

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

**«ΣΧΕΔΙΑΣΗ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ
ΜΟΡΙΑ»**

ΛΙΤΣΑ ΦΩΤΕΙΝΗ

Υπευθ.Καθηγητής : **Α .Γ. Κουτσολέλος**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
2008

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας των Ενώσεων Συναρμογής του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κρήτης. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας για το γεγονός ότι με δέχθηκε ως μεταπτυχιακό φοιτητή.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή Αθανάσιο Κουτσολέλο ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριο του ως μεταπτυχιακό φοιτητή. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την εργασία αυτή, για την ανεξαρτησία στο χειρισμό θεμάτων που αφορούσαν την πορεία της ερευνητικής μου δουλειάς, τη συνεχή ενθάρρυνση, καθώς και τις διάφορες συμβουλές που μου παρείχε, για ένα ευρύ πεδίο θεμάτων.

Ευχαριστώ επίσης τους καθηγητές Τρίκαλίτη Παντελή και Τοκατλίδη Κωνσταντίνο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Εξεταστική επιτροπή μου. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς συναδέλφους μου, για την φιλία και την άψογη συνεργασία που επικρατούσε στους χώρους του πανεπιστημίου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να αναφερθώ στους συναδέλφους του εργαστηρίου (μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς) για το μοναδικό κλίμα φιλίας και συνεργασίας που αναπτύξαμε. Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Γιώργο Χαραλαμπίδη για τη πολύτιμη βοήθειά του όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης την Μαρία Μαρκετάκη για την ηθική της συμπαράσταση, τις συμβουλές και την φιλία της. Ευχαριστώ ακόμη την συνάδελφο Γαλάτεια, την Αγγελική και την Χριστίνα για την άψογη συνεργασία και το υπέροχο κλίμα που είχαμε δημιουργήσει στο χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την αγάπη και την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Ευάγγελο και Ευθυμία, στην αδελφή μου Αργυρώ, και στον Αντώνη, για την κατανόηση και την ενθάρρυνση τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ

Α)ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ 5

Β)ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ 7

2.ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΑ ΟΞΕΑ

Α)ΕΙΣΑΓΩΓΗ 10

Β)ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 11

Γ)ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 13

3.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 14

4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 16

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ-ΣΥΝΘΕΣΗ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α)ΙΣΤΟΡΙΚΟ 22

Β)ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ 22

2.ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΣΤΕΡΑ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ

Α)ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗΣ ΒΕΝΖΑΛΔΕΥΔΗΣ 25

Β)ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ 26

Γ)ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΣΤΕΡΩΝ ΤΩΝ ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ 29

3.ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ ΜΕ ΟΜΑΔΑ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Α)ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΒΟΞΙΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ 31

Β)ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ 32

Γ)ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΥΡΙΔΙΝΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ 34

4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ-ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ	
Α) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	38
Β) ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ	39
Γ) ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΟ ΡΕΥΜΑ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ	40
Δ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	43
2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ – ΟΡΑΤΟΥ	
Α) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	51
Β) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	54
3. ΔΟΝΗΤΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	
Α) ΓΕΝΙΚΑ	60
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ ΙΙΙ	64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV – ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

1. ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	
Α) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	67
Β) ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ PDT	70
Γ) ΙΔΑΝΙΚΟΣ ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΗΣ	74
2. ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗ LDL	
Α) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	76
Β) ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ LDL	79
3. ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ	
Α) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	84

B) ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ	86
Γ) ΕΝΑΡΞΗ ΒΛΑΒΗΣ	87
4. ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ – LDL ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ – ΟΡΑΤΟΥ	
A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	91
B) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	91
Γ) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	102
5. ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ – LDL ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	
A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	104
B) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	104
Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	109
6. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ ΜΕ LDL ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Α	
A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	110
B) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	110
Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	113
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ IV	114
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	117

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

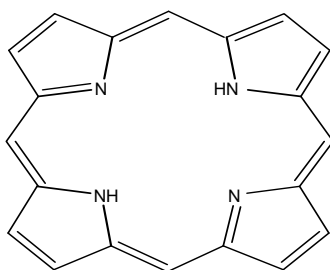
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ

Α) ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι πορφυρίνες και τα παράγωγα τους είναι από τα πιο ευρέως μελετημένα μακροκυκλικά συστήματα. Γεγονός που οφείλεται τόσο στις χημικές και φυσικές ιδιότητες τους, όσο και στο σημαντικό ρόλο που παίζουν σε διάφορα βιολογικά συστήματα. Όπως ήδη γνωρίζουμε η αιμοσφαιρίνη και η μυοσφαιρίνη βοηθούν στη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς, οι χλωροφύλλες στη φωτοχημική μεταφορά των ηλεκτρονίων μέσα στα φωτοσυστήματα των φυτών ενώ άλλες έχουν χρησιμοποιηθεί σαν φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία. Επίσης έχει αναφερθεί ότι οι μεταλλοπορφυρίνες έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες.

Οι πορφυρίνες είναι τετραπυρρολικά κυκλικά συζυγιακά συστήματα που έχουν σαν βασική δομική μονάδα το πυρρόλιο. Τα τέσσερα πυρρόλια είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με γέφυρες άνθρακα. Η δομή του βασικού μακροκυκλικού δακτυλίου ονομάζεται “πορφίνη” σύμφωνα με την ονοματολογία του Fisher που αναπτύχθηκε στις δεκαετίες του '20 και του '30. Αργότερα όμως ο Corwin υιοθέτησε για το σύστημα της πορφυρίνης την ονομασία “πορφυρίνη”, το οποίο επικρατεί μέχρι σήμερα (Σχήμα 1).



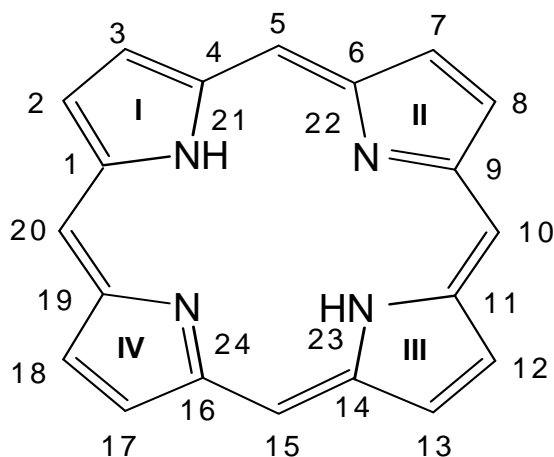
Σχήμα 1: Πορφίνη

Το μόριο της πορφυρίνης θεωρείται επίπεδο όμως δύο από τους πυρρολικούς δακτυλίους είναι στραμμένοι προς τα κάτω, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα αζώτου να είναι εκτός επιπέδου. Η απόσταση του πυρρολικού αζώτου από το κέντρο του δακτυλίου είναι 2,04 Å, ενώ το μήκος του δεσμού μετάλλου-αζώτου στις μεταλλοπορφυρίνες διαφέρει. Οι πορφυρίνες παρουσιάζουν πολύ υψηλή συζυγία λόγω του συστήματος των 18 π-ηλεκτρονίων που περιέχουν στην περιφέρεια του μορίου και γι αυτό το λόγο οι πορφυρίνες και τα παράγωγα τους είναι έντονα χρωματισμένα. Οι φυσικές πορφυρίνες είναι αρκετά σταθερές ακόμη και σε ισχυρά όξινο περιβάλλον, ενώ σε βασικά διαλύματα δίνουν πολυμοριακά συστήματα. Ο πορφυρινικός δακτύλιος μπορεί να δράσει τόσο ως οξύ όσο και ως βάση. Ισχυρές βάσεις, όπως τα αλκοξειδία, είναι δυνατόν να αποσπάσουν τα δύο πρωτόνια, των εσωτερικών ατόμων αζώτου τα οποία όμως μπορούν παράλληλα και να πρωτονιωθούν πολύ εύκολα υπό την επίδραση κάποιου οξέος, για παράδειγμα τρίφθορο οξικό οξύ.

Οι πορφυρίνες υπακούουν στον κανόνα του Hückel και εμφανίζουν αρωματικό χαρακτήρα. Όσον αφορά στην χημεία τους, παρέχουν έναν μεγάλο αριθμό χημικών αντιδράσεων, χαρακτηριστικές των αρωματικών ενώσεων. Για παράδειγμα οι πορφυρίνες, συμμετέχουν πολύ συχνά σε αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης των μεθινικών και των πυρρολικών πρωτονίων. Οι υποκαταστάτες αυτοί μπορούν στη συνέχεια να τροποποιηθούν γεγονός στο οποίο στηρίζεται η ύπαρξη πολλών και διαφορετικών πορφυρινικών ενώσεων. Επιπλέον, ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των πορφυρινών είναι η ικανότητα εισαγωγής ή και απομάκρυνσης ενός μετάλλου στην πορφυρινική κοιλότητα.

B) ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

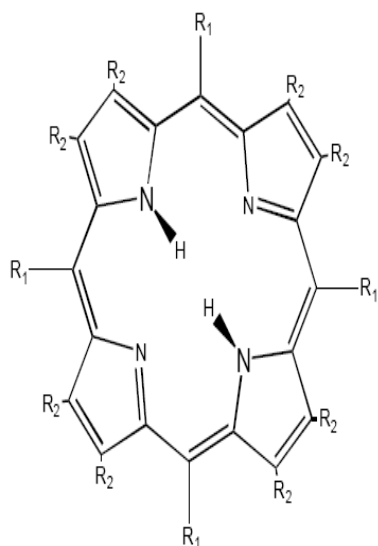
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η δομή του βασικού πορφυρινικού δακτυλίου ονομάστηκε ‘πορφίνη’ κατά Fisher. Αργότερα όμως ο Corwin το 1943 υιοθέτησε για το σύστημα της πορφυρίνης την ονομασία ‘πορφυρίνη’ και καθιέρωσε ένα τρόπο αρίθμησης των ατόμων που επικρατεί μέχρι σήμερα (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Αρίθμηση κατά Corwin

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα η αρίθμηση των ατόμων άνθρακα, ξεκινάει από το πρώτο άτομο άνθρακα του πυρρολικού δακτυλίου που βρίσκεται δίπλα στο πυρρολικό άζωτο και επεκτείνεται περιφερειακά και προς τα δεξιά.

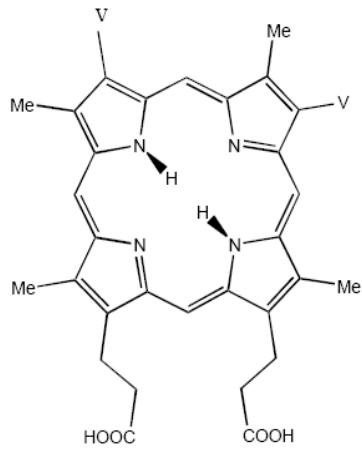
Οι διάφορες πορφυρίνες θεωρούνται παράγωγα της πορφυρίνης που προκύπτουν με αντικατάσταση των έξω-υδρογόνων (2,3,7,8,12,13,17,18) που είναι γνωστές ως β-υποκατεστημένες ή των μεθυνικών υδρογόνων (5,10,15,20) ως meso-υποκατεστημένες (οι θέσεις 1,4,6,9,11,14,16,19 είναι γνωστές ως α-υποκατεστημένες (σχήμα 3).



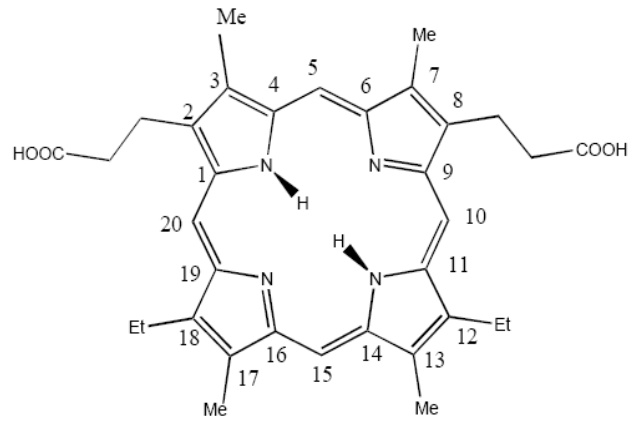
R ₁	R ₂	Σύμβολο
	H	(TMP)H ₂
	H	(TPP)H ₂
	H	(T-oMePP)H ₂
	H	(TPyP)H ₂
	H	(TpFPP)H ₂
	H	(T-pMePP)H ₂
H	Cl	(β-Cl ₈ TPP)H ₂

Σχήμα 3: Διάφορες υποκατεστημένες πορφυρίνες και οι συντομογραφίες τους .

Παρατηρούμε λοιπόν ότι αναγκαία η ανάπτυξη ενός άλλου συστήματος ονοματολογίας, πιο εύχρηστου. Για παράδειγμα η πρωτοπορφυρίνη IX ονομάζεται πρωτοπορφυρίνη και η μεσοπορφυρίνη V ονομάζεται 12,18-διέθυλ-3,7,13,17-τετράκις-μεθυλοπορφυρίνη-2,8-διπρωπιονικό οξύ.



Πρωτοπορφυρίνη IX



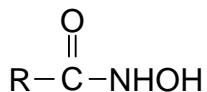
Μεσοπορφυρίνη V

ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΑ ΟΞΕΑ

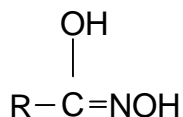
A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα υδροξαμικά οξέα έγιναν γνωστά στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, όμως οι ιδιότητες τους και οι εφαρμογές τους για να μελετηθούν χρειάστηκε μια εκατονταετία. Πιθανολογείται ότι η ανάπτυξη της χημείας αυτών των ενώσεων καθυστέρησε εξαιτίας της δυσκολίας προσδιορισμού της δομής τους. Ένα παράδειγμα που δείχνει πόσο ασαφής ήταν η βιβλιογραφία της εποχής πάνω στις ενώσεις αυτές βρίσκεται στον τόμο 56 του περιοδικού *Chemical Abstracts*, όπου ο οδηγός για την ονοματολογία, αναφέρει και τις δύο ταυτομερείς μορφές των υδροξαμικών οξέων σαν «υδροξαμικά οξέα».

Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο χώρο της χημείας αζωτούχων ενώσεων, όπως του Smith και του Exner, ο όρος «υδροξαμικό οξύ» χρησιμοποιήθηκε για να εκφράσει τα N-ακυλιωμένα παράγωγα της υδροξυλαμίνης με τη δομή που παρουσιάζεται παρακάτω



ενώ η αντίστοιχη ταυτομερής μορφή του εκφράζεται με τον όρο «υδροξαμικό όξυ» με τη παρακάτω δομή



Παρόλο που πολλά υδροξαμικά παράγωγα είναι γνωστά, τα ελεύθερα υδροξαμικά οξέα αποτελούν μόνο ένα ελάχιστο συστατικό του μίγματος ισορροπίας των δύο αυτών ταυτομερών μορφών.

Η διευκρίνηση των ξεχωριστών ταυτοτήτων μιας ευρείας ποικιλίας άκυλο- υδροξυλαμινικών παραγώγων, ήταν μία εξαιρετικά επίπονη και

πολύπλοκη εργασία, διότι εκτός από τον σημαντικό αριθμό δομικών τύπων που έπρεπε να ερευνηθούν, οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις βρίσκονται σε διάφορους πολυμορφικούς κρυσταλλικούς σχηματισμούς, καθώς επίσης σε ταυτομέρεια και γεωμετρική ισομέρεια. Το μεγαλύτερο μερίδιο αυτής της εργασίας πρέπει να αναγνωριστεί στον W. Lossen και τους μαθητές του, οι οποίοι κατάφεραν να χαρακτηρίσουν επιτυχώς τις περισσότερες δομές κατά τη διάρκεια του τελευταίου τέταρτου του 19^{ου} αιώνα, χωρίς το πλεονέκτημα των φασματοσκοπικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται σήμερα.

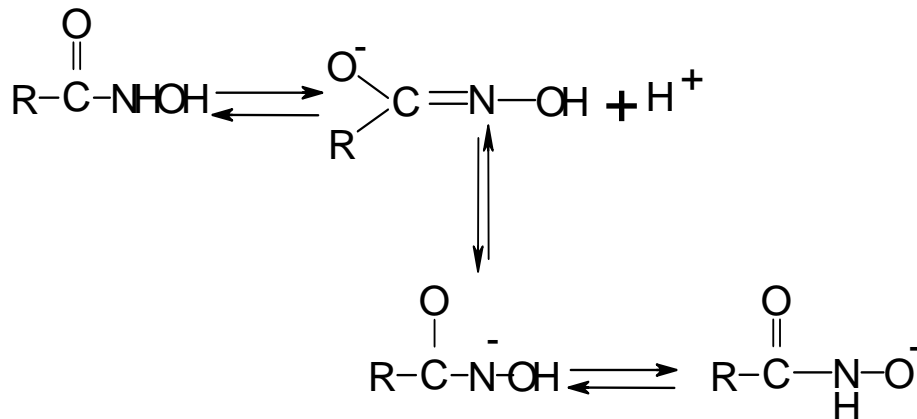
B) ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Τα μη υποκατεστημένα υδροξαμικά οξέα είναι στερεά, διαλυτά στο νερό (όταν το μέγεθος τους δεν ξεπερνά τους έξι άνθρακες) και σχεδόν αδιάλυτα στον αιθέρα (όταν είναι μικρά). Αν ληφθεί υπ' όψιν η κατανομή των ηλεκτρονίων παρατηρείται ότι υπάρχουν διάφορες θέσεις στις οποίες οι ενώσεις αυτές μπορούν να δράσουν σαν πυρηνόφιλα αντιδραστήρια. Είναι ασθενή οξέα, ενώ σαν πολύ ασθενείς βάσεις, μπορούν να σχηματίσουν άλατα με ισχυρά οξέα σε μη υδατικά διαλύματα.

Η οξύτητα των υδροξαμικών οξέων είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτή των καρβοξυλικών οξέων. Στην πραγματικότητα, οι τιμές pK_a των υδροξαμικών οξέων καταλαμβάνουν ένα ευρύ πεδίο, από 7,05 για το ο-νιτροβενζοϋδροξαμικό οξύ, έως 11,33 για το N-φαινυλο-n-βουτυροϋδροξαμικό οξύ. Οι τιμές αυτές επηρεάζονται κυρίως από την εισαγωγή ομάδων που προκαλούν αρνητικό ή θετικό επαγωγικό φαινόμενο, την υποκατάσταση του φαινυλικού δακτυλίου και τη σύνδεση διαφόρων συζυγιακών συστημάτων στη λειτουργική καρβονυλική ομάδα. Κατ' αυτό τον τρόπο υποκαταστάτες όπως η νίτρο- ομάδα, το χλώριο ή το φθόριο που

έχουν αρνητικό επαγωγικό φαινόμενο μειώνουν τις τιμές του pK_a , ενώ η μεθυλική ομάδα αντίθετα αυξάνει τις του pK_a , λόγω του θετικού επαγωγικού φαινομένου που προκαλεί. Ακόμα, από τις τιμές pK_a έχει παρατηρηθεί ότι τα μη κορεσμένα N-άρυλο υδροξαμικά οξέα είναι ισχυρότερα οξέα από τις αντίστοιχες κορεσμένες ενώσεις.

Ο ιονισμός των των υδροξαμικών οξέων είναι λίγο περίπλοκος, διότι παρόμοιας τάξης μεγέθους οξύτητα με τα ελεύθερα οξέα έχουν και οι εστέρες και τα N-άλκυλο παράγωγα τους . Και ενώ οι τιμές pK_a των υδροξαμικών οξέων είναι τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από αυτές των υδροξυμικών οξέων, οι N,O-διακυλοϋδροξυλαμίνες είναι αρκετά ισχυρότερα οξέα από τα υδροξαμικά. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι όξινες ιδιότητες των υδροξαμικών οξέων συνδέονται και με το υδρογόνο της «υδροξυλάμινο» υδροξυλικής ομάδας και με το υδρογόνο με το άτομο αζώτου. Ο ιονισμός των υδροξαμικών οξέων αποτυπώνεται στο παρακάτω σχήμα :



Σχήμα 4 : Ιονισμός των υδροξαμικών οξέων

Το κυριότερο μονοπάτι μεταβολισμού των περισσότερων υδροξαμικών οξέων, έπειτα από πειράματα *in vitro* και *in vivo*, φαίνεται να είναι η υδρόλυση τους προς τα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα.

Γ) ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Το ενδιαφέρον των επιστημόνων πάνω στα υδροξαμικά οξέα άρχισε να αυξάνεται κυρίως χάρη στη μελέτη της κυκλοσερίνης (D-4-άμινο-3-ισοξαζολιδόνης, «οξαμυκίνης»), των σιδηροχρωμικών, της επιτάχυνσης της υδρόλυσης οργανικών φθοροφωσφορικών και φθοροφωσφονικών ενώσεων όπως η σαρίνη (ισοπρότυλο μεθυλφώσφονο-φθορίδιο), ποικίλων εφαρμογών στην αναλυτική χημεία (βασισμένων στο χαρακτηριστικό χρώμα που σχηματίζεται κατά την αντίδραση των υδροξαμικών οξέων με διαλύματα σιδηροχλωριδίων) και των χρήσεων τους σαν αντιδραστήρια επίπλευσης. Κατ' αυτόν τον τρόπο η κύρια χρήση των υδροξαμικών οξέων για πολλά χρόνια ήταν σαν αντιδραστήρια ανίχνευσης διαφόρων μεταλλικών ιόντων στη σταθμική και φασματοφωτομετρική ανάλυση. Οι πιο πρόσφατες ανακαλύψεις όμως στις ιδιότητες συναρμογής τους έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των μελετών σε βιολογικές εφαρμογές και κυρίως στο ρόλο τους ως αντιδραστήρια μεταφοράς σιδήρου. Για παράδειγμα, η δεσφερριοξαμίνη, ένα φυσικό τριυδροξαμικό οξύ, χρησιμοποιείται στη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από υπερσιδήρωση και πιο συγκεκριμένα ανθρώπων που έχουν AIDS, η αδυναμία δράσης τους κατά τη χορήγηση τους από το στόμα και ο μικρός βιολογικός χρόνος ζωής περιορίζουν τη παραπάνω χρήση του. Άλλες εφαρμογές των υδροξαμικών οξέων σήμερα είναι σαν συστατικά σε διάφορα αντιβιοτικά και αντιμυκητιακά αντιδραστήρια, σαν αναστολείς καρκινικών κυττάρων, σαν παράγοντες ανάπτυξης, σαν αναστολείς της λιποξυγενάσης ή παράγοντες κυτταρικής διαίρεσης ακόμα και σαν πρόσθετα τροφίμων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η χοληστερόλη ή κοινώς χοληστερίνη είναι μια λιπαρή ουσία απαραίτητη στον οργανισμό, που συμμετέχει στη λειτουργία των κυττάρων και των ορμονών. Όμως η **υπερβολική αύξηση της στο αίμα** και η εναπόθεσή της στα τοιχώματα των αρτηριών είναι επικίνδυνη, γιατί δημιουργεί **αθηρωματικής πλάκας**. Ένα μεγάλο μέρος της χοληστερόλης παράγεται από τον ίδιο τον οργανισμό, στο **συκώτι**. Επιπλέον, προσλαμβάνουμε χοληστερόλη και από ορισμένα τρόφιμα, όπως τα αυγά, το κρέας, τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η χοληστερόλη εναποτίθεται στα τοιχώματα των αγγείων, ιδίως των στεφανιαίων αγγείων της καρδιάς, σχηματίζοντας την αθηρωματική πλάκα, με συνέπεια:

- την **ελάττωση** του εύρους των αρτηριών
- τη **μείωση** της παροχής αίματος στον μυϊκό ιστό της καρδιάς,
- το **σχηματισμό θρόμβων** και αποφράξεων των στεφανιαίων αγγείων, με αποτέλεσμα την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Η χοληστερόλη μεταφέρεται στο αίμα με τη βοήθεια ενώσεων που λέγονται **λιποπρωτεΐνες**. Ορισμένες από αυτές ευνοούν το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας και ανήκουν σ' αυτήν την κατηγορία που ονομάζουμε **κακή χοληστερόλη** ή **LDL-χοληστερόλη**. Άλλες δρουν **προστατευτικά**, βοηθώντας την εξαφάνιση της πλεονάζουσας χοληστερόλης μέσα στα κύτταρα, και ανήκουν στην κατηγορία που ονομάζουμε καλή χοληστερόλη ή **HDL-χοληστερόλη**. Η **αθηρωματική πλάκα** είναι σήμερα μια από τις σημαντικότερες απειλές του ανθρωπίνου γένους, Πολλές ομάδες ερευνητών άλλαξαν τον προσανατολισμό των ερευνών τους και ασχολούνται πλέον με την μελέτη αυτής. Ένας τρόπος αντιμετώπισης αυτής της ασθένειας είναι με τη βοήθεια της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Η ικανότητα της LDL να αλληλεπιδρά με φωτοευαίσθητοποιητές έχει εξεταστεί σε διάφορες μελέτες. Οι πληροφορίες όμως που έχουμε για την αλληλεπίδραση της LDL με πορφυρίνες είναι ανεπαρκής.

Η παρούσα εργασία σχετίζεται με την αναζήτηση νέων φωτοευαίσθητων μορίων ικανών να ενώνονται με την LDL, μέσω της οποίας στη συνέχεια θα μεταφέρονται με τη βοήθεια του αίματος στο σημείο που έχει δημιουργηθεί η αθηρωματική πλάκα. Η βλάβη θα αποκαθιστάται με φωτοδυναμική θεραπεία αφού οι ουσίες που παρήχθησαν, οι πορφυρίνες, είναι φωτοευαίσθητες. Χρησιμοποιήσαμε παράγωγα πορφυρινών, τα υδροξαμικά οξέα, και επικεντρωθήκαμε στη μελέτη χημικής αλληλεπίδρασης αυτών με την LDL .

Το πρώτο μέρος της εργασίας αφορά τη σύνθεση των ενώσεων, οι οποίες είναι μέλη επιλεγμένα από μια ευρύτερη σειρά πορφυρινικών παραγώγων. Η σειρά αυτή περιλαμβάνει πορφυρίνες, οι οποίες είναι υποκατεστημένες στις μέσο- θέσεις με πυρίδινο- και φαίνυλο- ομάδες, ενώ οι ομάδες των υδροξαμικών οξέων που φέρουν συνδέονται με τη μεσολάβηση μιας αλειφατικής αλυσίδας 4-ανθράκων σε μία από τις θέσεις υποκατάστασης των φαινυλίων. Στο δεύτερο μέρος περιλαμβάνεται ο φυσικοχημικός προσδιορισμός των ενώσεων, όπου γίνεται χρήση των φασματοσκοπικών τεχνικών UV-Vis, φθορισμού και NMR. Το τρίτο μέρος αναφέρεται στη βιοχημική μελέτη των ενώσεων που επιλέχθησαν. Αποσαφηνίζεται με διάφορες μεθόδους ο τρόπος αλληλεπίδρασης της πορφυρίνης με την LDL . Το τελευταίο μέρος της εργασίας περιέχει τα συμπεράσματα και ορισμένες παρατηρήσεις που έγιναν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. D. Dolphin, "*The Porphyrins*", **1978**, Academic Press, Vol. 1-8
2. Jasat, D. Dolphin, *Chem.Rev.*, **1997**, 97, 2267
3. D. Dolphin, *The Porphyrins*, **1978**, Academic Press, Vol. 1
4. "*Porphyrins and Metalloporphyrins*", Elsevier Scientific Publishing Company, **1975**, 2-28
5. J. A. S. Cavaleiro, A. M. d' A. Rocha Consalves, G. W. Kenner, K. M. Smith, *J. Chem. Soc. Trans. I*, **1973**, 2471
6. F. Hoppe-Seyler, *Phys. Chem.*, **1987-1988**, 1, 121
7. H. Corwin, *Organic Chemistry*, **1943**, Vol. II, 1272, Willey, New York
8. IUPAC, *Nomenclature Of Organic Chemistry*, **1979**, Pergamon
9. G. P. Moss, "*Nomenclature of tetrapyrroles*", *Pure Appl. Chem.*, **1987**, 59, 779
10. J. J. R. Frausto da Silva, R. J. P. Williams, "*The Biological Chemistry of Elements*", **1998**, Oxford University Press, New York
11. R. J. Fiel, J. C. Howard, E. H. Mark, N. Datta Gupta, *Nucleic Acids Res.*, **1979**, 6, 3093
12. J. C. Wang, *J. Mol. Biol.*, **1974**, 89, 783
13. E. J. Gibbs, R. F. Pasternack, *Seminars in Hematology*, **1989**, 2, 77
14. R. F. Pasternack, E. J. Gibbs, "*Metal Ions in Biological Systems*", **1996**, A. Sigel and H. Sigel eds. Marcel Decker, Inc., New York, 33, 367
15. M. J. Carvlin, E. Mark, R. J. Fiel, J. C. Howard, *Nucleic Acids Res.*, **1983**, 11, 6141

16. N. E. Mukundan, G. Pethö, D. W. Dixon, M. S. Kim, L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 4676
17. E. J. Gibbs, Tinoco Jr., M. F. Maestre, P. A. Ellinas, R. F. Pasternack, *Biochem. Biophys. Res. Chem. Comm.*, **1988**, 24, 350
18. M. A. Sari, J. P. Battioni, D. Dupre, D. Mansuy, J. B. Le Pecq, *Biochem.*, **1990**, 29, 4205
19. C. Verchere-Beaur, M. Perre-Fauvet, E. Tarnaud, G. Anneheim-Herbelin, N. Bone, A. Gaudemer, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 13589
20. W. Lossen, *Ann. Chem.*, **1869**, 150, 314
21. Sandler & Karo, "*Organic Functional Group Preparation (III)*", **1972**, Academic Press, NY and London, 406-411
22. O. Exner, *Dan. Tidsskr. Farm.*, **1968**, 42, 145
23. *Chem. Abstr.*, **1962**, 56, 30N
24. *Chem. Abstr.*, **1962**, 56, 52N
25. P. A. S. Smith, "*The Chemistry of Open Chain Organic Nitrogen Compounds*", **1966**, Vol. 2, p.68, Benjamin, New York
26. W. Lossen, *Ann. Chem.*, **1895**, 281, 176
27. M. A. Stolberg, W. A. Mosher, T. Wagner-Jauregg, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 2615
28. J. B. Summers, B. P. Gunn, H. Mazdiyasni, A. M. Goetze, P. R. Young, J. B. Bouska, R. D. Dyer, D. W. Brooks, G. W. Carter, *Med. Chem.*, **1978**, 30, 2121
29. S. X. Peng, M. J. Strojnowski, J. K. Hu, B. J. Smith, T. H. Eihold, K. R. Wehnemeyer, S. Pikul, N. J. Almstead, *J. of Chromatogr. B*, **1999**, 724, 181
30. "*Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids*", **1982**, ed. H. Kehl, Karger, New York

