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι μιας σειράς συμπαγών όγκων *in vitro*, ιδιαίτερα στην κυτταρική σειρά του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC)<sup>40</sup>.

Ωστόσο, η παραπάνω ένωση δεν έδειξε αποτελέσματα στη αναστολή της ανάπτυξης του όγκου *in vivo*. Το γεγονός αυτό οδήγησε σε αρκετές μελέτες συσχέτισης δομής-δραστικότητας (SAR) με στόχο τη δημιουργία ενός ανάλογου συμπλόκου με κλινικά χρήσιμη αντικαρκινική δράση. Τελικά, δομικές τροποποιήσεις στην φύση της ομάδας που συνδέει την ακριδίνη με το σύμπλοκο όπως και στους υπόλοιπους υποκαταστάτες, οδήγησαν στον σχεδιασμό ενώσεων που ικανοποιούν την ανάγκη επιβράδυνσης της εξέλιξης του καρκίνου *in vivo*. Η τροποποίηση στην σφαίρα ένταξης

του λευκοχρύσου, προτάθηκε από τον Ma και τους συνεργάτες του, και αφορούσε την αντικατάσταση του ατόμου δότη, θείου της θειουρίας, από το άζωτο μία αμιδίνης, όπως και του βοηθητικού υποκαταστάτη αιθυλενοδιαμίνη από δύο ομάδες αμμωνίας. Τα σύμπλοκα αυτά που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.9**, περιγράφονται από τον χημικό τύπο  $[Pt(X)(LH)Cl](NO_3)_2$  όπου το X αντιστοιχεί στις *cis*- ομάδες αμμωνίας,  $NH_3$ , στο σύμπλοκο (**XIII**), και αιθυλενοδιαμίνης ή αλλιώς en, στο σύμπλοκο (**XIV**). Το LH αντιπροσωπεύει τον συζευγμένο με τον linker υποκαταστάτη της ακριδίνης, N-[2-(ακριδιν-9-υλαμινο)αιθυλ]-N-μεθυλπροπιονιμιδαμίδιο<sup>41</sup>.



**Εικόνα 1.9:** Απεικόνιση των κατιονικών μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II) με υποκαταστάτες ακριδίνης<sup>42</sup>.

Μελέτες του μηχανισμού δράσης που διαφοροποιεί τα ανάλογα αυτά υβριδικά μονολειτουργικά σύμπλοκα σε σχέση με το πρωτότυπο Pt-ACRAMTU, δείχνουν αύξηση της ταχύτητας δέσμευσης τους στο DNA, ενώ ταυτόχρονα διαφοροποιείται ο τρόπος με τον οποίον το κύτταρο επιδιορθώνει τη βλάβη που αυτά προκαλούν στο DNA. Αναλυτικότερα, η αντικατάσταση του θείου με το άζωτο της αμιδίνης, πιθανότατα επιταχύνει τις αντιδράσεις των νουκλεοβάσεων του DNA λόγω μικρότερων στερικών παρεμποδίσεων. Ακόμα, υπάρχει δυνατότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του ίμινο-υδρογόνου της αμιδίνης και των εξωκυκλικών ομάδων των βάσεων του DNA, όπως το O6 της γουανίνης<sup>43</sup>. Η διεργασία αυτή μπορεί, επίσης, να συμβάλει στην αύξηση του ρυθμού δημιουργίας μονολειτουργικών προϊόντων προσθήκης στο DNA για τα σύμπλοκα αυτά.

Τα παραπάνω δεδομένα έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη βιολογική δράση των συμπλόκων αυτών σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές στις οποίες δοκιμάστηκαν, όπως οι κυτταρικές σειρές NSCLC (NCI-H460, NCI-H522, NCI-H1435). Αυτές οι μη κλασικές ενώσεις είναι πολύ πιο ισχυροί από το *cisplatin*, με το (XIV) που φέρει τον υποκαταστάτη αιθυλενοδιαμίνη στην θέση των δύο αμμωνίων να εμφανίζει την μεγαλύτερη συγκριτικά κυτταροτοξική δράση στην κλίμακα των  $nM^{44}$ . Περαιτέρω αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης της ένωσης (XIV) επιδεικνύει ισχυρή αντικαρκινική δράση σε μοντέλο όγκου H460 NSCLC σε ποντίκια επιβραδύνοντας την ανάπτυξη του όγκου σε συγκέντρωση κοντά στη μέγιστη ανεκτή δόση (MTD). Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι σημαντικά χαμηλότερες συγκριτικά με αυτές που απαιτούνται για το *cisplatin* αλλά και το μονολειτουργικό σύμπλοκο *pyriplatin* όταν χρησιμοποιούνται σε *in vivo* δοκιμές<sup>15,40</sup>

Τέλος, αντικαρκινικές ενώσεις οι οποίες στοχεύουν το DNA αλλά δεν δημιουργούν σταυροδεσμούς (cross-links) με αυτό, όπως τα (XIII) και (XIV), μπορούν να αποφύγουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA σε αντίθεση με το *cisplatin*. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί υποδεικνύουν μια σύνδεση μεταξύ των υψηλών επιπέδων του ενζύμου NER (Nucleotide Excision Repair) στον NSCLC και της κακής ανταπόκρισης του σε φάρμακα λευκοχρύσου όπως το *cisplatin*. Σε αντίθεση με τους σταυροδεσμούς που προκαλεί το *cisplatin* οι οποίοι παραμορφώνουν σημαντικά τη δομή του DNA, ενώσεις (XIII) και (XIV) σχηματίζουν προϊόντα προσθήκης που ξετυλίγουν το DNA τοπικά χωρίς να προκαλούν σοβαρή κάμψη της διπλής έλικας. Αυτή η μικρή δομική μεταβολή που προκαλούν μπορεί να τα καταστήσει λιγότερο ευαίσθητη την βλάβη του DNA σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης με τη μεσολάβηση NER, εξηγώντας έτσι την υψηλότερη αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία του NSCLC σε σχέση με τα υπάρχοντα διλειτουργικά φάρμακα του Pt(II)<sup>41,44</sup>.

#### 1.1.1.9. Σύμπλοκα με μεικτούς δραστικούς υποκαταστάτες

Ορμώμενοι από την προηγούμενη ερευνητική τους εργασία και την ανάπτυξη συμπλόκων με ημιδαζολικούς υποκαταστάτες<sup>33</sup>, η Rimoldi και η ερευνητική της ομάδα συνδύασαν τόσο τις ιδιότητες του ημιδαζολίου με τις ιδιότητες των 8-υποκατεστημένων κινολινών που εντάσσονται χημικά στον λευκόχρυσο, σχηματίζοντας ένα νέο μονολειτουργικό σύμπλοκο το (XV), όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.10**<sup>45</sup>.

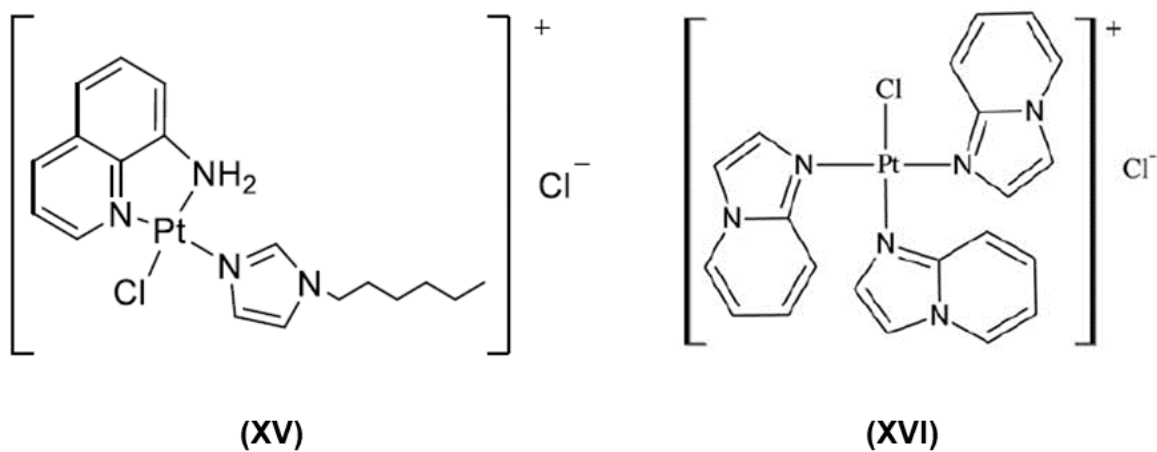
Η κυτταροτοξικότητα του συμπλόκου αυτού μελετήθηκε έναντι τεσσάρων ανθρώπινων καρκινικών σειρών, ενός μεσοθηλιώματος, και τριών κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος. Τα

αποτελέσματα συγκρίθηκαν με την αντικαρκινική δράση του *cisplatin*. Παρόλο που το (XV) επέδειξε χαμηλότερη δράση κατά των κυτταρικών σειρών του μεσοθηλιώματος σε σύγκριση με το *cisplatin*, παρατηρήθηκε ισχυρότερη δράση κατά των όγκων του γλοιοβλαστώματος. Συγκεκριμένα, οι τιμές IC<sub>50</sub> για το (XV) υπολογίστηκαν με τιμή ίση με  $3.68 \pm 0.69 \mu\text{M}$  για την κυτταρική σειρά U87-MG,  $11.53 \pm 0.16 \mu\text{M}$  για την U373-MG και  $8.05 \pm 0.23 \mu\text{M}$  για την U148-MG, σε σύγκριση με τις τιμές για το *cisplatin*  $7.27 \pm 1.80 \mu\text{M}$ ,  $22.69 \pm 0.05 \mu\text{M}$  και  $32.1 \pm 4.44 \mu\text{M}$ , αντίστοιχα. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου αποκάλυψε ότι επώαση των τελευταίων με το σύμπλοκο αυτό, αύξησε σημαντικά τα αποπτωτικά κύτταρα στη φάση G0/G1, ενώ παράλληλα μείωσε την δραστηριότητα των παραγόντων p53 και Bcl-2 (μίας πρωτεΐνης που λειτουργεί ως αναστολέας της απόπτωσης)<sup>45</sup>.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν μελέτες NMR που αφορούν την αλληλεπίδραση του συμπλόκου με τα GSH και Mets-7 (ένα οκταπεπτίδιο που μιμείται τον μεταφορέα CTR1), τα οποία επηρεάζουν τόσο την μεταφορά όσο και την βιοδιαθεσιμότητα του συμπλόκου στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Η ανάλυση των φασμάτων αυτών έδειξε πως το σύμπλοκο (XV) είναι ικανό να αλληλεπιδράσει μαζί τους και ειδικά στην περίπτωση του Mets-7, να ενταχθεί σε αυτό. Το (XV) αλληλεπιδρά επίσης και με την 9-αιθυλγουανίνη, 9-EtG, χωρίς όμως το DNA να είναι ο κύριος στόχος του, υποδηλώνοντας έναν νέο μηχανισμό δράσης διαφορετικό από αυτόν του *cisplatin*<sup>45</sup>.

Άλλη μία ένωση, η οποία εντάσσεται στην κατηγορία των μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II), συντέθηκε από την ερευνητική ομάδα του Arzuman. Συγκεκριμένα, η ένωση (XVI) σχεδιάστηκε για να δρα στον καρκίνο των ωοθηκών, διαθέτοντας τους ογκώδεις υποκαταστάτες ιμιδαζο(1,2-α)πυριδίνης που διευκολύνουν την ταχεία πρόσληψη της ένωσης αυτής μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Η αυξημένη αυτή βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να συμβάλλει στην αποτελεσματική δράση έναντι ανθεκτικών στο *cisplatin* κυτταρικών σειρών καρκίνου των ωοθηκών (A2780 και A2780<sup>cisR</sup>). Κυτταροτοξικές μελέτες *in vitro*, έδειξαν ότι το σύμπλοκο (XVI) είναι περισσότερο αποτελεσματικό από το *cisplatin*, έναντι των ανθεκτικών αυτών όγκων, υποδηλώνοντας μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών με φάρμακα που έχουν ως βάση τον λευκόχρυσο. Επιπλέον, το σύμπλοκο αυτό εμφάνισε τη μέγιστη συσσώρευση λευκοχρύσου στο κύτταρο περίπου στις τέσσερις ώρες, ενώ μετά από είκοσι τέσσερις ώρες το ποσοστό αυτό είχε μειωθεί, υποδηλώνοντας την ύπαρξη διεργασίας εκροής του συμπλόκου με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο, το μονολειτουργικό αυτό σύμπλοκο επέδειξε

σημαντικά ποσοστά δέσμευσης στο DNA στην ανθεκτική κυτταρική σειρά A2780<sup>cisR</sup> ακόμα και μετά από είκοσι τέσσερις ώρες, κάτι το οποίο συνάδει με την αυξημένη κυτταροτοξικότητα του σε αυτά τα μοντέλα όγκων<sup>46</sup>.



**Εικόνα 1.10:** Απεικόνιση των κατιονικών μονολειτουργικών συμπλόκων λευκοχρύσου (II) με μεικτούς δραστικούς υποκαταστάτες<sup>45,46</sup>.





## **2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 2.1. Αντιδραστήρια

Το τετραχλωρολευκοχρυσικό (II) κάλιο  $\{K_2[PtCl_4]\}$  (99,9 %), η αιθυλενοδιαμίνη (en) ( $\geq 99$  %), η πυριδίνη (py) ( $\geq 99,5$  %), η 2-μεθυλοπυριδίνη (2-merpy) ( $\geq 98$  %), η 2-φαινυλοπυριδίνη (2-phpy) ( $\geq 98$  %), η 9-μεθυλογουανίνη (9-MeG) και η γουανοσίνη (guo) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Alfa Aesar. Οι διαλύτες μεθανόλη, αιθανόλη, διαιθυλαιθέρας, διμεθυλοφορμαμίδιο, ακετονιτρίλιο, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας (Fluka) και δεν χρειάστηκαν περαιτέρω καθαρισμό. Τέλος, οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη φασμάτων NMR,  $D_2O$ , ήταν καθαρότητας  $> 99,8$  % και προμηθεύτηκαν από την εταιρία Deutero.

## 2.2. Φασματοσκοπικές και Αναλυτικές Μέθοδοι

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν κυρίως οι τεχνικές της φασματοσκοπίας NMR (Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός) και της φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης, οι οποίες ήταν απαραίτητες για την ανάλυση και την ταυτοποίηση των μοριακών δομών των συμπλόκων και των αλληλεπιδράσεων τους με την 9-μεθυλογουανίνη και την γουανοσίνη. Επιπλέον, μικροόργανα και συσκευές χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών όπως, ζυγός Mettler AC 100, συσκευή υπερήχων Sultan 300-ProSonic, περιστροφικός εξατμιστήρας Aiset Ne-5000, αντλία υψηλού κενού AEG mini, μαγνητικός αναδευτήρας CAT M6.1 κ.λπ. Τέλος, οι μεθοδολογίες και οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων αναλύονται λεπτομερώς στις ενότητες που ακολουθούν.

### 2.2.1. Φασματοσκοπία NMR

Οι μετρήσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας όργανα Bruker Avance 250, 400 και 500 NEO, με συχνότητες συντονισμού πρωτονίων 250.13, 400.13 και 500.13 MHz, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκε η λήψη των φασμάτων ήταν σταθερή στους 298K, ενώ ακόμα πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων και στους 310K. Τα ληφθέντα φάσματα επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό TopSpin 3.6.5 (Bruker Analytik GmbH) και MestreNova 14.1.1. Τα δισδιάστατα φάσματα COSY, NOESY και HSQC καταγράφηκαν ακολουθώντας τις τυπικές διαδικασίες των παλμοσειρών της Bruker.

### 2.2.2. Φασματοσκοπία μάζας

Τα φάσματα μάζας λήφθηκαν με τη χρήση φασματόμετρου υψηλής ευκρίνειας στο σύστημα Thermo Scientific και συγκεκριμένα του οργάνου LTQ Orbitrap XL™, χρησιμοποιώντας την τεχνική Electrospray Ionization (ESI). Τα δείγματα παρασκευάστηκαν και μετρήθηκαν ως αραιά υδατικά διαλύματα (HR-ESI-MS).

### 2.2.3. Προσδιορισμός σταθεράς ισορροπίας ( $K_{eq}$ )

Οι σταθερές ισορροπίας ( $K_{eq}$ ) για τις αντιδράσεις υδρόλυσης των συμπλόκων  $[Pt(en)(py)Cl]NO_3$  (**1**) και  $[Pt(en)(2\text{-merpy})Cl]NO_3$  (**2**) προσδιορίστηκαν με παρακολούθηση των φασμάτων  $^1H$  NMR στους 298K πρόσφατα παρασκευασμένων διαλυμάτων τους με αρχικές συγκεντρώσεις ( $C_i$ ) 3.2 mM και 2.9 mM αντίστοιχα. Τα κλάσματα ισορροπίας ( $F_{eq}$ ) των  $[1-H_2O]$  και  $[2-H_2O]$  υπολογίστηκαν, αφού οι αντιδράσεις υδρόλυσης έφτασαν σε ισορροπία, ολοκληρώνοντας επιλεκτικά τα σήματα  $^1H$  NMR των υδρολυμένων προϊόντων ως προς τα αντίστοιχα σήματα των αρχικών ενώσεων. Η αναλογία ολοκλήρωσης των υδρολυμένων ειδών ( $r_{eq}$ ) ως προς τα αρχικά δίνεται από την εξίσωση:

$$F_{eq} = r_{eq}/(1+r_{eq}) \quad (1)$$

Οι σταθερές ισορροπίας για την αντίδραση υδρόλυσης των (**1**) και (**2**) στους 298K υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$K_{eq} = [F_{eq}C_i]^2 / [1-F_{eq}]C_i \quad (2)$$

### 2.2.4. Προσδιορισμός σταθεράς υδρόλυσης ( $k$ )

Οι αντιδράσεις υδρόλυσης των συμπλόκων (**1**) και (**2**) μελετήθηκαν με φασματοσκοπία  $^1H$  NMR σε διαλύτη  $D_2O$  σε σταθερή θερμοκρασία 298K. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των ενώσεων ήταν 3.2 mM και 2.9 mM αντίστοιχα. Η ποσοτικοποίηση των υδρολυμένων προϊόντων  $[1-D_2O]$  και  $[2-D_2O]$  προέκυψε χρησιμοποιώντας την εξίσωση (1) για κλάσματα ( $F_t$ ) σε συγκεκριμένο χρόνο  $t$  (sec). Οι γραφικές παραστάσεις των κλασμάτων των υδρολυμένων προϊόντων ( $F_t$ ) ως προς τον χρόνο προσομοιάστηκαν με βάση την εξίσωση κινητικής ψευδο-πρώτης τάξης (3), για να προσδιοριστούν, τελικά, οι σταθερές ταχύτητας  $k_{(1)}$  και  $k_{(2)}$ .

$$A = A_1 - A_2(e^{-kt}) \quad (3)$$

Οι σταθερές  $A_1$  και  $A_2$  σχετίζονται με την αρχική συγκέντρωση και τη συγκέντρωση ισορροπίας του συμπλόκου, αντίστοιχα.

### 2.2.5. Ανάλυση διαμόρφωσης σακχάρου

Η επίδραση της ένταξης των συμπλόκων (1) και (2) στην γουανοσίνη, όσον αφορά την διαμόρφωση του σακχάρου της, μελετήθηκε εφαρμόζοντας γνωστές μεθόδους φασματοσκοπίας  $^1\text{H NMR}$  σε  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K. Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της εκάστοτε γεωμετρίας Στα σύμπλοκα [1-guo], [2-guo]A και [2-guo]B περιγράφονται αναλυτικά στην Ενότητα 3.4.

## 2.3. Κυτταροτοξικά πειράματα

Τα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα A549 υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των συμπλοκών (1), (2) και (3) σε περίοδο 48 ωρών. Μετά από αυτή την επώαση, τα κύτταρα χρωματίστηκαν με κρυσταλλική ιώδη χρωστική για να διευκολυνθεί η οπτικοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης. Το Tecan Plate Reader Infinite 200M Pro, μαζί με το εξειδικευμένο λογισμικό του, χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων και την αξιολόγηση των κυτταροτοξικών επιδράσεων που ασκούνται από τα σύμπλοκα. Για τον προσδιορισμό των τιμών  $\text{IC}_{50}$  των ενώσεων, συμπεριλαμβανομένης της ένωσης αναφοράς *cisplatin*, τα δεδομένα αναλύθηκαν προσαρμόζοντας τις καμπύλες συγκέντρωσης της ένωσης-αναστολέα έναντι της απόκρισης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism στην έκδοση 9.5.1. Αυτή η μέθοδος επέτρεψε τον ακριβή υπολογισμό των τιμών  $\text{IC}_{50}$ , υποδεικνύοντας τη συγκέντρωση στην οποία κάθε ένωση ανέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη κατά 50%, παρέχοντας έτσι κρίσιμες γνώσεις σχετικά με τις δυνατότητές τους ως θεραπευτικοί παράγοντες. Οι παραπάνω κυτταροτοξικές δοκιμές επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

## 2.4. Σύνθεσις συμπλόκων

### 2.4.1. Σύνθεση του συμπλόκου: Διγλωροαιθυλενοδιάμινο λευκόχρυσος (II) – $\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2$

Η σύνθεση του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την βιβλιογραφία με μικρές τροποποιήσεις για την αύξηση της απόδοσης<sup>47,48</sup>.