- 31.E. Farkas, D. A. Brown, R. Cittaro, W. K. Glass, *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, **1993**, 3903
- 32.D. A. Brown, R. A. Coogan, N. J. Fitzpatrick, W. K. Glas, D. E. Abukshima, L. Shiels, M. Ahlgren, K. Smolander, T. T. Pakkanen, T. A. Pakkanen, M. Perakyla, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1996**, 2673
- 33.A. J. Stemmler, J. W. Kampf, M. L. Kirk, V. L. Pecoraro, *J. Am.Chem. Soc.*, **1995**, 117, 6368
- 34.D. A. Brown, A.L. Roche, T. T. Pakkanen, T. A. Pakkanen, K. Smolander, *J. Chem. Soc. Commun.*, **1982**, 676
- 35.M. Julien-Pouzol, S. Jaulmes, P. Laruelle, S. Carvalho, E. D. Paniago, *Acta Crystallogr., Sect. C*, **1985**, 41, 712
- 36.C. O. B. de Miranda-Pinto, E. B. Paniago, S. Carvalho, M. Tabak, A. P. Mascarenhas, *Inorg. Chim. Acta*, **1987**, 137, 145
- 37.T. T. Pakkanen, T. A. Pakkanen, K. Smolander, D. A. Brown, W. K. Glas, A. L. Roche, *J. Mol. Struct.*, **1987**, 162, 313
- 38.T. Glowiak, B. Kurzak, *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.*, **1992**, 22, 341
- 39.M. S. Lah, V. L. Pecoraro, *Comments Inorg. Chem.*, **1990**, 11, 59
- 40." B. Chatterjee, *Coord. Chem. Rev.*, **1978**, 26, 281
- 41.G. M. Steinberg, R. Swidler, *J. Org. Chem.*, **1965**, 30, 2362
- 42.F. A. Kuehl, Jr., F. J. Wolf, N. R. Trenner, R. L. Peck, R. P. Buhs, E. Howe, I. Putter, B. D. Hunnewell, R. Ormond, G. Downing, J. E. Lyons, E. Newstead, L. Chaiet, K. Folkers, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 2344
- 43.T. Emery, J. B. Neilands, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 3658
- 44.B.E. Hackley, Jr., R. Plapinger, M. Stolberg, T. Wagner-Jauregg, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 3651
- 45.H. L. Yale, *Chem. Rev.*, **1943**, 33, 209

- 46.F. Mathis, *Sci. Math. Sci. Phys.*, **1961**, 25, 125
- 47.B. Kurzak, H. Kozlowski, E. Farkas, *Coord. Chem. Rev.*, **1992**, 114, 169
- 48.J.B. Neilands, *Science*, **1967**, 156, 1443
- 49.R. J. Bergeron, *Chem. Rev.*, **1984**, 84, 587
50. K. N. Raymond, *Coord. Chem. Rev.*, **1990**, 105, 135
- 51.R. J. Bergeron, C. Z. Liu, J. S. McManis, M. X. B. Xia, S. E. Algee, J. Weigand, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 1411
- 52.P. Hoffmann, J. B. Doucet, W. Li, L. Vergnes, S. Labidalle, *J. Chem. Research (S)*, **1997**, 218
- 53.M. J. Miller, *Chem. Rev.*, **1989**, 89, 1563
54. “*Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*”, **1979**, K. A. Geschneider Jr and Le Roy Eyring, North-Holland Publishing Company
- 55.F. A. Cotton, G. Wilkinson, “*Advanced Inorganic Chemistry*”, **1996**, Sixth Edition, Willey & Sun, New York
- 56.J. E. Huheey, *Ανόργανη Χημεία*, **1993**, Εκδόσεις «ΙΩΝ»
- 57.R. B. Hesley, K. Jones, *Inorganic Chemistry*, **1976**, New York
- 58.Γ. Ε. Μανουσάκης, *Γενική και Ανόργανη Χημεία*, **1981**, Εκδ. Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη
- 59.B. Chatterjee, *Coord. Chem. Rev.*, **1978**, 26, 281
- 60.K. Bhatt, Y. K. Agrawal, *Synth. Inorg. Met.-Org. Chem.*, **1972**, 175
- 61.E. Galdecka, Z. Galdecki, P. Gawryszewska, J. Legendziemicz, *New. J. Chem.*, **1998**, 9, 941
- 62.D. Parker, J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1996**, 3613
- 63.J. C. G. Bunzli, “*Lanthanides Probes in Life, Chemical and Earth Sciences*”, **1989**, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

- 64.R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 901
- 65.S. Aime, M. Botta, D. Parker, J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1996**, 17
- 66.S. H. Koenig, R. D. Brown. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1990**, 22, 487
- 67.K. Kumar, M. F. Tweedle, *Pure Appl. Chem.*, **1993**, 65, 515
- 68.M. Shibasaki, H. Sasai, T. Arai, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1997**, 36, 1236
- 69.R. Wietzke, M. Mazzanti, J. M. Latour, J. Pecaut, P. Y. Cordier, C. Madic, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 6690
- 70.C. E. Mathieu, D. Parker, *Chem. Commun.*, **1999**, 1699
- 71.C. Formoso, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1973**, 53, 1083
- 72.I. Πλακατούρας, «*Βιοανόργανη Χημεία II*», **1999**, ΕΠΕΑΕΚ Βιοανόργανης Χημείας, Ιωάννινα
- 73.H. Gries, H. Miklautz, *Physiol. Chemi. Phys. Medl. NMR*, **1984**, 16, 105
- 74.K. Wang, R. Li, Y. Cheng, B. Zhu, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 190-192, 297
- 75.G. Dougherty, *J. Inorg. Biochem.*, **1988**, 34, 95
76. R.J Fiel, *Biomol. Struct. & Dynamics*, **1989**, 6, 1259
- 77.S. Hashimoto, Y. Nakamura, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1996**, 1, 2623

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ
ΣΥΝΘΕΣΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A) ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Η πρώτη σύνθεση μέσο-άρυλο πορφυρινών πραγματοποιήθηκε με συμπύκνωση αλδεύδης και πυρρολίου. Το 1941 η περαιτέρω μελέτη αυτής της μεθόδου για διάφορα είδη αλειφατικών, αρωματικών και ετεροκυκλικών αλδευδών οδήγησε τους Rothmund και Menotti στη σύνθεση της τετραφαίνυλο-πορφυρίνης (TRP) με συμπύκνωση βενζαλδεύδης και πυρρολίου σε πυριδίνη κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Η αντίδραση αυτή όμως δεν έδινε καλή απόδοση (1%-5%) γι αυτό το 1967 οι Alder και Longo κατάφεραν να επιτύχουν μια καλύτερη απόδοση της τάξεως 20% , με συμπύκνωση βενζαλδεύδης και πυρρολίου σε διαλύτη προπιονικό οξύ, υπό συνθήκες βρασμού για 30 λεπτά. Στη συνέχεια επιτεύχθηκε η παρασκευή τέτρα-άρυλο πορφυρινών με δύο διαφορετικά είδη μέσο υποκαταστατών, με βάση ένα μείγμα από δυο αλδεύδες. Η συμπύκνωση αυτή αποδίδει ένα μείγμα από 6 πορφυρίνες που διαφέρουν ως προς τη φύση και την κατανομή των τεσσάρων μέσο-υποκαταστατών.

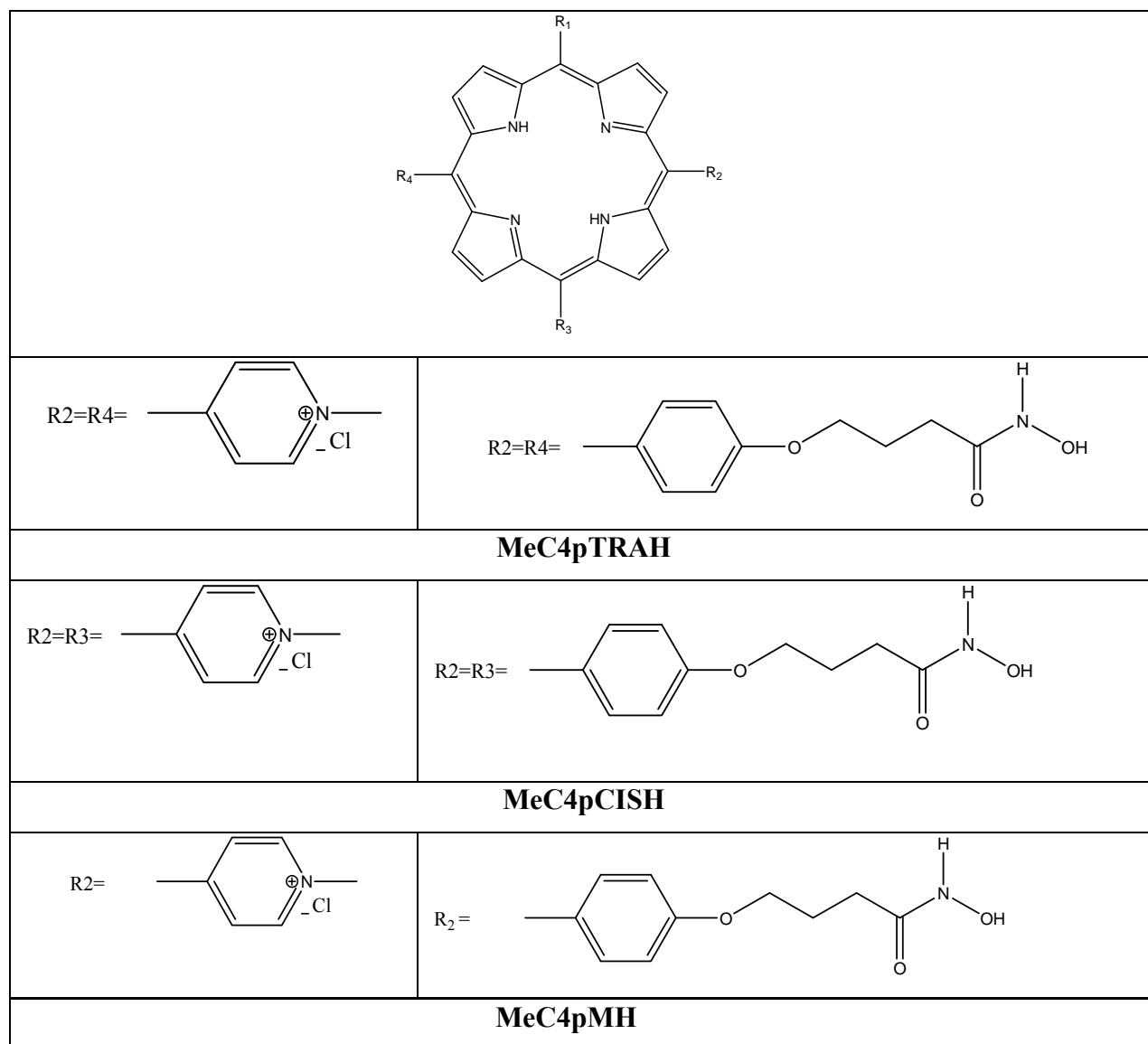
B) ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ

Στην ενότητα αυτή θα αναφερθούν οι εμπειρικές ονομασίες των πορφυρινών που αντιπροσωπεύουν την δομή, και το στάδιο σύνθεσης της κάθε πορφυρίνης. (πίνακας 1)

<i>Υποκατάσταση N του Πυριδινίου</i>				
ΙΔΙΟΤΗΤΑ	Μεθυλιωμένο		Μη μεθυλιωμένο	
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	Me		-	
<i>Αριθμός ανθράκων αλειφατικής αλυσίδας</i>				
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΘΡΑΚΩΝ	4		5	
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	C4		C5	
<i>Θέση υποκατάστασης αλειφατικής αλυσίδας στο φαινύλιο</i>				
ΘΕΣΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	ΌΡΘΟ-	ΠΑΡΑ-	META-	
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	O	p	m	
<i>Υποκατάσταση φαινυλίων ως προς τον πορφυρινικό δακτύλιο</i>				
ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	ΜΟΝΗ-	ΔΙΠΛΗ (TRANS)	ΔΙΠΛΗ (CIS)	ΤΡΙΠΛΗ
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	M	TRANS	CIS	TRI
<i>Υποκατάσταση αλειφατικής αλυσίδας</i>				
ΕΙΔΟΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	ΕΣΤΕΡΑΣ	ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟ ΟΞΥ	ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΟ ΟΞΥ	
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	E	A	H	

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Εμπειρική ονομασία πορφυρινών

Παρακάτω παρουσιάζεται η σύνθεση των πορφυρινικών ενώσεων που συντέθηκαν. Προκύπτουν από την H₂TMePyP-4 με αντικατάσταση των πυριδινικών δακτυλίων με φαινυλικές ομάδες, οι οποίες συνδέονται με μια αλειφατική αλυσίδα μήκους 4 ανθράκων που καταλήγει σε μια υδροξυαμική ομάδα.



Σχήμα 5: Δομές των συντιθέμενων πορφυρινικών συμπλόκων με υδροξαμικά οξέα

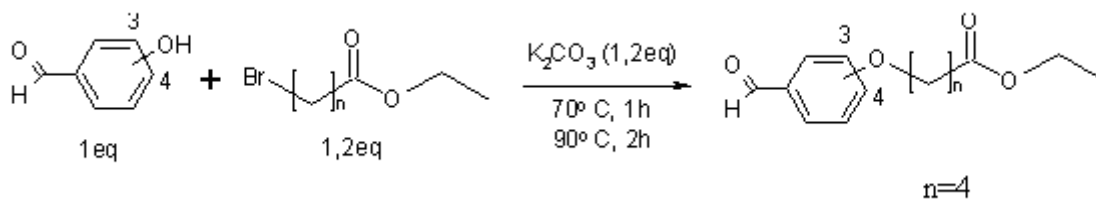
Η σύνθεση των πορφυρινικών συμπλόκων χωρίζεται σε δυο μέρη. Αρχικά στην παρασκευή της υποκατεστημένης βενζαλδεύδης και της αντίστοιχης πορφυρίνης στην εστερική μορφή της, και στη συνέχεια στη παρασκευή της ενεργής υδροξαμικής ομάδας καθώς και στη μεθυλίωση του

πυρίδινο-αζώτου. Από τις συντιθέμενες πορφυρίνες η MeC4TRAH, MeC4CISH και η MeC4MH επιλέχθηκαν για την παρούσα εργασία

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ

Α) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗΣ ΒΕΝΖΑΛΔΕΥΔΗΣ

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100ml, στην οποία έχει τοποθετηθεί ψυκτήρας και μαγνήτης ανάδευσης, προστίθενται 1eq 4-υδροξυβενζαλδεύδης και 1,2eq ανθρακικό κάλιο σε 30ml άνυδρου DMF. Ακολουθεί η προσθήκη 1,2eq 4-βρωμοβουτιρικού του αιθυλενίου, στάγδην. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 70⁰C για μία ώρα υπό ανάδευση και στη συνέχεια στους 90⁰C για 2 ώρες. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ατμόσφαιρα αργού. Κατά τη σύνθεση λαμβάνει χώρα S_N2 πυρηνόφιλη προσβολή της υδροξυλικής ομάδας της υδροξυβενζαλδεύδης στον βρωμοαλειφατικό εστέρα του αιθυλενίου.

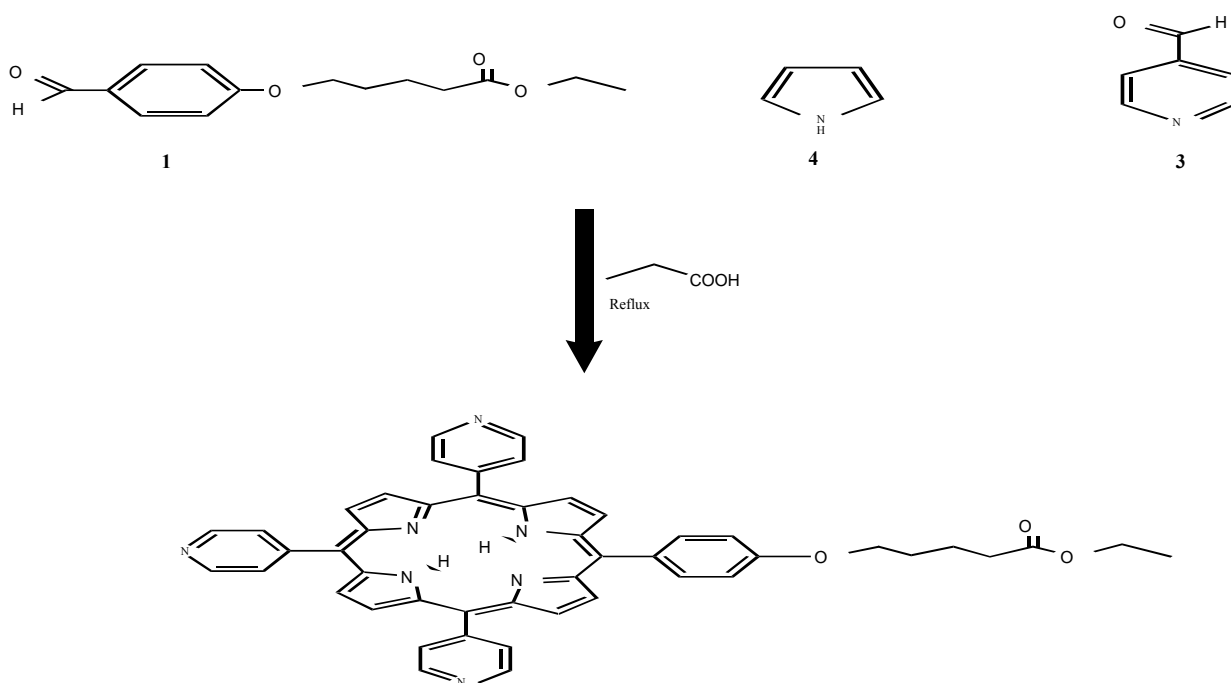


Σχήμα 6: Αντίδραση παρασκευής υποκατεστημένης βενζαλδεύδης

Ακολουθεί διήθηση και έκπλυση με διχλωρομεθάνιο. Τα άλατα που απομακρύνονται με τη διήθηση είναι το ανθρακικό κάλιο που δεν αντέδρασε και το βρωμιούχο κάλιο. Στη συνέχεια, το διάλυμα αποστάζεται υπό κενό στους 80⁰C, για την απομάκρυνση του DMF και στους 60⁰C για το CH₂Cl₂. Κατόπιν, επαναδιαλύουμε το στερεό υπόλειμμα σε CH₂Cl₂ και το διάλυμα διηθείται προκειμένου να απομακρυνθούν τα άλατα που πιθανόν να υπάρχουν. Για την ολική απομάκρυνση του DMF γίνεται εκχύλιση με νερό. Ακολουθεί προσθήκη άνυδρου θειϊκού νατρίου για την απομάκρυνση της υγρασίας, διήθηση και απόσταξη του διαλύτη μέχρι ξηρού. Τέλος το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας σαν πληρωτικό υλικό SiO₂. Η εύρεση του κατάλληλου διαλύτη έκλυσης γίνεται με τη βοήθεια χρωματογραφίας TLC και τη χρήση διαφόρων διαλυτών. Οι βέλτιστες συνθήκες βρέθηκε ότι είναι διχλωρομεθάνιο/εξάνιο σε αναλογία 80/20.

B) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ

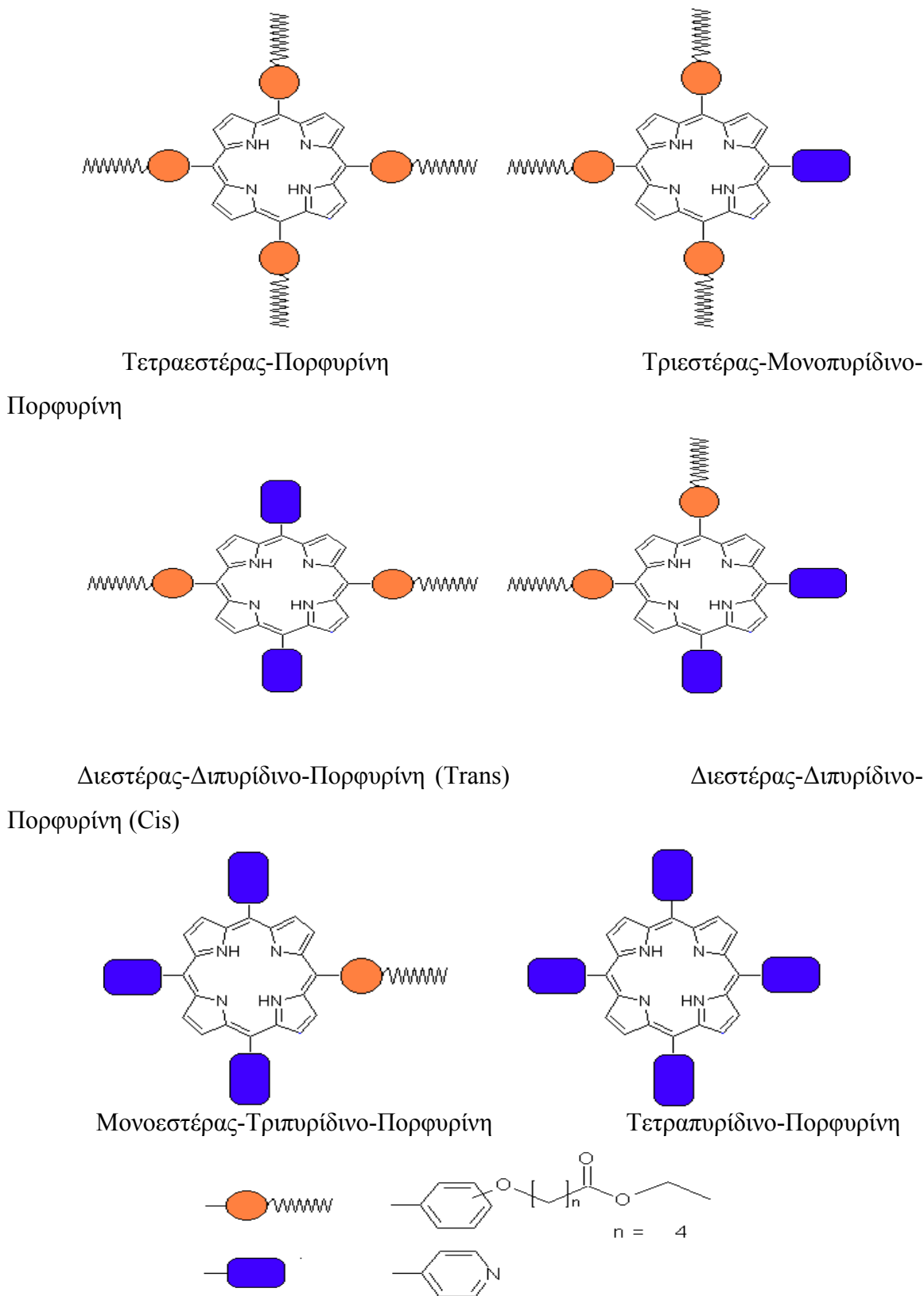
Σε σφαιρική του 1lt διαλύονται 1eq της υποκατεστημένης υδροξυβενζαλδεύδης που συντέθηκε στο προηγούμενο στάδιο και 1 eq 4-πυριδίνη-καρβοξαλδεύδη σε διαλύτη προπιονικό οξύ. Η ποσότητα του διαλύτη υπολογίζεται με το 20% του αριθμού των moles της υποκατεστημένης υδροξαλδεύδης πολλαπλασιασμένο με ένα συντελεστή 10⁵. Τοποθετείται στη φιάλη ψυκτήρας και θερμαίνεται το διάλυμα υπό ανάδευση μέχρι βρασμού, ενώ παράλληλα προστίθεται στάγδην 2 eq πυρρόλιο. Αφού προστεθεί όλη η ποσότητα του πυρρολίου και το μίγμα είναι ομογενές αφήνετε σε reflux για 2,5 ώρες.



Σχήμα 7: Αντίδραση πορφυρινικής συμπύκνωσης

Η παραπάνω αντίδραση αποδίδει έξι πορφυρινικά παράγωγα, τους έξι δηλαδή πιθανούς συνδυασμούς που λαμβάνονται κατά την υποκατάσταση των μέσο-θέσεων του πορφυρινικού δακτυλίου από δυο διαφορετικούς υποκαταστάτες (όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα 7).

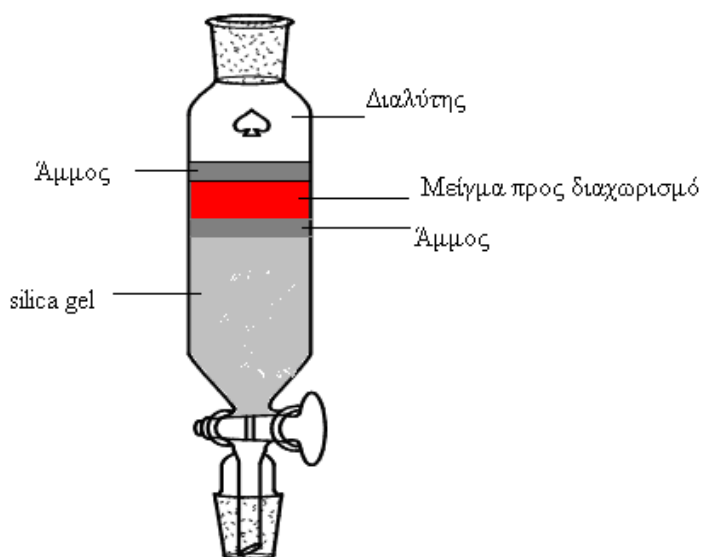
Πριν γίνει ο διαχωρισμός των έξι πορφυρινικών παραγώγων, πρέπει να απομακρυνθεί το προπιονικό οξύ. Αυτό επιτυγχάνεται με απόσταξη υπό κενό και θέρμανση στους 80°C , ενώ το στερεό υπόλειμμα εκπλένεται παράλληλα πολλές φορές με απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα διηθείται και το στερεό προϊόν μεταφέρεται σε σφαιρική όπου διαλύεται σε μίγμα διαλυτών CH_2Cl_2 / αιθανόλη (80/20). Ο διαλύτης αποστάζεται αρχικά στους 70°C και στη συνέχεια στους 90°C υπό κενό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά αλλά με τη χρήση μόνο CH_2Cl_2 .



Σχήμα 8: Πορφυρινικά προϊόντα της αντίδρασης συμπύκνωσης

Γ)ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΣΤΕΡΩΝ ΤΩΝ ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

Ο διαχωρισμός και η απομόνωση των προϊόντων της παραπάνω αντίδρασης πραγματοποιείται με χρωματογραφία στήλης με πληρωτικό υλικό silica gel. Το silica gel εισάγεται στη στήλη σε μικρές ποσότητες διαλυμένο σε CH_2Cl_2 και πολύ σημαντικό είναι να πακεταριστεί καλά. Στη συνέχεια φορτώνεται η ουσία στη στήλη.



Σχήμα 9: Στήλη διαχωρισμού

Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιείται το CH_2Cl_2 στο οποίο προστίθεται σταδιακά αιθανόλη σε ποσοστό από 1 έως 6% ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός. Μ' αυτόν τον τρόπο εκλούνται αρχικά διάφορα

παραπροϊόντα όπως χλωρίνες κτλ και κατόπιν οι έξι ουσίες με την παρακάτω σειρά:

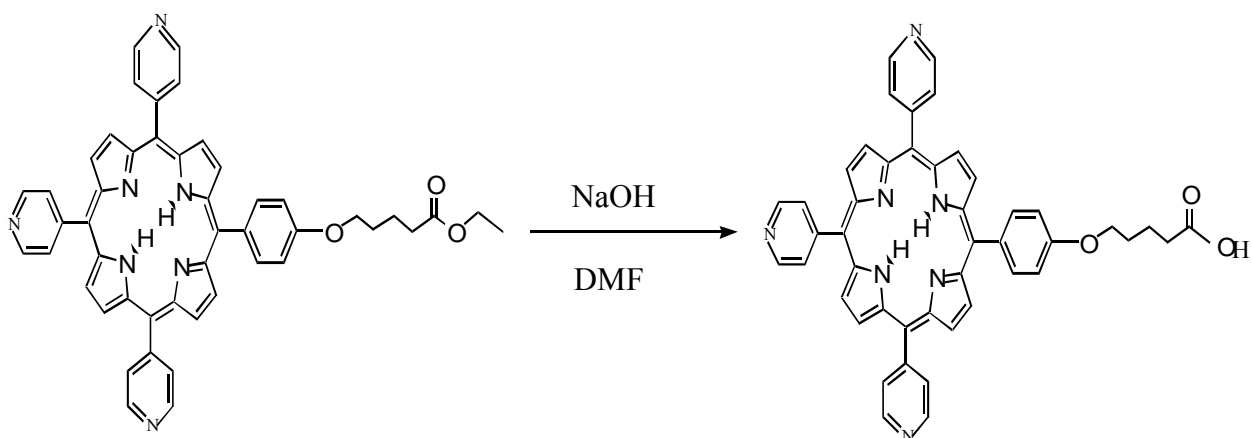
1. Τετραφαινυλεστέρας - πορφυρίνη
2. Τριεστέρας –μονοπυρίδιλο-πορφυρίνη
3. Διεστέρας –διπυρίδιλο-πορφυρίνη (trans)
4. Διεστέρας –διπυρίδιλο-πορφυρίνη (cis)
5. Μονοεστέρας-τριπυρίδιλο-πορφυρίνη
6. Τετραπυρίδιλο-πορφυρίνη

Παρατηρούμε ότι με την αύξηση τη πολικότητας του διαλύτη έκλουσης λαμβάνονται τα ισομερή με τον μεγαλύτερο αριθμό πυρίδιλο-ομάδων. Κάθε ισομερές που συλλέγεται υφίσταται επιπλέον καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης ,για την απομάκρυνση τυχόν προσμίξεων. Ακολουθεί απόσταξη των διαλυτών και συλλογή του προϊόντος υπό μορφή κρυσταλλικής σκόνης μωβ χρώματος. Στη συνέχεια ξηραίνεται στους 60⁰C υπό κενό για 12 ώρες.

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΙΟΝΙΚΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ ΜΕ ΟΜΑΔΑ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Α) ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ

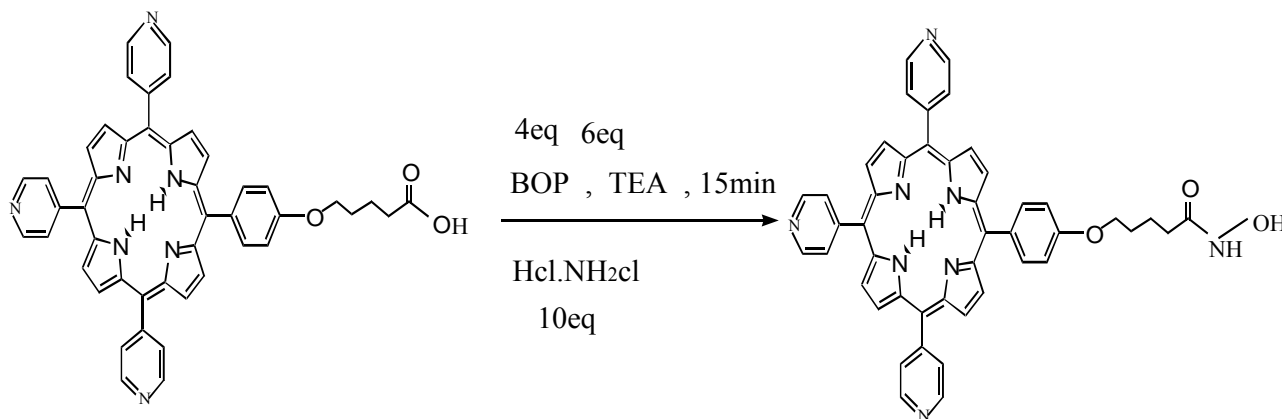
Σε σφαιρική φιάλη των 25ml προστίθενται ο εστέρας της πορφυρίνης και καυστικό νάτριο. Η αναλογία που χρησιμοποιείται ποικίλει ανάλογα με το ισομερές και με τον αριθμό αλυσίδων εστέρα. Για κάθε 1eq πορφυρίνης με μία αλυσίδα εστέρα, απαιτούνται 50eq NaOH. Πρόκειται για μία αντίδραση σαπωνοποίησης, η οποία πραγματοποιείται σε 10ml DMF, σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και με προστασία από το φως. Η διάρκειά της αντίδρασης είναι τρεις ώρες για κάθε αλυσίδα εστέρα της πορφυρίνης, ενώ η πορεία της ελέγχεται με TLC σε διαλύτη CH₂Cl₂/αιθανόλη. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη απεσταγμένου νερού και ρύθμιση του pH σε 5-6 με την προσθήκη HCl. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται, εκπλένεται με νερό για την απομάκρυνση του DMF και το προϊόν ξηραίνεται στους 60⁰C για 12 ώρες .