Σε φιαλίδιο με πάμα των 10 mL, προστίθενται 200 mg (0,48 mmol) κρυσταλλικού  $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$  τα οποία διαλύονται σε 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Στην συνέχεια, στο υδατικό διάλυμα προστίθενται 32  $\mu\text{L}$

αιθυλενοδιαμίνης (1 eq.) και η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση για 6 h. Παρατηρείται ο σχηματισμός κίτρινου ίζηματος, το οποίο λαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση, εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3 × 1 mL) και ξηραίνεται υπό κενό. Απόδοση: 88%

#### **2.4.2. Σύνθεση του συμπλόκου: Νιτρικός χλωροαιθυλενοδιαμινοπυριδίνη λευκόχρυσος (II) – [Pt(en)(pyridine)Cl](NO<sub>3</sub>) – (1)NO<sub>3</sub>**

Σε φιαλίδιο με πάμα των 10 mL, εισάγονται 40 mg (0,12 mmol) Pt(en)Cl<sub>2</sub>, τα οποία διαλύονται υπό ανάδευση σε 2,5 ml διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Στο διάλυμα που προκύπτει, προστίθενται 20 mg (0,11 mmol) AgNO<sub>3</sub> (0,95 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση overnight στο σκοτάδι. Μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου, το γαλακτόχρουν διάλυμα φυγοκεντρείται και το ίζημα του AgCl απορρίπτεται. Το διαυγές διάλυμα μεταφέρεται στην συνέχεια σε νέο φιαλίδιο και προστίθενται 12 μL (0,15 mmol) του υποκαταστάτη πυριδίνη (1,2 eq), και η αντίδραση αφήνεται overnight υπό ανάδευση με θέρμανση στους 55 °C. Έπειτα, το διάλυμα της αντίδρασης μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη, όπου απομακρύνεται ο διαλύτης σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό, μέχρι ξηρού. Αμέσως μετά, προστίθενται 2 mL μεθανόλης (MeOH) και το αδιάλυτο στερεό απομακρύνεται με φυγοκέντρηση. Στο υπερκείμενο διάλυμα εισάγονται 20 mL διαιθυλαιθέρα και μετά από ισχυρή ανάδευση, το λευκό στερεό που καθιζάνει συλλέγεται με φυγοκέντρηση, εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα (2 × 1 mL) και ξηραίνεται στον αέρα. Απόδοση: 55%

#### **2.4.3. Σύνθεση του συμπλόκου: Νιτρικός χλωροαιθυλενοδιάμινο(2-μεθυλοπυριδίνη) λευκόχρυσος (II) – [Pt(en)(2-methylpyridine)Cl](NO<sub>3</sub>) – (2)NO<sub>3</sub>**

Σε φιαλίδιο με πάμα των 10 mL, εισάγονται 50 mg (0,15 mmol) Pt(en)Cl<sub>2</sub>, τα οποία διαλύονται υπό ανάδευση σε 3 ml διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Στο διάλυμα που προκύπτει, προστίθενται 24 mg (0,14 mmol) AgNO<sub>3</sub> (0,95 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση overnight στο σκοτάδι. Μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου, το γαλακτόχρουν διάλυμα που προκύπτει φυγοκεντρείται και το ίζημα AgCl απορρίπτεται. Στην συνέχεια το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο και προστίθενται 20 μL (0,20 mmol) 2-μεθυλοπυριδίνης (1,3 eq), και η αντίδραση αφήνεται overnight υπό ανάδευση με θέρμανση στους 55 °C. Έπειτα, το διάλυμα της αντίδρασης μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη, όπου και απομακρύνεται ο διαλύτης σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό, μέχρι ξηρού. Αμέσως μετά, προστίθενται 2 mL μεθανόλης (MeOH) στην ίδια σφαιρική φιάλη και το αδιάλυτο στερεό απομακρύνεται με φυγοκέντρηση. Στο υπερκείμενο διάλυμα εισάγονται 20 mL διαιθυλαιθέρα και μετά από ισχυρή ανάδευση, καθιζάνει

κίτρινο-καφέ στερεό το οποίο συλλέγεται με φυγοκέντρηση, εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα ( $2 \times 1$  mL) και ξηραίνεται στον αέρα. Απόδοση: 80%

#### **2.4.4. Σύνθεση του συμπλόκου: Χλωριούχος χλωροαιθυλενοδιάμινο(2-φαινυλοπυριδίνη) λευκόχρυσος (II) – [Pt(en)(2-phenylpyridine)Cl]Cl – (3)Cl**

Σε φιαλίδιο με πόμα των 10 mL, εισάγονται 45 mg (0,14 mmol) Pt(en)Cl<sub>2</sub>, τα οποία διαλύονται υπό ανάδευση σε 3 mL διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Στο διάλυμα που προκύπτει, προστίθενται 22 mg (0,13 mmol) AgNO<sub>3</sub> (0,95 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση overnight στο σκοτάδι. Μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου, το γαλακτόχρουν διάλυμα φυγοκεντρείται και το ίζημα AgCl απορρίπτεται. Στην συνέχεια το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο, προστίθενται 20 mL (0,14 mmol) του υποκαταστάτη 2-φαινυλοπυριδίνη (1,1 eq), και η αντίδραση αφήνεται overnight υπό ανάδευση με θέρμανση στους 55 °C. Έπειτα, το διάλυμα της αντίδρασης μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη, όπου και απομακρύνεται ο διαλύτης σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό μέχρι ξηρού. Αμέσως μετά, προστίθενται 2 mL μεθανόλης στην σφαιρική φιάλη και το αδιάλυτο στερεό απομακρύνεται με φυγοκέντρηση. Στο υπερκείμενο διάλυμα εισάγονται 20 mL διαιθυλαιθέρα και μετά από ισχυρή ανάδευση, παρατηρείται ο σχηματισμός κίτρινου ιζήματος το οποίο συλλέγεται με φυγοκέντρηση, εκπλένεται με ( $2 \times 1$  mL) διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται στον αέρα. Το στερεό που προκύπτει υποβάλλεται σε περαιτέρω καθαρισμό με την χρήση χρωματογραφίας στήλης σε ένα μίγμα διαλυτών 1:1 μεθανόλη : ακετονιτρίλιο (MeOH:MeCN) κορεσμένο με NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>. Το έγχρωμο κλάσμα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη όπου και εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα έως όγκου περίπου 1 mL. Στην ποσότητα αυτή, προστίθεται 25 ml ενός μίγματος (4:1, v/v) διαιθυλαιθέρα:ακετόνης (D. Ether:Acetone), με αποτέλεσμα την καταβύθιση του συμπλόκου με (3)[PF<sub>6</sub>].

Ο σχηματισμός του αντιστοίχου άλατος (3)Cl προκύπτει από την διάλυση του (3)[PF<sub>6</sub>] σε 500 μL ξηρής ακετόνης και την προσθήκη 500 μL κορεσμένου ακετονικού διαλύματος LiCl, σύμφωνα με την βιβλιογραφία<sup>49</sup>. Το υπόλευκο ίζημα που σχηματίζεται, συλλέγεται με φυγοκέντρηση, εκπλένεται με ξηρή ακετόνη ( $2 \times 1$  mL) και ξηραίνεται υπό κενό πάνω από CaCl<sub>2</sub>. Απόδοση: 26%





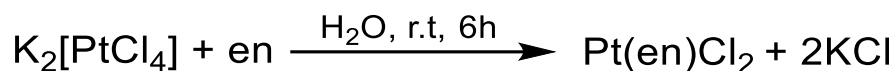
### **3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



### 3.1. Σύνθεση των συμπλόκων

#### 3.1.1. Σύνθεση του Pt(en)Cl<sub>2</sub>

Το σύμπλοκο Pt(en)Cl<sub>2</sub> συντέθηκε σε ένα στάδιο σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές μεθόδους<sup>47,48</sup>. Συγκεκριμένα, σε μια στοιχειομετρική αναλογία, ένα γραμμομοριακό ισοδύναμο αιθυλενοδιαμίνης (en) υποβλήθηκε σε αντίδραση με ένα υδατικό διάλυμα τετραχλωρολευκοχρυσικού καλίου (II) {K<sub>2</sub>[PtCl<sub>4</sub>]}, δίνοντας το σύμπλοκο Pt(en)Cl<sub>2</sub>. Το υδατικό διάλυμα ευνοεί την αντικατάσταση του χλωρίου γύρω από τον λευκόχρυσο με μόρια διαλύτη, ενώ το ελαφρώς βασικό περιβάλλον, εξαιτίας των αμινομάδων της en, ευνοεί την ένταξη της αμινομάδας της. Στη συνέχεια, λόγω του σχηματισμού σταθερού πενταμελούς χηλικού δακτυλίου με την άλλη αμινομάδα της en, δημιουργείται το σύμπλοκο Pt(en)Cl<sub>2</sub>, το οποίο επειδή δεν έχει φορτίο καταβυθίζεται ως ίζημα στο νερό. Δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα η en να δρα ως γεφυρωτικός υποκαταστάτη συνδέοντας δύο κέντρα λευκοχρύσου, εξαιτίας της θερμοδυναμικής σταθερότητας του χηλικού δακτυλίου που μπορεί να σχηματίζει. Η απεικόνιση της συνθετικής πορείας φαίνεται στην **Εικόνα 3.1**.



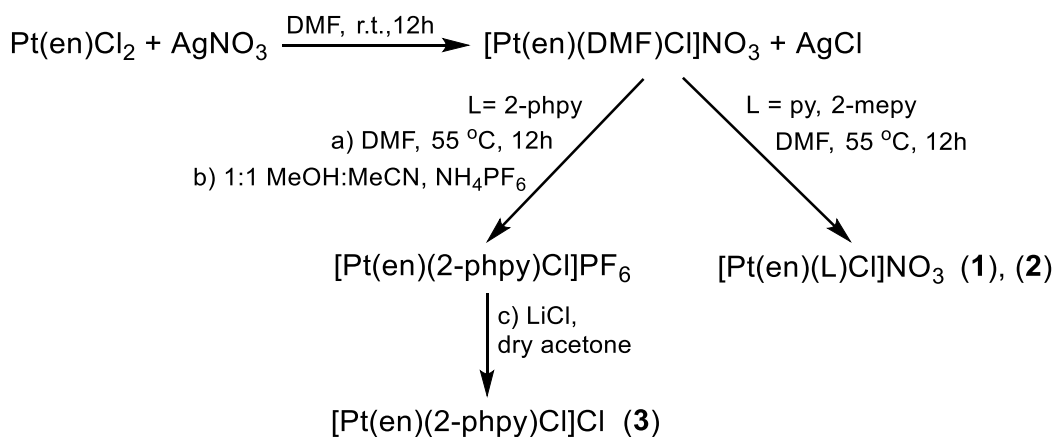
*Εικόνα 3.1: Απεικόνιση της αντίδραση σύνθεσης του Pt(en)Cl<sub>2</sub>.*

#### 3.1.2. Σύνθεση των συμπλόκων (1), (2) και (3)

Τα σύμπλοκα του τύπου [Pt(en)(L)Cl]NO<sub>3</sub>, όπου en = αιθυλενοδιαμίνη και L = πυριδίνη (1) και 2-μεθυλοπυριδίνη (2), συντέθηκαν σε δύο στάδια όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.2**. Στο πρώτο βήμα, το Pt(en)Cl<sub>2</sub> αντιδρά με ένα ισοδύναμο νιτρικού αργύρου (AgNO<sub>3</sub>) για την απομάκρυνση του ενός ενταγμένου χλωρίου. Η συγκεκριμένη αντίδραση λαμβάνει χώρα στο σκοτάδι για την προστασία από την αναγωγή του Ag(I) στον AgCl, σε Ag(0) και κατά συνέπεια τη διασπορά στο διάλυμα νανοσωματιδίων μεταλλικού Ag που είναι δύσκολο να απομακρυνθούν. Σε διαλύτη DMF η αντίδραση αυτή απομακρύνει σχεδόν ποσοτικά μόνο το ένα χλώριο από τον λευκόχρυσο ενώ το άλλο παραμένει ενταγμένο. Στο δεύτερο στάδιο, μετά την απομάκρυνση του AgCl, το διάλυμα περιέχει το ενδιάμεσο προϊόν [Pt(en)(DMF)Cl]NO<sub>3</sub> το οποίο δεν απομονώνεται. Στην συνέχεια, προστίθεται ο L σε μια μικρή περίσσεια (1,2 eq.), αντικαθιστώντας τον διαλύτη DMF με θέρμανση στους 55 °C. Είναι σημαντικό η θερμοκρασία να μην υπερβαίνει τους 55°C για να αποτραπεί ο

σηματισμός παραπροϊόντων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με δύο υποκαταστάτες πυριδίνης. Και τα δύο νιτρικά άλατα των συμπλόκων (1)NO<sub>3</sub> και (2)NO<sub>3</sub>, μαζί με το αρχικό σύμπλοκο Pt(en)Cl<sub>2</sub>, είναι διαλυτά σε διαλύτη DMF. Στη μεθανόλη, το αρχικό σύμπλοκο και τα πιθανά παραπροϊόντα παραμένουν αδιάλυτα και έτσι απομακρύνονται, καθώς μόνο τα (1)NO<sub>3</sub> και (2)NO<sub>3</sub> είναι ευδιάλυτα. Η καταβύθιση των νιτρικών αλάτων των συμπλόκων πραγματοποιείται με διαιθυλαιθέρα. Τέλος, τα σύμπλοκα (1)NO<sub>3</sub> και (2)NO<sub>3</sub> είναι διαλυτά στο νερό, όπως αναμένεται για τα περισσότερα νιτρικά άλατα, γεγονός που επιτρέπει τον χαρακτηρισμό τους χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία NMR σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, τη μελέτη των αντιδράσεων υδρόλυσης τους και τις αντιδράσεις τους με γουανοσίνη.

Το σύμπλοκο (3) το οποίο περιλαμβάνει τον υποκαταστάτη L = 2-φαινυλοπυριδίνη ακολουθεί την ίδια συνθετική πορεία δύο σταδίων με τα προαναφερθέντα σύμπλοκα (1) και (2), όμως απαιτούνται επιπλέον βήματα καθαρισμού έτσι ώστε να ληφθεί στην τελική του μορφή (**Εικόνα 3.2**). Αναλυτικότερα, η χρήση ενός δυαδικού συστήματος διαλυτών μεθανόλης:ακετονιτριλίου σε αναλογία 1:1, μέτριας πολικότητας, διευκολύνει τον διαχωρισμό των παραπροϊόντων από το (3). Επίσης, η χρήση του άλατος NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> στον διαλύτη έκλουσης βελτιώνει τον διαχωρισμό στην χρωματογραφική στήλη, όπως και την διαλυτότητα του (3)PF<sub>6</sub> σε οργανικούς διαλύτες. Η μετατροπή του (3)PF<sub>6</sub> στο αντίστοιχο (3)Cl γίνεται μετά από την επεξεργασία του πρώτου με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου λιθίου LiCl σε ξηρή ακετόνη. Η ακετόνη θα πρέπει να είναι ξηρή ώστε να μην διαλυθεί ποσότητα του τελικού συμπλόκου, το οποίο είναι ευδιάλυτο στο νερό. Η διαλυτότητα του (3)Cl ή του (3)NO<sub>3</sub> μας επιτρέπει την μελέτη της υδρόλυσής του με φασματοσκοπία NMR σε D<sub>2</sub>O.



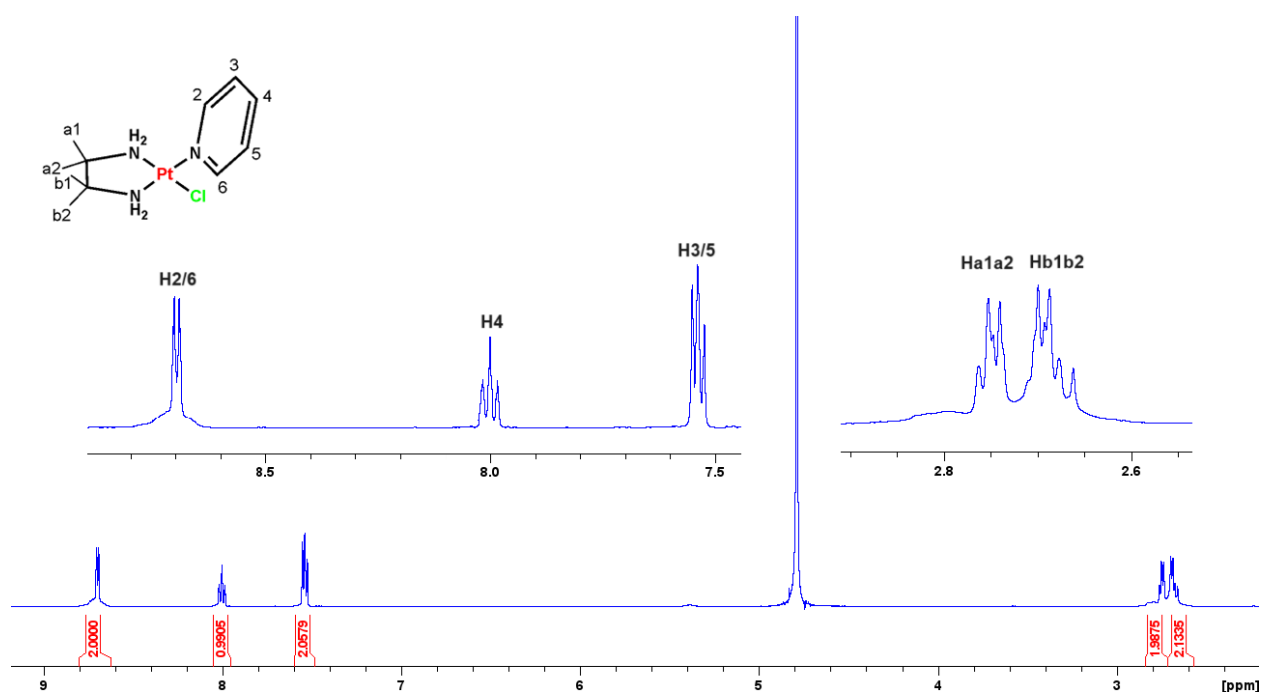
**Εικόνα 3.2:** Απεικόνιση της συνθετικής πορείας των συμπλόκων (1), (2) και (3).

## 3.2. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων

### 3.2.1. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων (1) – (3) με φασματοσκοπία $^1\text{H}$ NMR

#### 3.2.1.1. Απόδοση των σημάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου (1)

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του  $[\text{Pt}(\text{en})(\text{pyridine})\text{Cl}]\text{NO}_3$  (1) σε  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K (Εικόνα 3.3) διακρίνονται πέντε διαφορετικά σήματα συντονισμού, τα οποία αποδίδονται στα συνολικά εννέα μη ανταλλάξιμα πρωτόνια του συμπλόκου. Η μείωση των σημάτων οφείλεται στην συμμετρία κάποιων πρωτονίων μεταξύ τους, ενώ τα πρωτόνια των αμινομάδων της en έχουν ανταλλαχθεί με δευτέριο και δεν εμφανίζονται στο φάσμα.



Εικόνα 3.3: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (1) σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K.

Αναλυτικότερα, για τα συνολικά πέντε αρωματικά πρωτόνια της πυριδίνης, η διπλή κορυφή στα 8.70 ppm με σχετική ολοκλήρωση 2H και  $^3J_{\text{H-H}} = 6.2$  Hz, αποδίδεται στα ισοδύναμα πρωτόνια H2 και H6. Η μετατόπιση των πρωτονίων αυτών σε υψηλότερα ppm σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη πυριδίνη κατά +0.56 ppm, υποδεικνύει την ένταξη της πυριδίνης στον λευκόχρυσο (II) μέσω του αζώτου. Ενδεικτικό της ένταξης είναι επίσης οι κορυφές «δορυφόροι» από την  $^3J$  σύζευξη των σπιν των πρωτονίων H2/6 με το ισότοπο του  $^{195}\text{Pt}$  (33% σε φυσική αφθονία), με τιμή  $^3J_{\text{Pt-H2/6}} = 36$  Hz<sup>50</sup>. Στην συνέχεια, η τριπλή κορυφή στα 8.00 ppm με ολοκλήρωση 1H, αποδίδεται στο πρωτόνιο H4 το οποίο έχει εκατέρωθεν δυο γειτονικά πρωτόνια. Το τελευταίο σήμα της

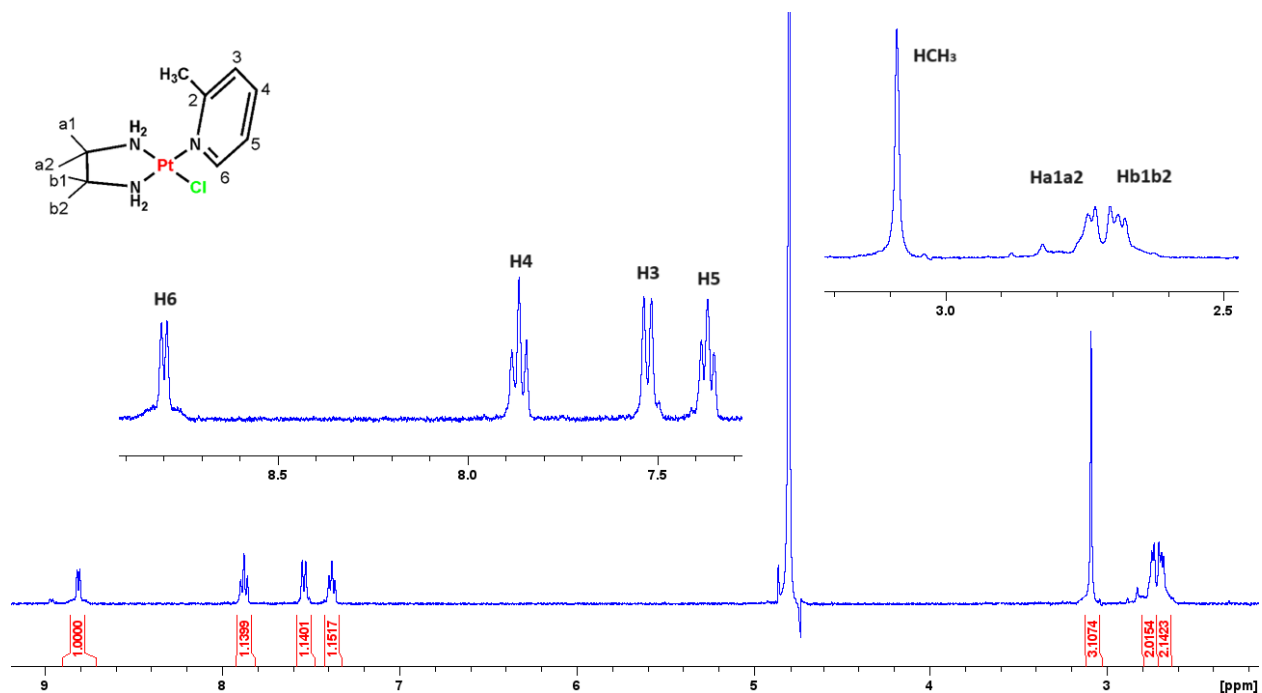
αρωματικής περιοχής στα 7.54 ppm έχει ολοκλήρωση 2H και αποδίδεται στα ισοδύναμα πρωτόνια H3 και H5, τα οποία εμφανίζονται ως τριπλή κορυφή λόγω των γειτονικών τους πρωτονίων. Τέλος, τα αλειφατικά πρωτόνια της αιθυλενοδιαμίνης  $[-(CH_2)_2-]$  μετατοπίζονται σε υψηλότερα ppm σε σχέση με την αρχική ένωση  $Pt(en)Cl_2$  κατά +0.45 ppm, ενώ εμφανίζονται ως μη ισοδύναμα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην μη συμμετρική σφαίρα ένταξης του λευκοχρύσου ( $N_{en}N_{en}N_{py}Cl$ ). Συγκεκριμένα, τα Ha1/a2 και τα Hb1/b2 αποδίδονται στα 2.72 ppm και 2.67 ppm ως δύο πολλαπλές κορυφές με ολοκλήρωση 2H η καθεμία<sup>51</sup>. Συνολικά, οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του συμπλόκου (**1**) σε σύγκριση με την ελεύθερη πυριδίνη και το αρχικό σύμπλοκο  $Pt(en)Cl_2$  περιγράφονται στον **Πίνακα 3.1**.

**Πίνακας 3.1:** Χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) των πρωτονίων του συμπλόκου (**1**), του υποκαταστάτη πυριδίνη και του αρχικού συμπλόκου  $Pt(en)Cl_2$  σε διαλύτη  $D_2O$  στους 298K.

$\delta$ (ppm)	H2/6	H4	H3/5	Ha1a2	Hb1b2
py	8.14	7.66	7.16	-	-
$Pt(en)Cl_2$	-	-	-	2.25	2.25
<b>(1)</b>	8.70	8.00	7.54	2.72	2.67

### 3.2.1.2. Απόδοση των σημάτων $^1H$ NMR του συμπλόκου (**2**)

Στο φάσμα  $^1H$  NMR του  $[Pt(en)(2\text{-methylpyridine})Cl]NO_3$  (**2**) σε  $D_2O$  στους 298K (**Εικόνα 3.4**), διακρίνονται επτά διαφορετικά σήματα συντονισμού, τα οποία αποδίδονται στα επτά είδη διαφορετικών πρωτονίων του συμπλόκου. Τα πρωτόνια των αμινομάδων της en έχουν ανταλλαχθεί με δευτέριο και δεν εμφανίζονται στο φάσμα.



**Εικόνα 3.4:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (2) σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K.

Αναλυτικότερα, για τα συνολικά τέσσερα αρωματικά πρωτόνια της 2-μεθυλοπυριδίνης παρατηρούνται τέσσερα διακριτά σήματα συντονισμού με ολοκλήρωση 1H για το καθένα. Η διπλή κορυφή στα 8.80 ppm με  $^3J_{\text{H-H}} = 5.95$  Hz αποδίδεται στο πρωτόνιο H6, το οποίο βρίσκεται μετατοπισμένο σε υψηλότερα ppm σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη κατά +0.33 ppm υποδεικνύοντας την ένταξη της 2-μεθυλοπυριδίνης στον λευκόχρυσο μέσω του αζώτου. Ενδεικτικό της ένταξης είναι επίσης οι κορυφές «δορυφόροι» από την  $^3J$  σύζευξη των σπιν του πρωτονίου H6 με το ισότοπο του  $^{195}\text{Pt}$  (33% σε φυσική αφθονία), με τιμή  $^3J_{\text{Pt-H6}} = 35$  Hz, όπως αναφέρθηκε και στο σύμπλοκο (1). Ακόμα, τα σήματα συντονισμού με τριπλές σχάσεις στα 7.86 και 7.37 ppm αποδίδονται στα πρωτόνια H4 και H5, αντίστοιχα, με δύο γειτονικά πρωτόνια το καθένα. Στην συνέχεια, η διπλή κορυφή στα 7.52 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο H3 το οποίο έχει μόνο ένα γειτονικό πρωτόνιο. Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR, εμφανίζεται μία απλή κορυφή στα 3.09 ppm, η οποία έχει σχετική ολοκλήρωση 3H και αποδίδεται στα τρία πρωτόνια της μεθυλομάδας ( $-\text{CH}_3$ ). Η τιμή αυτή είναι μετατοπισμένη σε υψηλότερα ppm σε σχέση με την ελεύθερη 2-μεθυλοπυριδίνη κατά +0.55 ppm, ενδεικτική της ένταξής της στον Pt. Τέλος, τα πρωτόνια της αιθυλενοδιαμίνης [ $-(\text{CH}_2)_2-$ ], Ha1/a2 και Hb1/b2, είναι ανά δύο ισοδύναμα και εντοπίζονται σε δύο πολλαπλά σήματα στις τιμές 2.71 και 2.66 ppm, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια αυτά είναι επίσης μετατοπισμένα σε υψηλότερα ppm κατά +0.45 ppm, όπως και στο σύμπλοκο



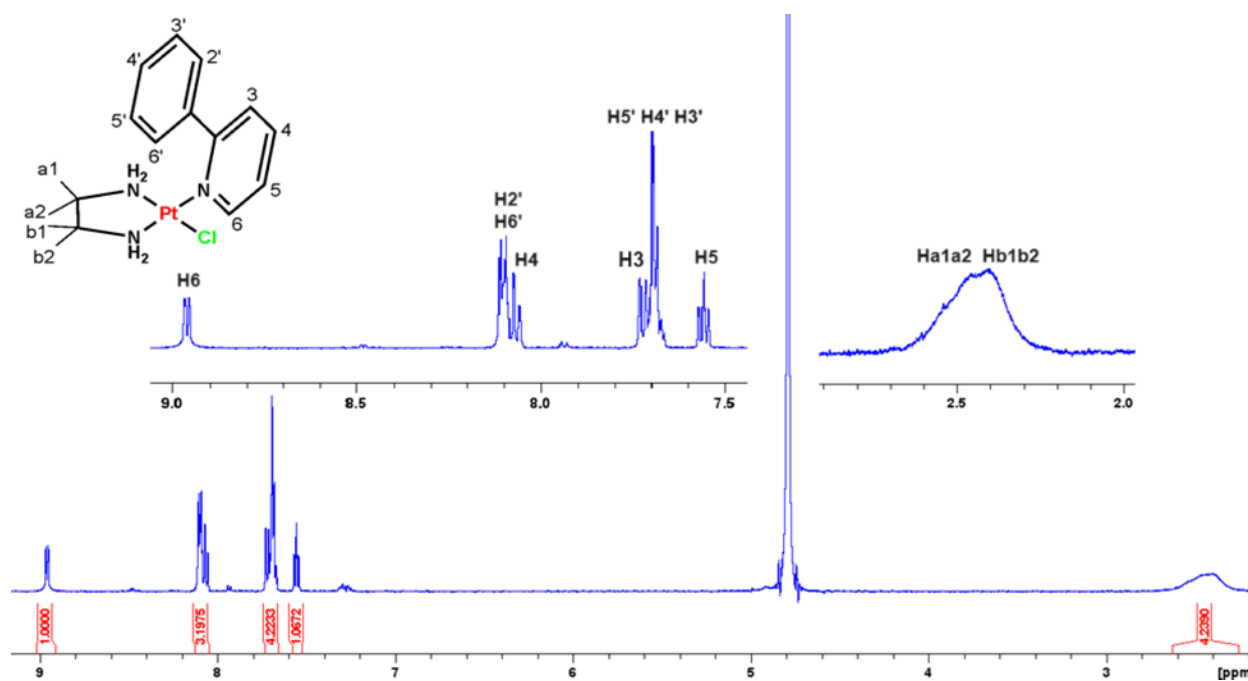
(1). Συνολικά, οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του συμπλόκου (2) σε σύγκριση με την ελεύθερη 2-μεθυλοπυριδίνη και το αρχικό σύμπλοκο Pt(en)Cl<sub>2</sub> περιγράφονται στον Πίνακα 3.2.

**Πίνακας 3.2:** Χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) των πρωτονίων του συμπλόκου (2), του υποκαταστάτη 2-μεθυλοπυριδίνης και του αρχικού συμπλόκου Pt(en)Cl<sub>2</sub> σε διαλύτη D<sub>2</sub>O στους 298K.

$\delta$ (ppm)	H6	H5	H4	H3	CH <sub>3</sub>	Ha1a2	Hb1b2
2-merp	8.47	7.08	7.53	7.12	2.54	-	-
Pt(en)Cl <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	2.25	2.25
(2)	8.80	7.37	7.86	7.52	3.09	2.71	2.66

### 3.2.1.3. Απόδοση των σημάτων <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου (3)

Στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR του [Pt(en)(2-phenylpyridine)Cl]Cl (3) σε D<sub>2</sub>O στους 298K (Εικόνα 3.5), διακρίνονται οκτώ διαφορετικά σήματα συντονισμού, τα οποία αποδίδονται στα συνολικά δεκατρία πρωτόνια του συμπλόκου. Τα πρωτόνια των αμινομάδων της en έχουν ανταλλαχθεί με δευτέριο και δεν εμφανίζονται στο φάσμα.



**Εικόνα 3.5:** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου (3) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O στους 298K, 500 MHz.

Αναλυτικότερα, για τα συνολικά εννέα αρωματικά πρωτόνια της ένωσης, η διπλή κορυφή στα 8.96 ppm με <sup>3</sup>J<sub>H5-H6</sub> = 5.8 Hz με σχετική ολοκλήρωση 1H αποδίδεται στο πρωτόνιο H6 του πυριδινικού δακτυλίου. Το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται μετατοπισμένο σε υψηλότερα ppm κατά +0.36 ppm, σε

σχέση την χημική του μετατόπιση στον ελεύθερο υποκαταστάτη 2-φαινυλοπυριδίνη, γεγονός που επιβεβαιώνει την ένταξη του τελευταίου μέσω αζώτου. Ενδεικτικό της ένταξης είναι επίσης οι κορυφές «δορυφόρου» από την  $^3J$  σύζευξη των σπιν του πρωτονίων H6 με το ισότοπο του  $^{195}\text{Pt}$  (33% σε φυσική αφθονία), με τιμή  $^3J_{\text{Pt-H6}} = 34.5$  Hz, όπως αναφέρθηκε και στα σύμπλοκα (1) και (2). Στην συνέχεια, η διπλή κορυφή στα 8.10 ppm με ολοκλήρωση 2H αποδίδεται στα πρωτόνια του φαινυλικού δακτυλίου H2' και H6'. Συνεχίζοντας, οι τριπλές κορυφές στα 8.07, 7.72 και 7.55 ppm με ολοκλήρωση 1H η καθεμία, αποδίδονται στα πρωτόνια H4, H3 και H5 της πυριδίνης αντίστοιχα. Τα πρωτόνια H3', H4' και H5' του φαινυλίου εντοπίζονται σε μία πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση τρία στα 7.68 ppm. Τέλος, στην αλειφατική περιοχή του φάσματος τα πρωτόνια της αιθυλενοδιαμίνης  $[-(\text{CH}_2)_2-]$ , Ha1/a2 και Hb1/b2, αποδίδονται στις τιμές 2.46 και 2.41 ppm ( $\Delta\delta \approx +0.19$  ppm σε σχέση με το  $\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2$ ), αντίστοιχα, ως μία διευρυμένη πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 4H. Η διεύρυνση αυτών των σημάτων, συγκριτικά με τα προηγούμενα σύμπλοκα (1) και (2), πιθανόν οφείλεται σε ενδιάμεση ταχύτητα περιστροφής του δεσμού Pt-N<sub>py</sub> στην κλίμακα χρόνου του NMR, όπου ο δακτύλιος του φαινυλίου της 2-φαινυλοπυριδίνης είναι τοποθετημένος με τέτοιο τρόπο ώστε να επιβραδύνεται η συστοφή του πενταμελούς δακτυλίου της αιθυλενοδιαμίνης. Συνολικά, οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του συμπλόκου (3) σε σύγκριση με την ελεύθερη πυριδίνη και το αρχικό σύμπλοκο  $\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2$  περιγράφονται στον **Πίνακα 3.3**.

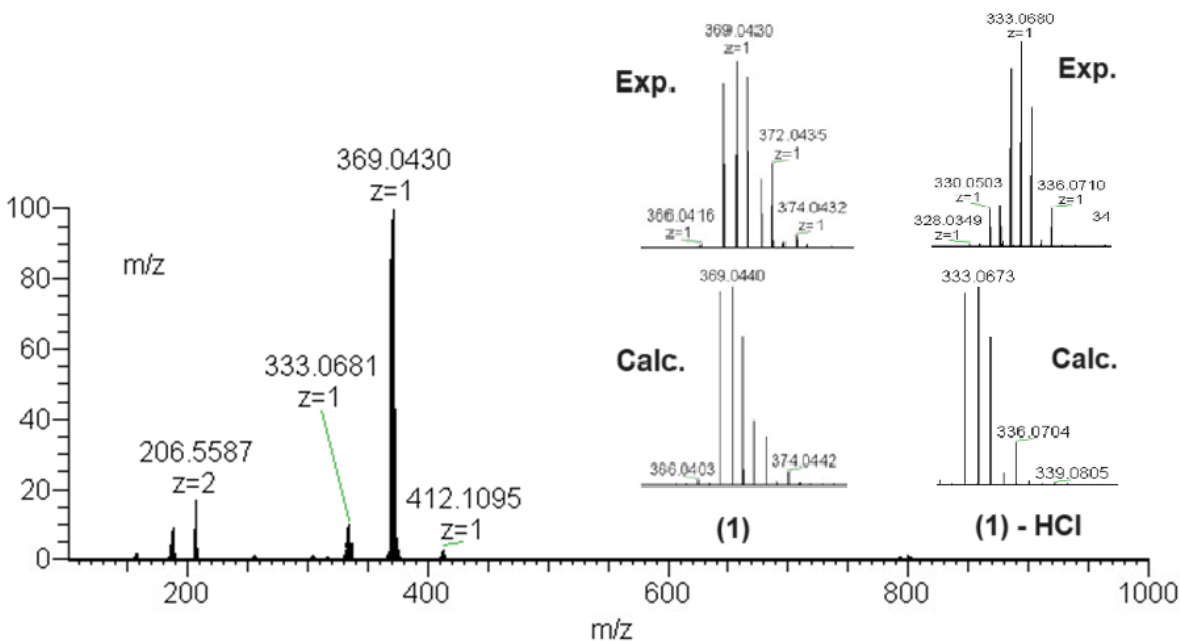
**Πίνακας 3.3:** Χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) των πρωτονίων του συμπλόκου (3), του υποκαταστάτη 2-φαινυλοπυριδίνης και του αρχικού συμπλόκου  $\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2$  σε διαλύτη  $D_2O$  στους 298K.

$\delta$ (ppm)	H6	H5	H4	H3	H2'/6'	H3'/4'/5'	Ha1a2	Hb1b2
2-phpy	8.60	7.45	7.96	7.87	7.90	7.56	-	-
$\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2$	-	-	-	-	-	-	2.25	2.25
(3)	8.86	7.55	8.07	7.72	8.10	7.68	2.46	2.41

### 3.2.2. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων (1) – (3) με φασματοσκοπία μάζας (HR-ESI-MS)

#### 3.2.2.1. Απόδοση κορυφών του συμπλόκου (1)

Το σύμπλοκο  $[\text{Pt}(\text{en})(\text{pyridine})\text{Cl}]\text{NO}_3$  (1) χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS) και πιο συγκεκριμένα με την τεχνική ιονισμού Electrospray Ionisation (ESI). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το δις απιονισμένο νερό. Το φάσμα των θετικών ιόντων απεικονίζεται στην **Εικόνα 3.6**.

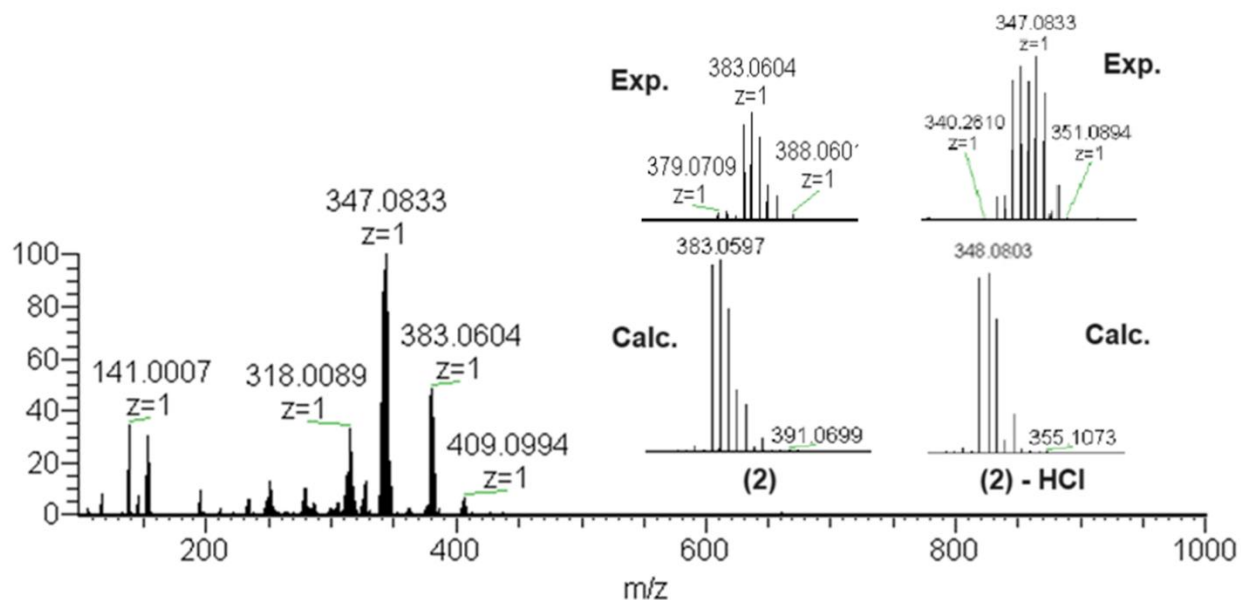


*Εικόνα 3.6: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (1) σε διαλύτη H<sub>2</sub>O.*

Στο φάσμα παρατηρούμε την ύπαρξη της κύριας κορυφής με λόγο  $m/z = 369.0430$ , που αντιστοιχεί στο μονοφορτιακό ιόν  $[C_7H_{13}ClN_3^{195}Pt]^+$ . Η συμφωνία της πειραματικής τιμής με το θεωρητικώς παραγόμενο φάσμα ( $m/z = 369.0440$ ), όπως και η ύπαρξη της χαρακτηριστικής κατανομής ισοτόπων λευκοχρύσου ( $^{190}Pt$ : 0.014%,  $^{192}Pt$ : 0.782%,  $^{194}Pt$ : 32.967%,  $^{195}Pt$ : 33.832%,  $^{196}Pt$ : 25.242%,  $^{198}Pt$ : 7.163%) επιβεβαιώνει την ύπαρξη του συμπλόκου  $[(1)]^+$ . Επίσης, στο ίδιο φάσμα παρατηρείται μικρότερη κορυφή με λόγο  $m/z = 333.0681$  (θεωρ. 333.0679) η οποία αντιστοιχίζεται στο μονοφορτιακό ιόν  $\{[Pt(en)(py)]-H\}^+$ . Η κορυφή αυτή πιθανόν προέρχεται από την υδρολυμένη μορφή του συμπλόκου  $\{[Pt(en)(py)H_2O]^{2+}$ , από την οποία όμως λείπει το μόριο του H<sub>2</sub>O, πιθανόν λόγω της διαδικασίας ιονισμού στην αέρια φάση, και ένα H<sup>+</sup> ώστε να προκύψει το μονοφορτιακό ιόν.

### 3.2.2.2. Απόδοση των κορυφών του συμπλόκου (2)

Το σύμπλοκο  $[Pt(en)(2\text{-methylpyridine})Cl]NO_3$  (2) χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS) όπως ακριβώς στην περίπτωση του (1). Το φάσμα των θετικών ιόντων απεικονίζεται στην **Εικόνα 3.7**.

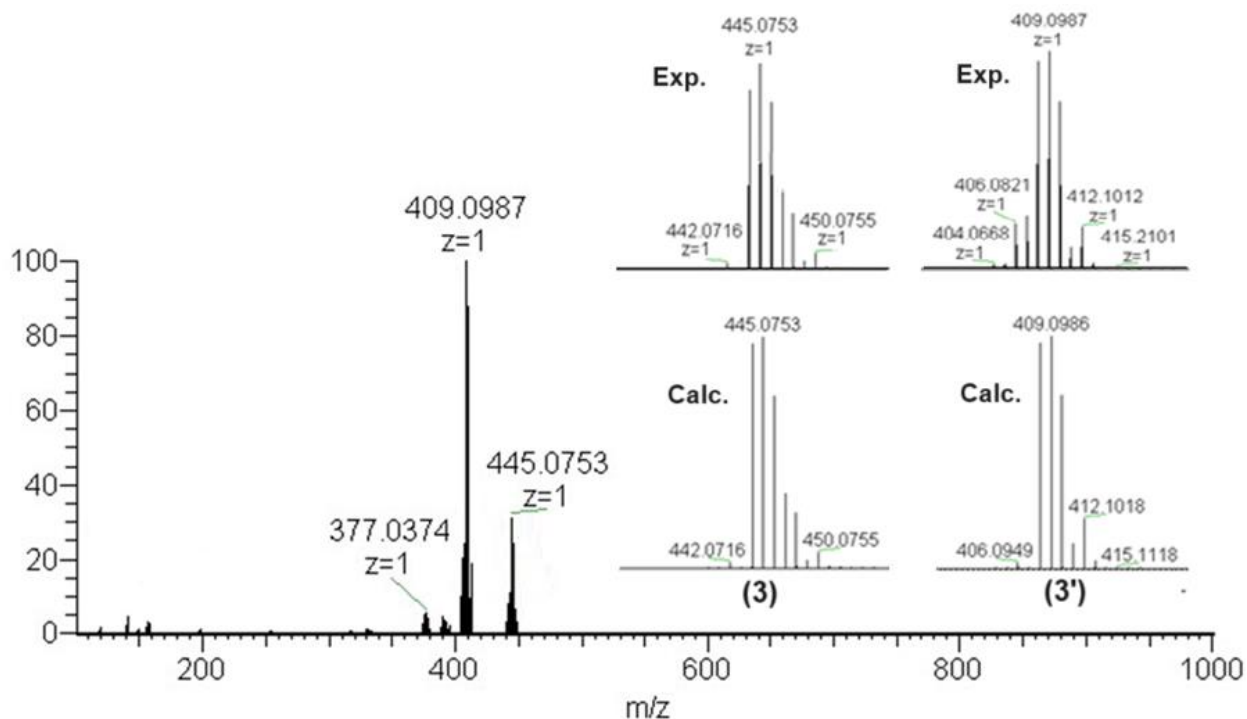


*Εικόνα 3.7: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (2) σε διαλύτη H<sub>2</sub>O.*

Στο φάσμα παρατηρούμε την ύπαρξη της δεύτερης εντονότερης κορυφής με λόγο  $m/z = 383.0604$ , που αντιστοιχεί στο μονοφορτιακό ιόν  $[C_8H_{15}ClN_3^{195}Pt]^+$ . Η συμφωνία τόσο της πειραματικής τιμής όσο και της ισοτοπικής κατανομής με το θεωρητικός παραγόμενο φάσμα ( $m/z = 383.0597$ ), επιβεβαιώνει την ύπαρξη σε διάλυμα του συμπλόκου  $[(2)]^+$ . Επίσης, στο ίδιο φάσμα η μεγαλύτερη σε ένταση κορυφή με λόγο  $m/z = 348.0803$  (θεωρ. 348.0908) η οποία αντιστοιχίζεται στο μονοφορτιακό ιόν από το οποίο έχει αφαιρεθεί υδροχλώριο (HCl) ή  $\{[Pt(en)(2\text{-merpy})]-H\}^+$ . Η παρατήρηση αυτή ταυτοποιεί την ύπαρξη της υδρολυμένης μορφής της ένωσης, η οποία προκύπτει κατά την παραμονή της στο υδατικό μέσο.

### 3.2.2.3. Απόδοση κορυφών του συμπλόκου (3)

Το σύμπλοκο  $[Pt(en)(2\text{-phenylpyridine})Cl]Cl$  (3) χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS) όπως και στις περιπτώσεις των (1) και (2). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το δις απιονισμένο νερό. Το φάσμα των θετικών ιόντων απεικονίζεται στην **Εικόνα 3.8**.



**Εικόνα 3.8:** Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (3) σε διαλύτη H<sub>2</sub>O.

Η δεύτερη σε ένταση κορυφή με λόγο  $m/z = 445.0753$  αντιστοιχεί στο μονοφορτιακό ιόν  $[C_{13}H_{17}ClN_3^{195}Pt]^+$ . Η συμφωνία τόσο της πειραματικής τιμής όσο και της ισοτοπικής κατανομής με το θεωρητικώς παραγόμενο φάσμα ( $m/z = 445.0753$ ), επιβεβαιώνει την ύπαρξη του [(3)]<sup>+</sup>. Επίσης, η μεγαλύτερη σε ένταση κορυφή, με  $m/z = 409.0987$  (θεωρ. 409.0986) αντιστοιχεί στο μονοφορτιακό ιόν  $\{[Pt(en)(2-phry)]-HCl\}^+$ . Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις από το φάσμα <sup>1</sup>H NMR υποδεικνύει το σχηματισμό ενός συμπλόκου με χηλικά ενταγμένη 2-φαινυλοπυριδίνη (Εικόνα 3.12) το οποίο προκύπτει μετά την υδρόλυση του Cl, την εν συνεχεία αποπρωτονίωση της 2-phry στον C6', και τον σχηματισμό πενταμελούς δακτυλίου.