Σχήμα 10 : Αντίδραση σαπωνοποίησης

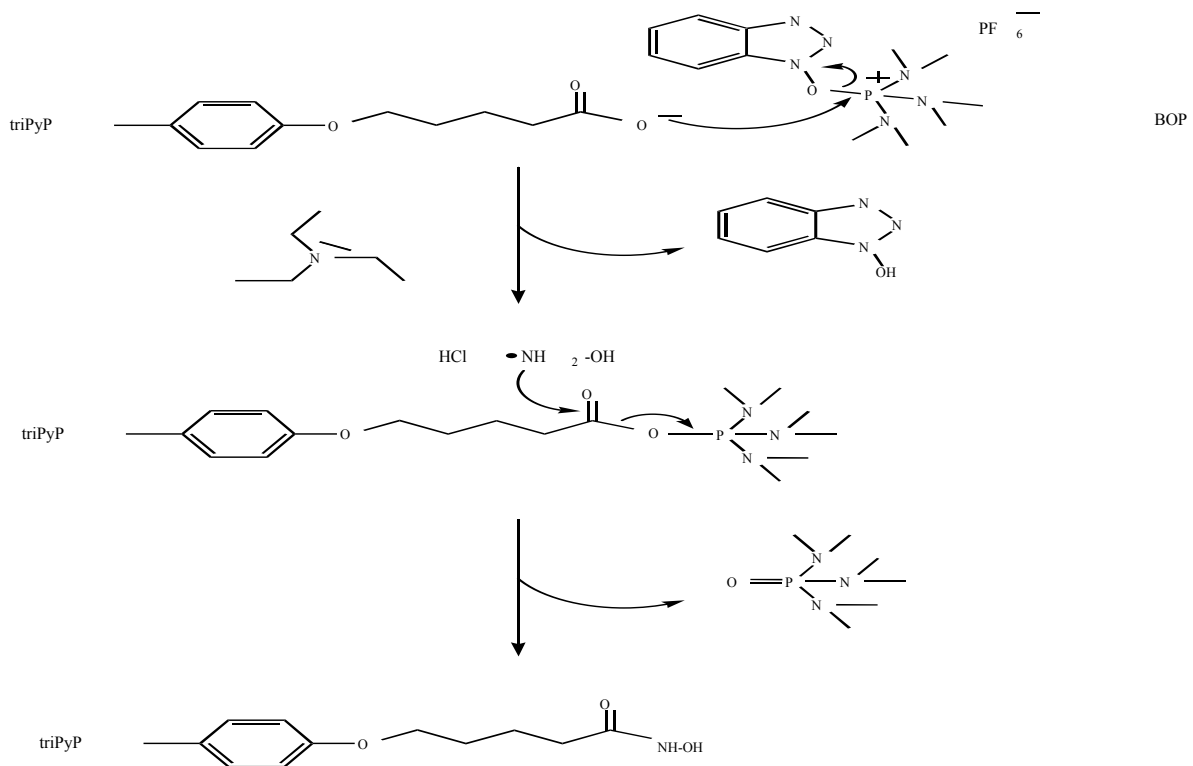
B) ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ

Σε σφαιρική φιάλη των 25ml που φέρει ψυκτήρα διαλύεται το οξύ της πορφυρίνης σε 5ml άνυδρου DMF. Στη συνέχεια, προστίθενται 4eq τριαιθυλαμίνη (TEA) και 2eq του αντιδραστηρίου σύζευξης 3-(βρωμοτριαζολ-1-υλοξυ)τρι(διμεθυλαμινο)-φώσφορο-εξαφθοριούχος φώσφορος (BOP) για κάθε ομάδα καρβοξυλικού οξέος της πορφυρίνης. Το διάλυμα αναδεύεται και προστατεύεται από το φως. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ατμόσφαιρα αργού ή αζώτου. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία TLC σε διαλύτη CH₂Cl₂ /αιθανόλη (90/10) και μετά την ποσοτική αντίδραση του οξέος προστίθεται υδροχλωρική υδροξυλαμίνη (HCl·NH₂OH). Η ολοκλήρωση της αντίδρασης διαπιστώνεται με TLC και κυμαίνεται από 2 έως 6 ώρες. Στη συνέχεια το προϊόν καθιζάνει με την προσθήκη απεσταγμένου νερού (DMF/H₂O 1/5), διηθείται υπό κενό σε φίλτρο No 4, εκπλένεται με απεσταγμένο νερό για την απομάκρυνση του DMF και ξηραίνεται στους 60⁰C για 12 ώρες.



Σχήμα 11: Αντίδραση σύνθεσης του υδροξαμικού οξέος της πορφυρίνης

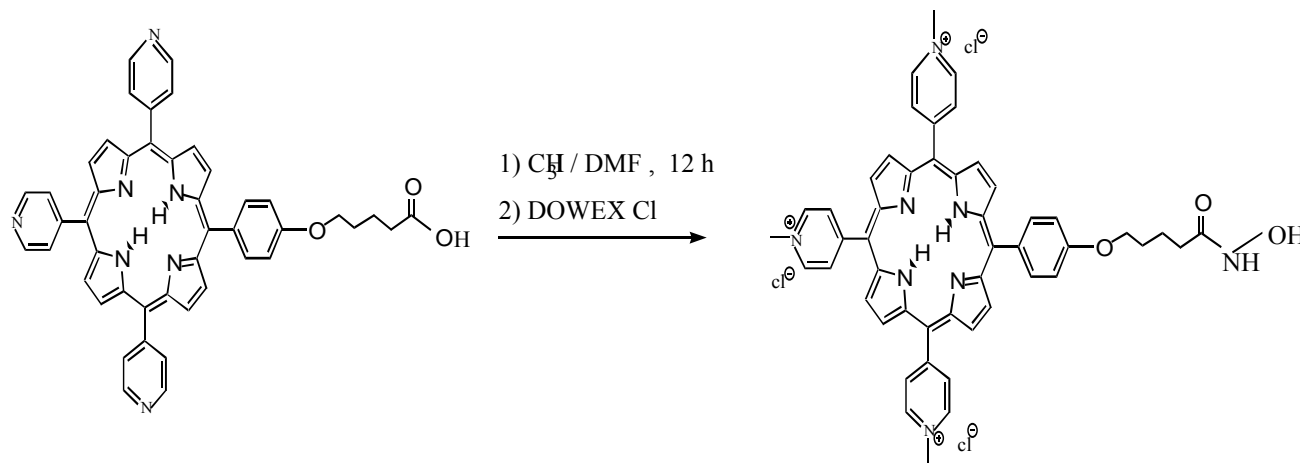
Ο μηχανισμός της παραπάνω αντίδρασης περιγράφεται στο σχήμα 12. Στο πρώτο στάδιο η καρβοξυλική ομάδα της πορφυρίνης αποπρωτονιώνεται από την TEA. Κατόπιν το πυρηνόφιλο αυτό προσλαμβάνει το ηλεκτρόφιλο κέντρο του BOP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του δεσμού φωσφόρου-οξυγόνου και τη δημιουργία ενός νέου μεταξύ του οξυγόνου του οξέος και του φωσφόρου του BOP. Το προϊόν που σχηματίζεται είναι ο ενεργοποιημένος εστέρας, ο οποίος στη συνέχεια προσβάλλεται από την ομάδα της υδροξυλαμίνης για την δημιουργία του υδροξαμικού οξέος. Τα παραπροϊόντα που σχηματίζονται είναι υδατοδιαλυτά και απομακρύνονται εύκολα μέσω της καθίζησης της πορφυρίνης στο μείγμα DMF/H₂O.



Σχήμα 12: Μηχανισμός της αντίδραση σύνθεσης του υδροξαμικού οξέος της πορφυρίνης

Γ) ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΥΡΙΔΙΝΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ

Σε σφαιρική φιάλη των 50ml, η οποία φέρει ψυκτήρα, προστίθενται 5ml άνυδρου DMF, το υδροξαμικό οξύ που παρασκευάστηκε. Με τη βοήθεια μικροσύριγγας προστίθενται 100 eq ιωδομεθάνιο. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και το διάλυμα προστατεύεται από το φως. Η διάρκεια της αντίδρασης είναι 12 ώρες. Το πέρας της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με TLC σε διαλύτη CH₂Cl₂ - /αιθανόλη (90/10). Ακολουθεί απόσταξη υπό κενό χωρίς θέρμανση, λόγω της πιθανότητας διάσπασης των δεσμών μεταξύ των αζώτων και των μεθυλομάδων, με σκοπό την απομάκρυνση του ιωδομεθανίου που δεν αντέδρασε. Η απόσταξη συνεχίζεται με θέρμανση έως 60⁰C, για την απομάκρυνση του DMF. Στη συνέχεια προστίθεται ακετόνη και το διάλυμα διηθείται και εκπλένεται με ακετόνη. Το προϊόν που λαμβάνεται είναι μερικώς διαλυτό στο νερό, λόγω των υδρόφιλων υδροξαμικών ομάδων. Ακολουθεί αντικατάσταση των ιόντων ιωδίου από ιόντα χλωρίου για να είναι πλήρως διαλυτό. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη ιοντοανταλλακτικής ρητίνης DOWEX Cl⁻, διαλυμένης σε μικρή ποσότητα νερού. Το διήθημα που προκύπτει αποστάζεται μέχρι ξηρού υπό κενό, το προϊόν ανακρυσταλλώνεται με προσθήκη διαιθυλαιθέρα σε ένα διάλυμα μεθανόλης και λαμβάνεται με τη μορφή κρυσταλλικής σκόνης, η οποία ξηραίνεται στους 60⁰C για 12 ώρες .



Σχήμα 13: Αντίδραση μεθυλίωσης

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G. Dougherty, *J. Inorg. Biochem.*, **1988**, 34, 95.
2. M. Perree-Fauvet, N. Gresh, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 4227.
3. M. Perree-Fauvet, C. Verchere-Beaur, E. Tarnaud, G. Anneheim-Herbelin, N. Bone, A. Gaudemer, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 13569.
4. Sadler & Karo, *Organic Functional Group Preparation (III)*, **1972**, Academic Press NY and London, 406-432.
5. C. Casa, B. Saint-Jalmes, C. Loup, C. Jeffrey Lacey, B. Meunier, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2913.
6. L. Ding, C. Casa, G. Etemad-Moghadam, B. Meunier, *New J. Chem.*, **1990**, 14, 421.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

Α) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μεγάλη ανάπτυξη της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) από τα τέλη της δεκαετίας του '50 επηρέασε σημαντικά την μελέτη σχεδόν όλων των κατηγοριών των οργανικών και οργανομεταλλικών ενώσεων. Ειδικότερα δε επηρέασε τις πορφυρίνες καθώς και τα παράγωγά τους.

Το πρώτο πυρηνικό μαγνητικό φάσμα (NMR) σε μόριο πορφυρίνης δημοσιεύτηκε από τους Becker και Bradley το 1959. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την φασματοσκοπία NMR χρησιμεύουν τόσο για την διευκρίνιση της δομής των πορφυρινών και των ενώσεών τους, όσο και για την μελέτη της δυναμικής τους μέσα σε διαλύματα ή ακόμη και τον έλεγχο της κινητικής μιας αντίδρασης. Αυτό συμβαίνει διότι η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται.

Κύριο χαρακτηριστικό του πορφυρινικού δακτυλίου είναι η μεγάλη μαγνητική ανισοτροπία που προκαλείται από το π -ηλεκτρονιακό νέφος του πορφυρινικού δακτυλίου. Το ηλεκτρονιακό "ρεύμα" (ring current) του πορφυρινικού δακτυλίου που προκύπτει απ' το εκτεταμένο π -συζυγιακό κυκλικό σύστημα δημιουργεί είτε επιπλέον προστασία είτε περαιτέρω αποπροστασία στα πρωτόνια του δακτυλίου. Αυτό το γεγονός έχει σαν

συνέπεια το πρωτονιακό φάσμα της ελεύθερης βάσης της πορφυρίνης να εκτείνεται σε μία περιοχή 15 ppm, περίπου.

B) ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ

Ένας ατομικός πυρήνας μπορεί να εμφανίζει πυρηνικό spin, υπό την έννοια ότι μπορεί να θεωρηθεί ως ένα περιστρεφόμενο ηλεκτρικό φορτίο και συνεπώς περιέχει στροφορμή. Η στροφορμή είναι ένα διάνυσμα που το μέγεθός της, σύμφωνα με την κβαντική θεωρία, είναι κβαντισμένο. Αυτός ο κβαντικός αριθμός συμβολίζεται με I.

Οι πυρήνες που ενδιαφέρουν την φασματοσκοπία NMR έχουν γωνιακή στροφορμή spin ($I \neq 0$). Τέτοιοι πυρήνες είναι αυτοί του ^1H , και του ^{13}C , και οι οποίοι ερευνήθηκαν για δύο κυρίως λόγους: α) επειδή ανιχνεύονται πιο εύκολα σε σχέση με άλλους πυρήνες και β) επειδή το άτομο υδρογόνου και του άνθρακα είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στην οργανική χημεία. Αυτά τα άτομα θεωρούνται σαν ηλεκτρικά φορτία που περιστρέφονται και κατέχουν πυρηνική μαγνητική ροπή. Η περιστροφή αυτών των θετικά φορτισμένων σωματιδίων δημιουργεί μικρά μαγνητικά πεδία τα οποία ευθυγραμμίζονται παράλληλα ή αντιπαράλληλα με ένα εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο.

Για την ανίχνευση σήματος και για όλα τα πειράματα NMR η βασική σχέση που ισχύει είναι η:

$$\nu = (\gamma / 2\pi) B_0$$

όπου γ είναι ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα που τοποθετείται μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο B_0 . Αν και με μία πρώτη ματιά στη παραπάνω σχέση αναμένεται όλοι οι πυρήνες να συντονίζονται στην ίδια συχνότητα, στη

πραγματικότητα το πεδίο που αισθάνεται κάθε πυρήνας τροποποιείται από το χημικό του περιβάλλον. Το τοπικά μαγνητικά πεδία που δημιουργούνται από τους γειτονικούς πυρήνες είναι ανάλογα του B_0 και η παραπάνω σχέση μετασχηματίζεται στην:

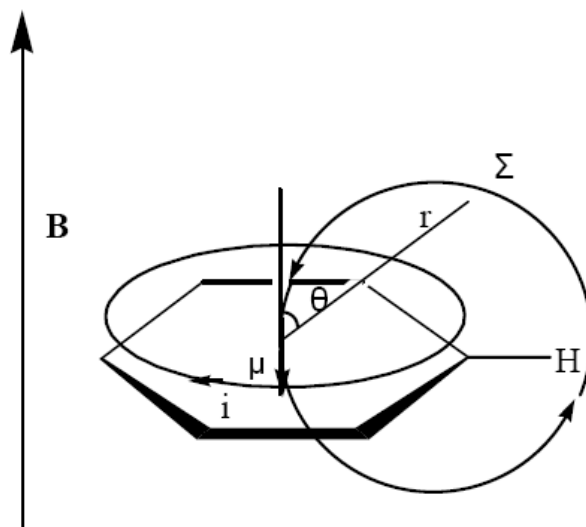
$$\nu = (\gamma / 2\pi)(1-\sigma)B_0$$

όπου σ είναι η σταθερά προστασίας (μέτρο της μετατροπής του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 από το χημικό περιβάλλον).

Γ) ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΟ ΡΕΥΜΑ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ

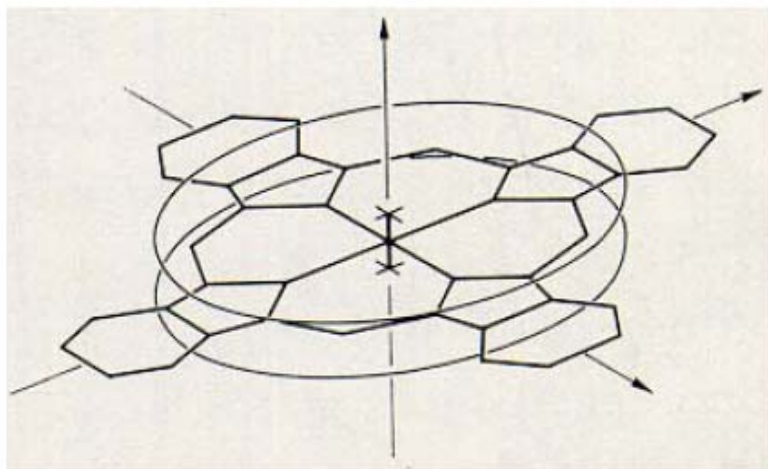
Στα $^1\text{H-NMR}$ φάσματα των πορφυρινών, η συνεισφορά του ρεύματος του αρωματικού δακτυλίου στις χημικές μετατοπίσεις είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που κάνει τις πορφυρίνες να ξεχωρίζουν από παρόμοια μη-αρωματικά συστήματα.

Όταν ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο εφαρμόζεται σ' ένα αρωματικό σύστημα η κίνηση των απεντοπισμένων π -ηλεκτρονίων έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ρεύματος δακτυλίου. Το επαγόμενο αυτό ρεύμα, οδηγεί σ' ένα δεύτερο μαγνητικό πεδίο. Το αποτέλεσμα είναι ισχυρά ανισότροπο, δεν δίνει μέσο όρο μηδέν από την τυχαία κίνηση του μορίου και έτσι οδηγεί σε ανισότροπη προστασία των πυρήνων. Το ρεύμα δακτυλίου είναι ένα φαινόμενο που εμφανίζεται σε μοριακά συστήματα τα οποία φέρουν βενζολικούς ή πολυπυρηνικούς αρωματικούς δακτυλίους. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το ρεύμα δακτυλίου που δημιουργείται στο μόριο του βενζολίου.



Σχήμα 14. Ρεύμα δακτυλίου στο βενζόλιο

Η πρώτη προσέγγιση για τον υπολογισμό της επίδρασης του ρεύματος δακτυλίου έγινε από τον Pople, ο οποίος θεώρησε έναν κύκλο στην περιφέρεια του πορφυρινικού δακτυλίου ως τροχιά της κίνησης των π -ηλεκτρονίων, όπου το δίπολο της μαγνητικής ροπής του πεδίου βρίσκεται στο κέντρο του δακτυλίου. Το μοντέλο αυτό αναθεωρήθηκε από τους Waugh–Fessenden⁴ και Johnson–Bovey, οι οποίοι αντί του ενός κύκλου του Pople, θεώρησαν δύο κύκλους, τοποθετημένους συμμετρικά, εκατέρωθεν του πορφυρινικού επιπέδου και σε απόσταση από το επίπεδο αυτό $0,45\text{\AA}$ και $0,65\text{\AA}$ αντίστοιχα.



Σχήμα 15. Θεωρητικό μοντέλο της τροχιάς των ηλεκτρονίων των Waugh–Fessenden και Johnson–Bovey, για το μόριο της φθαλοκυανίνης.

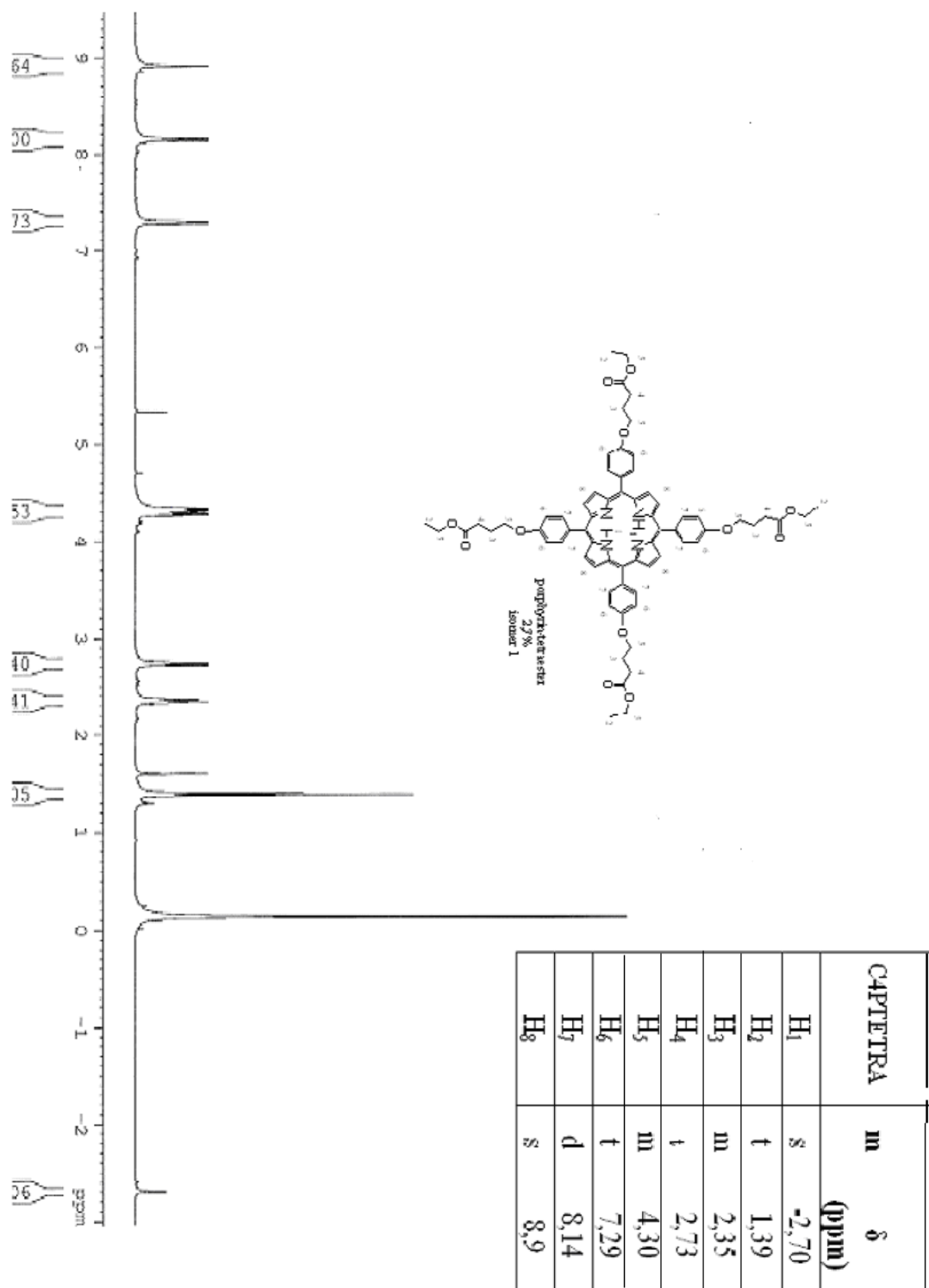
Τέλος ο Abraham χρησιμοποίησε ένα πιο πολύπλοκο μοντέλο λαμβάνοντας υπ' όψιν του τους πυρρολικούς και τους άλλους χηλικούς δακτυλίους του μορίου της πορφυρίνης. Το μοντέλο όμως αυτό δεν κρίθηκε ικανοποιητικό καθώς προέβλεπε μεγάλες χημικές μετατοπίσεις που δεν συμβαδίζουν με τα πειραματικά δεδομένα. Τελικά μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με *N*-υποκατεστημένες πορφυρίνες και με αξονικούς υποκαταστάτες οδήγησε στην εξαγωγή ημιεμπειρικών τύπων που με αρκετή ακρίβεια έδιναν τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της πορφυρίνης.

Το αποτέλεσμα του ρεύματος δακτυλίου στα πρωτόνια της πορφυρίνης είναι η μετατόπιση των β -πυρρολικών σε χαμηλότερα πεδία κατά 5ppm περίπου, σε σχέση με αυτά του πυρρολίου, ενώ αντίθετα τα N–H μετατοπίζονται κατά περίπου 11ppm σε υψηλότερα πεδία από τα αντίστοιχα του πυρρολίου.

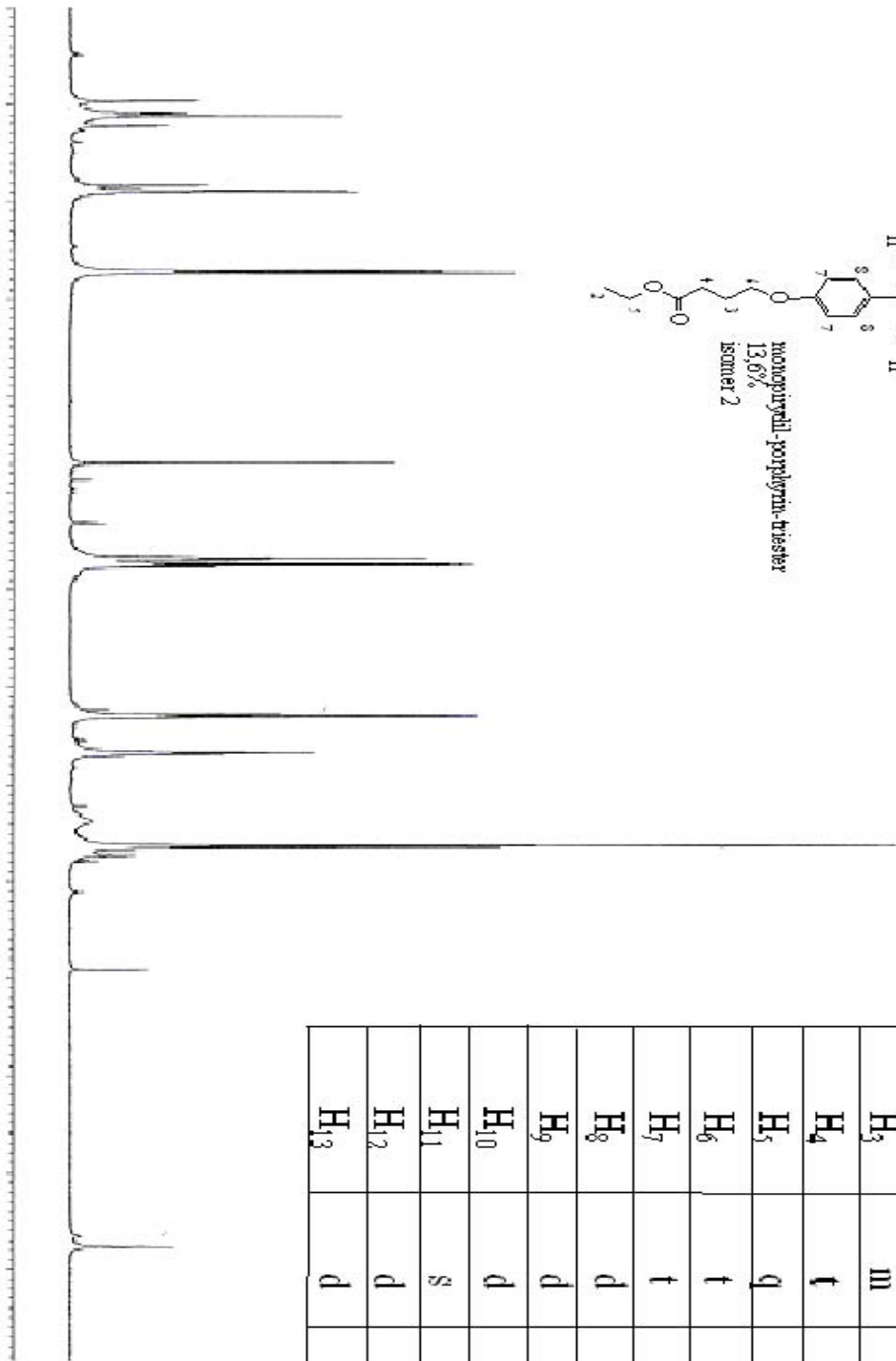
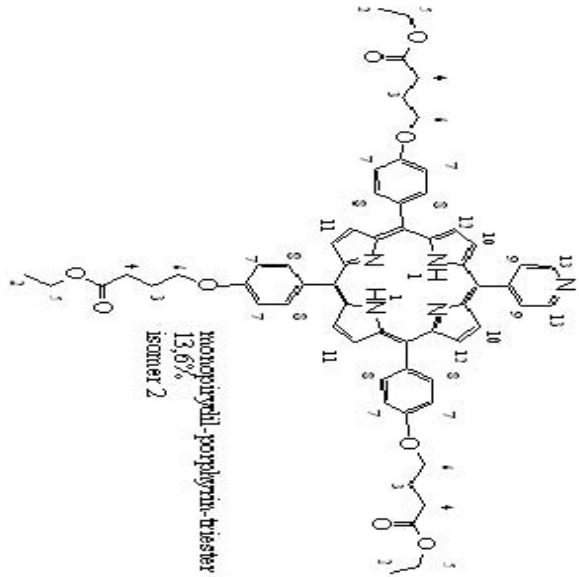
Δ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν καθώς προσδιορίζει τον αριθμό των πυριδικών ομάδων της πορφυρίνης και διαχωρίζει τα ισομερή trans και cis. Το φάσμα NMR πρωτονίου κάθε πορφυρινικού δακτυλίου περιέχει δυο περιοχές : α) τα αρωματικά πρωτόνια που συνδέονται με τα άτομα άνθρακα των ομάδων πυριδινίου, πυρολλίου και φαινυλίου τα οποία εμφανίζονται από 10 έως 7 ppm (χαμηλό πεδίο) β) τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας τα οποία εμφανίζονται από 5 έως 1 ppm (υψηλό πεδίο).

Μέσω της ανάλυσης των κορυφών των πυρρολικών πρωτονίων σε χαμηλές τιμές πεδίου ταυτοποιούμε τα έξι ισομερή που εκκλύονται από τη στήλη διαχωρισμού. Η τετραπυρίδινο πορφυρίνη και η τετραφαινυλεστέρας έχουν συμμετρία D_{2h} . Τα 8 πυρρολικά πρωτόνια είναι ισοδύναμα και αποδίδουν στο φάσμα μια μονή κορυφή. Το φάσμα της τριφαινυλεστέρας – μονοπυρίδινο πορφυρίνη διακρίνεται από δύο διπλές κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στα δύο πυρρολικά πρωτόνια, και από μια μονή που αντιστοιχεί σε τέσσερα ισοδύναμα πρωτόνια. Η διφαινυλεστέρας – διπυρίδινο πορφυρίνη (trans) έχει μια συμμετρία D_{2h} η οποία αποδίδεται στο φάσμα με δύο διπλές κορυφές για κάθε ομάδα ισοδύναμων πρωτονίων. Ενώ η διφαινυλεστέρας – διπυρίδινο πορφυρίνη (cis) κατέχει μια συμμετρία D_{2v} η οποία αποδίδεται στο φάσμα με δύο διπλές και δύο μονές κορυφές για κάθε δύο πρωτόνια. Τέλος το φάσμα της μονοφαινυλεστέρας-τριπυρίδινο πορφυρίνης εμφανίζει δύο διπλές κορυφές για κάθε ισοδύναμα πρωτόνια και μια μονή η οποία αντιστοιχεί σε τέσσερα πρωτόνια.