### 3.3. Υδρόλυση των συμπλόκων και ισορροπία

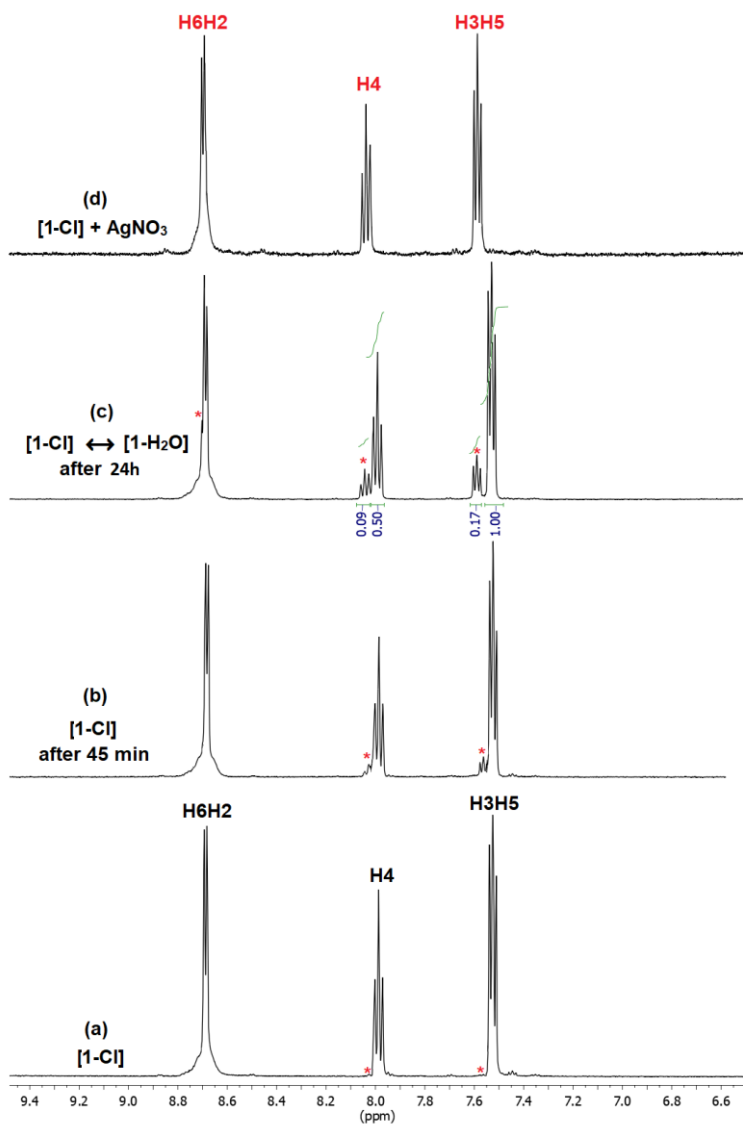
#### 3.3.1. Υδρόλυση των συμπλόκων (1) και (2)

Η υδρόλυση των συμπλόκων (1) και (2) μελετήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR, στους 298K σε D<sub>2</sub>O σε διαλύματα συγκέντρωσης 3,2 mM και 2,9 mM, αντίστοιχα. Η καταγραφή των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR πραγματοποιήθηκε σε συγκεκριμένους χρόνους, έως ότου επιτευχθεί χημική ισορροπία, σύμφωνα με την αντίδραση της Εικόνας 3.9:

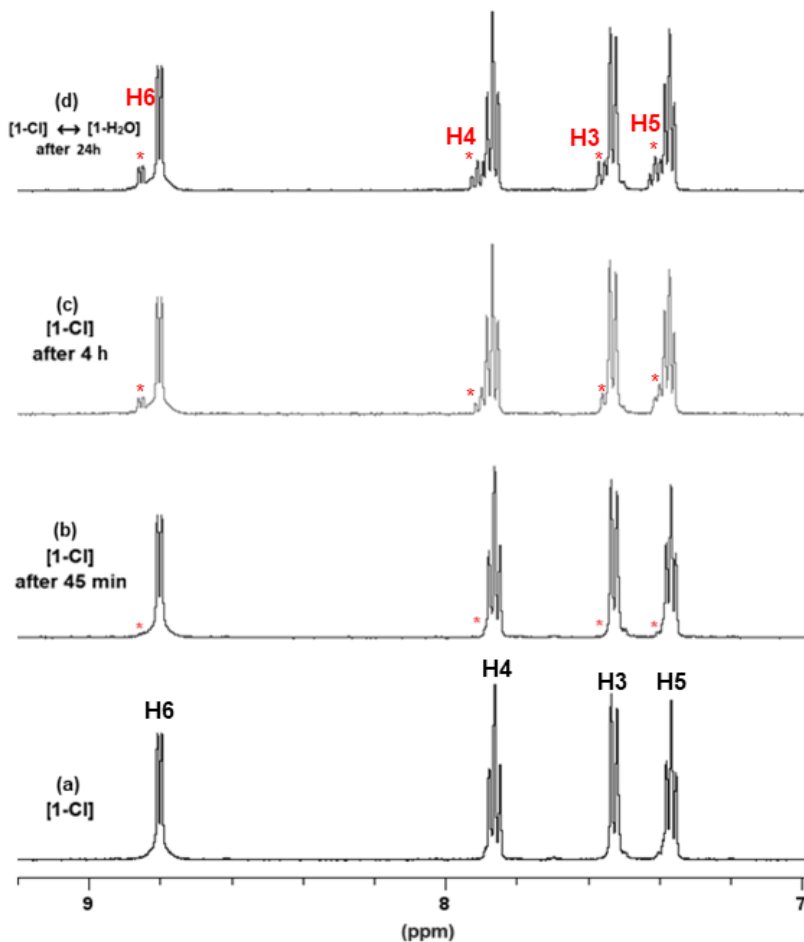


*Εικόνα 3.9: Απεικόνιση της χημικής ισορροπίας που υφίσταται κατά την αντίδραση υδρόλυσης στα σύμπλοκα (1) και (2).*

Για την μελέτη της υδρόλυσης των συμπλόκων (1) και (2), αρχικά ήταν απαραίτητη η απόδοση των σημάτων των [1-D<sub>2</sub>O] και [2-D<sub>2</sub>O] τα οποία παράγονταν κατά την αντίδραση του [1-Cl] και [2-Cl] σε D<sub>2</sub>O. Γι' αυτό τον λόγο, το σύμπλοκο (1) υποβλήθηκε σε επεξεργασία με ένα ισοδύναμο AgNO<sub>3</sub> προκειμένου να ληφθούν τα φάσματα της πλήρως υδρολυμένης του μορφής ως φάσμα αναφοράς. Μετά την απομάκρυνση του AgCl, λήφθηκε το φάσμα του εναπομείναντος διαλύματος το οποίο και αποδόθηκε στο πλήρως υδρολυμένου, [1-D<sub>2</sub>O] (Εικόνα 3.10d).



**Εικόνα 3.10:** Απεικόνιση των αρωματικών σημάτων της πυριδίνης στην περιοχή 7-9 ppm των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (**I**) σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K. (a) Φάσμα του (**I**) αμέσως μετά την διάλυση σε  $\text{D}_2\text{O}$ . (b) Το ίδιο δείγμα του (**I**) μετά από επώαση του στους 298K για 45 min. (c) Το φάσμα όταν πια έχει επιτευχθεί χημική ισορροπία και (d) Το φάσμα του πλήρως υδρολυμένου συμπλόκου (**I**) μετά την προσθήκη ενός ισοδύναμου  $\text{AgNO}_3$ . Τα νέα σήματα των υδρολυμένων ειδών επισημαίνονται με τους κόκκινους αστερίσκους.



**Εικόνα 3.11:** Απεικόνιση των αρωματικών σημάτων της 2-μεθυλοπυριδίνης στην περιοχή 7-9 ppm των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (**2**) σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. (a) Φάσμα του (**2**) αμέσως μετά την διάλυση σε  $\text{D}_2\text{O}$ . (b) Το ίδιο δείγμα του (**2**) μετά από επώαση του στους 298K για 45 min. (c) Το φάσμα του συμπλόκου μετά από 4 ώρες. (d) Το φάσμα όταν στο σύστημα υπάρχει χημική ισορροπία μετά από 24 ώρες. Οι κόκκινοι αστερίσκοι επισημαίνουν τα νέα σήματα των υδρολυμένων ειδών.

Στην συνέχεια, η παρακολούθηση της υδρόλυσης των  $[1\text{-C1}]$  και  $[2\text{-C1}]$  (Εικόνα 3.11) σε  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K, πραγματοποιήθηκε καταγράφοντας φάσματα  $^1\text{H}$  NMR σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Η αντίδραση υδρόλυσης ξεκίνησε σχεδόν αμέσως, αλλάζοντας σταδιακά τα φάσματα προς τον σχηματισμό των υδρολυμένων προϊόντων  $[1\text{-D}_2\text{O}]$  και  $[2\text{-D}_2\text{O}]$ . Δεδομένου ότι η κινητική αυτής της αντίδρασης είναι αργή στην χρονική κλίμακα του NMR σε θερμοκρασία 298K, παρατηρήθηκε η συνύπαρξη των κορυφών των αρχικών συμπλόκων με εκείνες των ύδατο

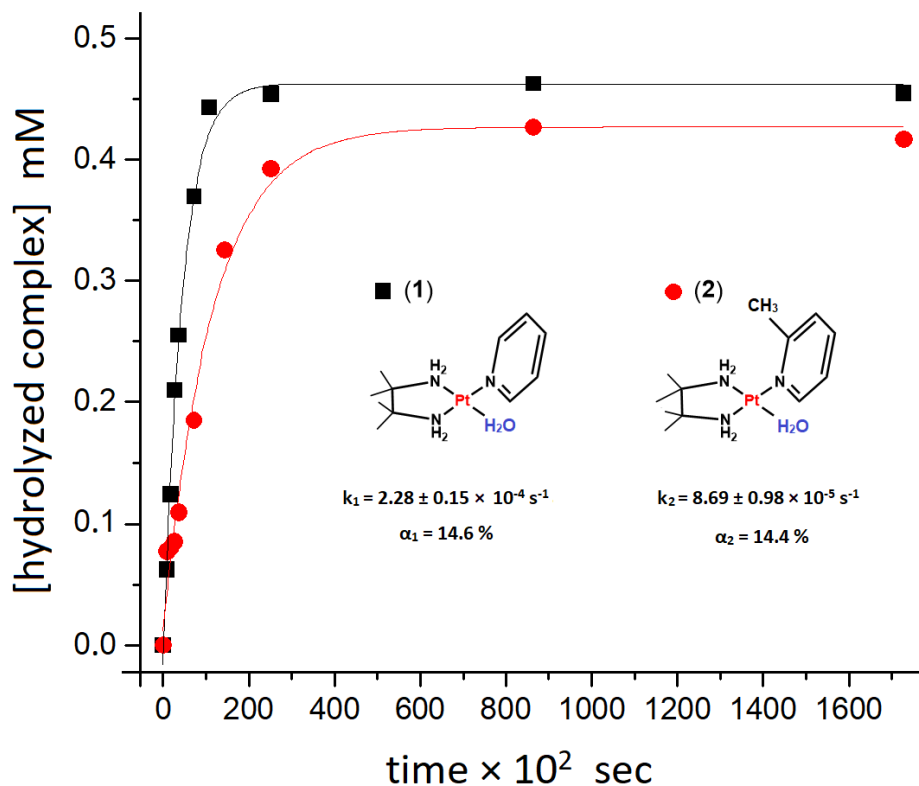


συμπλόκων. Η ποσοτικοποίηση των κλασμάτων [1-D<sub>2</sub>O] και [2-D<sub>2</sub>O] ως προς τις αρχικές συγκεντρώσεις των [1-Cl] και [2-Cl], επιτεύχθηκε ολοκληρώνοντας συγκεκριμένα σήματα των φασμάτων (Πίνακας 3.4)

**Πίνακας 3.4:** Συγκεντρώσεις (σε mM) του υδρολυμένου συμπλόκου (1) {[1-D<sub>2</sub>O]} και του υδρολυμένου συμπλόκου (2) {[2-D<sub>2</sub>O]} ως συνάρτηση του χρόνου (t).

Time (x 10 <sup>2</sup> sec)	[1-D <sub>2</sub> O] (mM)	[2-D <sub>2</sub> O] (mM)
0	0	0
9	0.062	0.0771
18	0.124	0.0805
27	0.210	0.0849
36	0.255	0.109
72	0.370	0.185
108	0.443	-
144	-	0.326
252	0.454	0.392
864	0.462	0.427
1728	0.454	0.417

Μετά από 24 ώρες, η υδρόλυση έφτασε σε ισορροπία, αποδίδοντας το 14,6% του υδρολυμένου προϊόντος για το σύμπλοκο (1) και το 14,4% για το σύμπλοκο (2). Τα φάσματα παρέμεναν αμετάβλητα ακόμα και μετά από αρκετές ημέρες. Τα ποσοστά αυτά με βάση τις εξισώσεις (1) και (2) (Ενότητα 2.2.3) αντιστοιχίζονται στις τιμές για την σταθερά ισορροπίας  $K_{eq1} = 0,079$  mM (1) και  $K_{eq2} = 0,071$  mM (2) στους 298K. Για τον προσδιορισμό τόσο της σταθεράς ταχύτητας της υδρόλυσης  $k_h$  όσο και του χρόνου ημιζωής  $t_{1/2}$ , κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα συγκέντρωσης των [1-D<sub>2</sub>O] και [2-D<sub>2</sub>O] συναρτήσει του χρόνου αντίστοιχα. Είναι γνωστό ότι η υδρόλυση για τέτοιου τύπου σύμπλοκα ακολουθεί κινητική ψευδοπρώτης τάξης (Ενότητα 2.2.4), τα πειραματικά σημεία της καμπύλης προσαρμόστηκαν (fitting) στην εξίσωση  $A = A_1 - A_2(e^{-kt})$ , δίνοντας τις τιμές για την  $k_1 = 2,28 \pm 0,15 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  για το σύμπλοκο (1) και  $k_2 = 8,69 \pm 0,98 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  για το σύμπλοκο (2). Ανάλογα και οι χρόνοι ημιζωής βρέθηκαν ως  $t_{1/2} = 52,5 \text{ min}$  για το (1) και  $t_{1/2} = 132,9 \text{ min}$  για το (2).



**Εικόνα 3.12:** Διαγράμματα που δείχνουν την αύξηση των συγκεντρώσεων  $[1-D_2O]$  και  $[2-D_2O]$  με την πάροδο του χρόνου έως ότου την επίτευξη χημικής ισορροπίας. Τα μαύρα τετράγωνα αντιπροσωπεύουν τις συγκεντρώσεις του  $[1-D_2O]$ , ενώ οι κόκκινοι κύκλοι τις συγκεντρώσεις του  $[2-D_2O]$ . Οι τιμές αυτές προσαρμόστηκαν στην καμπύλη που προκύπτει από εξίσωση της κινητικής μίας ψευδοπρώτης τάξης αντίδρασης [Ενότητα 2.2.4, Εξίσωση (3)].

Συνολικά, συγκρίνοντας τις σταθερές ισορροπίας  $K_{eq1}$  και  $K_{eq2}$  για τα δύο σύμπλοκα, οι τιμές τους είναι αρκετά παρόμοιες. Ωστόσο, η  $K_{eq2}$  είναι ελαφρώς μικρότερη από την  $K_{eq1}$ , γεγονός που αντικατοπτρίζει την επίδραση των διαφορετικών υποκαταστατών, δηλαδή της 2-μεθυλοπυριδίνης και της πυριδίνης στα σύμπλοκα, αντίστοιχα. Σημαντικό είναι επίσης, πως οι παρατηρούμενες σταθερές ισορροπίας είναι παρόμοιες με τις τιμές που αναφέρονται στην υπάρχουσα βιβλιογραφία για τα ανάλογα μονολειτουργικά σύμπλοκα λευκοχρύσου (II), *pyriplatin* και *phenanthriplatin* (0,1 mM σε θερμοκρασία 310 K)<sup>20</sup>.

Η υδρόλυση του συμπλόκου (1) συμβαίνει γρηγορότερα συγκριτικά με το σύμπλοκο (2) ( $k_1 > k_2$ ), υποδηλώνοντας ότι η αντίδραση υδρόλυσης αναστέλλεται από την παρουσία της αξονικά προσανατολισμένης μεθυλικής ομάδας στον υποκαταστάτη 2-μεθυλοπυριδίνη. Γενικά, οι ρυθμοί

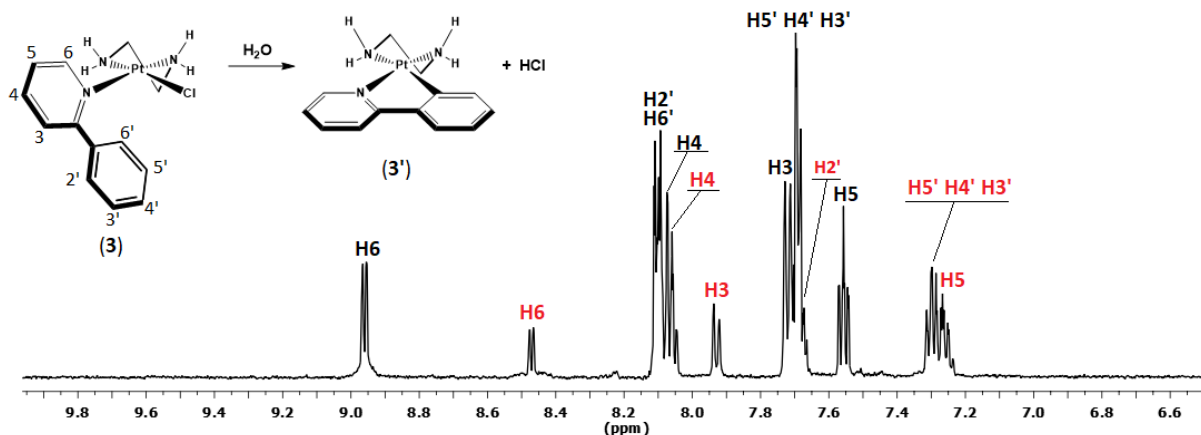
υδρόλυσης προσδιορίζονται με διάφορες μεθόδους και κάτω από διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, καθιστώντας τις άμεσες συγκρίσεις μεταξύ τους δύσκολες. Ωστόσο, μια κατά προσέγγιση σύγκριση με παρόμοια σύμπλοκα δείχνει ότι το σύμπλοκο (1) υδρολύεται γρηγορότερα από το *phenanthriplatin* ( $0,62 \pm 0,04 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  στους 310 K), ενώ το σύμπλοκο (2) έχει παρόμοια ταχύτητα υδρόλυσης. Σε σύγκριση με τα σύμπλοκα  $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]\text{NO}_3$  ( $6,50 \pm 0,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  στους 293 K) και  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}]\text{NO}_3$  ( $1,10 \pm 0,03 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  K), που υιοθετούν παρόμοια σφαίρα ένταξης, το σύμπλοκο (1) υδρολύεται γρηγορότερα, ενώ το σύμπλοκο (2) υδρολύεται με παρόμοιο ρυθμό με το  $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]\text{NO}_3$ <sup>52,53</sup>.

### 3.3.2. Υδρόλυση του συμπλόκου (3)

Προκειμένου να μελετηθεί η υδρόλυση του συμπλόκου (3) και να μπορεί να συγκριθεί με εκείνες των (1) και (2), ήταν απαραίτητο να μετατραπεί σε μορφή νιτρικού άλατος. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε αλλαγή των αντισταθμιστικών ιόντων του με νιτρικά, προσθέτοντας μόνο ένα ισοδύναμο  $\text{AgNO}_3$ . Ο  $\text{AgCl}$  που καταβυθίστηκε, απομακρύνθηκε από το μίγμα της αντίδρασης με διήθηση. Το νιτρικό άλας του (3) που συντέθηκε *in situ* ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας. Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του  $[\text{Pt}(\text{en})(2\text{-phry})\text{Cl}]\text{NO}_3$  ή (3) $\text{NO}_3$  διαφέρει ελάχιστα σε σχέση με το αρχικό φάσμα του συμπλόκου (3)Cl.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η υδρόλυση του συμπλόκου  $[\text{Pt}(\text{en})(2\text{-phenylpyridine})\text{Cl}]\text{NO}_3$  με την χρήση φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR, στους 298K σε  $\text{D}_2\text{O}$  σε διάλυμα συγκέντρωσης 3 mM. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα, καθώς τα νέα σήματα που εμφανίζονταν στα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR αποδίδονταν στο νέο σύμπλοκο που σχηματίζεται όπου το 2-phry δρα χηλικά μετά από αποπρωτονίωση του C6' και το σχηματισμό δεσμού Pt-C σχηματίζοντας το σύμπλοκο  $[\text{Pt}(\text{en})(2\text{-phry})\text{-H}^+]\text{NO}_3$  (3')<sup>54</sup>. Αναλυτικότερα, ο μηχανισμός αυτός πιθανόν περιλαμβάνει στην αρχή την υδρόλυση του δεσμού Pt-Cl προς το ενδιάμεσο προϊόν Pt-OD<sub>2</sub>, το οποίο όμως δεν εντοπίζεται στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR καθώς μετασχηματίζεται πολύ γρήγορα στο (3'). Φαίνεται ότι η θερμοδυναμική σταθερότητα του πενταμελούς δακτυλίου της χηλικά ενταγμένης 2-φαινυλοπυριδίνης με την παράλληλη απελευθέρωση HCl στο διάλυμα εμποδίζει τον πλήρη μετασχηματισμό του (3) στο (3'), λόγω της επίδρασης κοινού ιόντος, με αποτέλεσμα τα σύμπλοκα (3) και (3') να έρχονται σε ισορροπία. Τελικά, η αντίδραση φτάνει σε ισορροπία μετά από τρεις ημέρες σε  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K με σταθερά  $K_{\text{eq}3} = 0,385 \text{ mM}$  [Ενότητα 2.2.3, Εξίσωση (1)] όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.13. Ο

*in situ* χαρακτηρισμός του (3') βασίστηκε στο φάσμα COSY του μείγματος καθώς και στο HR-ESI-MS (Εικόνα 3.8).



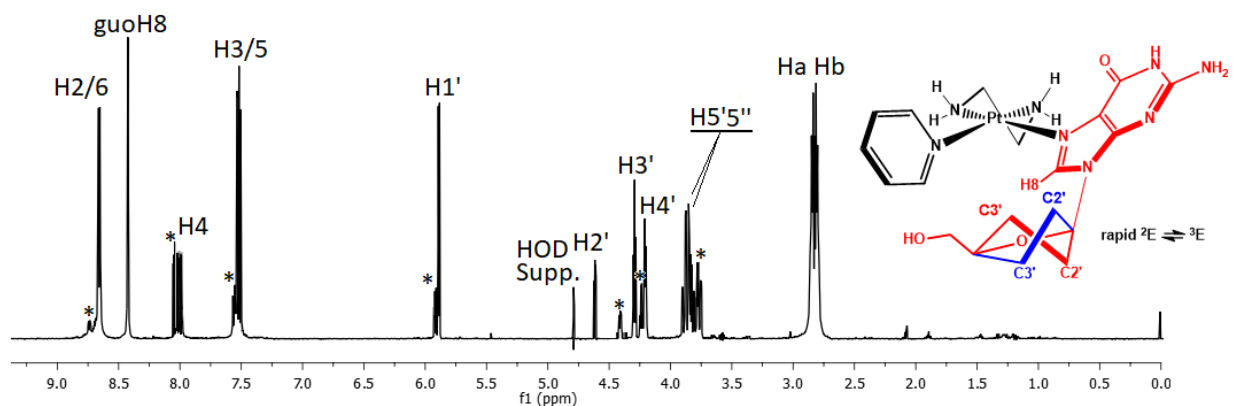
**Εικόνα 3.13:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του νιτρικού άλατος του συμπλόκου (3) (3 mM σε  $\text{D}_2\text{O}$ ) που δείχνει το μίγμα ισορροπίας του  $[\text{Pt}(\text{en})(\text{phry})\text{Cl}]^+$  και  $[\text{Pt}(\text{en})(\text{phry}-\text{H}^+)]^+$  (3'). Οι κορυφές με κόκκινο χρώμα αποδίδονται στο (3'), ενώ με μαύρο στο νιτρικό άλας του (3).

### 3.4. Αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων (1) και (2) με γουανωσίνη (Guo)

Οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων (1) και (2) με το νουκλεοσίδιο γουανωσίνη (guo) μελετήθηκαν με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K. Λόγω της πολυπλοκότητας του ανάλογου φάσματος με το σύμπλοκο (3), επιλέχθηκε η χρήση της 9-μέθυλογουανίνη (9-MeG) ως απλούστερο μοντέλο DNA (Ενότητα 3.5). Η προετοιμασία των δειγμάτων ήταν κοινή και για τις δύο ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, στα σύμπλοκα (1) και (2) προστέθηκε ένα ισοδύναμο  $\text{AgNO}_3$  στο καθένα, με στόχο την ύπαρξη των πλήρως υδρολυμένων μορφών τους στο δείγμα,  $[\mathbf{1}-\text{D}_2\text{O}]$  και  $[\mathbf{2}-\text{D}_2\text{O}]$ , αντίστοιχα. Μετά από 24 ώρες και αφότου απομακρύνθηκε το ίζημα του  $\text{AgCl}$ , η γουανωσίνη προστέθηκε με τιτλοδότηση στο διάλυμα έως ότου η αναλογία μεταξύ συμπλόκου και βάσης να γίνει 1:1. Έκτοτε, τα φάσματα καταγράφονταν σε συγκεκριμένους χρόνους για τέσσερις ημέρες, ενώ τα δείγματα παρέμεναν σε σταθερή θερμοκρασία 298K.

### 3.4.1. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου (1) με γουανοσίνη

Η προετοιμασία του δείγματος για την μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του συμπλόκου (1) και της γουανοσίνης διεξήχθη όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR καταγράφονταν σε μία περίοδο τεσσάρων ημερών για την παρακολούθηση της προόδου της αντίδρασης. Σε όλο αυτό το διάστημα, παρατηρήθηκε η εμφάνιση και η σταδιακή αύξηση νέων σημάτων συντονισμού στα φάσματα, ενδεικτικά του σχηματισμού του συμπλόκου  $[\text{Pt}(\text{en})(\text{py})(\text{guo})](\text{NO}_3)_2$  (**1-guo**). Μετά το πέρας των τεσσάρων ημερών, το φάσμα παρέμενε αμετάβλητο, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η αντίδραση βρίσκεται σε ισορροπία με ποσοστό προϊόντων 69% (Εικόνα 3.14).



**Εικόνα 3.14:**  $^1\text{H}$  NMR φάσμα του μίγματος 1:1 του συμπλόκου [**1-D<sub>2</sub>O**] και της γουανοσίνης σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$ , μετά από επώαση για τέσσερις ημέρες στους 298K. Το ποσοστό ολοκλήρωσης της αντίδρασης είναι 69%. Οι αστερίσκοι επισημαίνουν τις κορυφές των εναπομείναντων [**1-D<sub>2</sub>O**] και ελεύθερη γουανοσίνη. Η προτεινόμενη διαμόρφωση του συμπλόκου [**1-guo**] φαίνεται στα δεξιά.

Αναλυτικότερα, στο  $^1\text{H}$  NMR φάσμα του τελικού μίγματος, εκτός από τις κορυφές που αποδίδονται στο αρχικό σύμπλοκο [**1-D<sub>2</sub>O**] και την ελεύθερη γουανοσίνη που δεν αντέδρασαν, ένα νέο σετ σημάτων συντονισμού διακρίνεται το οποίο αντιστοιχίζεται στο [**1-guo**]. Η απόδοση των κορυφών του νέου συμπλόκου δίνονται στον Πίνακα 3.5. Τα πρωτόνια της πυριδίνης μετατοπίζονται σε χαμηλότερα ppm κατά 0.02 έως 0.05 ppm, ενώ τα σήματα για τα πρωτόνια της αιθυλενοδιαμίνης Ha1a2 και Hb1b2, μετατοπίζονται σε υψηλότερα ppm κατά 0.12 και 0.13 ppm, αντίστοιχα. Το πρωτόνιο H8 στο σύμπλοκο [**1-guo**], γειτονικό του N7, εντοπίζεται ως μία απλή κορυφή στα 8.44 ppm. Η κορυφή αυτή βρίσκεται μετατοπισμένη σε υψηλότερα ppm κατά +0.41

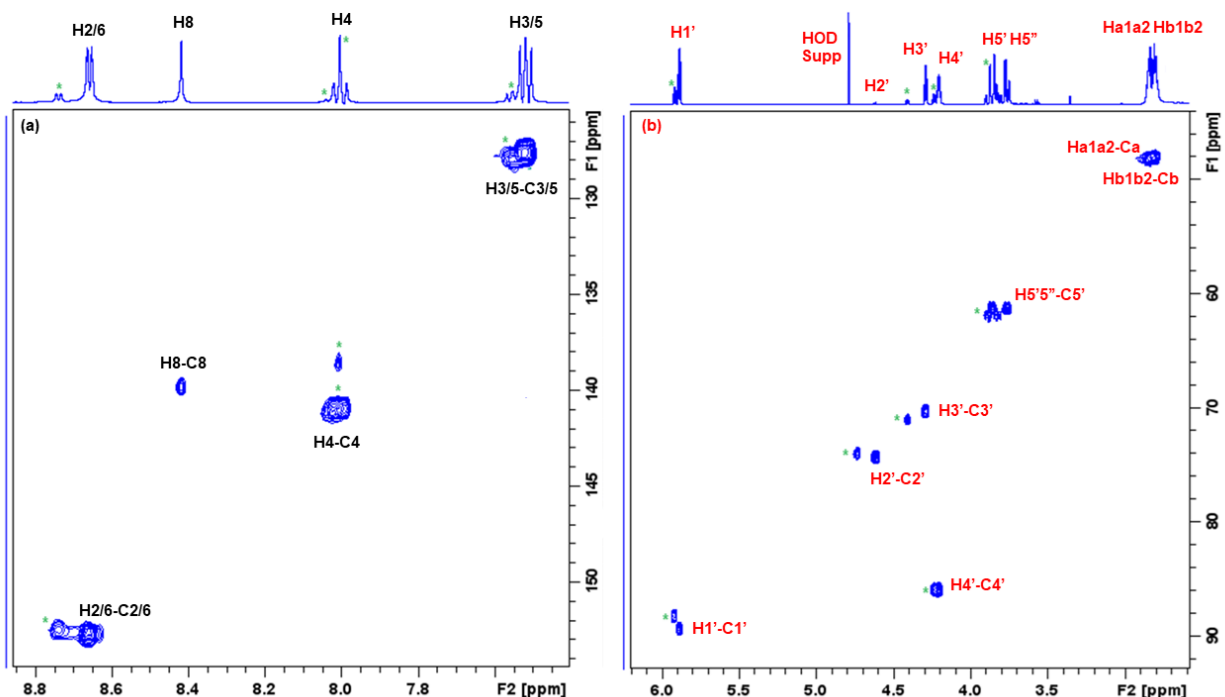
ppm σε σύγκριση με την ελεύθερη γουανοσίνη (8.03 ppm). Το μέγεθος της διαφοράς ( $\Delta\delta = +0.41\text{ppm}$ ) είναι ενδεικτικό της ένταξης της γουανοσίνης στον Pt(II) μέσω του N7 (guoN7)<sup>55,56</sup>.

Ωστόσο, αν και η βιβλιογραφία είναι πλούσια σε ισομερή της γουανοσίνης όταν συνδέεται με τον Pt(II), στην περίπτωση μας η εμφάνιση ενός μόνο σήματος H8 στο νέο σύμπλοκο που σχηματίζεται, [1-guo], μπορεί να οφείλεται σε τρεις διαφορετικούς λόγους: (α) στην υψηλή συμμετρία του υποκαταστάτη πυριδίνη, (β) στην γρήγορη και μη παρεμποδισμένη περιστροφή της γουανοσίνης γύρω από τον δεσμό Pt-N7 στην κλίμακα χρόνου του NMR στους 298K, είτε (γ) στην δημιουργία ενός μόνο ισομερούς το οποίο ευνοείται θερμοδυναμικά σε σχέση με τα υπόλοιπα και σταθεροποιείται μέσω του σχηματισμού δεσμού υδρογόνου ανάμεσα στο οξυγόνο του C6 της γουανοσίνης (guoO6) και κάποιο από τα πρωτόνια των αμινομάδων της αιθυλενοδιαμίνης, όπως έχει διαπιστωθεί στην περίπτωση του *phenanthriplatin*<sup>24</sup>. Στην περίπτωση της αντίδρασης του *phenanthriplatin* με 9-alkylguanine (9-RG), η γρήγορη περιστροφή του συμπλόκου  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{phenanthridine})(9\text{-RG})]^{2+}$  γύρω από τον δεσμό Pt-N7 δεν οδηγεί στην διάκριση δύο διαφορετικών ισομερών εκ περιστροφής, καθώς δημιουργείται ένα σταθερό ισομερές που σταθεροποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης του guoO6 και της *cis*- ενταγμένης αμμωνίας<sup>24</sup>. Τα πρωτόνια του σακχάρου στο [1-guo], H1', H4', H5' και H5'', παρατηρούνται ελαφρώς μετατοπισμένα σε χαμηλότερα ppm κατά 0.02 έως 0.03 σε σύγκριση με την ελεύθερη γουανοσίνη. Μεγαλύτερες όμως μετατοπίσεις εντοπίζονται στα πρωτόνια της ριβόζης H2' και H3', τα οποία αποδίδονται στα 4.29 ppm ( $\Delta\delta = -0.12\text{ ppm}$ ) και 4.21 ppm ( $\Delta\delta = -0.13\text{ ppm}$ ) αντίστοιχα. Αιτία του φαινομένου αυτού είναι η αλλαγή στους σχετικούς πληθυσμούς των διαμορφομερών <sup>2</sup>E (C2'-endo) και <sup>3</sup>E (C3'-endo), οι οποίοι σχετίζονται με τη σχετική θέση των C3' και C2', λόγω της ένταξης της γουανοσίνης στον λευκόχρυσο (II).

**Πίνακας 3.5:** Χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ελεύθερης guo, του συμπλόκου [1-D<sub>2</sub>O] και του [1-guo] σε διαλύτη D<sub>2</sub>O στους 298K. Στις παρενθέσεις παρατίθενται οι τιμές σταθεράς σύζευξης  $^3J_{\text{H-H}}$  (Hz) για τα πρωτόνια του σακχάρου ριβόζης στην γουανοσίνη.

Ένωση	Πυριδίνη (py)			Αιθυλενοδιαμίνη (en)		Γουανοσίνη (guo)						
	H2/6	H4	H3/5	Ha1a2	Hb1b2	H8	H1' $J_{(1'2')}$	H2' $J_{(2'3')}$	H3' $J_{(3'4')}$	H4'	H5' $J_{(4'5')}$	H5'' $J_{(4'5'')}$
<b>guo</b>	-	-	-	-	-	8.03	5.91 (5.95)	4.74 (5.40)	4.41 (3.80)	4.18	3.89 (3.05)	3.74 (4.05)
<b>[1-D<sub>2</sub>O]</b>	8.71	8.03	7.56	2.72	2.67	-	-	-	-	-	-	-
<b>[1-guo]</b>	8.66	8.00	7.52	2.84	2.80	8.44	5.89 (4.85)	4.61 (4.95)	4.29 (5.60)	4.21	3.86 (2.75)	3.77 (4.15)

Ο σχηματισμός του [1-guo] μελετήθηκε και φασματοσκοπία  $^{13}\text{C}$  (HSQC για την απόδοση των σημάτων του  $^{13}\text{C}$ ) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O στους 298K (**Εικόνα 3.15**). Όπως αναμένεται στο φάσμα παρατηρούνται τρία διαφορετικά σείτ σημάτων συντονισμού  $^{13}\text{C}$ , τα οποία αποδίδονται στην ελεύθερη γουανοσίνη, στο αρχικό σύμπλοκο [1-D<sub>2</sub>O] και στο [1-guo].



**Εικόνα 3.15:** Δισδιάστατο φάσμα HSQC του συμπλόκου [1-D<sub>2</sub>O] σε αναλογία 1:1 με guo, μετά από τέσσερις ημέρες σε διαλύτη D<sub>2</sub>O στους 298K. (α) Αρωματική περιοχή φάσματος HSQC με τα πρωτόνια του [1-guo] με μαύρο χρώμα, (β) Περιοχή του φάσματος HSQC όπου φαίνονται τα πρωτόνια του σακχάρου, όπως και τα αλειφατικά πρωτόνια της ep στο [1-guo] με κόκκινο χρώμα. Οι πράσινοι αστερίσκοι συμβολίζουν τα σήματα των [1-D<sub>2</sub>O] και ελεύθερη γουανοσίνη, που δεν αντέδρασαν.

Αναλυτικότερα, κατά την αντιστοίχιση των σημάτων των πυρήνων <sup>13</sup>C με τους αντίστοιχους πυρήνες <sup>1</sup>H παρατηρούμε πως οι κορυφές που αποδίδονται στην αρωματική περιοχή του φάσματος του <sup>13</sup>C δεν επηρεάζονται σχεδόν καθόλου. Η μεγαλύτερη διαφορά εντοπίζεται στον C8 ο οποίος όντας γειτονικός στο N7 που εντάσσεται στον λευκόχρυσο, μετατοπίζεται κατά Δδ = +1.3 ppm. Σημαντικές είναι και οι μετατοπίσεις των ανθράκων του σακχάρου καθώς ο πυρήνας του σακχάρου είναι ευαίσθητος σε αλλαγές διαμορφώσεων. Έτσι οι άνθρακες C1' και C2' μετατοπίζονται κατά Δδ = +1.2 ppm και Δδ = +0.3 ppm αντίστοιχα, ενώ οι άνθρακες C3' και C5' μετατοπίζονται κατά Δδ = -0.7 ppm. Οι αλλαγές αυτές στις χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων του σακχάρου της γουανοσίνης υποδεικνύουν τις αλλαγές που συμβαίνουν στην διαμόρφωσή του. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων <sup>13</sup>C παρατίθενται στον Πίνακα 3.6.

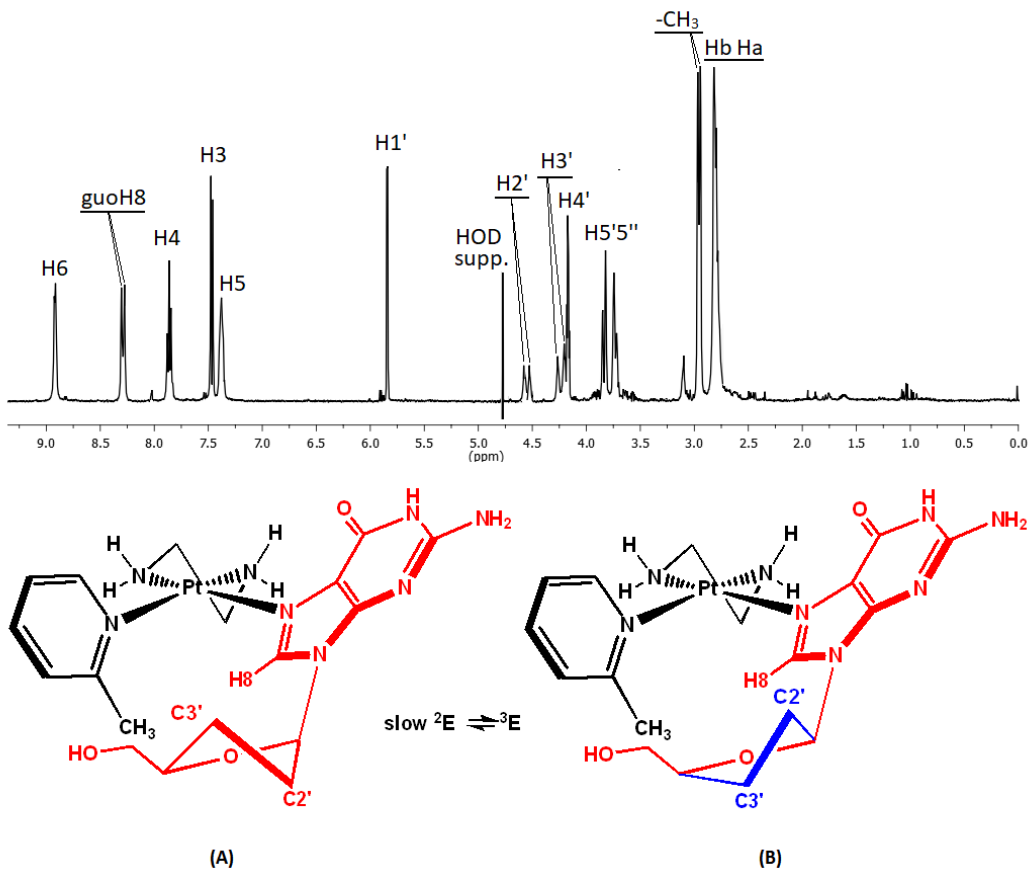


**Πίνακας 3.6:** Χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) των πυρήνων του  $^{13}\text{C}$  για την ελεύθερη guo, το συμπλόκου [1- $D_2O$ ] και το [1-guo] σε διαλύτη  $D_2O$  στους 298K.

Ένωση	Πυριδίνη (py)			Αιθυλενοδιαμίνη (en)		Γουανοσίνη (guo)					
	C2/6	C4	C3/5	Ca	Cb	C8	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'
guo	-	-	-	-	-	138.6	88.1	73.9	70.9	85.9	61.8
[1- $D_2O$ ]	152.6	141.1	127.8	47.9	47.9	-	-	-	-	-	-
[1-guo]	152.7	141.0	127.6	47.9	47.9	139.9	89.3	74.2	70.2	85.9	61.1

### 3.4.2. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου (2) με γουανοσίνη

Η προετοιμασία του δείγματος για την εξέταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του συμπλόκου (2) και της γουανοσίνης πραγματοποιήθηκε με βάση το καθιερωμένο πρωτόκολλο. Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR καταγράφηκαν σε διάστημα τεσσάρων ημερών για την παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, παρατηρήθηκε η εμφάνιση και η σταδιακή αύξηση νέων σημάτων, που επιβεβαιώνουν το σχηματισμό του συμπλόκου [Pt(en)(2-merpy)(guo)]( $\text{NO}_3$ )<sub>2</sub> ([2-guo]). Μετά από τέσσερις ημέρες, το φάσμα δεν εμφάνισε περαιτέρω αλλαγές, υποδεικνύοντας ότι η αντίδραση είχε έρθει σε ισορροπία με προϊόντα στο 95%. (Εικόνα 3.16).



**Εικόνα 3.16:**  $^1\text{H}$  NMR φάσμα του μίγματος 1:1 του συμπλόκου [2- $\text{D}_2\text{O}$ ] και της γουανοσίνης σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$ , μετά από επώαση για τέσσερις ημέρες στους 298K. Το ποσοστό ολοκλήρωσης της αντίδρασης είναι 95%. Οι αστερίσκοι επισημαίνουν τις κορυφές των εναπομείναντων [2- $\text{D}_2\text{O}$ ] και ελεύθερη γουανοσίνη. Τα δύο προτεινόμενα ισομερή (A) και (B) του συμπλόκου [2-guo] φαίνονται στο κάτω μέρος της εικόνας.

Όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.7**, στην περίπτωση του [2-guo] μόνο το πρωτόνιο H3 της 2-μεθυλοπυριδίνης μετατοπίζεται χαμηλότερα, κατά 0.06 ppm, συγκριτικά με το αρχικό σύμπλοκο [2- $\text{D}_2\text{O}$ ]. Ωστόσο, τα πρωτόνια H4 και H5 μετατοπίζονται ελαφρώς σε υψηλότερα ppm κατά 0.04 ppm. Το πρωτόνιο H6 φαίνεται να επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό με  $\Delta\delta = +0,1$  ppm. Ωστόσο για τα πρωτόνια H5 και H6 παρατηρείται διεύρυνση των σημάτων τους υποδεικνύοντας μάλλον μια αργή περιστροφή της 2-μεθυλοπυριδίνης γύρω από τον δεσμό Pt-N. Ακόμη, τα αλειφατικά πρωτόνια Ha1a2 και Hb1b2 είναι μετατοπισμένα κατά +0.11 και +0.14 ppm αντίστοιχα. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση διπλών σημάτων της  $-\text{CH}_3$  της 2-μεθυλοπυριδίνης μετατοπισμένα κατά -0.11 και -0.13 ppm. Διπλά σήματα παρατηρούνται επίσης για το πρωτόνιο guoH8, με δύο απλές κορυφές στα 8.29 και 8.31 ppm με διαφορά μεταξύ τους 0.02 ppm. Οι

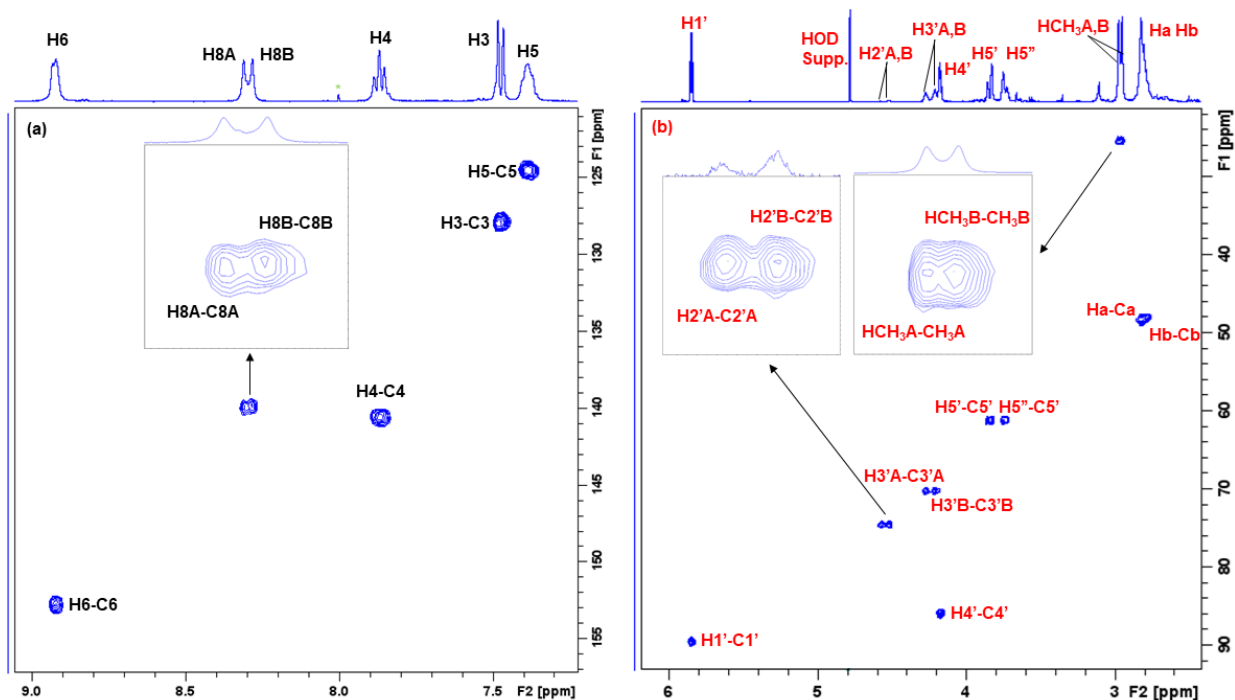
κορυφές αυτές είναι μετατοπισμένες σε υψηλότερα ppm κατά +0.26 και +0.28 ppm αντίστοιχα, σε σχέση με το guoH8 της ελεύθερης γουανοσίνης. Η μετατόπιση είναι μικρότερη από εκείνη στο σύμπλοκο [1-guo], πιθανόν λόγω εγγύτητας της γουανοσίνης με τον αρωματικό δακτύλιο της 2-μεθυλοπυριδίνης, ενώ τα διπλά σήματα μπορεί να προέρχονται από διαφορετικές διαμορφώσεις του σακχάρου της γουανοσίνης. Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν τον Ma *et. al.* όπου σε μία μελέτη εξέτασης της σύνδεσης του συμπλόκου [Pt(en)(PICAC)]NO<sub>3</sub> (PICAC = 6-(methylpyridin-2-yl)acetate) με το 5'-GMP, το guoH8 εμφανίζεται ως δύο διακριτά σήματα πολύ κοντά μεταξύ τους με  $\Delta\delta = 0.02$  ppm<sup>57</sup>. Διπλά σήματα συντονισμού για το H8 βρέθηκαν από τον Marzilli και τους συνεργάτες για το σύμπλοκο [Pt(L)(G)]<sup>+</sup> (όπου L = N-(6-methyl-2-picolyl)-N-(2-picolyl)amine και G = 9-αιθυλογουανίνη, 3'-GMP, 5'-GMP και 5'-GTP). Τα διπλά σήματα αποδόθηκαν στην ύπαρξη ισομερών εκ περιστροφής, πλην όμως οι χημικές μετατοπίσεις τους διαφέρουν πολύ περισσότερο ( $\Delta\delta = 0.3 - 0.4$  ppm)<sup>58</sup>.

Στην περιοχή 3 – 6 ppm του φάσματος <sup>1</sup>H εντοπίζονται τα πρωτόνια του σακχάρου για το σύμπλοκο [2-guo]. Αναλυτικότερα, το πρωτόνιο H1' εμφανίζεται σε ένα σήμα, διπλής σχάσης, μετατοπισμένο κατά +0.07 ppm συγκριτικά με την ελεύθερη γουανοσίνη. Απλά επίσης εμφανίζονται τα σήματα και για τα πρωτόνια H4', H5' και H5'' με αμελητέες διαφορές στις χημικές τους μετατοπίσεις. Αντιθέτως, ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι χημικές μετατοπίσεις για τα πρωτόνια H2' και H3' τα οποία εμφανίζονται ως δύο ξεχωριστά διευρυμένα σήματα το καθένα μετατοπισμένα σε χαμηλότερες ppm κατά 0.13 και 0.21 ppm. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ισορροπία στους πληθυσμούς <sup>3</sup>E και <sup>2</sup>E γίνεται αργά σε θερμοκρασία 298K στην κλίμακα χρόνου του NMR και ότι τα σήματα που εμφανίζονται αντικατοπτρίζουν τις δύο αυτές διαμορφώσεις. Συνολικά, εξετάζοντας τα δεδομένα του φάσματος <sup>1</sup>H NMR για το σύμπλοκο [2-guo], τόσο οι διευρυμένες κορυφές για τα αρωματικά πρωτόνια H5 και H6, τα δύο διακριτά σήματα για τα guoH8, την -CH<sub>3</sub>, τα H2' και H3' του σακχάρου, υποδεικνύουν πως τα δύο διαφορετικά διαμορφομερή που οφείλονται στο σάκχαρο της γουανοσίνης, [2-guo]A και [2-guo]B είναι «ορατά» καθώς η γρήγορη ισορροπία τους παρεμποδίζεται – επιβραδύνεται από την μεθυλομάδα (-CH<sub>3</sub>) της 2-μεθυλοπυριδίνης. Αντιθέτως, η απουσία αυτής της ομάδας στην περίπτωση του [1-guo] οδηγεί σε μία γρήγορη ισορροπία ανάμεσα στις <sup>2</sup>E και <sup>3</sup>E χωρίς την διάκρισή τους στο <sup>1</sup>H NMR φάσμα.

Οι μετατοπίσεις για τον  $^{13}\text{C}$  δίνονται στον πιο κάτω πίνακα που ακολουθεί και η απόδοση τους έγινε με την βοήθεια του HSQC (Εικόνα 3.17). Στο φάσμα παρατηρείται μόνο ένα σετ σημάτων συντονισμού του πυρήνα  $^{13}\text{C}$ , το οποίο αποδίδεται στο προϊόν καθώς η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε ποσοστό 95%. Διπλά σήματα  $^{13}\text{C}$  παρατηρήθηκαν μόνο για τους άνθρακες C8, C2', C3' και CCH<sub>3</sub>.