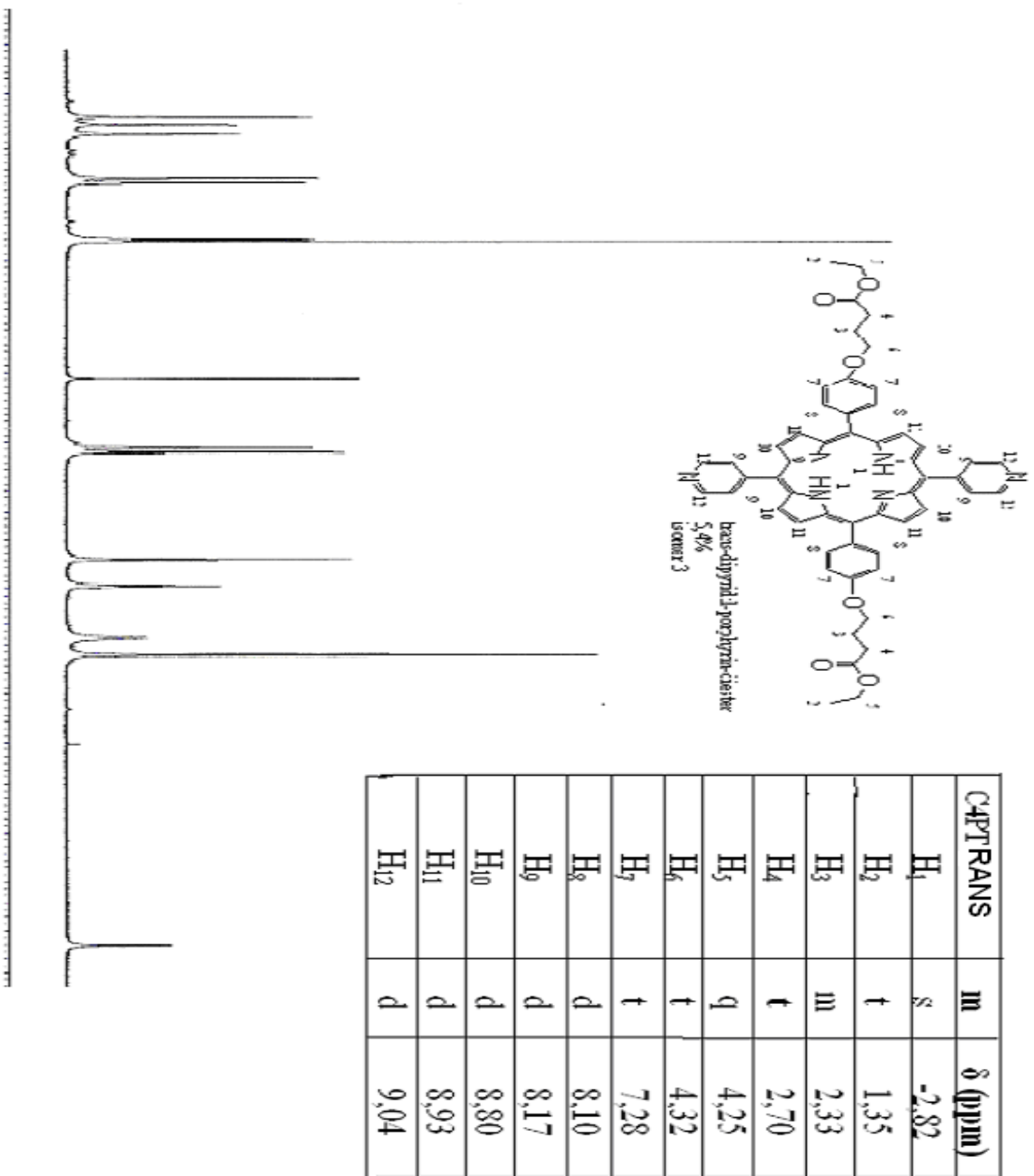


ΦΑΣΜΑ 1: Φάσμα ¹H NMR του Τετραεστέρ

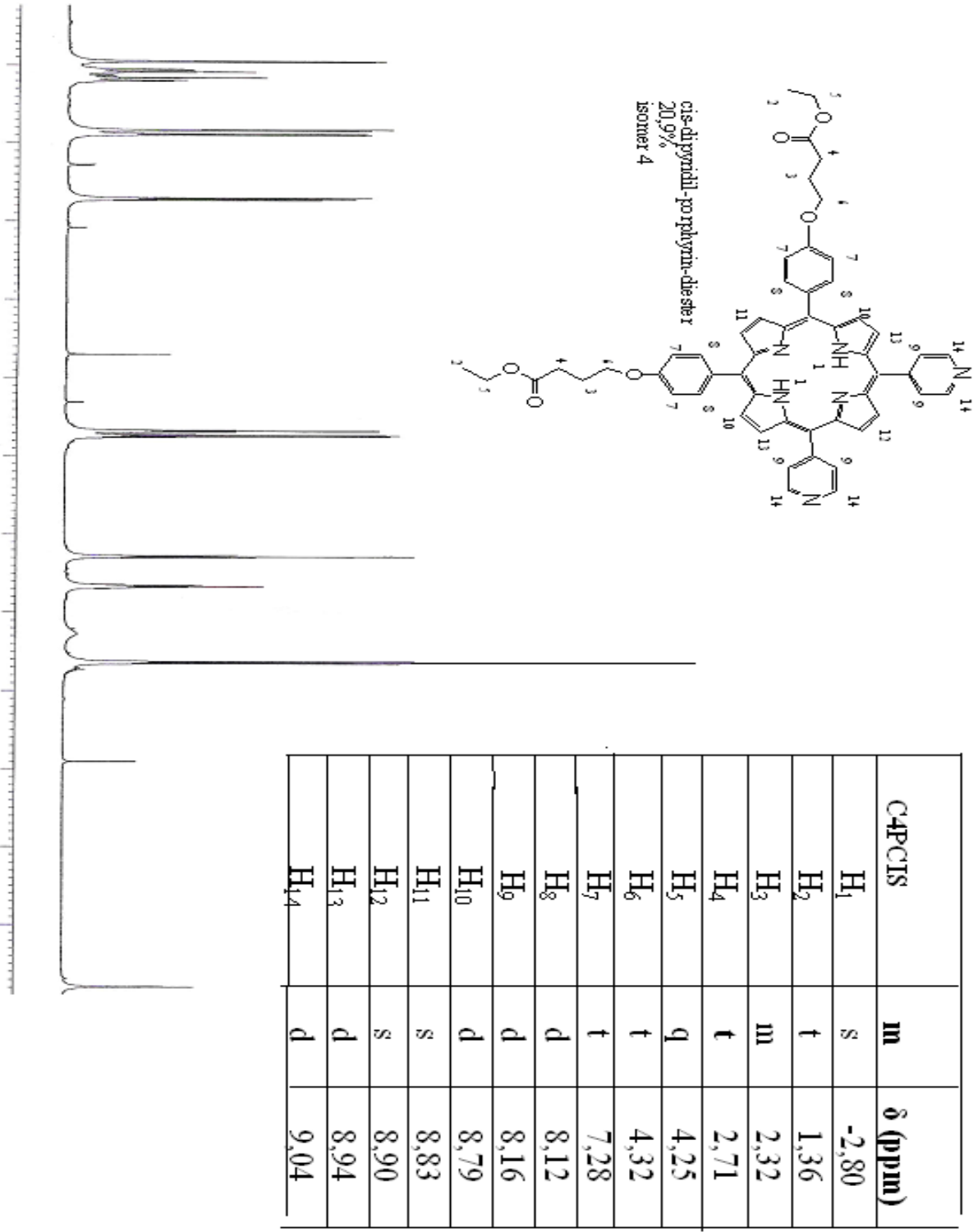


CAPITRI	m	δ (ppm)
H ₁	s	-2,77
H ₂	t	1,35
H ₃	m	2,32
H ₄	t	2,70
H ₅	q	4,25
H ₆	t	4,31
H ₇	t	7,27
H ₈	d	8,11
H ₉	d	8,17
H ₁₀	d	8,78
H ₁₁	s	8,88
H ₁₂	d	8,91
H ₁₃	d	9,03

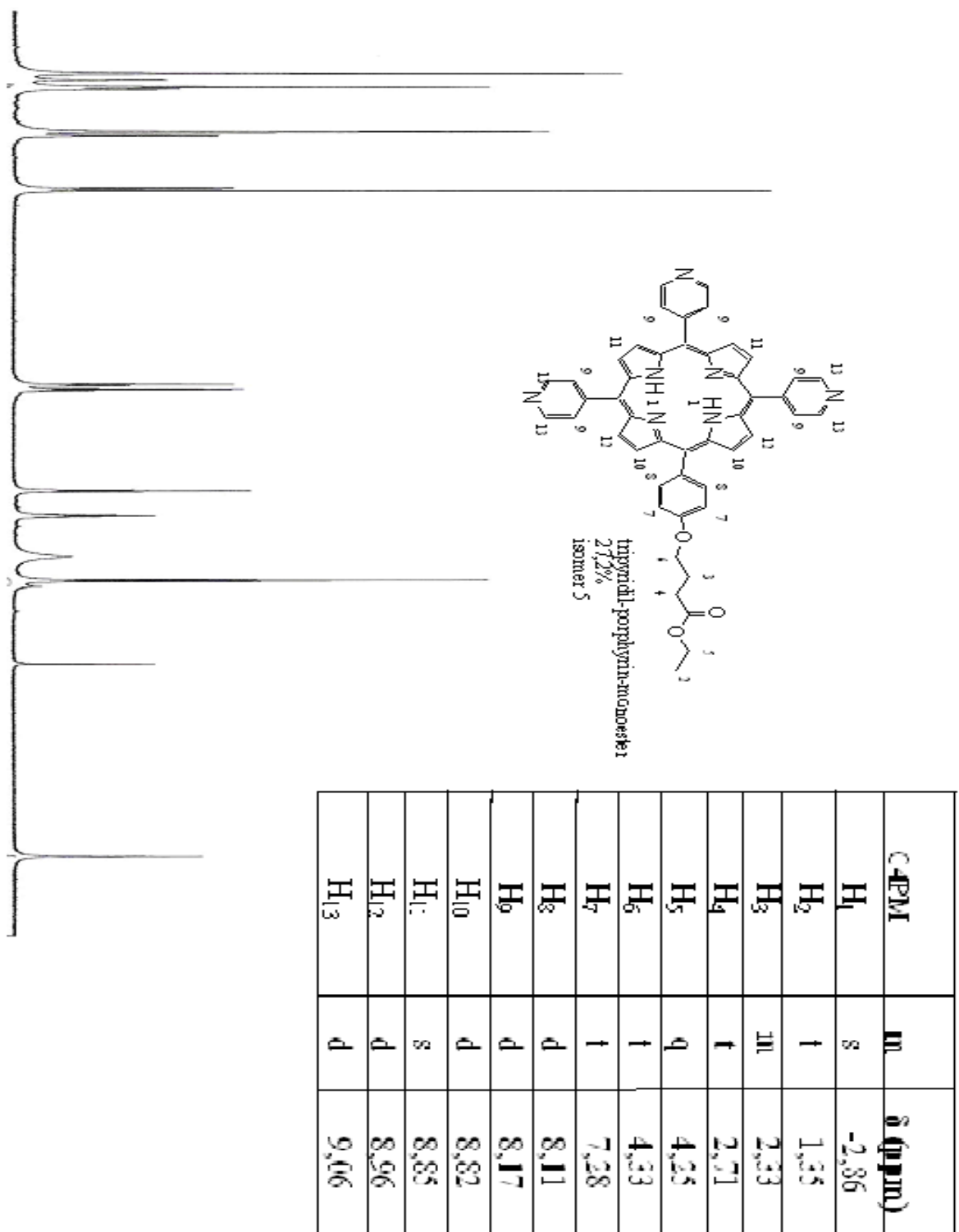
ΦΑΣΜΑ 2: Φάσμα ¹H NMR του Τριαστέρας



ΦΑΣΜΑ 3: Φάσμα ¹H NMR του Διεστέρα -trans



ΦΑΣΜΑ 4: Φάσμα ¹H NMR του Διεστέρα -cis

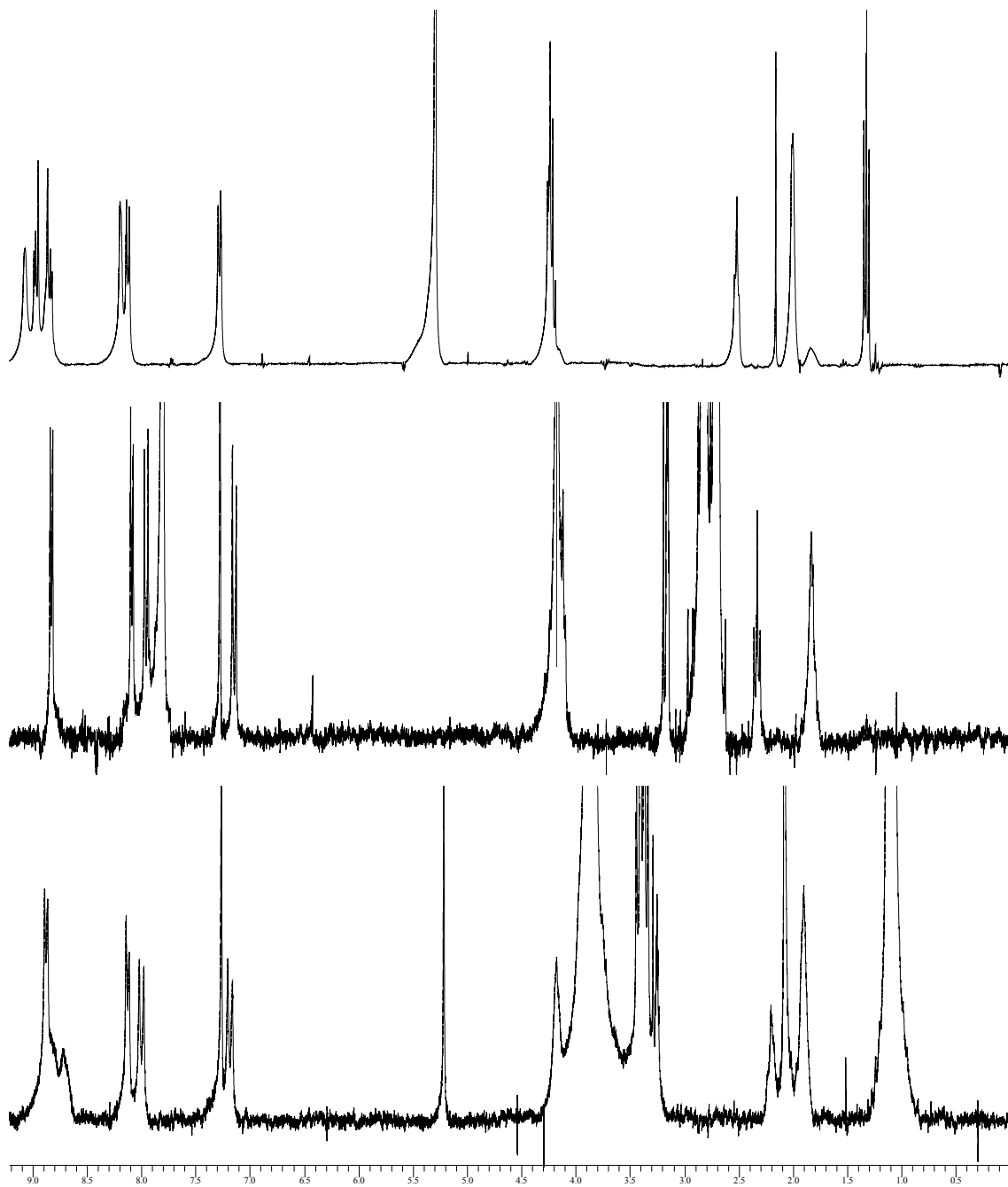


ΦΑΣΜΑ 5: Φάσμα ¹H NMR του Μονοεστέρα

Χρησιμοποιήσαμε τη φασματοσκοπία NMR για τον έλεγχο των αντιδράσεων σύνθεσης της ομάδας του υδροξαμικού οξέος. Η σημαντικότερη διαφορά στη δομή του φάσματος του καρβοξυλικού παραγώγου από αυτού του εστερικού είναι η εξαφάνιση των κορυφών που οφείλονται στα πρωτόνια της εστερικής ομάδας. Επίσης παρατηρείται μια μετατόπιση όλων των κορυφών προς υψηλότερα πεδία ενώ κατά τη σύνθεση του υδροξαμικού οξέος παρατηρείται μια μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία.

Η σύνθεση του καρβοξυλικού οξέος της πορφυρίνης έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατόπιση της τριπλής κορυφής που οφείλεται στα πρωτόνια του άνθρακα της αλειφατικής αλυσίδας που είναι γειτονικός με την εστερική ομάδα από τα 2,53 ppm στα 2,35 ppm. Ενώ κατά τη σύνθεση του υδροξαμικού οξέος η κορυφή αυτή μετατοπίζεται σε υψηλότερες τιμές και συγκεκριμένα στα 2,20 ppm, δεν είναι όμως πλέον ορατή η σχάση της τριπλής κορυφής.

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι οι σχάσεις σχεδόν όλων των κορυφών, ιδιαίτερα των πυρρολικών πρωτονίων, κατά τη σύνθεση των παραγώγων δεν εμφανίζονται εξαιτίας της προσθήκης του CD_3OD για τη διάλυση των ουσιών προς ανάλυση των δειγμάτων NMR. Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα η διάλυση των ουσιών δεν επιτεύχθηκε με τη προσθήκη CD_3OD . Για το λόγο αυτό και εξαιτίας των ευρέων κορυφών που εμφανίζονται στο φάσμα (οι οποίες οφείλονται στους διαλύτες CD_3OD και $CDCl_3$) εφαρμόζονται και άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές για την ταυτοποίηση των ενώσεων.

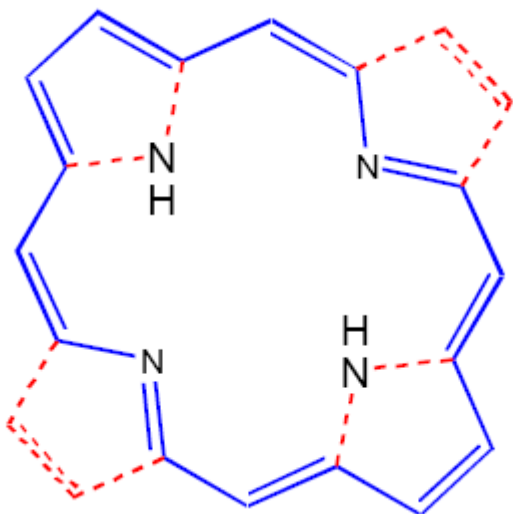


Σχήμα 16 : Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ σε $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ 2-3% των παραγώγων C4pCIS εστερικού (πάνω), καρβοξυλικού οξέος (μέση) και υδροξυαμικού οξέος (κάτω)

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ

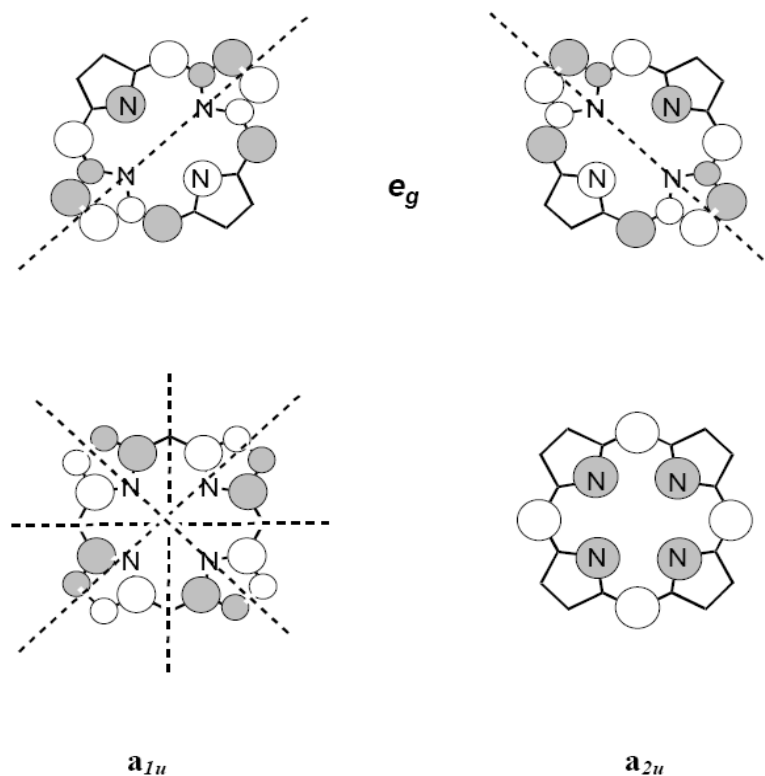
Α) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κβαντοχημικές μελέτες σε πορφυρινικούς δακτυλίους άρχισαν περίπου 50 χρόνια πριν. Η πρώτη αναφορά για την εύρεση λεπτομερώς της μορφής του μορίου της πορφυρίνης, όπου και πρωτοαναφέρεται ότι ο δακτύλιος υπακούει στον κανόνα των $4n+2$ του Hückel, έγινε από τους Longuet-Higgins et al. το 1950. Οι ερευνητές αυτοί θεώρησαν ότι τα ηλεκτρόνια 16 ατόμων του πορφυρινικού δακτυλίου (14 άτομα άνθρακα και τα 2 κεντρικά άτομα αζώτου που δεν φέρουν πρωτόνια (Σχήμα 17), σχηματίζουν ένα συζυγιακό πολυένιο $18 e^-$ που υπακούει στον κανόνα του Hückel και που ισχύει για τα πολυένια των $4n+2$ ηλεκτρονίων.



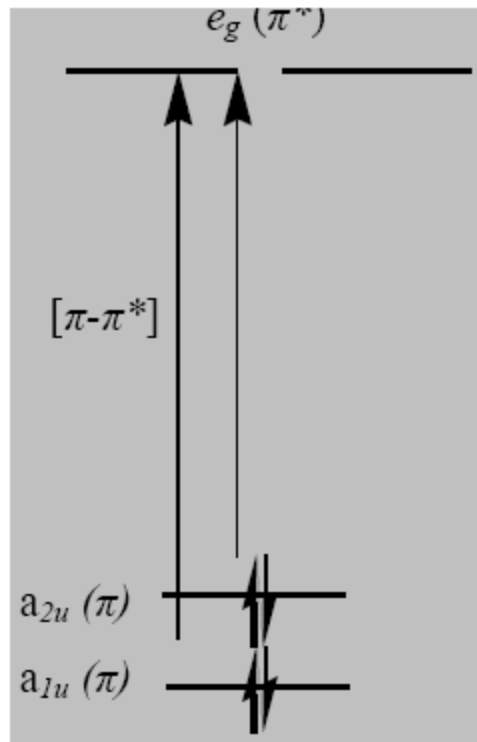
Σχήμα 17: Ο πορφυρινικός δακτύλιος υπακούει στον κανόνα του Hückel των $4n+2$ ηλεκτρονίων. Οι δεσμοί του συζυγιακού πολυενίου φαίνονται με συνεχή γραμμή.

Κατά το διάστημα 1961–1963, ο Gouterman έδωσε με αρκετή λεπτομέρεια ,ένα θεωρητικό μοντέλο, το ονομαζόμενο τεσσάρων τροχιακών για την περιγραφή των διαφόρων ηλεκτρονικών καταστάσεων των φασμάτων των πορφυρινών καθώς και των συμπλόκων τους. Με βάση αυτό το μοντέλο τα δύο *HOMO* μοριακά τροχιακά ενός πορφυρινικού δακτυλίου είναι σχεδόν εκφυλισμένα, όπως άλλωστε και τα δύο *LUMO* μοριακά τροχιακά. Τα *HOMO* τροχιακά έχουν συμμετρία a_{1u} και a_{2u} ενώ τα *LUMO* έχουν συμμετρία e_g . Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται τα υψηλότερα κατειλημμένα μοριακά τροχιακά (*HOMO*) και τα χαμηλότερα μη κατειλημμένα μοριακά τροχιακά (*LUMO*), όπου 48 οι γραμμοσκιασμένες επιφάνειες αντιστοιχούν σε (+), ενώ οι μη σε (-) πρόσημο κυματοσυνάρτησης.



Σχήμα 18: Διαγράμματα *HOMO* (συμμετρίας a_{1u} και a_{2u}) και *LUMO* (συμμετρίας e_g) τροχιακών.

Τα τέσσερα αυτά τροχιακά είναι ευκρινώς διαχωρισμένα από όλα τα άλλα συμπληρωμένα και μη συμπληρωμένα μοριακά τροχιακά. Με το μοντέλο αυτό, όλα τα βασικά χαρακτηριστικά των ηλεκτρονικών φασμάτων στις πορφυρίνες, οφείλονται κατά προσέγγιση, σε ηλεκτρονικές μεταβάσεις που λαμβάνουν χώρα στα τέσσερα αυτά τροχιακά (Σχήμα 18).



Σχήμα 19: Σχηματική παράσταση των τροχιακών του πορφυρινικού δακτυλίου.

Η ελεύθερη πορφυρίνη έχει συμμετρία D_{2h} και τα φάσματα της είναι τύπου normal. Στα φάσματα αυτά εμφανίζεται μια ισχυρή απορρόφηση μεταξύ 320 και 450nm (Soret ή B-ταινία), και τέσσερις μικρότερης έντασης απορροφήσεις από τα 450 έως τα 700nm (Q-ταινίες ($Q_y(1,0)$, $Q_y(0,0)$, $Q_x(1,0)$, και $Q_x(0,0)$). Η ένταση των συγκεκριμένων κορυφών ελαττώνεται

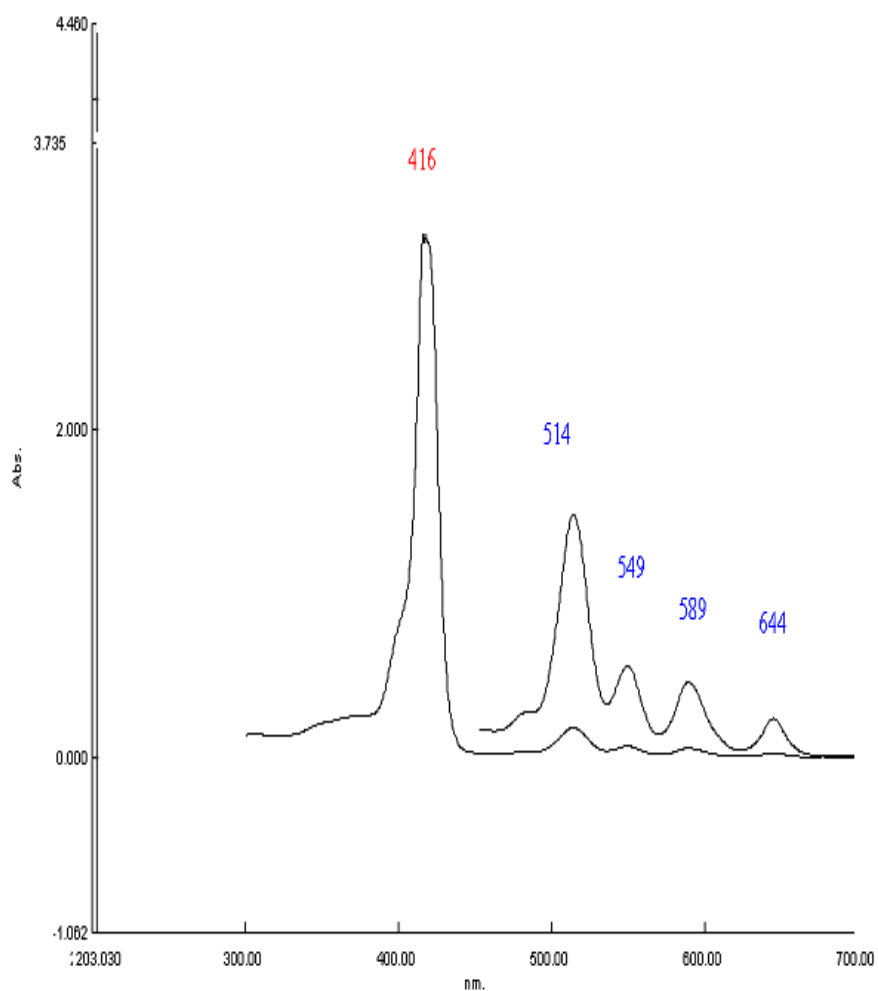
προς τα μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η B-ταινία αναφέρεται σε ισχυρώς επιτρεπτή διεγερμένη κατάσταση, ενώ η Q σε μία ημιεπιτρεπτή.

Σύμφωνα με το Gouterman, η B-ταινία που αναφέρεται σε μια ισχυρώς επιτρεπτή διεγερμένη κατάσταση, είναι το αποτέλεσμα της ανυσματικής πρόσθεσης των δίπολων της διεργασίας μετάβασης $\pi \rightarrow \pi$. Αντιθέτως η Q-ταινία η οποία οφείλεται στην δονητική αλληλεπίδραση, εμφανίζοντας τέσσερις καταστάσεις, είναι το αποτέλεσμα της αφαίρεσης των δύο δίπολων και γι' αυτό το λόγο έχουν μικρότερη ένταση.

Β) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

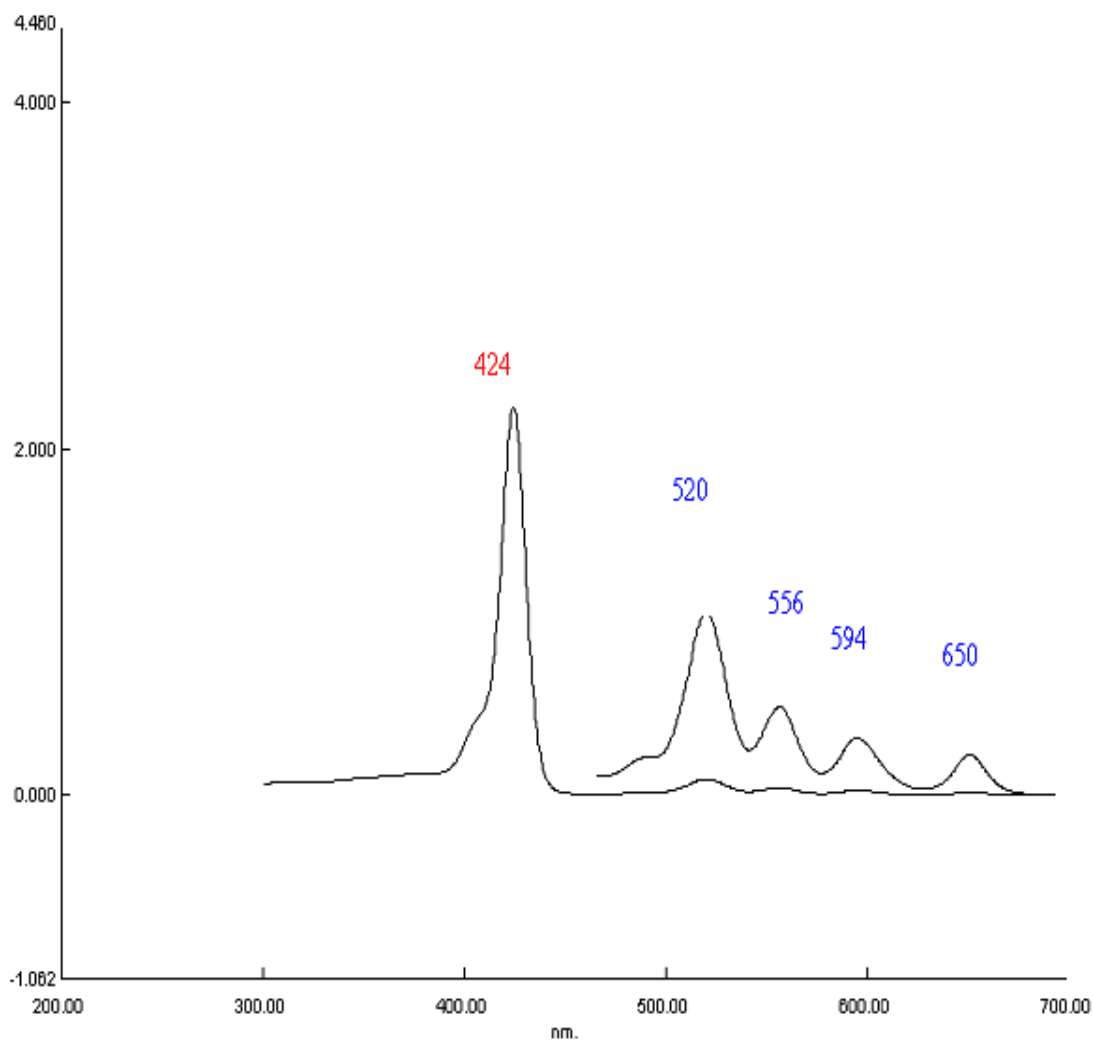
Αυτή η φασματοσκοπική μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των πορφυρινών έναντι των παραπροϊόντων που εκκλύονται από την στήλη διαχωρισμού κατά την αντίδραση συμπύκνωσης. Η ταυτοποίηση των παραγόμενων ενώσεων δεν θα ήταν ιδιαίτερα αξιόπιστη εξαιτίας των μικρών διαφορών στην απορρόφηση των παραγώγων. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis των εστέρων.