**Πίνακας 3.7:** Χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ελεύθερης guo, του συμπλόκου [2-D<sub>2</sub>O] και των [2-guo]A και [2-guo]B σε διαλύτη D<sub>2</sub>O στους 298K. Στις παρενθέσεις παρατίθενται οι τιμές σταθεράς σύζευξης  $^3J_{\text{H-H}}$  (Hz) για τα πρωτόνια του σακχάρου ριβόζης στην γουανοσίνη. Η ένδειξη “b” αναφέρεται στις διευρυμένες κορυφές.

Ένωση	2-Μεθυλοπυριδίνη (2-merp)						Αιθυλενοδιαμίνη (en)		Γουανοσίνη (guo)							
	H2	H3	H4	H5	H6	HCH <sub>3</sub>	Ha1a2	Hb1b2	H8	H1' $J_{(1'2')}$	H2' $J_{(2'3')}$	H3' $J_{(3'4')}$	H4'	H5' $J_{(4'5')}$	H5'' $J_{(4'5'')}$	
guo	-	-	-	-	-	-	-	-	8.03	5.91 (5.95)	4.74 (5.40)	4.41 (3.80)	4.18	3.89 (3.05)	3.74 (4.05)	
[2-D <sub>2</sub> O]	-	7.54	7.83	7.34	8.83	3.09	2.71	2.66	-	-	-	-	-	-	-	
[2-guo]A	-	7.48	7.87	7.39 b	8.93 b	2.96	2.82	2.80	8.31	5.84 (4.70)	4.58 (4.30)	4.28 (5.60)	4.18	3.85 (2.75)	3.74 (4.95)	
[2-guo]B	-	7.48	7.87	7.39 b	8.93 b	2.98	2.82	2.80	8.29	5.84 (4.70)	4.53 (4.60)	4.22 (4.90)	4.18	3.85 (2.75)	3.74 (4.05)	



**Εικόνα 3.17:** Δισδιάστατο φάσμα HSQC του συμπλόκου [2-D<sub>2</sub>O] σε αναλογία 1:1 με guo, μετά από τέσσερις ημέρες σε διαλύτη D<sub>2</sub>O στους 298K. (α) Αρωματική περιοχή φάσματος HSQC με τα πρωτόνια του [2-guo] με μαύρο χρώμα, (β) Περιοχή του φάσματος HSQC όπου φαίνονται τα πρωτόνια του σακχάρου, όπως και τα αλειφατικά πρωτόνια στο [2-guo] με κόκκινο χρώμα. Οι πράσινοι αστερίσκοι συμβολίζουν τα σήματα της ελεύθερη γουανωσίνης, που δεν αντέδρασε.

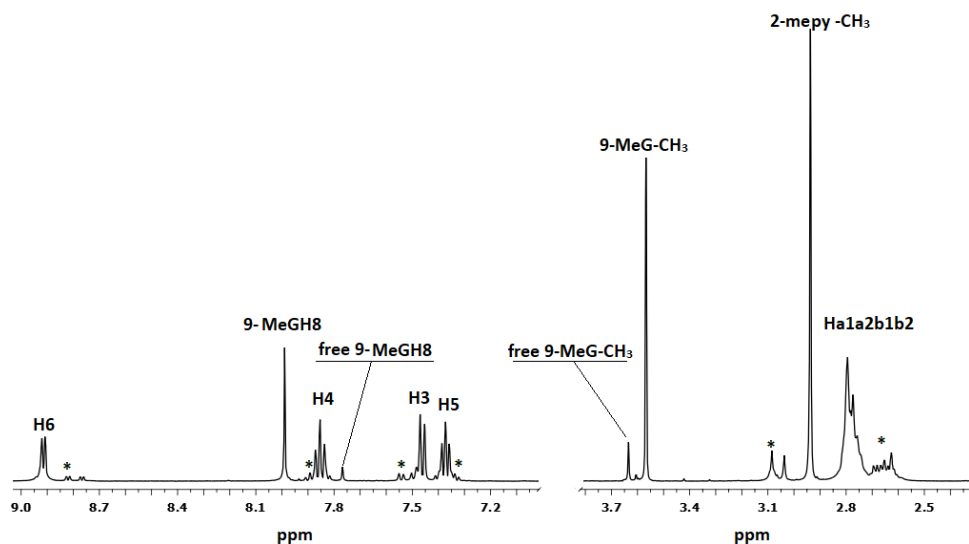
Πιο συγκεκριμένα, η ένταξη της γουανωσίνης στον λευκόχρυσο φαίνεται να επηρεάζει τις χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων <sup>13</sup>C όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3.8**. Το ηλεκτρονιακό περιβάλλον του C8 φαίνεται να μεταβάλλεται τόσο στο διαμορφωμερές [2-guo]A ( $\Delta\delta = +1.3$  ppm) όσο και στο [2-guo]B ( $\Delta\delta = +1.1$  ppm). Ισοδύναμη παρατηρείται η επίδραση στον C1' όπου η διαφορά στην χημική του μετατόπιση είναι  $\Delta\delta = +1.1$  ppm. Τα διπλά σήματα των C2' επηρεάζονται λιγότερο στην σφαίρα ένταξης του λευκοχρύσου με τις χημικές τους μετατοπίσεις να είναι  $\Delta\delta = -0.7/ -0.6$  ppm για τις διαφορετικές διαμορφώσεις των A και B αντίστοιχα. Ανάλογα και οι κορυφές του C3' στα [2-guo]A και [2-guo]B μετατοπίζονται κατά  $-0.8/ -0.7$  ppm, αντίστοιχα. Η χημική συμπεριφορά των ατόμων <sup>13</sup>C κατά τον συντονισμό τους επιβεβαιώνει τις αλλαγές στο ηλεκτρονιακό περιβάλλον και την γεωμετρία των μορίων. Είναι σημαντικό πως για τα διαφορετικά διαμορφωμερή οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων, ιδιαίτερα γύρω από τον δεσμό C2' και C3'

διαφέρουν μεταξύ τους, επαληθεύοντας μία ξεχωριστή στερεοχημεία σε σχέση με την χρονική κλίμακα λήψης φασμάτων NMR.

**Πίνακας 3.8:** Χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) των πυρήνων του  $^{13}\text{C}$  στο φάσμα HSQC της ελεύθερης guo και των συμπλόκων [2-guo]A και [2-guo]B σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K.

Ένωση	2-Μεθυλοπυριδίνη (2-mpy)						Αιθυλενοδιαμίνη (en)		Γουανοσίνη (guo)					
	C2	C3	C4	C5	C6	CCH <sub>3</sub>	Ca	Cb	C8	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'
guo	-	-	-	-	-	-	-	-	138.6	88.1	73.9	70.9	85.9	61.8
[2-guo]A	-	127.9	140.6	124.5	152.9	25.3	48.0	48.0	139.9	89.4	74.2	70.1	85.8	61.1
[2-guo]B	-	127.9	140.6	124.5	152.9	25.3	48.0	48.0	139.7	89.4	74.3	70.2	85.8	61.1

Για να τεκμηριώσουμε περαιτέρω τον ισχυρισμό ότι η παρουσία δύο ισομερών στο [2-guo] οφείλεται στη μονάδα σακχάρου της γουανοσίνης και όχι σε κάποια άλλη στερεοχημική διαμόρφωση όπως για παράδειγμα ο προσανατολισμός του υποκαταστάτη 2-mpy προς το guoH8, επαναλάβαμε την αντίδραση για το σύμπλοκο (2) υπό τις ίδιες συνθήκες χρησιμοποιώντας 9-MeG.



**Εικόνα 3.18:**  $^1\text{H}$  NMR φάσμα του συμπλόκου [2- $\text{D}_2\text{O}$ ] και της 9-μεθυλογουανίνης (9-MeG) σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298K. Οι αστερίσκοι επισημαίνουν τις κορυφές των εναπομεινάντων [2- $\text{D}_2\text{O}$ ] και ελεύθερη 9-MeG. Στο φάσμα φαίνονται ευδιάκριτα τα μονά σήματα για το 9-MeGH8, 9-MeG- $\text{CH}_3$  και 2-mpy- $\text{CH}_3$ .

Σε αντίθεση με τη γουανωσίνη, η 9-MeG έχει μια μεθυλομάδα στη θέση N9, η οποία μειώνει την στερική παρεμπόδιση με την 2-mery. Σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις για το [2-guo], το φάσμα του [Pt(en)(2-mery)(9-MeG)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> {[2-(9-MeG)]} έδειξε μόνο ένα σήμα συντονισμού για το 9-MeGH8 ( $\Delta\delta = +0.23$  ppm), το 9-MeG-CH<sub>3</sub> ( $\Delta\delta = -0.07$  ppm) όπως και το 2-mery-CH<sub>3</sub> ( $\Delta\delta = -0.13$  ppm). Τα υπόλοιπα σήματα των πρωτονίων του συμπλόκου παραμένουν σχεδόν ανεπηρέαστα (Εικόνα 3.16). Κατά αυτό τον τρόπο επαληθεύεται ότι τα δύο ισομερή στο [2-guo]A και [2-guo]B προέκυψαν από την αργή μετάβαση μεταξύ των διαμορφώσεων C2'-endo και C3'-endo του σακχάρου γουανωσίνης, υποδεικνύοντας ότι η ομάδα μεθυλίου της 2-mery εμποδίζει την ταχεία μετάβαση C2'-endo  $\leftrightarrow$  C3'-endo.

**Πίνακας 3.9:** Χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ελεύθερης 9-MeG, του συμπλόκου [2-D<sub>2</sub>O] και των [2-(9-MeG)] σε διαλύτη D<sub>2</sub>O στους 298K.

Ένωση	2-Μεθυλοπυριδίνη (2-mery)						Αιθυλενοδιαμίνη (en)		9-Μεθυλογουανίνη (9-MeG)	
	H2	H3	H4	H5	H6	HCH <sub>3</sub>	Ha1a2	Hb1b2	H8	HCH <sub>3</sub>
9-MeG	-	-	-	-	-	-	-	-	7.76	3.65
[2-D <sub>2</sub> O]	-	7.54	7.83	7.34	8.83	3.09	2.71	2.66	-	-
[2-(9-MeG)]	-	7.46	7.86	7.37	8.91	2.96	2.81	2.79	7.99	3.58

### 3.4.3. Μελέτη διαμόρφωσης σακχάρου

Ο μηχανισμός κυτταροτοξικής δράσης των μονολειτουργικών συμπλόκων του λευκοχρύσου(II) συνδέεται άμεσα με την επίδρασή τους στα δομικά χαρακτηριστικά του DNA. Γενικά, μικρές τοπικές αλλαγές στη γεωμετρία του DNA, μπορούν να εμποδίσουν την μεταγραφή ενώ παραμένουν αόρατα στους επιδιορθωτικούς του μηχανισμούς<sup>59</sup>. Μελέτη του [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(py)Cl]<sup>+</sup> με DNA έχει αποδείξει πως το σύμπλοκο αυτό προκαλεί μικρότερες παραμορφώσεις στην έλικα του DNA σε σχέση με το *cisplatin*. Κρυσταλλογραφική μελέτη των συμπλόκων αυτών με ένα ολιγονουκλεοτίδιο, έδειξε πως το [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(py)Cl]<sup>+</sup> προκαλεί 8° ξεδίπλωμα στην έλικα, ενώ το *cisplatin* 13°<sup>17</sup>.

Σε μια προσπάθεια να διερευνήσουμε το μέγεθος των δομικών αλλαγών των πιο πάνω συμπλόκων κατά την δέσμευσή τους στο DNA, μελετήσαμε με φασματοσκοπία NMR τις αλλαγές στη διαμόρφωση του σακχάρου της γουανωσίνης που προκαλεί η ένταξής της στον Pt(II), κυρίως λόγω

της αλληλεπίδρασης με τον γειτονικό της υποκαταστάτη. Αυτό συνίσταται στις μεταβολές  $syn \leftrightarrow anti$ ,  ${}^3E \leftrightarrow {}^2E$  και  $gg \leftrightarrow (tg+tg)$ . Στους Πίνακες 3.5 και 3.7 δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης  ${}^3J_{H-H}$  για τα πρωτόνια των σακχάρων των [1-guo], [2-guo]A και [2-guo]B καθώς και την ελεύθερη γουανοσίνη που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.

Ο προσδιορισμός τόσο της  $syn$ - όσο και της  $anti$ - διαμόρφωσης, δηλαδή της διαμόρφωσης που αφορά τον σχετικό προσανατολισμό του σακχάρου της γουανοσίνης ως προς τον πουρινικό δακτύλιο, πραγματοποιήθηκε με μελέτη της χημικής μετατόπισης του πρωτονίου H2'. Αναλυτικότερα, οι νουκλεοζίτες με ογκώδεις υποκαταστάτες στη θέση C8 του δακτυλίου πουρίνης εμποδίζουν την υιοθέτηση της  $anti$ - διαμόρφωσης στο σάκχαρο, ευνοώντας τη διαμόρφωση  $syn$ -. Παραδείγματα τέτοιων τροποποιημένων νουκλεοζιτών αποτελούν η 8-βρωμογουανοσίνη (8-Brguo)<sup>60</sup>, η 8-N-ακετυλ-2-αμινοφθορενγουανοσίνη (8-AAFguo)<sup>61</sup>, όπως και η μονοφωσφορική 8-τριτ-βουτυλ-γουανοσίνη (8-tBuGp)<sup>62</sup>, τα οποία επάγουν μετατοπίσεις σε υψηλότερα ppm για το H2'. Αντίθετα, οι  $anti$ - διαμορφώσεις που παρατηρήθηκαν σε περιπτώσεις MgN7Gp ή PtN7Gp<sup>63</sup>, οδηγούν σε μετατόπιση του H2' σε χαμηλότερα ppm. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το σάκχαρο είναι αποκλειστικά προσανατολισμένο σε διαμόρφωση  $syn$ - στο 8-<sup>1</sup>BuG ( $\delta_{H2'} = 5.07$  ppm)<sup>62</sup>, και αποκλειστικά στην  $anti$ - διαμόρφωση στην ένωση της ενταγμένης γουανοσίνης στον λευκόχρυσο μέσω N7, στο σύμπλοκο  $trans$ -[Pt(guo)<sub>2</sub>(alaH)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> ( $\delta_{H2'} = 4.49$  ppm)<sup>64</sup>, εξάγοντας τις εμπειρικές εξισώσεις (4) και (5) για τον προσδιορισμό των ποσοστών των  $syn$ - και  $anti$ - διαμορφώσεων στα σύμπλοκα [1-guo], [2-guo]A και [2-guo]B. Οι εξισώσεις αυτές θεωρούν ότι ο βαθμός μεταβολής της χημικής μετατόπισης του H2' ακολουθεί γραμμική σχέση με τις αλλαγές στους πληθυσμούς των  $syn$ - και  $anti$ - διαμορφώσεων.

$$\% anti = \{(\delta_{H2'}^{8-tBuGp} - \delta_{H2'}^X) / (\delta_{H2'}^{8-tBuGp} - \delta_{H2'}^{trans-[Pt(guo)_2(alaH)_2]Cl_2})\} \times 100 \quad (4)$$

$$\% syn = 100 - \% anti \quad (5)$$

Το  $\delta_{H2'}^X$  ορίζεται ως η χημική μετατόπιση της υπό εξέταση ένωσης.

Από τις σταθερές σύζευξης ( ${}^3J_{H-H}$ ) των πρωτονίων του σακχάρου της γουανοσίνης και τις γνωστές στη βιβλιογραφία εξισώσεις (6) και (7) υπολογίστηκε το ποσοστό των  ${}^3E$  (C3'-*endo*) και  ${}^2E$  (C2'-*endo*) διαμορφώσεων του πενταμελούς δακτυλίου του σακχάρου<sup>65</sup>.

$$\% {}^2E = [J_{1'2'} / (J_{1'2'} + J_{3'4'})] \times 100 \quad (6)$$



$$\% \text{}^3\text{E} = 100 - \% \text{}^2\text{E} \quad (7)$$

Επιπλέον, οι γωνίες στρέψης του δεσμού C4'-C5' προσδιορίστηκαν με βάση τις εξισώσεις (8) και (9), εκφρασμένες ως ποσοστά του πληθυσμού gg (gauche-gauche) και (gt + tg) (gauche-trans + trans-gauche)<sup>66</sup>:

$$\% \text{gg} = [(13 - \Sigma)/10] \times 100, \Sigma = (J_{4'5'} + J_{4'5''}) \quad (8)$$

$$\% (\text{gt} + \text{tg}) = 100 - \% \text{gg} \quad (9)$$

Με βάση τα παραπάνω υπολογίστηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά του σακχάρου για τα σύμπλοκα (1) και (2). Τα δεδομένα στον Πίνακα 3.10 αποκαλύπτουν πως και στα δύο σύμπλοκα που μελετήθηκαν (1) και (2), η διαμόρφωση *anti*- του σακχάρου τους είναι η επικρατέστερη σε σχέση με την ελεύθερη γουανοσίνη. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται από την γνωστή συμπεριφορά του *cisplatin* το οποίο όταν εντάσσεται στο N7 της γουανοσίνης αυξάνει τον πληθυσμό της *anti*-διαμόρφωσης<sup>67</sup>. Πιο συγκεκριμένα, στο [1-guo] υιοθετείται η *anti*- διαμόρφωση σε παρόμοιο ποσοστό με το [2-guo]A, ενώ στο [2-guo]B η *anti*- διαμόρφωση είναι σχετικά μεγαλύτερη. Το γεγονός αυτό, πιθανώς να συνεπάγεται πως η ένταξη του [2-guo]B στο DNA να προκαλεί μεγαλύτερες παραμορφώσεις.

**Πίνακας 3.10:** Ποσοστά επί τις εκατό (%) των διαμορφώσεων του σακχάρου της γουανοσίνης στα σύμπλοκα [1-guo], [2-guo]A και [2-guo]B, όπως υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις (4)- (9).

Ένωση	<i>anti</i> (%)	<i>syn</i> (%)	<sup>3</sup> E (%)	<sup>2</sup> E (%)	gg (%)	(gt + tg) (%)
guo	57	43	39	61	59	41
[1-guo]	79	21	54	46	61	39
[2-guo]A	85	15	-	-	62	38
[2-guo]B	93	7	-	-	53	47
Pt-N7Gp5' <sup>a</sup>			51	49	36	64
Me-N7Gp5' <sup>b</sup>			54	46	97	3
H <sup>+</sup> -N7Gp5' <sup>b</sup>			57	43	87	13
Gp5' <sup>a</sup>			36	64	65	35

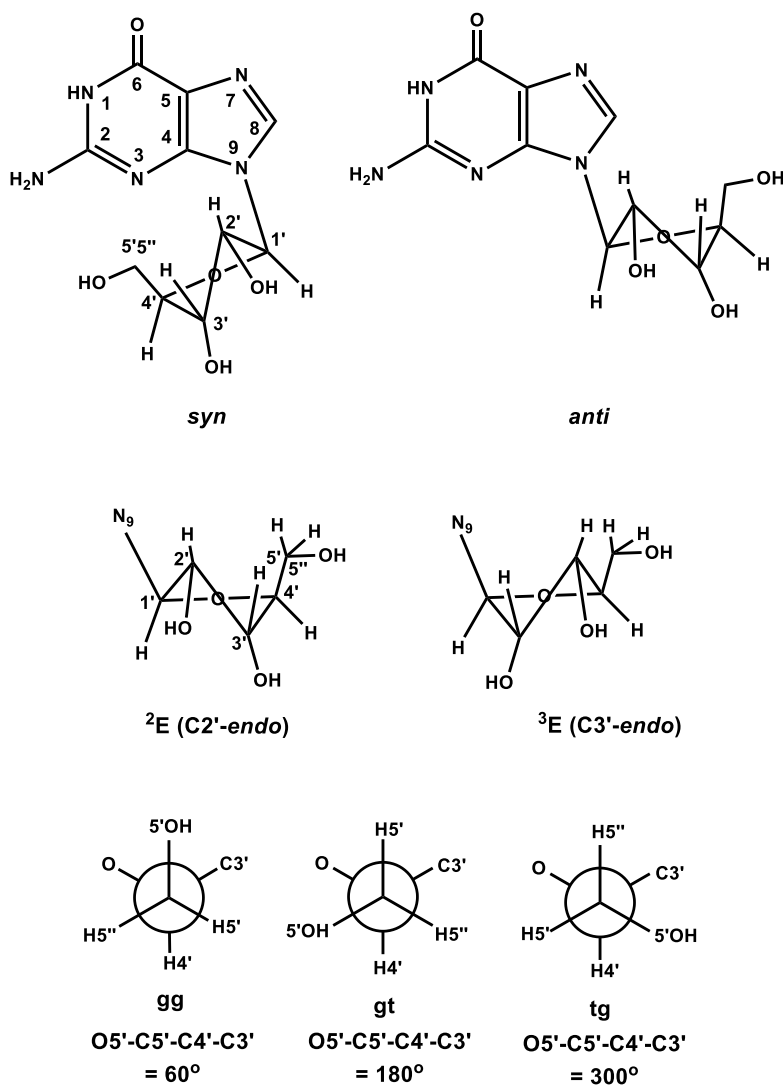
<sup>a,b</sup>Οι τιμές έχουν ληφθεί από τις αναφορές <sup>68,69</sup> αντίστοιχα.

Σε συνέχεια, υπολογίστηκαν τα ποσοστά <sup>2</sup>E (C2'-*endo*) και <sup>3</sup>E (C3'-*endo*) των σακχάρων με βάση τις εξισώσεις (6) και (7). Η γρήγορη ισορροπία ανάμεσα στα <sup>2</sup>E και <sup>3</sup>E στο [1-guo] επιτρέπει τον προσδιορισμό των σχετικών πληθυσμών τους με τις πιο πάνω εξισώσεις. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η διαμόρφωση C3'-*endo* προτιμάται κατά την πλατινίωση του N7 της guo σε

ποσοστό  ${}^3E = 54\%$ , σε σχέση με την ελεύθερη γουανοσίνη  ${}^3E = 39\%$ . Είναι δε πρακτικά η ίδια με εκείνη που προκαλεί το *cisplatin*, υποδεικνύοντας πως τόσο ο μονολειτουργικός τρόπος δράσης του συμπλόκου, αλλά και η αλληλεπίδραση της γουανοσίνης με την γειτονική της πυριδίνη, δεν προκαλούν μικρότερης έκτασης διαταραχές από το *cisplatin*. Είναι γνωστό ότι αύξηση της  ${}^3E$  διαμόρφωσης στο τμήμα του σακχάρου της γουανοσίνης προκαλείται είτε από την πλατινίωση στο N7<sup>68</sup>, είτε από την πρωτονίωση<sup>68</sup>, είτε ακόμη από τη μεθυλίωση του N7<sup>69</sup>.

Ατυχώς, η αργή ισορροπία ανάμεσα στις διαμορφώσεις  ${}^2E$  και  ${}^3E$  στην περίπτωση του [2-guo], δεν επιτρέπει την εφαρμογή των παραπάνω σχέσεων. Εάν όμως θεωρήσουμε πως τα διακριτά σήματα ανταποκρίνονται στις δύο διαφορετικές διαμορφώσεις  ${}^3E$  και  ${}^2E$  στο [2-guo]A και [2-guo]B αντίστοιχα, οι ολοκληρώσεις των κορυφών τους φαίνεται να δείχνουν πως βρίσκονται σε σχεδόν ίση αναλογία μεταξύ τους.

Τέλος, η ποσοτικοποίηση των πληθυσμών gg και (gt+tg), υπολογίστηκε με βάση τις εξισώσεις (8) και (9), με τις αντίστοιχες τιμές να φαίνονται στον **Πίνακα 3.10**. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται πως η μεταβολή στην γωνία στρέψης γύρω από τον δεσμό C4'-C5' δεν επηρεάζεται από την ένταξη του συμπλόκου (**1**) στην γουανοσίνη καθώς οι τιμές των μεγεθών αυτών παραμένουν περίπου ίδιες σε σχέση με αυτές της ελεύθερης γουανοσίνης. Ανάλογα συμπεριφέρεται και το [2-guo]A, αφήνοντας την διαμόρφωση γύρω από αυτόν τον δεσμό ανεπηρέαστη. Η μεγαλύτερη μεταβολή εντοπίζεται στο [2-guo]B, με την τιμή του για το gg% να είναι ελάχιστα μικρότερη σε σχέση με την ελεύθερη γουανοσίνη. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τα ευρήματα στο σύμπλοκο Pt-N7Gr5', στο οποίο το ποσοστό του διαμορφωμένου (gt+tg) είναι η επικρατέστερη. Δηλαδή η πλατινίωση του N7 προκαλεί αλλαγή στον περιστροφικό προσανατολισμό γύρω από τον δεσμό C4'-C5', με την προτίμηση της *trans*- διαμόρφωσης (180 μοίρες) σε μία από τις δύο διέδρες γωνίες (O5'-C5'-C4'-C3' και C3'-C4'-C5'-O5'), προκαλώντας έτσι δομικές παραμορφώσεις στο τμήμα του σακχάρου κάτι το οποίο επηρεάζει δυνητικά την σταθερότητα και την λειτουργία των νουκλεϊκών οξέων<sup>68</sup>. Αντιθέτως, σημαντική είναι η αύξηση του διαμορφωμένου gg στις περιπτώσεις μεθυλίωσης<sup>69</sup> ή πρωτονίωσης του N7 στο Gr5'<sup>68</sup>. Συνολικά, οι πιθανές διαμορφώσεις του τμήματος σακχάρου παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.19**.

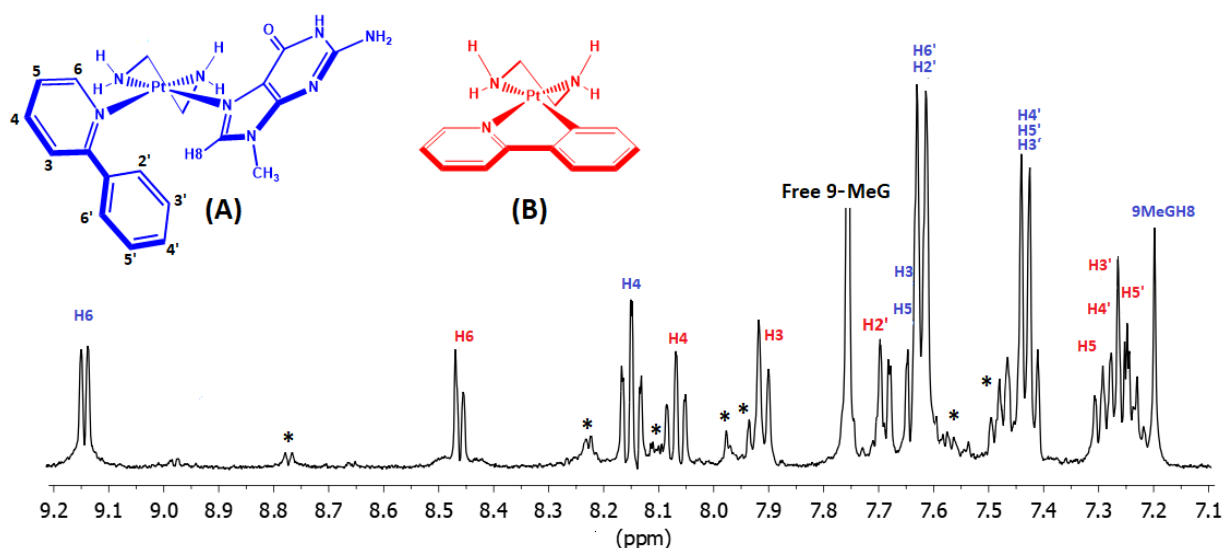


*Εικόνα 3.19: Ισομερή διαμορφομερών του τμήματος σακχάρου της ριβόζης στην γουανοσίνη.*

### 3.5. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου (3) με 9-μέθυλογουανίνη (9-MeG)

Η αντίδραση του συμπλόκου (3) με 9-μεθυλογουανίνη μελετήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας NMR σε διάλυμα 5mM NaCl σε D<sub>2</sub>O, στους 310K. Η προσθήκη ισομοριακής ποσότητας άλατος NaCl με το (3) στο δείγμα ήταν απαραίτητη προκειμένου να περιοριστεί η υδρόλυση του δεσμού Pt-Cl η οποία οδηγεί στον σχηματισμό του (3') (Ενότητα 3.3.2/ Εικόνα 3.13). Αναλυτικότερα, σε διάλυμα του συμπλόκου (3) συγκέντρωσης 5mM προστέθηκε τετραπλάσια περίσσεια 9-μέθυλογουανίνης. Για την παρακολούθηση της μεταξύ τους αντίδρασης λαμβάνονταν φάσματα <sup>1</sup>H NMR ανά τακτά χρονικά διαστήματα για μία περίοδο τεσσάρων ημερών, ενώ το δείγμα παρέμενε σταθερά σε θερμοκρασία 310K. Μετά τις τέσσερις ημέρες το φάσμα παρέμενε πρακτικά

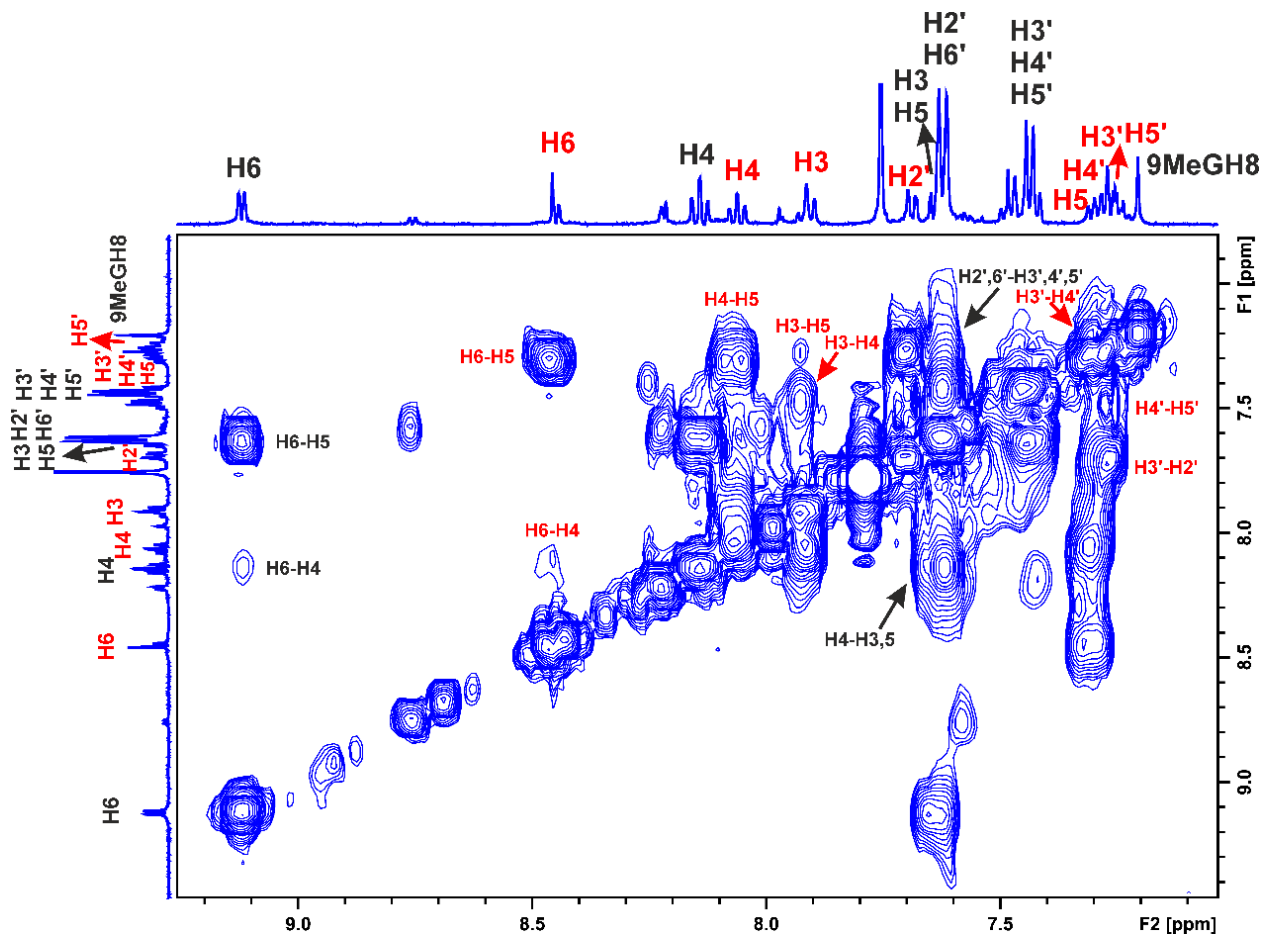
αμετάβλητο υποδηλώνοντας ότι στο σύστημα είχε επέλθει χημική ισορροπία με ποσοστό προϊόντων περίπου 90% (**Εικόνα 3.20**). Στο τελικό φάσμα διακρίνονται κατά κύριο λόγο δύο ξεχωριστά χημικά είδη των οποίων η απόδοση των σημάτων συντονισμού τους πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια φασμάτων δύο διαστάσεων COSY και NOESY (**Εικόνες 3.21 και 3.22**). Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων για τα σύμπλοκα (**3**), (**3'**) και [**3-(9-MeG)**] παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.11**.



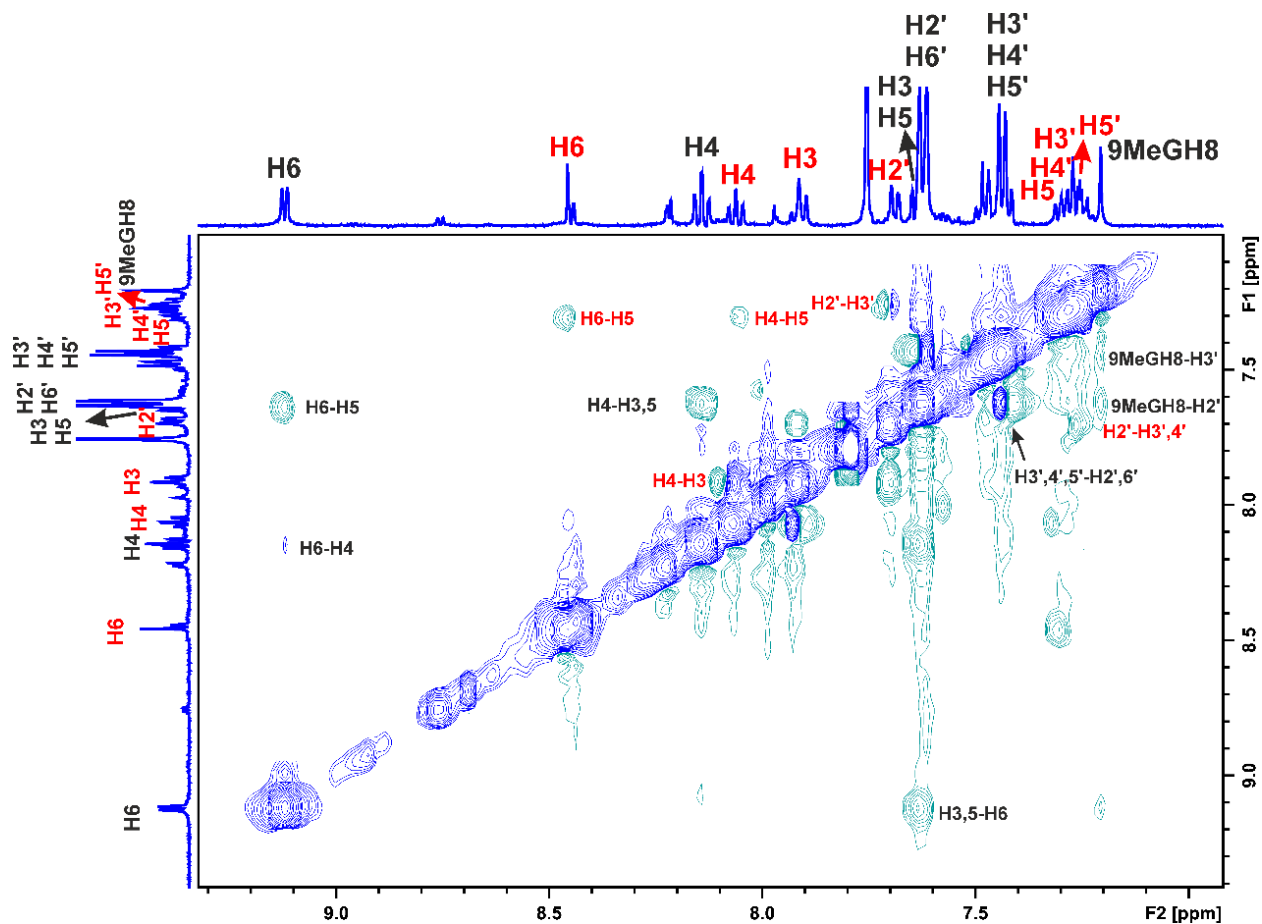
**Εικόνα 3.20:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR για το μείγμα του συμπλόκου (**3**) με την 9-μεθυλογουανίνη (9-MeG) σε 5mM NaCl διαλύματος  $\text{D}_2\text{O}$  στους 310K μετά από τέσσερις ημέρες. Με μπλε χρώμα επισημαίνεται το προϊόν  $[\text{Pt}(\text{en})(2\text{-rhry})(9\text{-MeG})]\text{Cl}_2$ , [**3-(9-MeG)**], ενώ με κόκκινο χρώμα το σύμπλοκο (**3'**). Οι αστερίσκοι επισημαίνουν τις κορυφές δευτερευόντων προϊόντων, τα οποία βρίσκονται σε ποσοστό λιγότερο από 10% στο δείγμα.

Τα χημικά είδη (**3'**) και  $[\text{Pt}(\text{en})(2\text{-rhry})(9\text{-MeG})]\text{Cl}_2$  {[**3-(9-MeG)**]} βρίσκονται σε αναλογία 1:1 όπως προκύπτει από την ολοκλήρωση επιλεγμένων σημάτων στο φάσμα. Στο προϊόν [**3-(9-MeG)**] η ένταξη της 9-μεθυλογουανίνης συμβαίνει μέσω της περισσότερο πυρηνόφιλης θέσης N7, καθώς η παραγωγή HCl κατά την δημιουργία του πενταμελούς δακτυλίου καθιστά το περιβάλλον της αντίδρασης όξινο ( $\text{pD} \approx 5$ ). Επομένως, το N1 παραμένει πρωτονιωμένο και δεν συμμετέχει στην δημιουργία δεσμού ένταξης με τον λευκόχρυσο<sup>70</sup>. Η κορυφή στα 7.21 ppm αντιστοιχίζεται στο πρωτόνιο 9-MeGH8 του [**3-(9-MeG)**] όπως επιβεβαιώνεται και από το σήμα που αντιστοιχίζεται στο φάσμα HSQC για τον C8 της 9-MeG, στα 141.2 ppm (**Εικόνα 3.23**). Το πρωτόνιο αυτό

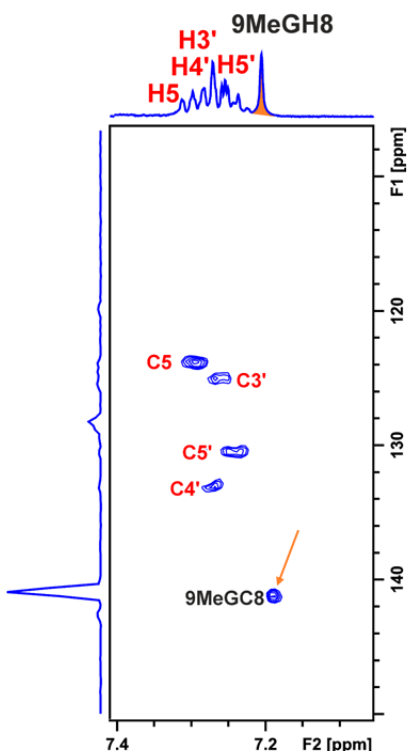
μετατοπίζεται σε χαμηλότερα ppm σε σχέση με την ελεύθερη 9-MeG κατά 0.55 ppm, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί μόνο από έναν προσανατολισμό κάθετο ως προς τον αρωματικό δακτύλιο της 2-φαινυλοπυριδίνης. Ο φαινυλικός δακτύλιος δηλαδή της 2-phry, βρίσκεται πάνω από το πρωτόνιο H8 προσφέροντάς του έτσι ένα πλούσιο ηλεκτρονικό περιβάλλον.



**Εικόνα 3.21:** Αρωματική περιοχή του διδιάστατου φάσματος  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY για το μείγμα του συμπλόκου (3) με την 9-μεθυλογουανίνη (9-MeG) σε 5mM NaCl διαλύματος  $\text{D}_2\text{O}$  στους 310K μετά από τέσσερις ημέρες. Με μαύρο χρώμα επισημαίνεται το προϊόν  $[\text{Pt}(\text{en})(2\text{-phry})(9\text{-MeG})]\text{Cl}_2$ , [3-(9-MeG)], ενώ με κόκκινο χρώμα το σύμπλοκο (3').



**Εικόνα 3.22:** Αρωματική περιοχή του διδιάστατου φάσματος  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY για το μείγμα του συμπλόκου (3) με την 9-μεθυλογουανίνη (9-MeG) σε 5mM NaCl διαλύματος  $\text{D}_2\text{O}$  στους 310K μετά από τέσσερις ημέρες. Με μαύρο χρώμα επισημαίνεται το προϊόν [3-(9-MeG)], ενώ με κόκκινο χρώμα το σύμπλοκο (3').



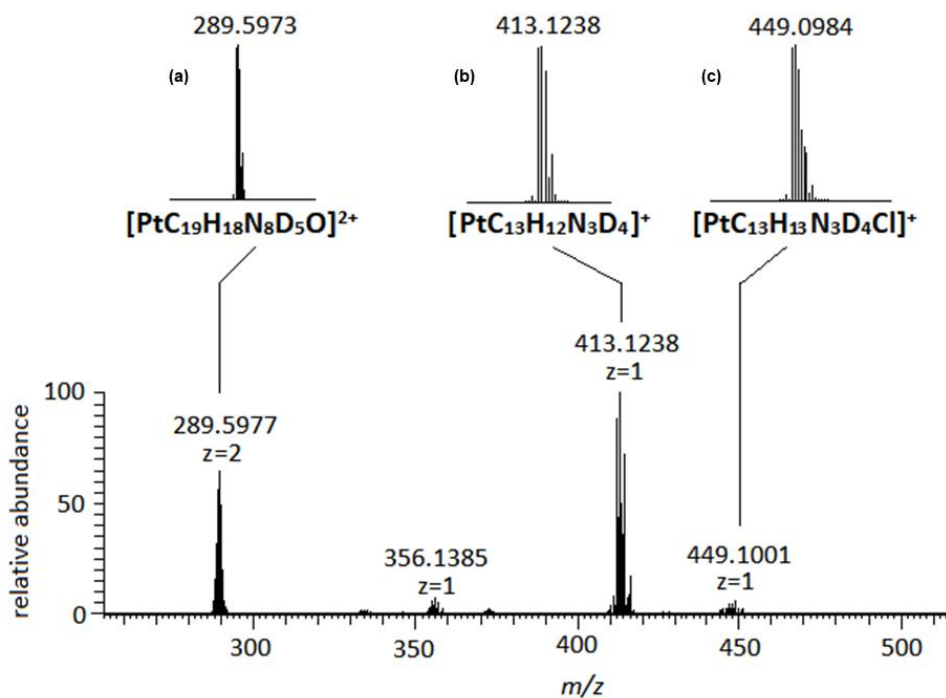
**Εικόνα 3.23:** Τμήμα από την αρωματική περιοχή του διδιάστατου φάσματος HSQC για το μείγμα του συμπλόκου (**3**) με την 9-μεθυλογουανίνη (9-MeG) σε 5mM NaCl διαλύματος D<sub>2</sub>O στους 310K μετά από τέσσερις ημέρες. Με πορτοκαλί χρώμα επισημαίνεται το 9-MeGH8 και 9-MeGC8 του [**3**-(9-MeG)], ενώ με κόκκινο χρώμα το σύμπλοκο (**3'**).

**Πίνακας 3.11:** Χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) των συμπλόκων (**3**), (**3'**) και [**3**-(9-MeG)] σε διαλύτη D<sub>2</sub>O στους 310K.

Ένωση	2-Φαινυλοπυριδίνη (2-phry)									Αιθυλενοδιαμίνη (en)	9-Μεθυλογουανίνη (9-MeG)	
	H3	H4	H5	H6	H2'	H3'	H4'	H5'	H6'	Ha1a2- Hb1b2	H8	HCH <sub>3</sub>
9-MeG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.76	3.65
<b>(3)</b>	7.72	8.07	7.55	8.96	8.10	7.68	7.68	7.68	8.10	2.46-2.41	-	-
<b>(3')</b>	7.92	8.07	7.25	8.46	7.69	7.32	7.31	7.31	-	2.58-2.56	-	-
[ <b>3</b> -(9-MeG)]	8.23	8.15	7.65	9.12	7.64	7.44	7.44	7.44	7.64	2.60-2.55	7.21	3.62

Ο σχηματισμός των συμπλόκων [**3**-(9-MeG)] και (**3'**) στο μείγμα της αντίδρασης επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με την χρήση φασματοσκοπίας μάζας (HR-ESI-MS). Στο φάσμα του μείγματος της αντίδρασης σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.24**, παρατηρούμε υψηλής έντασης κορυφή με λόγο m/z = 413.1238 (θεωρ. m/z = 413.1238), η οποία αντιστοιχίζεται στο

μονοφορτιακό κατιόν  $[\text{PtC}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{D}_4]^+$ . Το τελευταίο αποδίδεται στο σύμπλοκο (**3'**<sub>D4</sub>), στο οποίο φαίνεται πως τα τέσσερα ευκίνητα πρωτόνια των αμινο-ομάδων της αιθυλενοδιαμίνης έχουν ανταλλαχθεί με δευτέριο από τον διαλύτη D<sub>2</sub>O. Ανάλογης έντασης είναι η κορυφή με λόγο m/z = 289.5977 (θεωρ. m/z = 289.5973), η οποία αποδίδεται στο διφορτιακό κατιόν  $[\text{PtC}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{D}_5\text{O}]^{2+}$  με τύπο  $[\text{Pt}(\text{en})(2\text{-phry})(9\text{-MeG})]^{2+}$ . Τέλος, παρατηρούμε μία μικρής έντασης κορυφή με λόγο m/z = 449.1001 (θεωρ. m/z = 449.0984) η οποία αποδίδεται στο κατιόν  $[\text{PtC}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{D}_4\text{Cl}]^+$ , (**3**<sub>D4</sub>), το οποίο προέρχεται από το αρχικό σύμπλοκο στο μείγμα. Συνολικά, τόσο τα θεωρητικώς παραγόμενα φάσματα, όσο και οι ισοτοπικές κατανομές τους, επαληθεύουν τον σχηματισμό των συμπλόκων [**3**-(9-MeG)] και (**3'**<sub>D4</sub>).



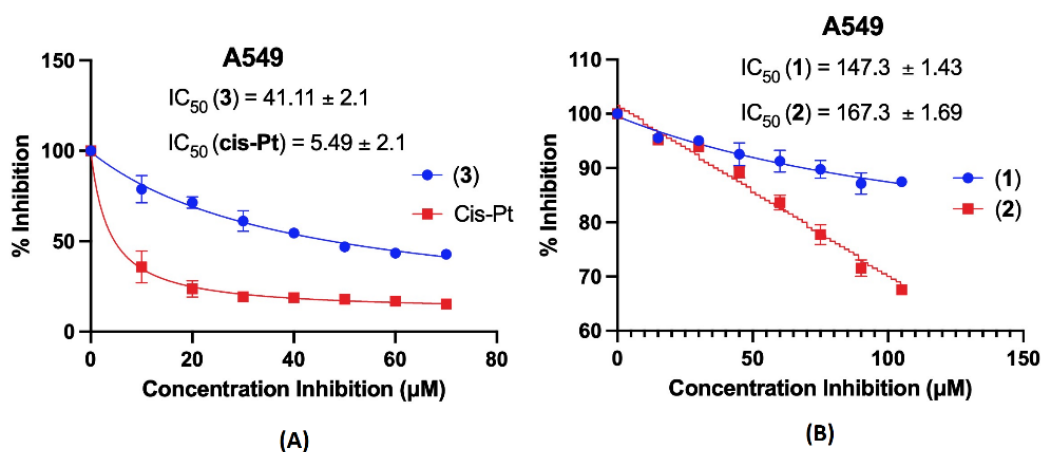
**Εικόνα 3.24:** Φάσμα HR-ESI-MS του μείγματος του συμπλόκου (**3**) με 9-MeG σε διαλύτη D<sub>2</sub>O. Οι κορυφές στο πάνω μέρος αποτελούν τα θεωρητικώς παραγόμενα φάσματα μάζας για τα (a) [**3**-(9-MeG)], (b) **3'**<sub>D4</sub> και (c) **3**<sub>D4</sub>.