Μονοεστέρας $7,2 \cdot 10^{-5} \text{M}$	Q Bands					Soret
	λ (nm)	644	589	549,5	514	416
	A	0,238	0,460	0,557	1,480	3,175
	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	3296	6371	7715	20499	439751



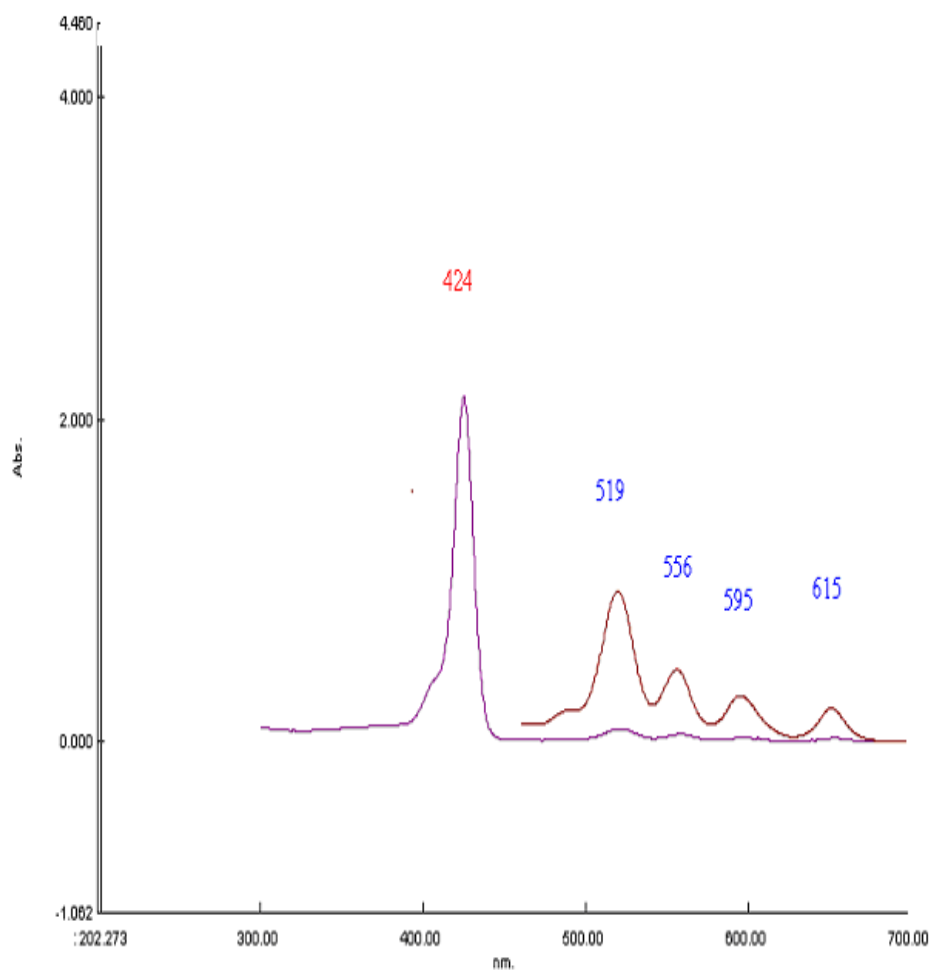
ΦΑΣΜΑ 6: Φάσμα UV-Vis του μονοεστέρα

cis- Διεστέρας $5,8 \cdot 10^{-5} \text{M}$	Q Bands					Soret
	λ (nm)	650,5	594,5	556,5	520	424,5
	A	0,233	0,327	0,508	1,049	2,241
	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	4017	5638	8759	18086	386379



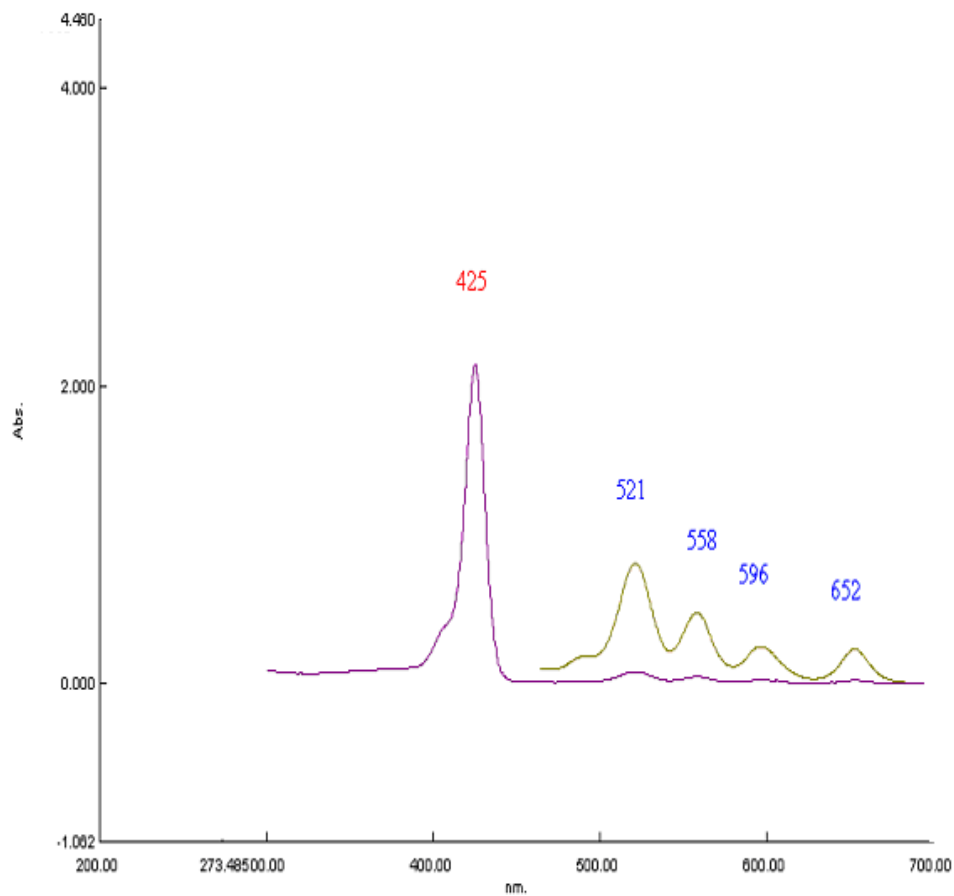
ΦΑΣΜΑ 7: Φάσμα UV-Vis του cis-διεστέρα

trans- Διεστέρας $6 \cdot 10^{-5} M$	Q Bands					Soret
	λ (nm)	651	595	556	519,5	424
	A	0,208	0,282	0,447	0,931	1,992
	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	3467	4700	7450	15517	332000



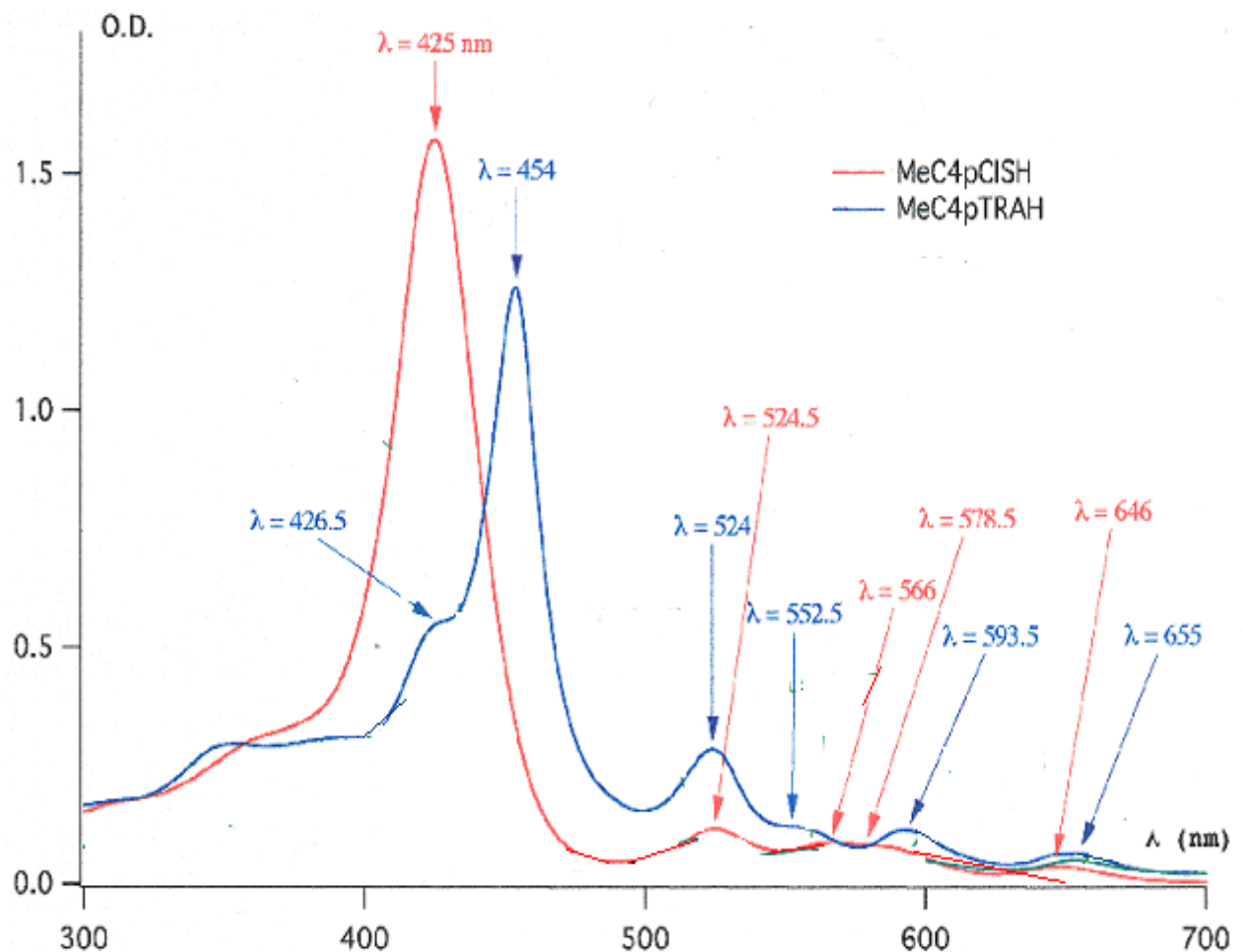
ΦΑΣΜΑ 8: Φάσμα UV-Vis του trans -διεστέρα

Τριεστέρας $5,2 \cdot 10^{-5} \text{M}$		Q Bands				Soret
	λ (nm)	652,5	596,5	558	521	425
	A	0,232	0,249	0,476	0,805	2,135
	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	4462	4788	9154	15481	410577



ΦΑΣΜΑ 9: Φάσμα UV-Vis του τριεστέρα

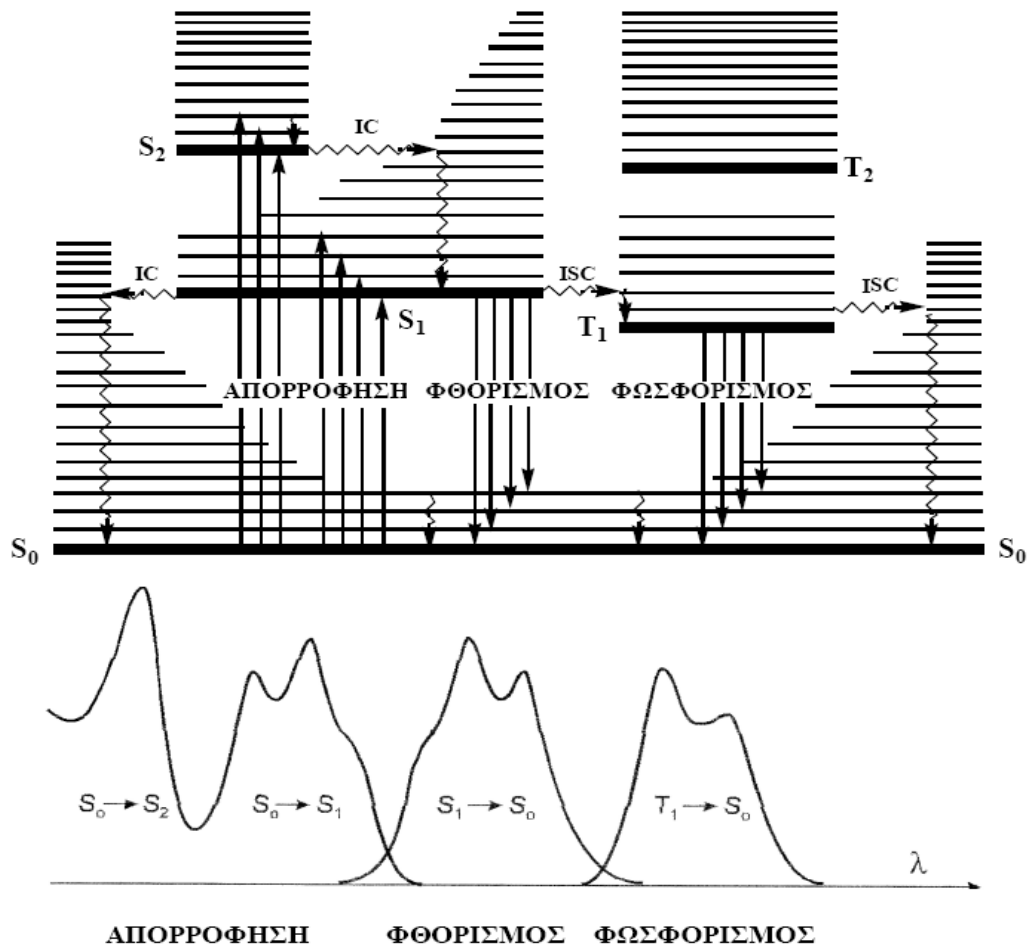
Κατά τη μεθυλίωση των πυριδικών ομάδων παρατηρούμε μετατοπίσεις των ταινιών απορρόφησης και διαπλάτυνση της Β-ταινίας. Αυτό οφείλεται στον απεντοπισμό του ηλεκτρονικού νέφους, λόγω του κατιονικού χαρακτήρα που προσδίδουν τα φορτία που εισάγονται στο μόριο. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα παρουσιάζεται παρακάτω στο φάσμα .



Φάσματα απορρόφησης των πορφυρινών MeC₄pCISH και MeC₄pTRAH σε διαλύτη απ.Η₂O

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Οι μεταπτώσεις μεταξύ των ηλεκτρονιακών καταστάσεων, της βασικής S_0 και των απλών (S_1 , S_2 κλπ.) ή τριπλών (T_1 , T_2 κλπ.) διεγερμένων, απεικονίζονται στο διάγραμμα Perrin-Jablonski (Σχήμα 20)



Σχήμα 20: Το διάγραμμα Perrin-Jablonski και οι απεικονίσεις των σχετικών θέσεων των φασμάτων απορρόφησης, φθορισμού και φωσφορισμού.

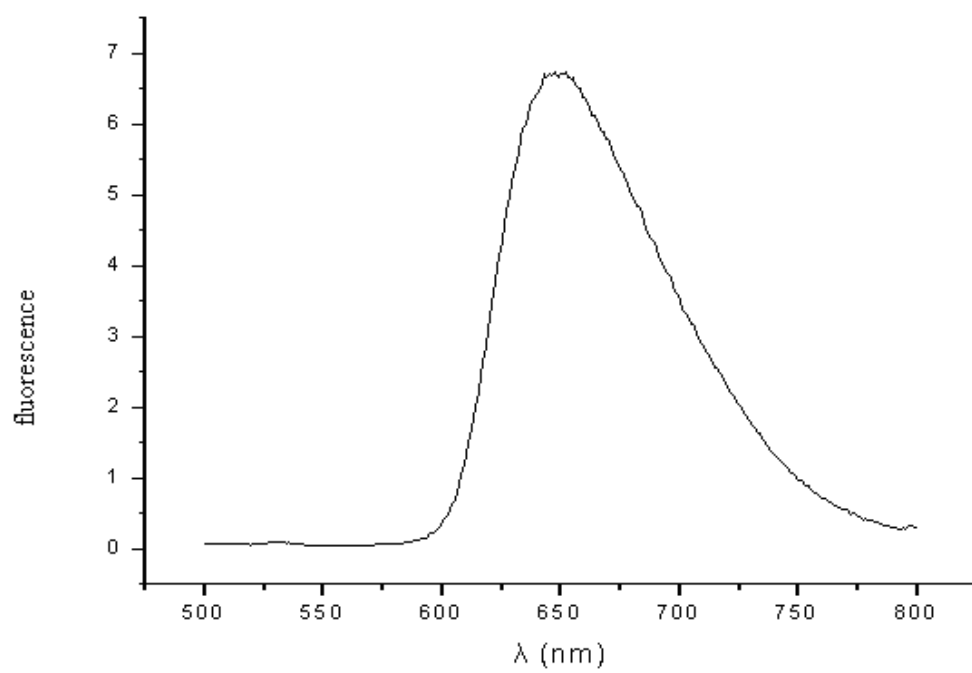
Οι σημαντικότερες από τις διεργασίες αυτές είναι η απορρόφηση φωτονίων, η εσωτερική μετάπτωση (internal conversion, IC), η διασυστημική διασταύρωση (intersystem crossing, ISC), ο φωσφορισμός και ο φθορισμός ο οποίος αποτελεί και την διεργασία η οποία θα αναφερθεί στην παρούσα διατριβή. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η απορρόφηση είναι σημαντικά ταχύτερη ($\approx 10-15$ s) συγκρινόμενη με οποιαδήποτε άλλη μετάπτωση.

Η εκπομπή φωτονίων η οποία συνοδεύει την αποδιέγερση $S1 \rightarrow S0$ ονομάζεται φθορισμός. Παρά το γεγονός ότι η μετάπτωση 0-0 (δηλαδή μεταξύ των δυο χαμηλότερων επιπέδων των καταστάσεων $S0$ και $S1$) είναι της ίδιας ενέργειας για την απορρόφηση και τον φθορισμό, εντούτοις το φάσμα φθορισμού εμφανίζεται σε υψηλότερα μήκη κύματος (χαμηλότερη ενέργεια). Αυτό οφείλεται στην απώλεια ενέργειας στη διεγερμένη κατάσταση εξαιτίας της δονητικής αποδιέγερσης.

Σύμφωνα με τον κανόνα Stokes (μια εμπειρική παρατήρηση που προηγήθηκε χρονικά του διαγράμματος Jablonski), το μήκος κύματος φθορισμού θα πρέπει να είναι πάντοτε μεγαλύτερο από εκείνο της απορρόφησης. Σε πολλές περιπτώσεις ωστόσο, το φάσμα απορρόφησης επικαλύπτει μερικώς το φάσμα φθορισμού, επειδή σε ένα μικρό ποσοστό το φως εκπέμπεται σε μικρότερα μήκη κύματος από το απορροφούμενο φως. Μια τέτοια παρατήρηση φαίνεται να είναι σε αντίφαση με τον κανόνα διατήρησης της ενέργειας. Πάντως, μια τέτοια “ενεργειακή ατέλεια” αντισταθμίζεται από το γεγονός ότι σε θερμοκρασία δωματίου, ένα μικρό ποσοστό μορίων βρίσκεται σε υψηλότερο δονητικό επίπεδο από το μηδενικό

τόσο στη βασική όσο και στη διεγερμένη κατάσταση (κατανομή ενεργειακών επιπέδων σύμφωνα με τον κανόνα του Boltzmann). Σε χαμηλή θερμοκρασία η απόκλιση αυτή από τον κανόνα του Stokes θα πρέπει να εξαλείφεται.

Σε γενικές γραμμές, οι διαφορές μεταξύ των δονητικών επιπέδων στη βασική και στις διεγερμένες καταστάσεις είναι παρόμοιες, επομένως το φάσμα φθορισμού συχνά ομοιάζει με την πρώτη ταινία απορρόφησης. Η διαφορά (εκφραζόμενη σε κυματαριθμούς) μεταξύ του μέγιστου της πρώτης ταινίας απορρόφησης και του μέγιστου φθορισμού ονομάζεται μετατόπιση Stokes. Πρέπει να σημειωθεί ότι η εκπομπή και η απορρόφηση φωτονίου είναι εξίσου ταχείες διεργασίες ($\approx 10-15$ s). Ωστόσο τα διεγερμένα μόρια παραμένουν στην S1 για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, το οποίο κυμαίνεται από μερικά δέκατα των picoseconds έως μερικές εκατοντάδες nanoseconds, πριν εκπέμψουν φωτόνια ή υποστούν άλλες διαδικασίες αποδιέγερσης. Έτσι, μετά την διέγερση ενός πληθυσμού μορίων με έναν σύντομο παλμό φωτός, η ένταση φθορισμού αυξάνεται εκθετικά με χαρακτηριστικό χρόνο αντικατοπτρίζοντας τη μέση διάρκεια ζωής των μορίων στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση. Ένα χαρακτηριστικό μέγεθος είναι η κβαντική απόδοση φθορισμού Φ , δηλαδή το κλάσμα των διεγερμένων μορίων που επιστρέφουν στη βασική κατάσταση εκπέμποντας φωτόνια φθορισμού. Με άλλα λόγια, η κβαντική απόδοση φθορισμού ορίζεται ως το πηλίκο του αριθμού των εκπεμπόμενων φωτονίων προς τον αριθμό των απορροφούμενων φωτονίων.



ΦΑΣΜΑ 10: Φάσμα Φθορισμού του μονοεστέρα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. I. Γεροθανάσης, ‘Εργαστήριο Φασματοχημικών και Φυσικοχημικών Τεχνικών’, Ιωάννινα, Ν. Χατζηλιάδης, 1999, 93.
2. J. A. Pople, *J. Chem. Phys.*, 1956, 24, 1111.
3. J. S. Waygh, R. W. Fessenden, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 79, 846.
4. C. E. Johnson, F. A. Bovey, *J. Chem. Phys.*, 1958, 29, 1012.
5. R. J. Abraham, *Mol. Phys.*, 1961, 4, 145.
6. M. Gouterman, in “*The porphyrins*”, D. Dolphin, Academic Press, 1978, Vol.III, Chapt 1.
7. K. Kalyanasundaram, “*Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes*”, Academic Press, 1992, 376.
8. J. R. Platt, “*Radiation Biology*”, A. Hollaender Ed., Mc Graw-Hill Book Co., 1956, Vol.III, Chapt. 2.
9. W. T. Simpson, *J. Chem. Phys.*, 1949, 17,1218.
10. M. Gouterman, *J. Chem. Phys.*, 1959, 30, 5.
11. A. H. Corwin, A. B. Chivvis, R. W. Poor, D. G. Whitten and E. W. Baker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 6577.
12. J. A. Shelnutt and V. Ortiz, *J. Phys. Chem.*, 1985, 89, 4733.
13. J. W. Buchler, W. Kokisch and P. D. Smith, *Struct. Bonding*, 1978, 34, 80.
14. K. S. Suslick, R. A. Watson, *New J. Chem.*, 1992, 16, 633.
15. P. Hambright, E. B. Fleischer; *Inorg. Chem.*, 1970, 9, 1757.

16. E. Van Caemelbecke, W. Kutner, K. M. Kadish; *Inorg. Chem.*, 1993, 32, 438.
17. Valeur B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH 2001.

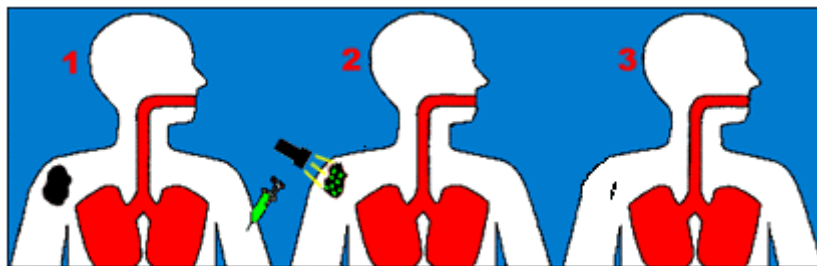
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

1. ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Α) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια ελάχιστα επεκτατική και υποσχόμενη νέα μέθοδος για την καταπολέμηση του καρκίνου και της αθηροματικής πλάκας κατά την οποία ένα φωτοευαίσθητο μέσο δρα ενάντια στους κακοήθεις όγκους υπό την επίδραση του φωτός. Μπορεί να εφαρμοστεί πριν ή μετά την χημειοθεραπεία, την ακτινοβολία ιονισμού ή την χειρουργική επέμβαση χωρίς να δεσμεύει αυτές τις θεραπείες ή να δεσμεύονται από μόνα τους. Επιπλέον μπορεί να εφαρμοστεί επανειλημμένα πολλές φορές στο ίδιο σημείο χωρίς να διακινδυνεύσει η ακεραιότητα των περιβαλλόντων ιστών. Η αντοχή της είναι καλύτερη από αλλά παραδοσιακά θεραπευτικά εργαλεία και έχει λιγότερη νοσηρότητα και καλύτερη λειτουργική έκβαση. Η πιθανότητα της ενδιάμεσης διανομής φωτός όπου το φως διαπερνά άμεσα μέσα από τους στερεούς όγκους επιτρέπει στην PDT να χρησιμοποιηθεί για μεγάλους βαθύς όγκους.

Τρεις θεμελιώδεις απαιτήσεις για PDT είναι το οξυγόνο, ορατό φως και η φωτοευαίσθητη ουσία. Κάθε παράγοντας είναι αβλαβής αλλά ο συνδυασμός τους μπορεί να παράγει θανατηφόρους κυτταροτοξικούς παράγοντες οι οποίοι μπορούν να καταστρέψουν τους όγκους κυττάρων.



Σχήμα 21:A typical PDT session.

Σε πρώτη φάση , ο ασθενής λαμβάνει φωτοευαίσθητες ουσίες μέσω ενδοφλέβιας ένεσης , ένα χρωστικό μόριο το οποίο ευαισθητοποιεί χημικές / βιοχημικές αντιδράσεις σύμφωνα με την απορρόφηση του φωτός. Απαιτείται μια περίοδος επώασης κατά την διάρκεια της οποίας τα φυσιολογικά κύτταρα εξοβελίζουν τον φωτοευαισθητοποιητή και τα κακοήθη κύτταρα το συγκεντρώνουν ανάμεσα στους μηχανισμούς. Η περίοδος της επώασης βελτιστοποιεί την αναλογία της συγκέντρωσης των φαρμάκων στα κακοήθη κύτταρα με αυτά στα φυσιολογικά κύτταρα έτσι ώστε τα κακοήθη κύτταρα έχουν αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις φωτοευαίσθητης ουσίας. Ο χρόνος επώασης μπορεί να ποικίλει από δυο ώρες ως αρκετές μέρες εξαρτώμενος από τα χαρακτηριστικά της φωτοευαίσθητης ουσίας.

Σε δεύτερη φάση, ο ασθενής επιστρέφει στην κλινική μετά την περίοδο επώασης και ο γιατρός εκθέτει μόνο τον ογκώδη ιστό και όχι τον φυσιολογικό, στο φως κατάλληλου μήκους κύματος και ισχύς για απορρόφηση της φωτοευαίσθητης ουσίας. Αρχικά οι πηγές φωτός για κλινική PDT ήταν *argon-pumped dye lasers*. Αλλά στις μέρες μας laser διόδων στερεάς κατάστασης (ιατρικά lasers) τα οποία συνδέονται με τις οπτικές ίνες υιοθετούνται όλο και περισσότερο για να ακτινοβολήσουν τους φωτοευαισθητοποιητές που βρίσκονται σε κάθε επιθυμητό μέρος του

σώματος και σε κάθε επιθυμητό μήκος κύματος στην περιοχή του ορατού ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Ο γενικά αποδεκτός μηχανισμός της δράσης της PDT είναι ο ακόλουθος. Όταν οι ευαισθητοποιείς ουσίες διευκρινίζονται με φως του σωστού μήκους κύματος, αυτά απορροφούν ενέργεια και στην επιστροφή την μεταφέρουν στο μοριακό οξυγόνο. Η ενέργεια που μεταφέρεται από την φωτοευαίσθητη ουσία μετατρέπει το $^3\text{O}_2$ σε $^1\text{O}_2$, ένα εξαιρετικά αντιδραστικό είδος το οποίο οδηγεί τελικά στην καταστροφή των κύτταρων στόχων.

Ο αρχικός στόχος όλων των θεραπειών ενάντια στον καρκίνο και την αθηρωματική πλάκα είναι να έχει επιπτώσεις στα κύτταρα στόχος ενώ διαφυλάσσουν τα φυσιολογικά κύτταρα και ιστούς: η απαίτηση είναι να μεγιστοποιήσει αυτή την επιλεκτικότητα. Η επιλεκτικότητα είναι ένα ξεχωριστό χαρακτηριστικό της PDT η οποία εκλείπει στις παραδοσιακές θεραπείες. Η PDT εξασφαλίζει ένα μέσο για να πετύχει υψηλή επιλεκτικότητα από τα δυο συστατικά του: φως και φωτοευαίσθητη ουσία. Ο φωτοευαισθητοποιητής που παρέχεται στο σώμα δεν είναι ενεργός απουσία φωτός. Στην πραγματικότητα, το πραγματικό φάρμακο στην PDT είναι «φωτοευαισθητοποιητής». Ο φωτοευαισθητοποιητής απουσία φωτός είναι ένα «προ-φάρμακο». Οι ιστοί που προορίζονται να καταστραφούν είναι επιλεκτικά φωτισμένοι και η καταστροφή είναι γενικά περιορισμένη μόνο σε εκείνες τις περιοχές. Άλλες θέσεις επηρεάζονται ελάχιστα γιατί οι φωτοευαισθητοποιητές δεν είναι τοξικοί εν απουσία φωτός και επειδή αυτά τείνουν να συσσωρεύουν στους ιστούς στόχους. Εν πράξη, το ποσό επιλεκτικότητας εξαρτάται από τον βαθμό συσσώρευσης του φωτοευαισθητοποιητή στα κύτταρα στόχος και το βαθμό στον οποίο ο φωτισμός είναι στο χώρο εντοπισμένος στο στόχο.