### 3.6. Κυτταροτοξική δράση των συμπλόκων (**1**) – (**3**)

Η κυτταροτοξική δράση των συμπλόκων (**1**), (**2**) και (**3**) εξετάστηκε *in vitro* έναντι της κυτταρικής σειράς καρκίνου του πνεύμονα A549 σε περίοδο επώασης 48 ωρών σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην **Ενότητα 2.2.6**. Μεταξύ των τριών συμπλόκων, μόνο το σύμπλοκο (**3**)



επέδειξε σημαντική αντικαρκινική δράση, με την τιμή για το IC<sub>50</sub> του να είναι ίση με 41,11±2,1 μM (Εικόνα 3.25A). Αντιθέτως, τα σύμπλοκα (1) και (2) είναι μάλλον ανενεργά στην ίδια καρκινική σειρά με τιμές IC<sub>50</sub> μεγαλύτερες των 100 μM (Εικόνα 3.25B). Αξίζει να σημειωθεί πως τα ανάλογα σύμπλοκα των (1) και (2) με δύο *cis*- ενταγμένες αμμωνίες (-NH<sub>3</sub>) στην θέση της αιθυλενοδιαμίνης, *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(py)Cl]NO<sub>3</sub> και *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(2-merpy)Cl]NO<sub>3</sub>, εμφανίζουν καλύτερες τιμές IC<sub>50</sub> για την ίδια κυτταρική σειρά, με τιμές 52.1 ± 2.3μM και 50.6 ± 1.7 μM αντίστοιχα<sup>20</sup>. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει πως στα μονολειτουργικά σύμπλοκα λευκοχρύσου (II), ο υποκαταστάτης αιθυλενοδιαμίνη έχει αρνητική επίδραση στην κυτταροτοξικότητά τους. Μελέτη του *enpyriplatin*, {[Pt(en)(py)Cl]Cl}, στην κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου DLD-1 επιβεβαιώνει την παραπάνω υπόθεση με την τιμή IC<sub>50</sub> του να ξεπερνά τα 300 μM<sup>71</sup>. Ωστόσο, η αύξηση του μεγέθους του υποκαταστάτη στο σύμπλοκα (1) έως (3) φαίνεται πως επηρεάζει θετικά την κυτταροτοξική τους δράση. Γενικά, τα σύμπλοκα λευκοχρύσου (II) με ενταγμένες 2-φαινυλοπυριδίνες εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξική δραστηριότητα ακόμα και σε κυτταρικές σειρές που αντιστέκονται στην χρήση του *cisplatin* όπως στην κυτταρική σειρά σαρκώματος S-180<sup>72</sup>. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως η κυτταροτοξική δράση των μονολειτουργικών ενώσεων του Pt(II), γενικά επηρεάζεται από πολλούς άλλους παράγοντες όπως τρόπος σύνδεσης τους στο DNA, ο ρυθμός υδρόλυσης, κλπ.



**Εικόνα 3.25:** (A) Καμπύλη της επί τις εκατό (%) κυτταρικής διαθεσιμότητας συναρτήσεως των συγκεντρώσεων του συμπλόκου (3) και του *cisplatin* (*cis*-Pt) για την κυτταρική σειρά καρκίνου του πνεύμονα A549. (B) Καμπύλη της επί τις εκατό (%) κυτταρικής διαθεσιμότητας συναρτήσεως των συγκεντρώσεων των συμπλόκων (1) και (2) για την ίδια κυτταρική σειρά A549. Οι καμπύλες αφορούν τον μέσο όρο για τις τιμές που προσδιορίστηκαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα.



## **4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**



- I. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τριών νέων μονολειτουργικών συμπλόκων του λευκοχρύσου (II) του τύπου  $[Pt(en)(L)Cl]^+$ , όπου ο υποκαταστάτης L αντιπροσωπεύει μία υποκατεστημένη στην θέση δύο πυριδίνη με H (**1**), Me (**2**) και Ph (**3**). Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR και με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-ESI-MS).
- II. Η μελέτη της υδρόλυσης στους 298K των συμπλόκων (**1**) και (**2**) οδήγησε στο συμπέρασμα πως το μέγεθος της υποκατάστασης του πυριδινικού υποκαταστάτη αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην ταχύτητα της αντίδρασης. Το σύμπλοκο (**2**) έχει μικρότερη σταθερά υδρόλυσης ( $k_{(2)} = 8.69 \pm 0.98 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ) σε σχέση με το σύμπλοκο (**1**) το οποίο υδρολύεται γρηγορότερα ( $k_{(1)} = 2.28 \pm 0.15 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Αντιθέτως, η 2-φαινυλοπυριδίνη στο σύμπλοκο (**3**) παρουσιάζει ιδιαιτερότητα κατά την διάλυση του τελευταίου σε υδατικό μέσο, ο C6' αποπρωτονιώνεται, εντάσσεται στον Pt(II) και δημιουργείται ένας πενταμελής δακτύλιος. Η χημική ισορροπία ανάμεσα στο σύμπλοκο (**3'**) που σχηματίζεται με το αρχικό (**3**) έχει  $K_{eq3} = 0.385 \text{ mM}$  στους 298K. Η αδυναμία ανίχνευσης του ενδιάμεσου υδρολυμένου προϊόντος  $[Pt(en)(2\text{-phry})(D_2O)]^{2+}$ , δεν μας επιτρέπει τον προσδιορισμό της αντίστοιχης σταθεράς ταχύτητας. Συνολικά, οι ρυθμοί υδρόλυσης των δύο συμπλόκων (**1**) και (**2**) συμφωνούν με τις τιμές της βιβλιογραφίας που έχουν βρεθεί για το *phenanthriplatin* ( $k = 0.62 \pm 0.04 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  στους 310 K).
- III. Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων (**1**) και (**2**) με το DNA μελετήθηκε με μοντέλο την γουανοσίνη, ενώ για το σύμπλοκο (**3**) η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο μοντέλο 9-μεθυλογουανίνη για λόγους πολυπλοκότητας του φάσματος με την γουανοσίνη. Η απόδοση των σημάτων NMR για τα σύμπλοκα [**1**-guo], [**2**-guo] και [**3**-(9-MeG)] υποδεικνύει πως η ένταξη της γουανοσίνης και της 9-MeG, γίνεται μέσω του N7.
- IV. Για την διαμόρφωση του σακχάρου για τα σύμπλοκα [**1**-guo] και [**2**-guo], σε ότι αφορά τη θέση *syn*- και *anti*-, παρατηρήσαμε πως η πλατινίωση του N7 της γουανοσίνης αυξάνει την διαμόρφωση *anti*- όπως περίπου συμβαίνει με το *cisplatin*.
- V. Η γρήγορη ισορροπία στην κλίμακα χρόνου του NMR στους 298K μεταξύ των διαμορφομερών  $^2E$  και  $^3E$  μας επέτρεψε τον προσδιορισμό των σχετικών πληθυσμών τους, με την διαμόρφωση  $^3E$  (C3'-*endo*) να είναι επικρατέστερη στο σύμπλοκο [**1**-guo]. Ωστόσο, στην περίπτωση του [**2**-guo] η ισορροπία είναι αργή οδηγώντας στην

εμφάνιση διπλών και διευρυμένων κορυφών για τα πρωτόνια που επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό. Έτσι υπολογίστηκαν οι διαμορφώσεις από την ολοκλήρωση των σημάτων του σακχάρου και βρέθηκε ότι είναι σχεδόν ίσες. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται με ανάλυση του φάσματος του [2-(9-MeG)], όπου η απουσία του τμήματος του σακχάρου οδηγεί στην ύπαρξη μονών σημάτων συντονισμού για τα ίδια πρωτόνια.

- VI. Ο σχετικός προσανατολισμός των ατόμων γύρω από τον δεσμό C4'-C5' δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό στα σύμπλοκα [1-guo] και [2-guo]A. Η μεγαλύτερη διαφορά εντοπίζεται στο [2-guo]B, το οποίο φαίνεται να προτιμά ελαφρώς περισσότερο την (*gt+tg*) διαμόρφωση.
- VII. Η κυτταροτοξική μελέτη των συμπλόκων (1), (2) και (3) έναντι της κυτταρικής σειράς του καρκίνου του πνεύμονα A549, έδειξε πως τα σύμπλοκα (1) και (2) είναι ανενεργά ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ), ενώ το σύμπλοκο (3) εμφανίζει σημαντική κυτταροτοξική ικανότητα με τιμή  $IC_{50} = 41,11 \pm 2,1 \mu M$ . Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως η ύπαρξη ενός υποκαταστάτη L με εκτεταμένο αρωματικό σύστημα και κατάλληλο προσανατολισμό, σε σύμπλοκα του τύπου *cis*-[Pt(en)(L)Cl]NO<sub>3</sub> μπορεί να αυξήσει την κυτταροτοξικότητα αυτών των ενώσεων.



## **5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**





1. Siegel, R. L., Giaquinto, A. N. & Jemal, A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin* **74**, 12–49 (2024).
2. *BIOPHYSICS Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode.*
3. Natarajan, G., Malathi, R. & Holler, E. *Increased DNA-Binding Activity of Cis-1,1-Cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum(II) (Carboplatin) in the Presence of Nucleophiles and Human Breast Cancer MCF-7 Cell Cytoplasmic Extracts: Activation Theory Revisited.* (1999).
4. Weiss, R. B. & Christian, M. C. *New Cisplatin Analogues in Development A Review.* *Drugs* vol. 46 (1993).
5. Johnstone, T. C., Suntharalingam, K. & Lippard, S. J. Third row transition metals for the treatment of cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **373**, (2015).
6. Khan, O. & Protheroe, A. Testis cancer. *Postgraduate Medical Journal* vol. 83 624–632 Preprint at <https://doi.org/10.1136/pgmj.2007.057992> (2007).
7. Jamieson, E. R. & Lippard, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev* **99**, 2467–2498 (1999).
8. Szefer, B. & Czeleń, P. Will the Interactions of Some Platinum (II)-Based Drugs with B-Vitamins Reduce Their Therapeutic Effect in Cancer Patients? Comparison of Chemotherapeutic Agents such as Cisplatin, Carboplatin and Oxaliplatin—A Review. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms24021548> (2023).
9. Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E. & Oun, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions* **39**, 8113–8127 (2010).
10. Oun, R., Moussa, Y. E. & Wheate, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalton Transactions* vol. 47 6645–6653 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c8dt00838h> (2018).
11. Johnstone, T. C., Wilson, J. J. & Lippard, S. J. Monofunctional and higher-valent platinum anticancer agents. *Inorg Chem* **52**, 12234–12249 (2013).
12. Pinto, A. L. & Lippard, S. J. *Sequence-Dependent Termination of in Vitro DNA Synthesis by Cis- and Trans-Diamminedichloroplatinum(II) (Platinum Antitumor Drug/Replication Inhibition/Replication Mapping/DNA Polymerase).* *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* vol. 82 (1985).
13. Cuurei, M. J. & Hoesch, J. D. *Studies on the Antitumor Activity of Group VIII Transition Metal Complexes. Part I. Platinum (II) Complexes\**. *BIOINORGANIC CHEMISTRY* vol. 2 (1973).
14. Macquet, J.-P. & Butour, J.-L. *Platinum-Amine Compounds: Importance of the Labile and Inert Ligands for Their Pharmacological Activities Toward L1210 Leukemia Cells Downloaded From.* vol. 70 <http://jnci.oxfordjournals.org/> (2016).
15. Steven Hollis, L., Amundsen, A. R., Stern, E. W. & Ko-nigsveld, van. ) *International Tables for X-Ray Crystallography. In Biochemical Mechanisms of Platinum Antitumor Drugs* vol. 32 <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (1989).

16. Zhang, S. *et al.* Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res* **66**, 8847–8857 (2006).
17. Lovejoy, K. S. *et al.* *Cis-Diammine(Pyridine)Chloroplatinum(II), a Monofunctional Platinum(II) Antitumor Agent: Uptake, Structure, Function, and Prospects*. [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/) (2008).
18. Lovejoy, K. S. *et al.* Spectrum of cellular responses to pyriplatin, a monofunctional cationic antineoplastic platinum(II) compound, in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* **10**, 1709–1719 (2011).
19. Wang, D., Zhu, G., Huang, X. & Lippard, S. J. X-ray structure and mechanism of RNA polymerase II stalled at an antineoplastic monofunctional platinum-DNA adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9584–9589 (2010).
20. Park, G. Y., Wilson, J. J., Song, Y. & Lippard, S. J. Phenanthriplatin, a monofunctional DNA-binding platinum anticancer drug candidate with unusual potency and cellular activity profile. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11987–11992 (2012).
21. Riddell, I. A., Johnstone, T. C., Park, G. Y. & Lippard, S. J. Nucleotide Binding Preference of the Monofunctional Platinum Anticancer-Agent Phenanthriplatin. *Chemistry - A European Journal* **22**, 7574–7581 (2016).
22. Kellinger, M. W., Park, G. Y., Chong, J., Lippard, S. J. & Wang, D. Effect of a monofunctional phenanthriplatin-DNA adduct on RNA polymerase II transcriptional fidelity and translesion synthesis. *J Am Chem Soc* **135**, 13054–13061 (2013).
23. Almaqwashi, A. A. *et al.* DNA Intercalation Facilitates Efficient DNA-Targeted Covalent Binding of Phenanthriplatin. *J Am Chem Soc* **141**, 1537–1545 (2019).
24. Johnstone, T. C. & Lippard, S. J. The chiral potential of phenanthriplatin and its influence on guanine binding. *J Am Chem Soc* **136**, 2126–2134 (2014).
25. Zhou, W. *et al.* The effect of geometric isomerism on the anticancer activity of the monofunctional platinum complex: Trans -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(phenanthridine)Cl]NO<sub>3</sub>. *Chemical Communications* **54**, 2788–2791 (2018).
26. Gregory, M. T. *et al.* Structural and mechanistic studies of polymerase η bypass of phenanthriplatin DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 9133–9138 (2014).
27. Riddell, I. A., Agama, K., Park, G. Y., Pommier, Y. & Lippard, S. J. Phenanthriplatin acts as a covalent poison of topoisomerase II cleavage complexes. *ACS Chem Biol* **11**, 2996–3001 (2016).
28. Bruno, P. M. *et al.* A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat Med* **23**, 461–471 (2017).
29. Monroe, J. D. *et al.* Article RNA-seq analysis of cisplatin and the monofunctional platinum(II) complex, phenanthriplatin, in A549 non-small cell lung cancer and IMR90 lung fibroblast cell lines. *Cells* **9**, 1–17 (2020).
30. Margiotta, N. *et al.* Sterically hindered complexes of platinum(II) with planar heterocyclic nitrogen donors. A novel complex with 1-methyl-cytosine has a spectrum of activity different from

- cisplatin and is able of overcoming acquired cisplatin resistance. *J Inorg Biochem* **100**, 1849–1857 (2006).
31. Margiotta, N., Savino, S., Gandin, V., Marzano, C. & Natile, G. Monofunctional platinum(II) complexes with potent tumor cell growth inhibitory activity: The effect of a hydrogen-bond donor/acceptor N-heterocyclic ligand. *ChemMedChem* **9**, 1161–1168 (2014).
  32. Wang, F. Y. *et al.* New Platinum(II) agent induces bimodal death of apoptosis and autophagy against A549 cancer cell. *Free Radic Biol Med* **129**, 418–429 (2018).
  33. Rimoldi, I. *et al.* In vitro anticancer activity evaluation of new cationic platinum(II) complexes based on imidazole moiety. *Bioorg Med Chem* **25**, 1907–1913 (2017).
  34. Rimoldi, I. *et al.* Uptake-release by MSCs of a cationic platinum(II) complex active in vitro on human malignant cancer cell lines. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **108**, 111–118 (2018).
  35. Jennette, K. W., Lippard, S. J., Vassiliades, G. A. & Baueri, W. R. *Metallointercalation Reagents. 2-Hydroxyethanethiolato(2,2',2''-Terpyridine)-Platinum(II) Monocation Binds Strongly to DNA By Intercalation (Metal Binding/Supercoiled DNA/Viscosity/Thermal Denaturation/Fluorescence)*. vol. 71 (1974).
  36. Cummings, S. D. Platinum complexes of terpyridine: Interaction and reactivity with biomolecules. *Coordination Chemistry Reviews* vol. 253 1495–1516 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.009> (2009).
  37. Ćočić, D. *et al.* New monofunctional platinum(II) and palladium(II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interaction, and cytotoxic activity. *J Inorg Biochem* **189**, 91–102 (2018).
  38. Martins, E. T. *et al.* Design, synthesis, and biological activity of a novel non-cisplatin-type platinum-acridine pharmacophore. *J Med Chem* **44**, 4492–4496 (2001).
  39. Baruah, H., Rector, C. L., Monnier, S. M. & Bierbach, U. *Mechanism of Action of Non-Cisplatin Type DNA-Targeted Platinum Anticancer Agents: DNA Interactions of Novel Acridinylthioureas and Their Platinum Conjugates*.
  40. Hess, S. M. *et al.* Platinum-acridinylthiourea conjugates show cell line-specific cytotoxic enhancement in H460 lung carcinoma cells compared to cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* **56**, 337–343 (2005).
  41. Ma, Z. *et al.* A non-cross-linking platinum-acridine agent with potent activity in non-small-cell lung cancer. *J Med Chem* **51**, 7574–7580 (2008).
  42. Facchetti, G. & Rimoldi, I. Anticancer platinum(II) complexes bearing N-heterocycle rings. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* vol. 29 1257–1263 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.03.045> (2019).
  43. Gelasco, A. & Lippard, S. J. *Anticancer Activity of Cisplatin and Related Complexes*.
  44. Smyre, C. L., Saluta, G., Kute, T. E., Kucera, G. L. & Bierbach, U. Inhibition of DNA synthesis by a platinum-acridine hybrid agent leads to potent cell kill in nonsmall cell lung cancer. *ACS Med Chem Lett* **2**, 870–874 (2011).

45. Coccè, V. *et al.* In vitro activity of monofunctional pt-ii complex based on 8-aminoquinoline against human glioblastoma. *Pharmaceutics* **13**, (2021).
46. Arzuman, L., Beale, P., Yu, J. Q. & Huq, F. Monofunctional Platinum-containing Pyridine-based Ligand Acts Synergistically in Combination with the Phytochemicals Curcumin and Quercetin in Human Ovarian Tumour Models.
47. 47\_The behavior of chelate groupings attached to paltinum and to palladium.
48. Galanski, M. & Keppler, B. K. *SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NEW ETHYLENEDIAMINE PLATINUM(IV) COMPLEXES CONTAINING LIPOPHILIC CARBOXYLATE LIGANDS.*
49. Tsolis, T., Manos, M. J., Karkabounas, S., Zelovitis, I. & Garoufis, A. Synthesis, X-ray structure determination, cytotoxicity and interactions with 9-methylguanine, of ruthenium(II) η<sup>6</sup>-arene complexes. *J Organomet Chem* **768**, 1–9 (2014).
50. *Binding Sites between Platinum( Ii) and Tiracil Derivntives.*
51. Rochon, F. D. & Morneau, A. *95Pt and <sup>1</sup>H NMR Studies of Platinum(II) Complexes with Ethylenediamine Derivatives.* *MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY* vol. 29 (1991).
52. Kozelka, J. Hydrolysis of chlorido complexes of d8 metals: Old models, new facts. *Inorganica Chim Acta* **495**, (2019).
53. Marti, N., Hui, G., Hoa, B. & Kozelka, J. *I NORGANIC CC HEMISTRY OMMUNICATIONS Reversible Hydrolysis of [ PtCl( Dien) ] + and [ PtCl( NH3) 3] +. Determination of the Rate Constants Using UV Spectrophotometry.* *Inorganic Chemistry Communications* vol. 1 (1998).
54. Mdleleni, M. M., Bridgewater, J. S., Watts, R. J. & Ford, P. C. Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Ortho-Metalated Platinum(II) Complexes The ortho-metalated Pt(II) complexes Pt(ppy)(CO)Cl (1), Pt(pty)(CO)Cl (2), and Pt(ppy)(Hppy)Cl (3) (where ppy and pty are respectively the ortho-C-deprotonated forms of 2-phenylpyridine and 2-p-tolylpyridine and Hppy.
55. Lemaire, D., Fouchet, M.-H. & Kozelka, J. *Effect of Platinum N7-Binding to Deoxy-Guanosine and Deoxyadenosine on the HS and H2 Chemical Shifts. A Quantitative Analysis.*
56. 56\_interaction-of-bis(platinum)-complexes-with-the-mononucleotide-5-guanosine-monophosphate-effect-of (1).
57. Ma, Y., Day, C. S. & Bierbach, U. Synthesis, structure, and reactivity of monofunctional platinum(II) and palladium(II) complexes containing the sterically hindered ligand 6-(methylpyridin-2-yl)acetate. *J Inorg Biochem* **99**, 2013–2023 (2005).
58. Saad, J. S., Scarcia, T., Natile, G. & Marzilli, L. G. Factors influencing conformer equilibria in retro models of cisplatin-DNA adducts as revealed by moderately dynamic (N,N'-dimethyl-2,3-diaminobutane)PtG<sub>2</sub> retro models (G = a guanine derivative). *Inorg Chem* **41**, 4923–4935 (2002).
59. Kim, S.-G., Lin, L.-J. & Reid, B. R. *Determination of Nucleic Acid Backbone Conformation by <sup>1</sup>H NMRt.* *Biochemistry* vol. 31 (1992).

60. Giorgi, T. *et al.* Supramolecular Helices via Self-Assembly of 8-Oxoguanosines. *J Am Chem Soc* **125**, 14741–14749 (2003).
61. Heflich, R. H. & Neft, R. E. *Genetic Toxicity of 2-Acetylaminofluorene, 2-Aminofluorene and Some of Their Metabolites and Model Metabolites. Reviews in Genetic Toxicology* R.H. Heflich, R.E. Neft~Mutation Research vol. 318 (1994).
62. Pless, R., Dudycz, L., Stolarski, R. & Shugar, D. *Purine Nucleosides and Nucleotides Unequivocally in the Syn Conformation'. Guanosine and 5-GMP with 8-Ter/-Butyl and 8-(β-Hydroxyisopropyl) Substituents. Z. Naturforsch* vol. 33 (1978).
63. Polissiou, M. & Theophanides, T. *NMR and FT-IR Conformational Studies of Substituted Guanine Nucleosides and Nucleotides and Their Metal Adducts and Cancer\**. *Inorganica Chimica Acta* vol. 137 (1987).
64. Garoufis, A., Hatiris, J. & Hadjiliadis, N. *Ternary Complexes of Pt (II) With Guanosine and Amino Acids of the Type Trans-[(Guol), Pt (Amach) Cl, Where Amach Is Glycine, L-Alanine, L-Valine, and L-Isoleucine.*
65. Binary and Ternary Katsarou.
66. Cheng, D. M. & Sarma, R. H. *Nuclear Magnetic Resonance Study of the Impact of Ribose a'-O-Methylation on the Aqueous Solution Conformation of Cytidylyl-(3'-\*5')-Cytidine. BIOPOLYMERS* vol. 16 (1977).
67. den HARTOG, J. H. J. *et al.* Cis-Platinum Induced Distortions in DNA: Conformational Analysis of d(GpCpG) and cis-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(GpCpG)}, Studied by 500-MHz NMR. *Eur J Biochem* **134**, 485–495 (1983).
68. O S C ~ O S Polissiou, M., Phan, M. T., St-Jacques, M. & Theophanides, T. *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Studies of Platinum(II)-Guanosine-5'-Monophosphate Interactions in Aqueous Solutions.*
69. Kim, C. H. & Sarma, R. H. *Kim Sarma / Spatial Configuration of MRNA 5' Terminus Spatial Configuration of the Bizarre 5' Terminus of Mammalian MRNA1.*  
<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
70. Brandi-Blanco, P. *et al.* Expanding the pH range of Metal-nucleobase complexes for acid-base chemistry: Properties of bis(guanine) complexes of (bpy)PtII with Either two major or major and minor tautomers bonded simultaneously. *Inorg Chem* **48**, 5208–5215 (2009).
71. Graziotto, M. E. *et al.* The influence of the ethane-1,2-diamine ligand on the activity of a monofunctional platinum complex. *J Inorg Biochem* **177**, 328–334 (2017).
72. El-Mehasseb, I. M. *et al.* *Platinum (II) Complex with Cyclometalating 2-Phenylpyridine Ligand Showing High Cytotoxicity against Cisplatin-Resistant Cell. Journal of Inorganic Biochemistry* vol. 84 [www.elsevier.nl/locate/jinorgbio](http://www.elsevier.nl/locate/jinorgbio) (2001).