Το Photofrin είναι ένα εξευγενισμένο παράγωγο αιματοπορφυρίνης, το οποίο είναι ένα εγκεκριμένο πρώτο παράγωγο φωτοευαίσθητοποιητή για PDT. Έχει γίνει αποδεκτό για τη θεραπεία των διάφορων μορφών καρκίνου σε πολλές χώρες. Παρόλο που αυτό εκπληρώνει ορισμένα κριτήρια για ιδανικό φωτοευαίσθητοποιητή έχει διάφορα μειονεκτήματα.

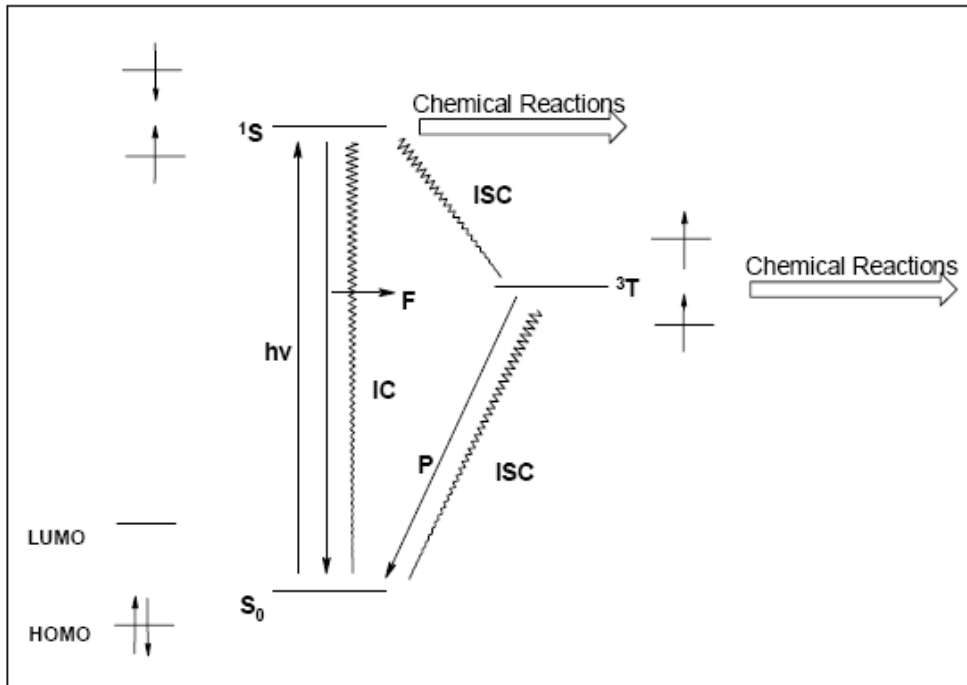
Το Photofrin μένει στο δέρμα για περίπου 30 μέρες μετά την θεραπεία κάνοντας τον ασθενή ευαίσθητο στο έντονο φως (Mayer-Betz's 1933). Σε μια ηλιόλουστη μέρα, ο ασθενής στον οποίο έχει χορηγηθεί αυτός ο φωτοευαίσθητοποιητής θα πρέπει να μείνει μέσα ή θα χρειαστεί να φορέσει καπέλο και γάντια αν προτιμά να είναι έξω στο ύπαιθρο.

B) ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ PDT

Η θεραπευτική αποτελεσματικότητα κάθε αντικαρκινικού φάρμακου εξαρτάται από το μηχανισμό της δράσης του. Προφανώς η καταστροφή των κακοήθων κυττάρων είναι ένα βιοχημικό/μοριακό βιολογικό και τελικά ένα κλινικό γεγονός. Αλλά όσον αφορά την PDT, συνδέεται στενά με την αλληλεπίδραση του φωτός με μια φωτοευαίσθητη ουσία, μια καθαρά φυσική διαδικασία.

Φυσική Χημεία: Όλα αρχίζουν με την φωτοευαίσθητη ουσία να απορροφά ένα φωτόνιο από πηγή φωτός κατάλληλου μήκους κύματος. Η φωτοευαίσθητη ουσία ενεργοποιείται, με ένα τυπικά διεγερμένο ηλεκτρόνιο από υψηλά κατειλημμένο μοριακό τροχιακό HOMO σε ένα χαμηλότερου μη κατειλημμένου μοριακού τροχιακού LUMO. Ένα τροποποιημένο διάγραμμα Jablonski επεξηγεί την διαδικασία διέγερσης και το αναμενόμενο

αποτέλεσμα μια διεγερμένης κατάστασης 1S του φωτοευαισθητοποιητή. Η 1S κατάσταση μπορεί να προέρθει από ένα από τα βήματα :



- i. Ραδιενεργή αποσύνθεση – Φθορισμός (F)
- ii. Διασυστηματικό **crossing** (ISC) για να παραγάγει την κατάσταση σωματιδίου με σπιν 1 (3T).
- iii. Μη Ραδιενεργή αποσύνθεση (εσωτερική μετατροπή, ολοκληρωμένο κύκλωμα) με απώλεια θερμότητας για να παραγάγει την θεμελιώδη κατάσταση(S_0).
- iv. Χημική /φυσική αντίδραση με τα περιβάλλοντα υποστρώματα.
- v. Ραδιενεργή αποσύνθεση – φωσφορισμός (P)

vi. ISC (μη Ραδιενεργή) για να παράγει τη βασική κατάσταση (S_0).

vii. Χημική/ φυσική αντίδραση με τα περιβάλλοντα υποστρώματα συμπεριλαμβανόμενου του οξυγόνου.

Από τις 7 παραπάνω διαδικασίες, η 7^η είναι η κεντρική στον βιοχημικό μηχανισμό της PDT. Τα βήματα I – III, v και vi είναι όλες φωτοχημικές διαδικασίες. Αλλά (iv) και (vii) περιλαμβάνει χημικούς μετασχηματισμούς.

Βιοχημικός μηχανισμός: Τρία γεγονότα είναι σημαντικά εδώ:

- i) η παροχή και διατήρηση φαρμάκων,
- ii) μοριακούς μηχανισμούς, και
- iii) βήματα καταστροφής όγκων

Η μεταφορά των ευαισθητοποιών ουσιών στο σώμα και ο ακολούθως συγκεκριμένος εντοπισμός εξαρτάται από την υδροφοβικότητα του, την κατάσταση συσσώρευσης και την συγκεκριμένη ιονική κατάσταση. Οι κύριοι μεταφορείς στο αίμα είναι οι λιποπρωτείνες και η αλβουμίνη. Δύο σημαντικές παρατηρήσεις μπορούν να γίνουν από τα διάφορα σενάρια που προτείνονται για την συγκέντρωση και διατήρηση της ευαισθητοποιώ ουσίας σε έναν όγκο. Αυτά είναι:

1. υψηλά επίπεδα LDL υποδοχέων σε πολλαπλασιασμένα κύτταρα συνδεδεμένα με συγκέντρωση χοληστερόλης,
2. χαμηλότερο pH που συχνά βρίσκεται ενδιάμεσα στα νεοπλασματικά κύτταρα.

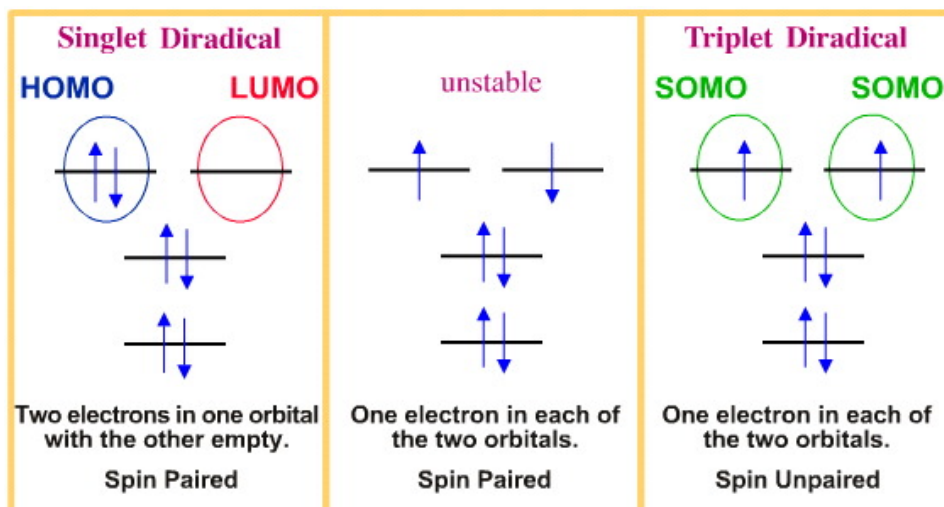
Έχει αποδειχθεί ότι υδροφοβικές ευαισθητοποιώ ουσίες βασισμένες σε πορφυρίνες μεταφέρονται κυρίως στο αίμα από λιποπρωτείνες, ιδιαίτερα LDL. Οι LDL είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος επειδή αναγνωρίζονται από

έναν συγκεκριμένο δεκτή ο οποίος καλείται B/E δέκτης και οδηγεί στην γρήγορη εσωτερικήυση και παράδοση του μορίου LDL στο λυσοσωμικό τμήμα. Ο αριθμός των LDL δεκτών συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών κύτταρων είναι γενικά υψηλότερος στα κακοήθη κύτταρα. Αυτό συμβαίνει επειδή τα υπερπολλαπλασιασμένα κύτταρα απαιτούν μια έξτρα τροφοδότηση της χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων, τα οποία ικανοποιούνται μέσω του σχηματισμού των δεκτών που ελέγχουν συγκεκριμένα τον μεταβολισμό της εξωκυτταρικής LDL. Συνεπώς, πιστεύεται ότι η υδροφοβική συσσώρευση της ευαισθητοποιώ ουσίας από ένα όγκο οδηγείται από την παράδοση του στα κύτταρα μέσω της LDL. Ωστόσο, έχει επίσης αποδειχθεί ότι μερικές πορφυρίνες είναι συνδεδεμένες σε HDL αλλά βρίσκονται σε μικρό ποσοστό στο πλάσμα. Από την άλλη μεριά υδρόφιλοι φωτοευαισθητοποιητές, όπως πορφυρίνες διαλυτές στο νερό και φθαλοκυανίνες μεταφέρονται κατά ένα μεγάλο μέρος από την αλβουμίνη και άλλες πρωτεΐνες ορού.

Σε κακοήθη ιστό, η χορήγηση οξυγόνου σε γρήγορα αυξανόμενα κακοήθη κύτταρα είναι γενικά ανεπαρκής αλλά όχι σε βαθμό που η PDT είναι αρκετά παρεμποδισμένη. Η γλυκόζη εν μέρει χρησιμοποιείται μέσω του αναερόβιου βήματος παράγοντας μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος. Η υπερβολική ποσότητα οξέος που παράγεται στα κύτταρα μεταφέρεται στο εξωτερικό μέσο. Το pH στους διάφορους όγκους έχει βρεθεί να είναι χαμηλότερο από αυτό των κανονικών ιστών. Κατά συνέπεια, υπάρχει μια πιθανή συμμετοχή των ισορροπιών οξέων βάσεων στην αυξανόμενη συσσώματωση και διατήρηση των ευαισθητοποιητών ουσιών που έχουν ιονισμένες ομάδες από όγκους.

Γ) ΙΔΑΝΙΚΟΣ ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΗΣ

Οι φωτοευαίσθητοποιητές (PS) χρησιμοποιούνται στην φωτοθεραπεία και σκοπός τους είναι να εισχωρούν στα κύτταρα, να απορροφούν την ενέργεια του φωτός, να διεγείρονται και κατά την αποδιέγερση τους να μετατρέπουν το οξυγόνο σε singlet oxygen.



Σχήμα 22

Το παράγωγο της αιματοπορφυρίνης και οι παρασκευές προερχόμενες από αυτό καλούνται φωτοευαίσθητοποιητές πρώτης γενεάς. Εν όψει των ανεπαρειών που συναντώνται από την πρώτη γενεά φωτοευαίσθητοποιητών, ερευνητές σε όλο τον κόσμο βρίσκονται σε αναζήτηση για πιο ισχυρούς, αποδοτικούς φωτοευαίσθητοποιητές που μπορούν να εξασφαλίσουν αποτελεσματική θεραπεία (για όγκους, πλάκα που βρίσκονται σε μεγάλο βάθος με ελάχιστες παρενέργειες).

Μερικές από τις ουσιαστικές ιδιότητες για ιδανικό φωτοευαίσθητοποιητή παρατίθεται κατωτέρω:

1. Πρέπει να είναι χημικά καθαρό και γνωστής συγκεκριμένης σύστασης με αναπαραγωγική σύνθεση.
2. Πρέπει να έχει υψηλή κβαντική απόδοση για την παραγωγή $^1\text{O}_2$ με σκοπό την αποτελεσματική καταστροφή των κυττάρων όγκων.
3. Πρέπει να απορρόφα ισχυρά με υψηλό συντελεστής ϵ στη ερυθρά περιοχή μήκους κύματος κατά προτίμηση μεταξύ 700-800 nm όπου η σκέδαση του φωτός είναι ελάχιστη και η διείσδυση σε ιστό είναι μέγιστη και είναι αρκετά ενεργητικός να παραγάγει το $^1\text{O}_2$.
4. Πρέπει να κατέχει την ελάχιστη τοξικότητα και να είναι μόνο κυτταροτοξικός στην παρουσία φωτός.
5. Πρέπει να έχει την προνομιακή συνοχή από τον ιστό στόχων (κύτταρα όγκων).
6. Πρέπει να εκκριθεί γρήγορα από το σώμα, κατά συνέπεια πρόκληση μιας χαμηλής συστημικής τοξικότητας.
7. Πρέπει να συντίθεται εύκολα με χαμηλό κόστος

2.ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗ LDL

A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι λιποπρωτεΐνες δεν έχουν κύριους χημικούς δεσμούς μεταξύ των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, αλλά αποτελούν σύμπλοκες ενώσεις που σχηματίζονται από την εναπόθεση των λιποειδών πάνω σε ορισμένες πρωτεΐνες (από-λιποπρωτεΐνες) και οι οποίες σταθεροποιούνται με δευτερεύοντες δεσμούς (υδρόφοβους κτλ).

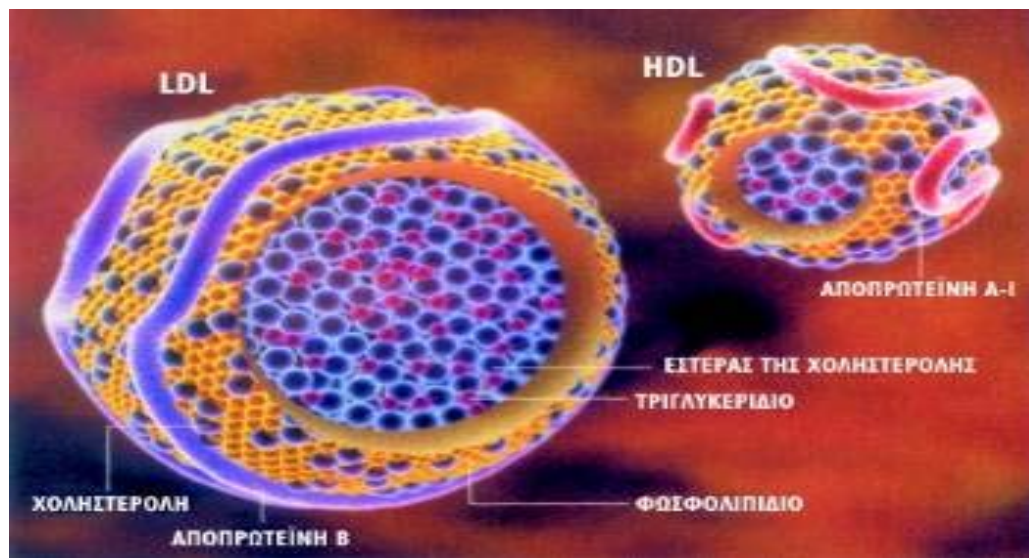
Η από- πρωτεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταβολική τύχη των λιποπρωτεϊνών διότι: α) συμμετέχει στην αναγνώριση των λιποπρωτεϊνών από τους μεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων β) παίζει το ρόλο του συμπαραγόντα στις μεταβολικές πορείες και στην ανταλλαγή των λιποειδών μεταξύ των λιποπρωτεϊνών και των διαφόρων ιστών γ) η ενζυμική τους δράση πιστεύεται ότι στο μέλλον θα αποτελέσει εξήγηση σημαντικών παθοφυσιολογικών μηχανισμών.

Οι λιποπρωτεΐνες μεταφέρουν τη χοληστερόλη μέσα στο αίμα. Η LDL τη μεταφέρει από το συκώτι και τα έντερα προς διάφορους ιστούς, όπου χρησιμοποιείται για την επισκευή των μεμβρανών και την παραγωγή στεροειδών. Η HDL επιστρέφει τη χοληστερόλη στο συκώτι για αποβολή ή ανακύκλωση.



Σχήμα 23

Η LDL είναι μια λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας της οποίας τα σωματίδια προκύπτουν από την VLDL (λιποπρωτεΐνη χαμηλότερης πυκνότητας που εκκρίνεται από το ήπαρ) με απομάκρυνση των τριγλυκεριδίων και της ApoC. Η LDL έχει διάμετρο περίπου 22 nm και προσλαμβάνεται με ενδοκύττωση από τα κύτταρα αφού προσδεθούν σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς μέσω της ApoB-100 πρωτεΐνης. Αποτελείται κυρίως πρωτεΐνη APOB-100, εστέρες χοληστερόλης, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια και χοληστερόλη.

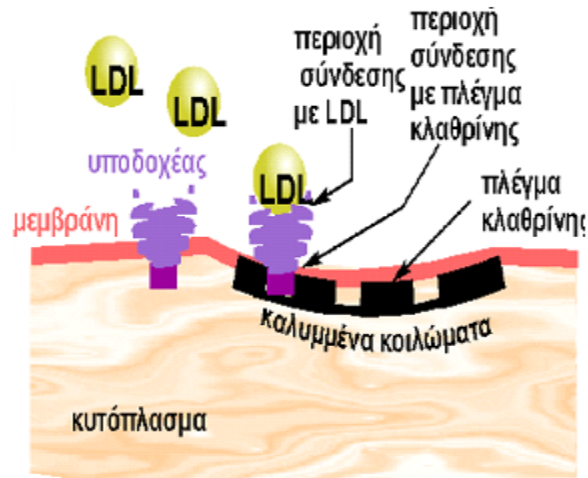


Σχήμα 24: Δομή λιποπρωτεϊνών

Όταν τα κύτταρα χρειάζονται χοληστερόλη για τη βιοσύνθεση νέων μεμβρανών, την παραλαμβάνουν από την LDL ως εξής:

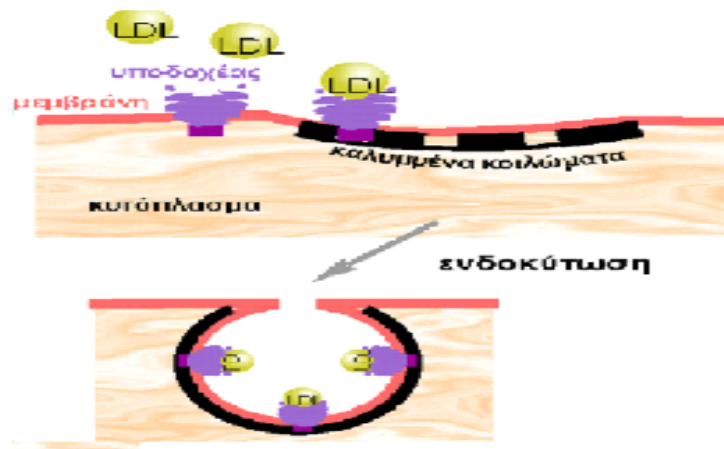
- 1 Η LDL δεσμεύεται σε ειδικούς υποδοχείς στην περικυτταρική μεμβράνη, οι οποίοι είναι γλυκοπρωτεΐνες με το μεγαλύτερο τμήμα τους στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης και ένα μικρό τμήμα τους στην εσωτερική πλευρά (προς το κυτταρόπλασμα)

- 2 Οι υποδοχείς αυτοί που βιοσυντίθενται από το κύτταρο όταν απαιτείται αυτή η διεργασία, φέρονται στη μεμβράνη και συνδέονται με ειδικές περιοχές αυτής (τα καλυμμένα κοιλώματα)(σχήμα 25).



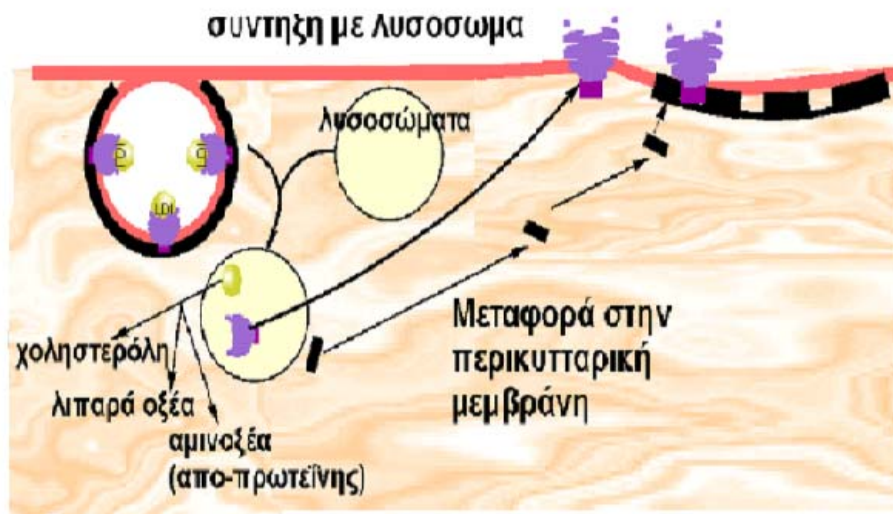
Σχήμα 25

- 3 Μετά τη σύνδεση της LDL στον υποδοχέα γίνεται ενδοκύτωση με όχι πλήρως καθορισμένο μηχανισμό(σχήμα 26).



Σχήμα 26

- 4 Τελικά οι υποδοχείς και η LDL μεταφέρονται στα λυσοσώματα όπου πραγματοποιούνται οι παρακάτω διεργασίες α) οι εστέρες της χοληστερόλης υδρολύονται σε ελεύθερη χοληστερόλη και β) ενώ οι από-πρωτεΐνες υδρολύονται προς τα αμινοξέα τους(σχήμα 27).



Σχήμα 27

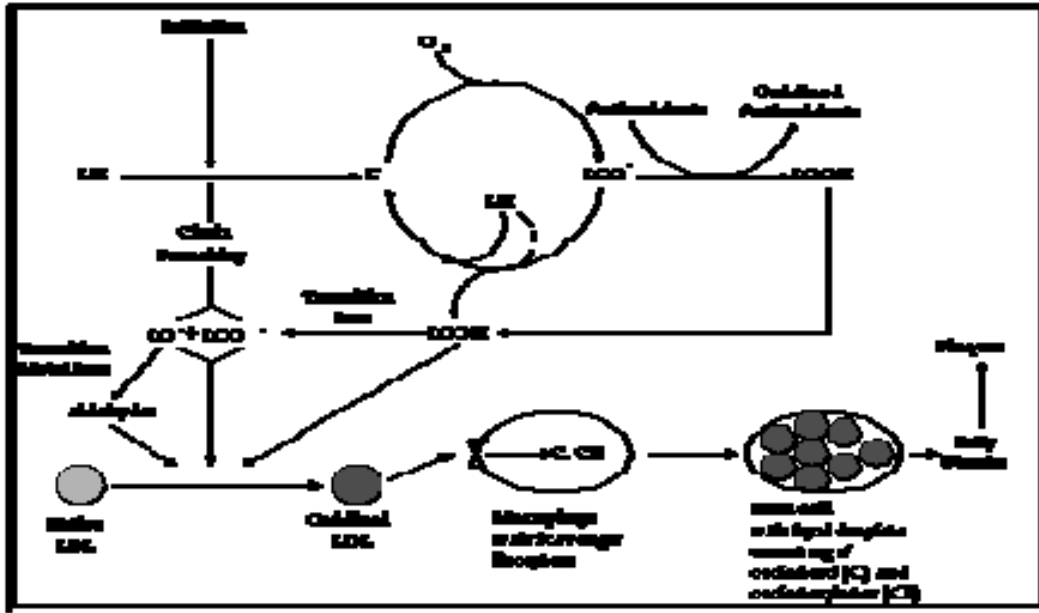
B) ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ LDL

Η εναπόθεση της οξειδωμένης LDL (oxLDL) στο τοίχωμα της αρτηρίας έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας . Πολλά κύτταρα είναι ικανά να οξειδώνουν την LDL, όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και ινωδοβλάστες. Ωστόσο, αυτά που εμπλέκονται στην αθηροσκληρωτική βλάβη, και στα οποία βρέθηκε oxLDL, είναι τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα (τα οποία φαίνεται να συμβάλλουν στην οξείδωση της LDL in vivo). Είναι πιθανό ότι η LDL οξειδώνεται σε

μικροπεριοχές στο αρτηριακό τοίχωμα, απομονωμένες από τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος. Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο ποιοι οξειδωτικοί μηχανισμοί ή ποια είδη ελευθέρων ριζών εμπλέκονται. Στους πιθανούς υποψήφιους περιλαμβάνονται η NADPH-εξαρτώμενη οξειδάση, η μυελοϋπεροξειδάση, το κυτόχρωμα P450, η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, τα υπεροξυνιτρώδη, η ξανθοξειδάση, η κερουλοπλασμίνη και η λιποξυγονάση.

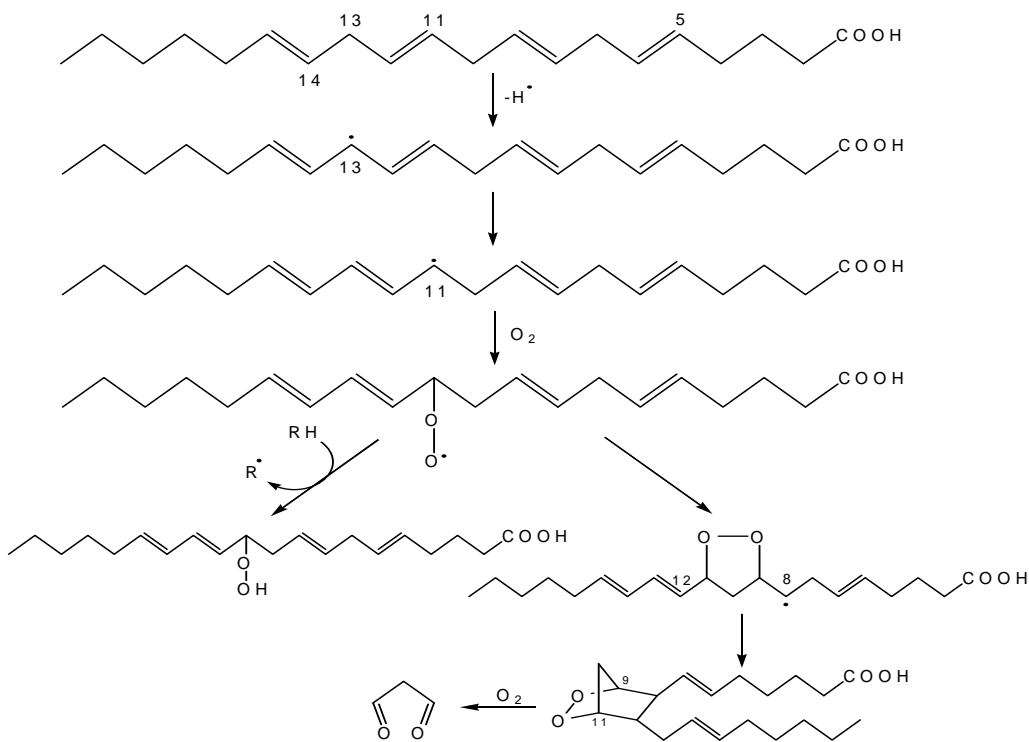
Η οξείδωση που πραγματοποιείται παρουσία μεταβατικών μετάλλων φαίνεται να συμβαίνει σε προχωρημένες βλάβες, ενώ οξείδωση μέσω της δράσης της μυελοϋπεροξειδάσης ή δραστικών μορφών αζώτου συμβαίνει κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της πλάκας.

Η οξείδωση της LDL είναι αλυσιδωτή αντίδραση λιπιδικής υπεροξειδωσης. Ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από την ενός ηλεκτρονίου αναγωγή του μοριακού οξυγόνου μπορεί να προσβάλλουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, που περιέχονται στην LDL, καταλήγοντας στο σχηματισμό λιπιδικής ρίζας επικεντρωμένης σε άτομο άνθρακα. Η προκύπτουσα ασταθής ρίζα με μοριακή αναδιάταξη καταλήγει σε μια πιο σταθερή διαμόρφωση, ένα συζευγμένο διένιο. Το συζευγμένο διένιο αντιδρά πολύ γρήγορα με μοριακό οξυγόνο σχηματίζοντας ένα σημαντικό ενδιάμεσο, μια λιπιδική υπεροξυλική ρίζα (LOO[•]).



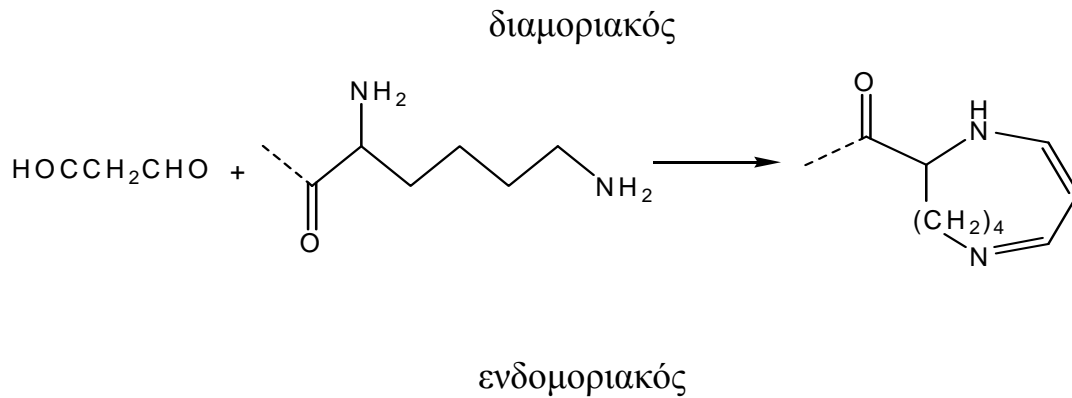
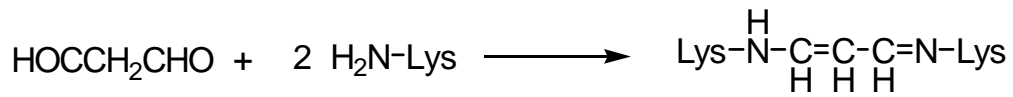
Σχήμα 28: Οξείδωση LDL

Μια υπεροξυλική ρίζα πολυακόρεστου λιπαρού οξέος της LDL μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό πολυακόρεστο λιπαρό οξύ προς σχηματισμό υδροϋπεροξειδίου και μιας άλλης λιπιδικής ρίζας, οδηγώντας έτσι σε αλυσιδωτή αντίδραση. Απομάκρυνση ατόμων υδρογόνου, λόγω υπεροξυλικών ριζών, από άλλα λιπίδια, συμπεριλαμβανομένης της χοληστερόλης, δίνει τελικά οξυστερόλες. Τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία διασπώνται σε αλδεύδες μικρότερης αλυσίδας, όπως η μηλονική διαλδεύδη και η 4-υδροξυ-εννεάλη (σχήμα 28).



Σχήμα 28

Αυτές οι δραστικές αλδεύδες μπορούν με τη σειρά τους να συνδεθούν στην ε-αμινομάδα λυσίνης της apo B-100 αυξάνοντας το αρνητικό φορτίο της πρωτεΐνης. Ο κλασικός υποδοχέας LDL αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη περιοχή θετικού φορτίου από κατάλοιπα λυσίνης, αργινίνης και ιστιδίνης στην apo B-100. Η μετατροπή αυτής της περιοχής έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία σύνδεσης με τον B/E υποδοχέα, και επιπλέον, η αύξηση του αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια της apo B-100 οδηγεί σε αυξημένη αναγνώριση από τους υποδοχείς-παγίδες των μακροφάγων.



Σχήμα 29: Προσβολή υπολοίπων λυσίνης, του ίδιου ή διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων, από τη μηλονική διαλδεύδη .

3.ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ

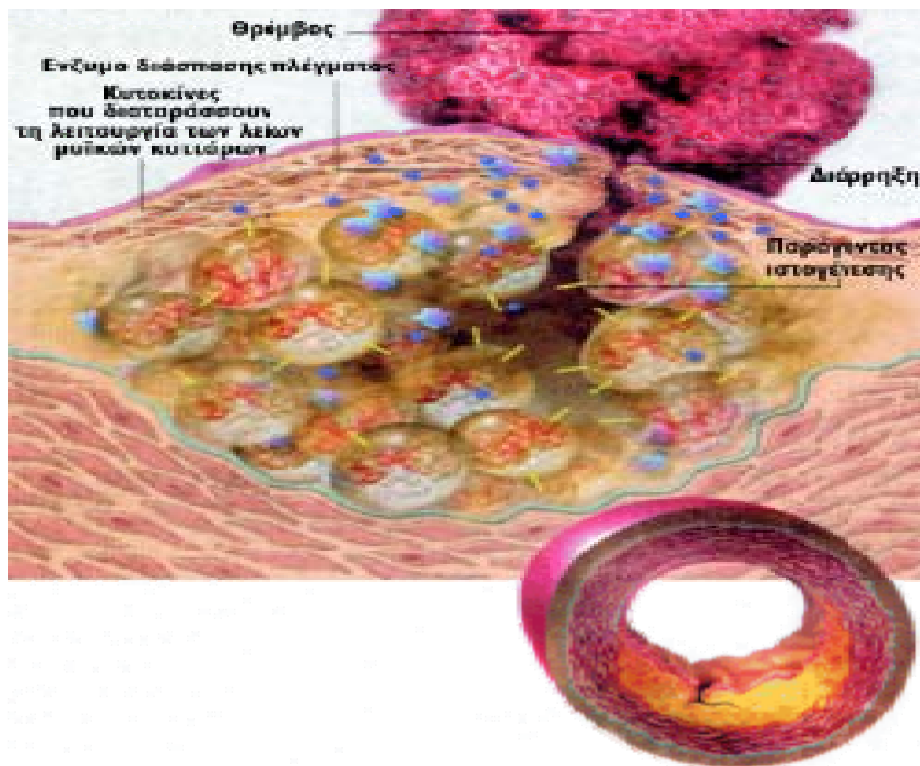
A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αθηροσκλήρυνση, η κύρια αιτία θανάτων στις δυτικές χώρες, είναι μια προοδευτική παθολογική διεργασία που γενικά αρχίζει στην παιδική ηλικία και εκδηλώνεται κλινικά στο μέσο της ενήλικης ζωής και αργότερα. Πριν από 25 χρόνια, η αθηροσκλήρυνση θεωρείτο εκφυλιστική νόσος λόγω της συσσωρεύσεως λιπιδίων και νεκρωτικών υπολειμμάτων στις προχωρημένες βλάβες. Σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι μια πολυπαραγοντική διεργασία, η οποία για να έχει κλινικά επακόλουθα, απαιτεί την εκτεταμένη συσσώρευση λείων μυϊκών κυττάρων στον έσω χιτώνα της πάσχουσας αρτηρίας.

Η μορφή και το περιεχόμενο των προχωρημένων βλαβών της αθηροσκλήρυνσεως αντικατοπτρίζουν τα αποτελέσματα τριών θεμελιωδών βιολογικών διεργασιών. Αυτές είναι: α) συσσώρευση λείων μυϊκών κυττάρων στον έσω χιτώνα, σε συνδυασμό με ποικίλο αριθμό συσσωρευόμενων μακροφάγων και T-λεμφοκυττάρων β) σχηματισμός από τα υπερπλασσόμενα λεία μυϊκά κύτταρα μεγάλων ποσοτήτων θεμέλιας ουσίας συνδετικού ιστού, συμπεριλαμβανομένου του κολλαγόνου, των ελαστικών ινών και των πρωτεαγλυκανών, και γ) συσσώρευση λιπιδίων, κυρίως με τη μορφή των εστέρων χοληστερόλης και ελεύθερης χοληστερόλης, εντός των κυττάρων και στους γύρω συνδετικούς ιστούς .

Παρά το γεγονός ότι ο όρος «αθηροσκλήρυνση» προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «αθήρη» που σημαίνει πυκνός πολτός και «σκλήρυνση», είναι σημαντικό να υπογραμμίσουμε ότι υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις σχετικές αναλογίες των ιστών που παράγονται από τις διεργασίες αυτές στις

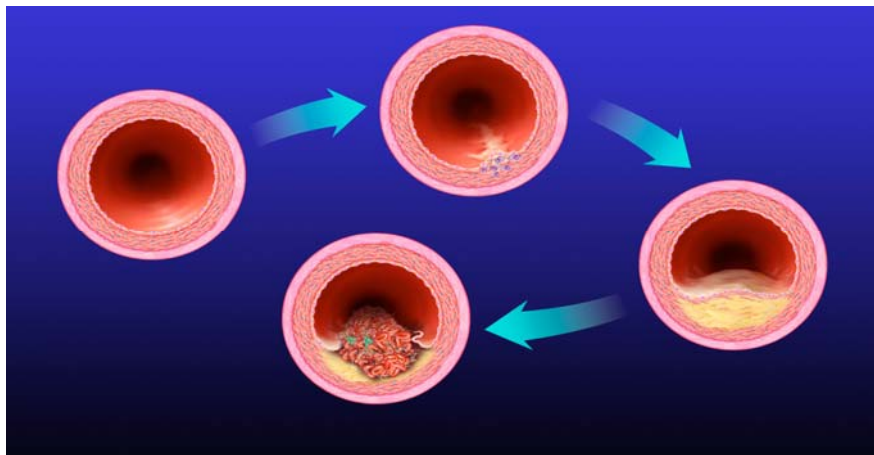
αθηροσκληρυντικές βλάβες. Συνεπώς, πολλές βλάβες της αθηροσκληρύνσεως είναι πυκνές και ινώδεις, ενώ άλλες περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων και νεκρωτικών καταλοίπων και οι περισσότερες εμφανίζουν συνδυασμούς και διάφορες αναλογίες των χαρακτηριστικών αυτών. Η κατανομή των λιπιδίων και του συνδετικού ιστού στις βλάβες καθορίζει αν αυτές είναι σταθερές ή έχουν τον κίνδυνο ρήξεως, θρομβώσεως και κλινικών επακολούθων.



Σχήμα 30: Δομή αθηρωματικής πλάκας

B) ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Παθολογικές μελέτες έδειξαν μία σειρά καθοριστικών αλλαγών που συμβαίνουν στα αγγεία κατά τη διάρκεια της αθηρογένεσης. Σημαντικό ρόλο στις παθολογικές αυτές αλλαγές παίζουν τα προερχόμενα από το αίμα φλεγμονώδη κύτταρα όπως μονοκύτταρα/μακροφάγα. Κυτταρολογικές μελέτες με αγγειακά κύτταρα και μονοκύτταρα/μακροφάγα υποδηλώνουν τα πιθανά κυτταρικά και βιοχημικά μονοπάτια για την έναρξη και εξέλιξη της νόσου. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι το ενδοθήλιο είναι ο βασικός μεσολαβητής της φλεγμονής και ότι η εναπόθεση της οξειδωμένης LDL (oxLDL) στον υπενδοθηλιακό χώρο συμβάλλει σημαντικά στη μετανάστευση των μονοκυττάρων και στη διαφοροποίησή τους σε αφρώδη κύτταρα (foam cells). Για τη διαλεύκανση και κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της αθηρογένεσης, πολλοί ερευνητές τις δύο τελευταίες δεκαετίες ανέπτυξαν τεχνικές και μεθοδολογίες σε διαγονιδιακά ποντίκια .



Σχήμα 31: Πορεία δημιουργίας Αθηρωματικής πλάκας

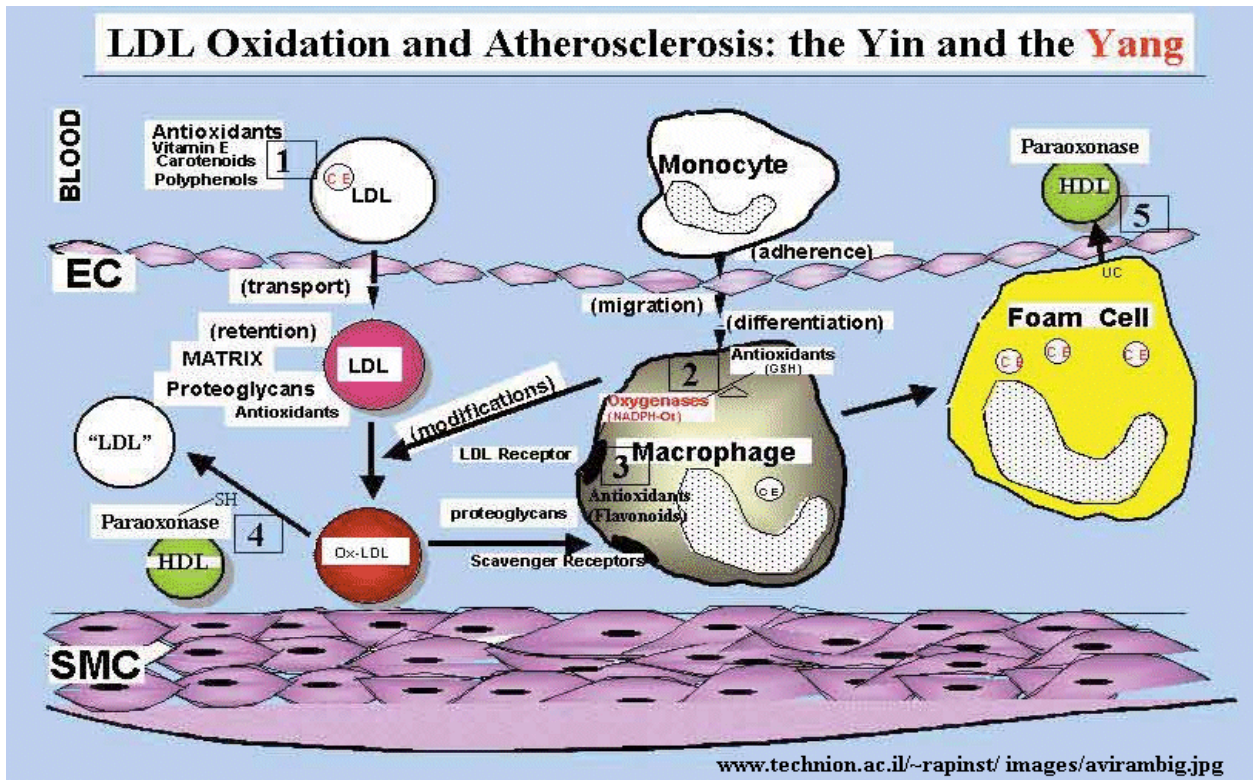
Γ) ΕΝΑΡΞΗ ΒΛΑΒΗΣ

Το ενδοθήλιο, με τις ισχυρές διακυτταρικές συνδέσεις του, λειτουργεί σαν ένας ημιδιαπερατός φραγμός ανάμεσα στο αίμα και τους ιστούς. Αυτό έχει αισθητήριες και εκτελεστικές λειτουργίες και μπορεί να παράγει μόρια τα οποία ρυθμίζουν τη θρόμβωση, τη φλεγμονή, τον αγγειακό τόνο και την αγγειακή αναδιοργάνωση. Για παράδειγμα, αφαίρεση του ενδοθηλίου έχει ως αποτέλεσμα την αποκόλληση, μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων (VSMCs), φαινόμενο το οποίο υποχωρεί με την ενδοθηλιακή αναμόρφωση. Μεταξύ των σπουδαιότερων φυσικών δυνάμεων, ασκούμενων στο ενδοθήλιο είναι η διατμητική τάση των αγγείων (shear stress), η οποία επιδρά στη μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων (ECs). Τα κύτταρα που βρίσκονται στα σωληνώδη σημεία του αγγείου (tubular regions), όπου η αιματική ροή είναι ομοιόμορφη, είναι ελλειψοειδή στο σχήμα και παρατάσσονται ανάλογα με την κατεύθυνση της ροής. Από την άλλη πλευρά τα κύτταρα που βρίσκονται στους αγγειακούς διχασμούς, όπου η αιματική ροή παρενοχλείται, έχουν πολυγωνικό σχήμα και όχι συγκεκριμένο προσανατολισμό. Οι περιοχές αυτές παρουσιάζουν αυξημένη διαπερατότητα στα μακρομόρια όπως είναι η LDL και είναι προνομιακά σημεία για τη δημιουργία της βλάβης .

Όπως υποδεικνύεται και στην παρακάτω εικόνα, το αρχικό συμβάν στην αθηροσκλήρυνση είναι η εναπόθεση της LDL στον υπενδοθηλιακό χιτώνα. Το φαινόμενο της συσσωρεύσεως της LDL στα συγκεκριμένα σημεία είναι πιο έντονο όταν τα επίπεδα της LDL στο περιφερικό αίμα είναι υψηλά. Η LDL διαχέεται παθητικά διαμέσου των διακυτταρικών συνδέσμων των ECs, και η συγκράτησή της μέσα στο αγγειακό τοίχωμα φαίνεται να ενισχύεται με την περαιτέρω αλληλεπίδραση της apoB και των πρωτεογλυκανών (proteoglycans). Επίσης, άλλες λιποπρωτεΐνες που

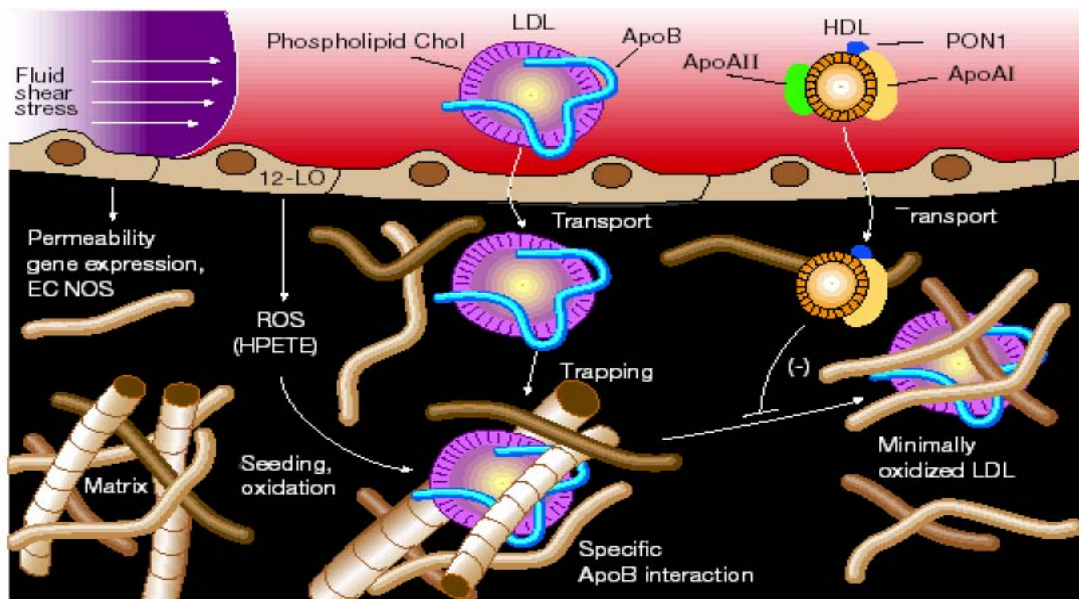
περιέχουν apoB, που ονομάζονται α-λιποπρωτεΐνες (lipoprotein-a) και λιποπρωτεϊνικά θραύσματα, μπορούν να συσσωρεύονται στον έσω χιτώνα (intima) και να επάγουν την αθηροσκλήρυνση. Η lipoprotein-a, ένα ειδικό σύμπλεγμα της LDL το οποίο περιέχει ακόμα ένα πολυπεπτίδιο, την α-απολιποπρωτεΐνη (apolipoprotein-a) και που προσδέεται με έναν δισουλφιδικό δεσμό, φαίνεται να είναι αθηρογενετική, εξ αιτίας των περαιτέρω ιδιοτήτων της όπως η ινιδιόλυση (fibrinolysis) και η ενεργοποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs) .

Η γηγενής LDL δεν ενδοκυτταρώνεται αμέσως από τα μακροφάγα ώστε να διαφοροποιηθούν σε αφρώδη κύτταρα. Έχει δειχθεί ότι η LDL μέσα στο αγγειακό τοίχωμα μπορεί να υποστεί χημικές διαφοροποιήσεις όπως οξείδωση, λιποδιάλυση, πρωτεόλυση και συσσωμάτωση, και ότι αυτού του είδους οι χημικές μεταβολές συμβάλλουν στη δημιουργία φλεγμονής και στη διαφοροποίηση των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα. Η σημαντικότερη τροποποίηση της LDL είναι η οξείδωσή της, ως αποτέλεσμα της έκθεσής της στα οξειδωτικά μεταβολικά παράγωγα των αγγειακών κυττάρων. Αυτές οι τροποποιήσεις δημιουργούν τις μερικά οξειδωμένες ρίζες LDL (minimally oxidized LDL species) που έχουν προ-φλεγμονώδεις ιδιότητες αλλά δεν είναι αρκετά αλλοιωμένες ώστε να αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς των μακροφάγων (scavenger receptors).



Σχήμα 32: Οξείδωση της LDL και αθηρωματική πλάκα

Σε αντίθεση με την LDL, η HDL είναι ένας ισχυρός προστατευτικός παράγοντας κατά της αθηροσκλήρυνσης. Η HDL συμβάλλει στην απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τους ιστούς. Επιπροσθέτως, η HDL εμποδίζει την οξείδωση της LDL με την αντιοξειδωτική της δράση και επομένως τη δημιουργία της νόσου. Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες της HDL βρίσκονται εν μέρει σε ένα προσθετικό μόριο της, την serum paraoxonase (μία εστεράση) η οποία μπορεί και αποικοδομεί ορισμένα ενεργά φωσφολιπίδια.



Σχήμα 32: Έναρξη της βλάβης. Τα αγγειακά κύτταρα που συνήθως αναπτύσσεται η βλάβη είναι τα σημεία όπου στα ενδοθηλιακά τους κύτταρα εξασκούνται αιμοδυναμικές πιέσεις. Αυτό επηρεάζει τη διαπερατότητα του ενδοθηλιακού φραγμού καθώς και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs), όπως αυτής της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide synthase, NOS). Ένα σημαντικό συμβάν έναρξης της βλάβης, είναι η κατακράτηση της LDL στην intima καθώς επίσης και της απολιποπρωτεΐνης-B (apolipoprotein-B, apoB), ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους με μόρια της εξωκυττάριας ουσίας. Η LDL υφίσταται οξείδωση από ενεργά οξειδωτικά μόρια (reactive oxygen species: ROS), όπως το HPETE, προϊόν της 12/15 λιποξυγενάσης (12/15 lipoxygenase, 12-LO). Η οξείδωση της LDL καταστέλλεται από την HDL, η οποία περιέχει στο μόριό της την αντιοξειδωτική πρωτεΐνη παραοξονάση (paraoxonase: PON1).

4. ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ-LDL ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ- ΟΡΑΤΟΥ

A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού για την μελέτη αλληλεπίδρασης των συντιθέμενων πορφυρινών με την LDL , αποτελεί το πρώτο στάδιο ελέγχου. Για τη μελέτη αυτή προσθέτουμε LDL στο πορφυρινικό διάλυμα και στη συνέχεια παρατηρούμε η επακόλουθη βαθυχρωμία και υποχρωμία στο φάσμα υπεριώδους-ορατού. Ο όρος βαθυχρωμία υποδηλώνει την μετατόπιση του μέγιστου της ταινίας απορροφήσεως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, ενώ η υποχρωμία την ελάττωση της απορροφήσεως.

- Βαθυχρωμία: $\Delta\lambda = \lambda - \lambda_0$ (όπου λ_0 το μήκος κύματος της ελεύθερης πορφυρίνης και λ το μήκος κύματος της πορφυρίνης παρουσία LDL)
- Υποχρωμία: $H_{app} \% = [(A - A_0)] \times 100 / A_0$ (όπου A_0 είναι η απορρόφηση του διαλύματος της πορφυρίνης με αρχική συγκέντρωση $[P]_0$ στο λ_0 και A η απορρόφηση του διαλύματος της πορφυρίνης στην ίδια συγκέντρωση και παρουσία LDL στο λ)

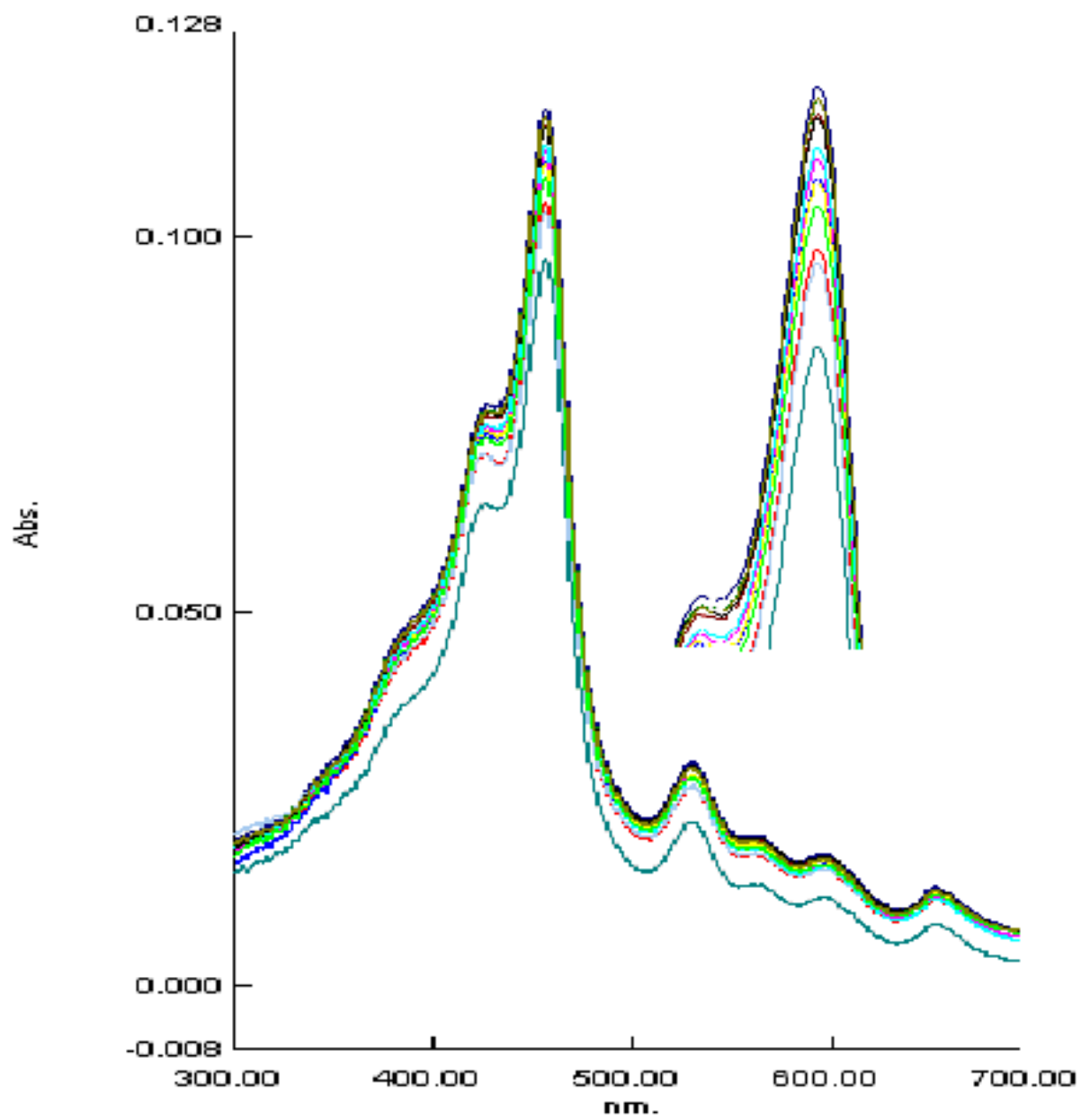
B) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα στην περιοχή 350-700 nm. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε LDL από ανθρώπινο πλάσμα ενώ ο διαλύτης ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα HCl/Tris με pH=7,4 και NaCl. Ο λόγος $1/r_0$ εκφράζει την αναλογία των συγκεντρώσεων της LDL και της πορφυρίνης στο διάλυμα ($[LDL]_0 / [P]_0$).

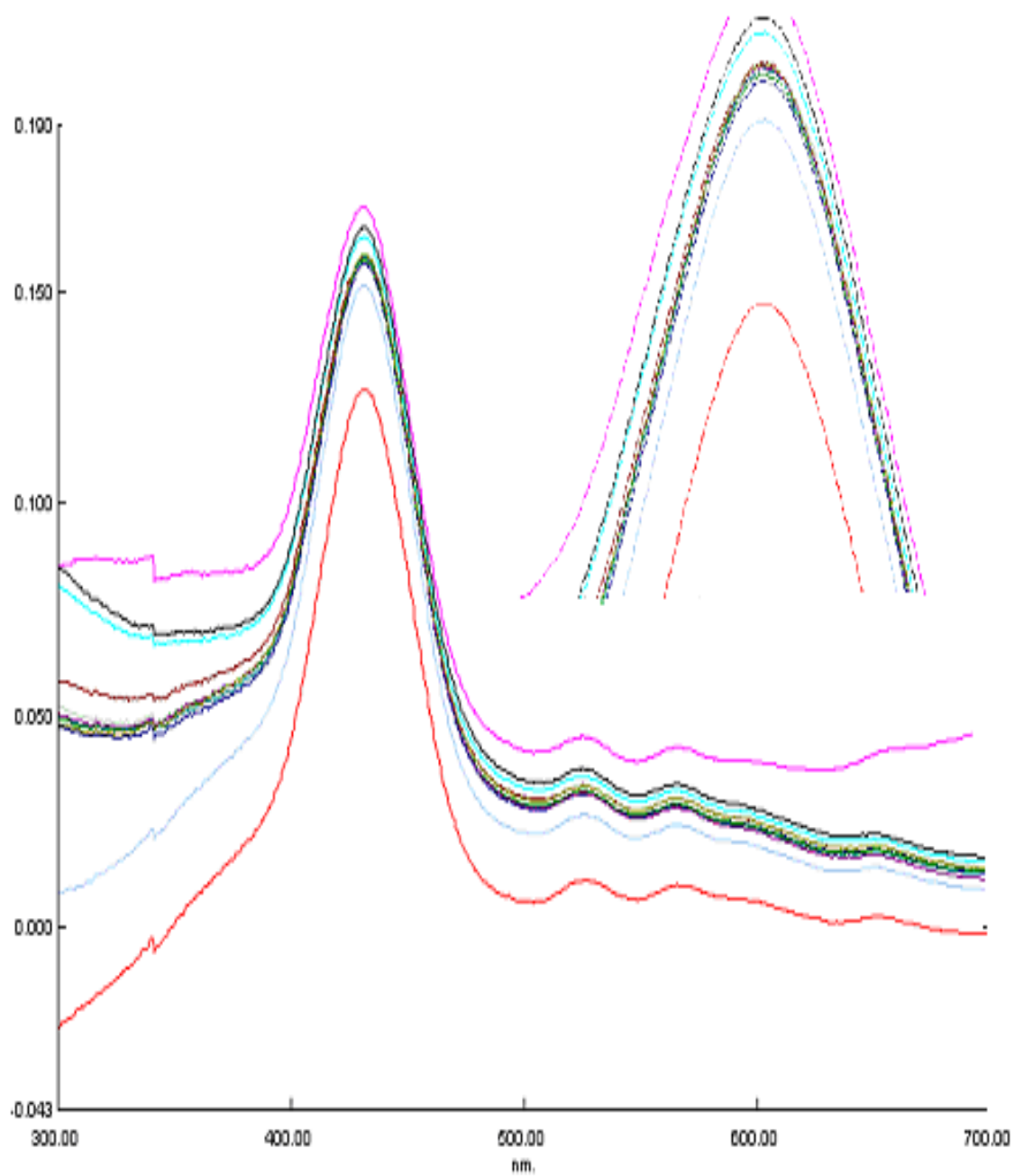
Για την διεξαγωγή του πειράματος παρασκευάζουμε τρία διαλύματα:

1. P_0 : Το διάλυμα που περιέχει την προς μελέτη πορφυρίνη σε κατάλληλη συγκέντρωση.
2. P_x : Το διάλυμα που περιέχει την προς μελέτη πορφυρίνη σε ίδια συγκέντρωση και κατάλληλη ποσότητα LDL στο διάλυμα.
3. A_x : Το διάλυμα περιέχει LDL σε ίδια συγκέντρωση με το P_x και χρησιμοποιείται ως διάλυμα αναφοράς.

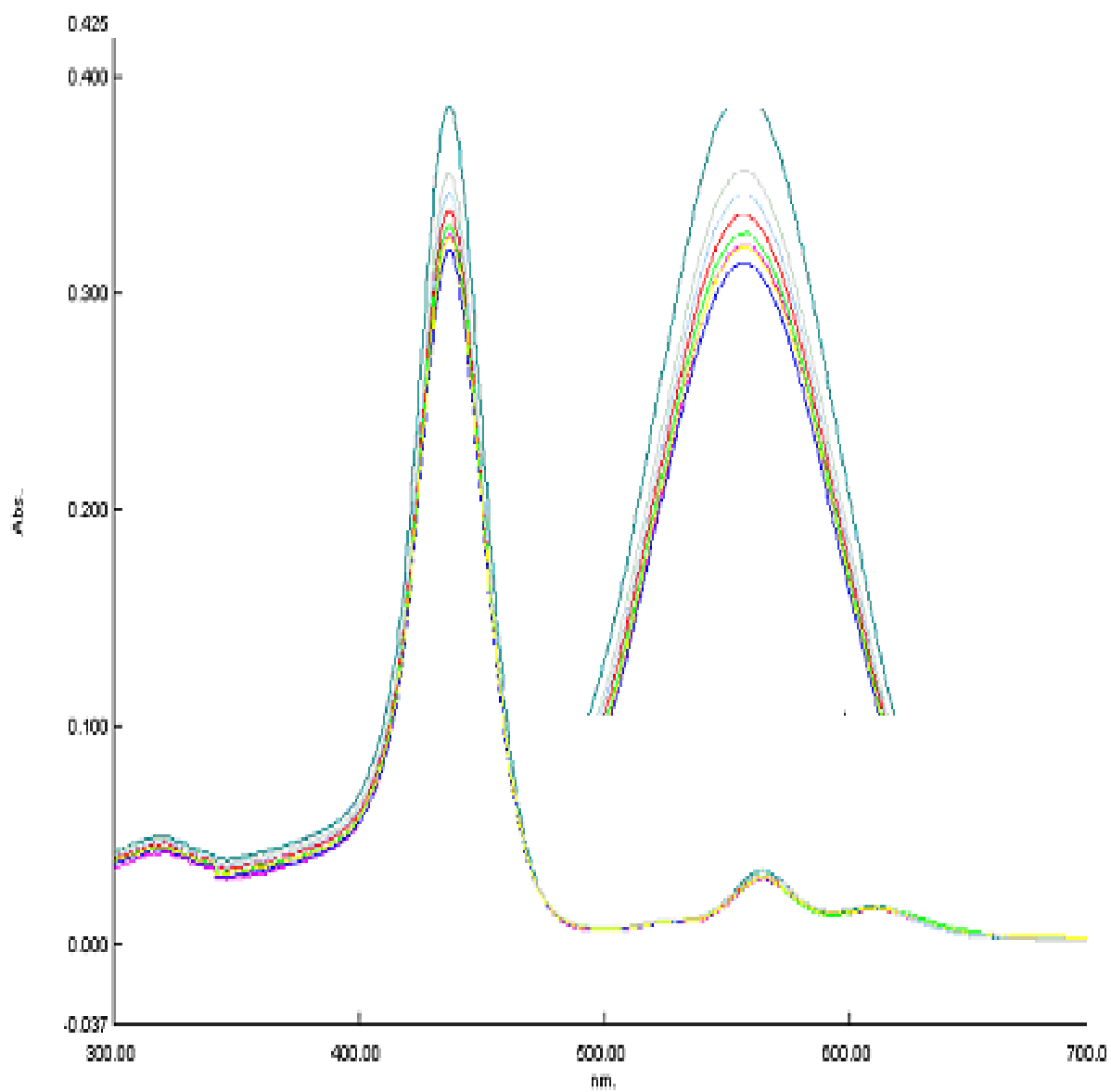
Αρχικά λαμβάνεται η μέτρηση του διαλύματος P_0 με διάλυμα αναφοράς το buffer. Στη συνέχεια και σε συγκεκριμένο χρόνο προστίθενται κατά σειρά συγκεκριμένες ποσότητες του διαλύματος P_x στην κυψελίδα που περιέχει το διάλυμα P_0 και αντίστοιχες ποσότητες A_x στην κυψελίδα που περιέχει το buffer. Με τη σταδιακή προσθήκη P_x στο P_0 επιτυγχάνονται οι επιθυμητές τιμές $1/\tau_0$ στο διάλυμα που μετράτε στην κυψελίδα, ενώ με την προσθήκη του A_x στο διάλυμα αναφοράς κρατάμε σταθερή την γραμμή βάσης του φάσματος. Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που ελήφθησαν των πορφυρινών MeC₄CISH, MeC₄TRAH και MeC₄MH ενώ στη συνέχεια απεικονίζονται τα φάσματα UV-Vis των πορφυρινών αυτών .



ΦΑΣΜΑ 11(UV-Vis): MeC₄TRAH ME LDL



ΦΑΣΜΑ 12(UV-Vis): MeC₄CISH ME LDL



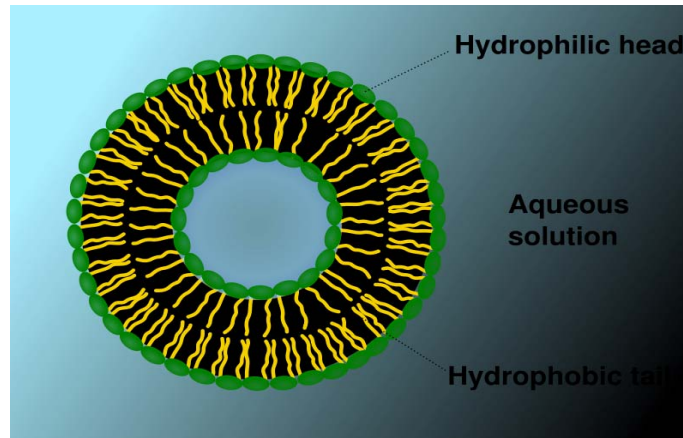
ΦΑΣΜΑ 13 (UV-Vis): MeC₄MH ME LDL

		MeC ₄ CISH		MeC ₄ TRAH		MeC ₄ MH	
1/r ₀	+ P _x (μl)	Δλ	H _{αpp} %	Δλ	H _{αpp} %	Δλ	H _{αpp} %
0	0	-	-	-	-	-	-
0,35	150	1,5	-4,12	-	6,18	-	-8,03
0,65	300	0,5	-2,94	-	7,22	-	-10,36
0,92	450	1	-6,47	-	11,34	-	-12,18
1,15	600	1	-7,06	-	13,40	0,5	-14,25
1,36	750	1,5	-6,47	0,5	13,40	0,5	-15,54
1,55	900	1	-7,65	-	14,43	0,5	-17,10
1,72	1050	1	-6,47	-	15,46	*	*
1,88	1200	1,5	-7,06	-	18,56	*	*
2,02	1350	1,5	-6,47	-	18,56	*	*
2,14	1500	*	*	0,5	19,59	*	*
2,26	1650	*	*	0,5	19,59	*	*
5	P _x	1,5	-10,59	-	20,62	0,5	-15,28

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗ-LDL(το αρνητικό πρόσημο σημαίνει μείωση της απορρόφησης)

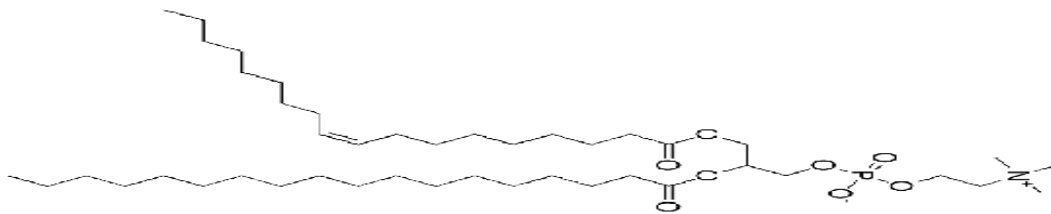
Εξαιτίας του υψηλού κόστους της LDL και της περιορισμένης διαθεσιμότητας της επαναλάβουμε το παραπάνω πείραμα αντικαθιστώντας την λιποπρωτεΐνη με λιποσώμα.

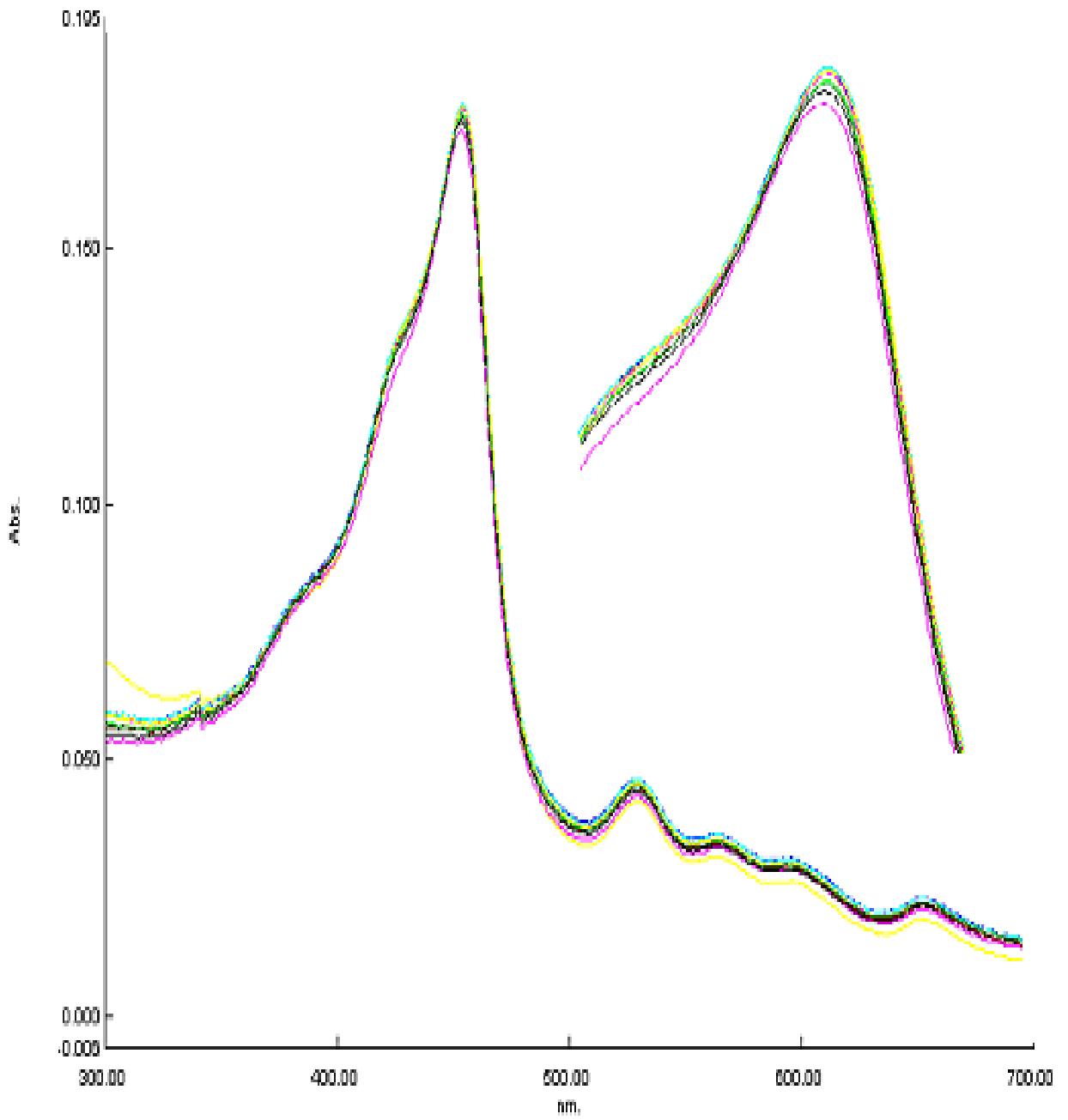
Το **λιπόσωμα** είναι ένα μικρό σφαιρίδιο που παρασκευάζεται από το ίδιο υλικό με τις κυτταρικές μεμβράνες. Τα λιποσώματα μπορούν να ενωθούν με φάρμακα, και να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση του καρκίνου και άλλων ασθενειών. Οι μεμβράνες αποτελούνται συνήθως από τα φωσφολιπίδια, τα οποία παρουσία νερού σχηματίζουν μικύλια.



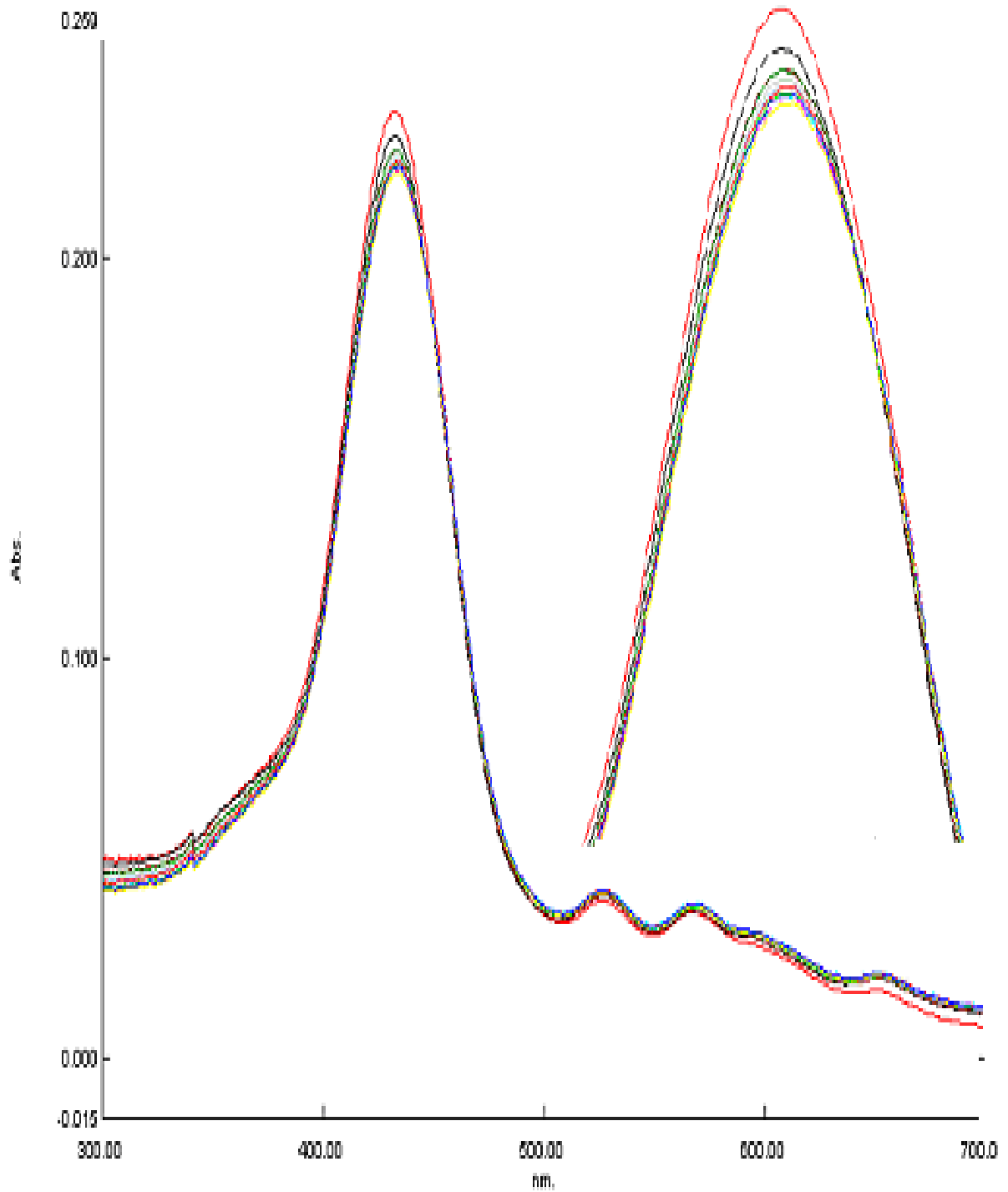
Στη φύση, τα φωσφολιπίδια βρίσκονται στις σταθερές μεμβράνες που αποτελούνται από διπλοστοιβάδες. Παρουσία του ύδατος, το πολικό άκρο έλκεται από το νερό και διατάσσεται με τέτοιο τρόπο ώστε να διαμορφώσει μια υδρόφιλη επιφάνεια εξωτερικά. Ενώ το άπολο άκρο απωθείται προς το εσωτερικό του λιποσώματος .

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis των πορφυρινών με τα λιποσώματα. Τα λιποσώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Egg Phosphatidylcholine .

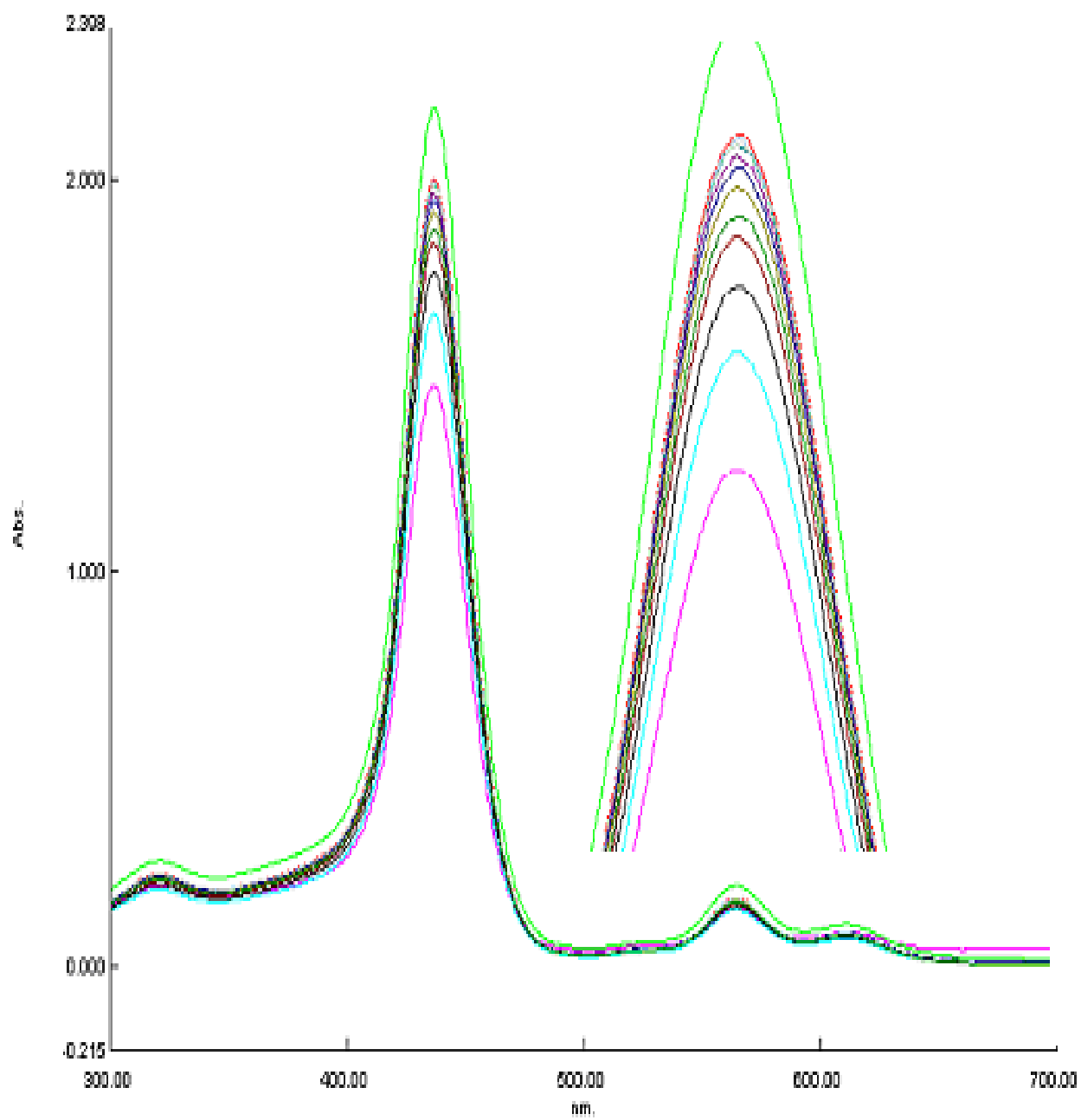




ΦΑΣΜΑ 14 (UV-Vis): MeC₄TRAH ME LIPOSOME



ΦΑΣΜΑ 15 (UV-Vis): MeC₄CISH ME LIPOSOME



ΦΑΣΜΑ 16 (UV-Vis): MeC₄MH ME LIPOSOME

		MeC ₄ CISH		MeC ₄ TRAH		MeC ₄ MH	
1/r₀	+ P_x(μl)	Δλ	H_{app} %	Δλ	H_{app} %	Δλ	H_{app} %
0	0	-	-	-	-	-	-
0,35	150	-	-1,74	0,5	1,15	-	12,41
0,65	300	-	-1,74	-	1,15	-	19,52
0,92	450	1	-2,17	-	1,73	-	24,68
1,15	600	1	-2,6	-	1,73	-	26,91
1,36	750	1	-2,6	-	1,73	-	29,97
1,55	900	1	-3,04	-	2,31	-	31,86
1,72	1050	2,5	-3,91	0,5	2,89	-	33,36
1,88	1200	2,5	-3,04	0,5	2,31	-	34,51
2,02	1350	2,5	-3,47	0,5	2,89	-	35,25
2,14	1500	2,5	-3,47	0,5	2,89	*	*
2,26	1650	2	-3,04	0,5	2,89	*	*
5	1800	-0,5	+2,6	-	2,89	-	35,59

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗ-ΛΙΠΟΣΩΜΑ

Γ) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για την πορφυρίνη MeC₄CISH σε αλληλεπίδραση με την LDL (φάσμα 12) παρατηρούμε μια μικρή βαθυχρωμία, μια μικρή μετατόπιση του μεγίστου απορρόφησης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Επίσης παρατηρούμε ότι σε όλη τη διάρκεια των μετρήσεων η απορρόφηση αυξομειώνεται. Η υποχρωμία φτάνει σε ποσοστό 10% αλλά χωρίς να έχουμε σταδιακή μείωση. Την ίδια συμπεριφορά παρατηρούμε και κατά την αλληλεπίδραση MeC₄CISH με λιποσώματα.

Για την πορφυρίνη MeC₄TRAH σε αλληλεπίδραση με την LDL παρατηρούμε ότι το μήκος κύματος της Soret ταινίας παραμένει αμετάβλητο στα $\lambda=456$ nm, ενώ η απορρόφηση αυξάνεται σταδιακά με την προσθήκη LDL στο διάλυμα (μέχρι 20%). Κατά την αλληλεπίδραση MeC₄TRAH με λιποσώματα παρατηρούμε μια ελάχιστη μετατόπιση της Soret σε μεγαλύτερο μήκος κύματος $\lambda=456,5-457$ nm ενώ η αύξηση της απορρόφησης φτάνει το 2%.

Για την πορφυρίνη MeC₄MH σε αλληλεπίδραση με την LDL παρατηρούμε ότι το μήκος κύματος της Soret ταινίας παραμένει και σ αυτή τη περίπτωση αμετάβλητο στα $\lambda=436$ nm, ενώ εδώ η απορρόφηση μειώνεται σταδιακά με την προσθήκη LDL στο διάλυμα, σε ποσοστό που φτάνει το 15%. Κατά την αλληλεπίδραση MeC₄MH με λιποσώματα παρατηρούμε αύξηση της απορρόφησης μέχρι και 35% ενώ το μήκος κύματος παραμένει στα $\lambda=436$ nm .

Γενικά με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας UV-Vis καταφέραμε να μελετήσουμε σε πρώτο στάδιο την αλληλεπίδραση της πορφυρίνης με την

LDL. Στην πορφυρίνη MeC₄CISH κατά την προσθήκη επιπλέον ποσότητας LDL στο διάλυμα, η απορρόφησή αυξομειώνεται γύρω από το αρχικό μέγιστο απορρόφησης της πορφυρίνης. Οι άλλες δύο πορφυρίνες δίνουν καλύτερα αποτελέσματα και παρατηρείται ότι υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση ,απλά δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για το τρόπο που ενώνονται αυτές με την LDL. Κατά την επαναληψιμότητα των πειραμάτων η MeC₄TRAH παρουσίασε διάφορα προβλήματα (δεν είχε κάποια σταθερή αλλαγή στο φάσμα, διαλυόταν δύσκολα στο διαλύτη) γι αυτό και επιλέξαμε την MeC₄MH για την συνέχεια των πειραμάτων.

5.ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ-LDL ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

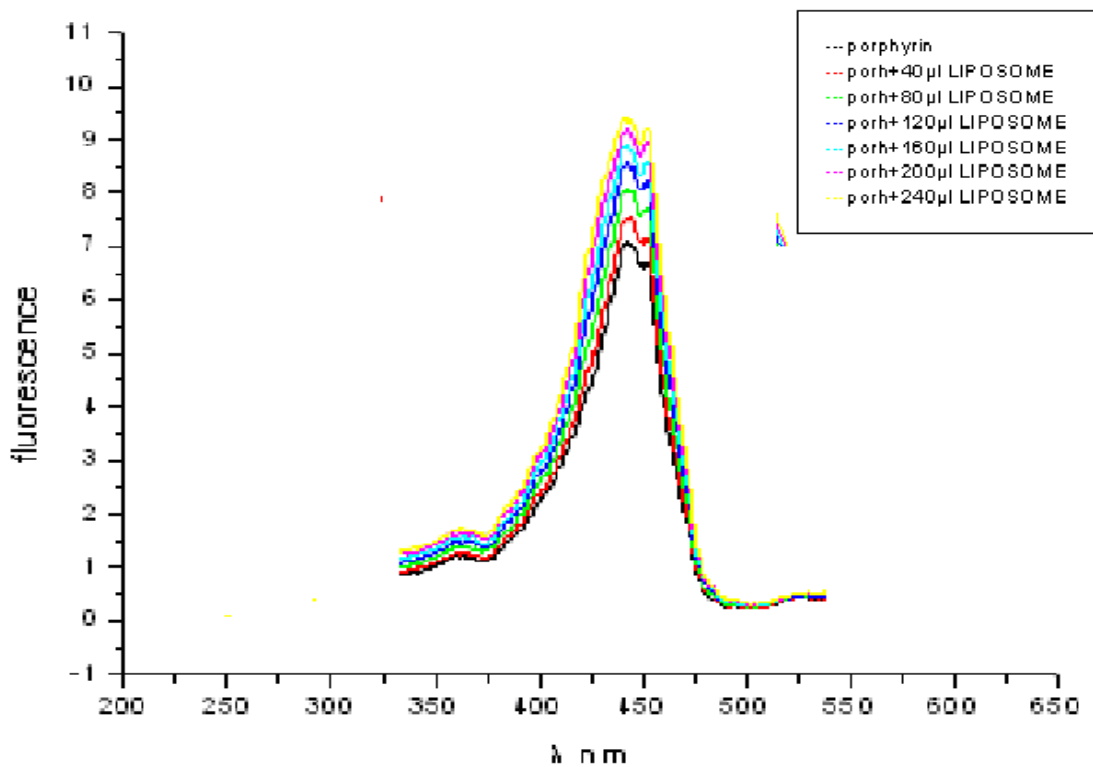
Η μελέτη αλληλεπίδρασης των συντιθέμενων πορφυρινών με την LDL με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας φθορισμού, αποτελεί το δεύτερο στάδιο ελέγχου. Για τη μελέτη των βιομορίων χρησιμοποιείται συχνά ο φθορισμός διότι είναι ευαίσθητη μέθοδος και δίνει καλύτερα φάσματα. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η αλληλεπίδραση προσθέτουμε LDL ή λιπόσωμα στο πορφυρινικό διάλυμα και στη συνέχεια μελετάμε την επακόλουθη αλλαγή στο φάσμα φθορισμού.

B) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

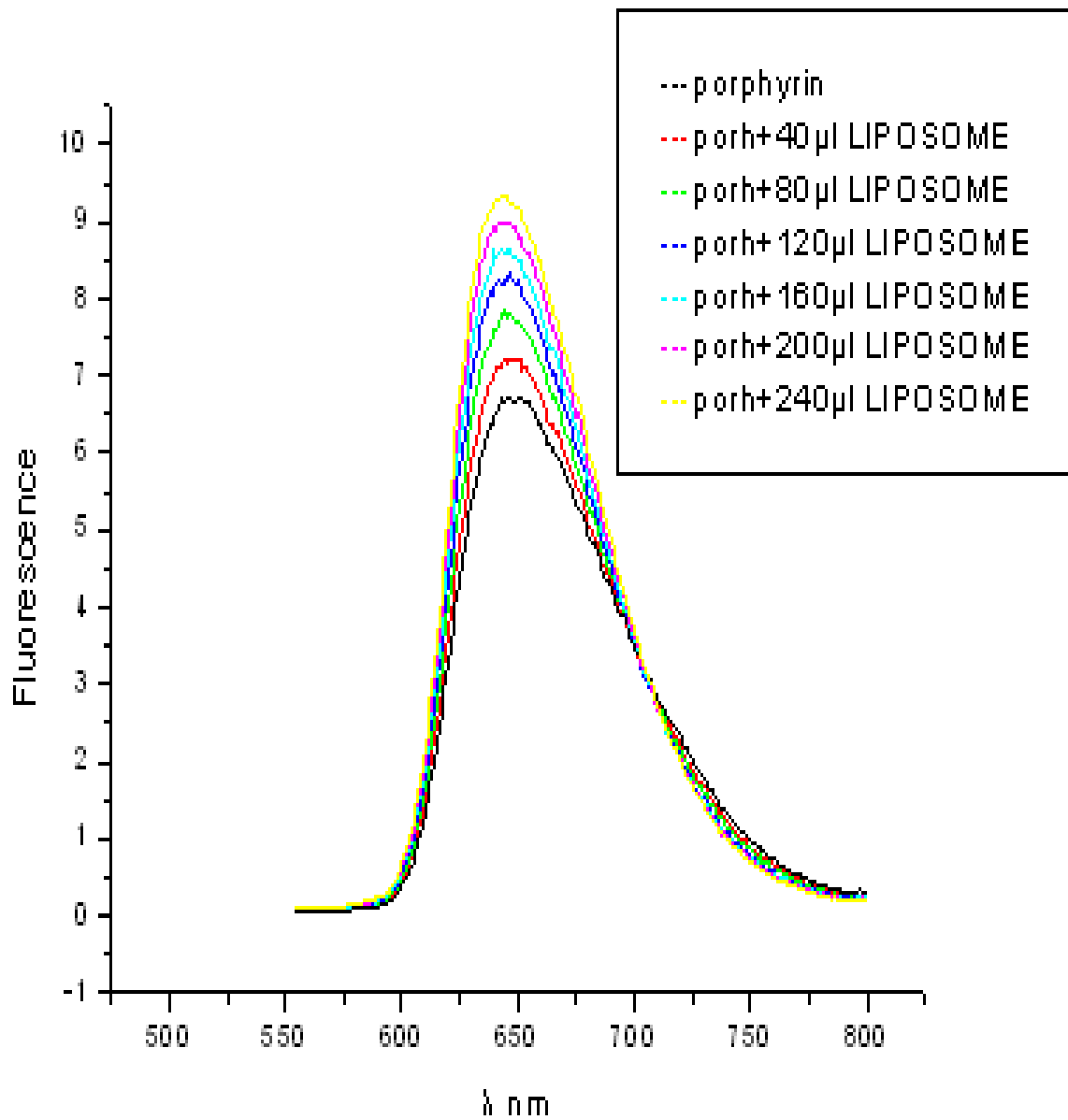
Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα στην περιοχή 300-600 nm (στην περιοχή της διέγερσης) και στην περιοχή 600-800 nm (στην περιοχή της αποδιέγερσης). Χρησιμοποιήσαμε τις ίδιες ουσίες και το ίδιο διάλυμα αναφοράς (buffer).

1. P₀: Το διάλυμα που περιέχει την προς μελέτη πορφυρίνη σε κατάλληλη συγκέντρωση .
2. P_x: Το διάλυμα που περιέχει την προς μελέτη πορφυρίνη σε ίδια συγκέντρωση και κατάλληλη ποσότητα LDL .
3. A_γ: Το διάλυμα που περιέχει LDL σε ίδια συγκέντρωση με το P_x και χρησιμοποιείται ως διάλυμα αναφοράς

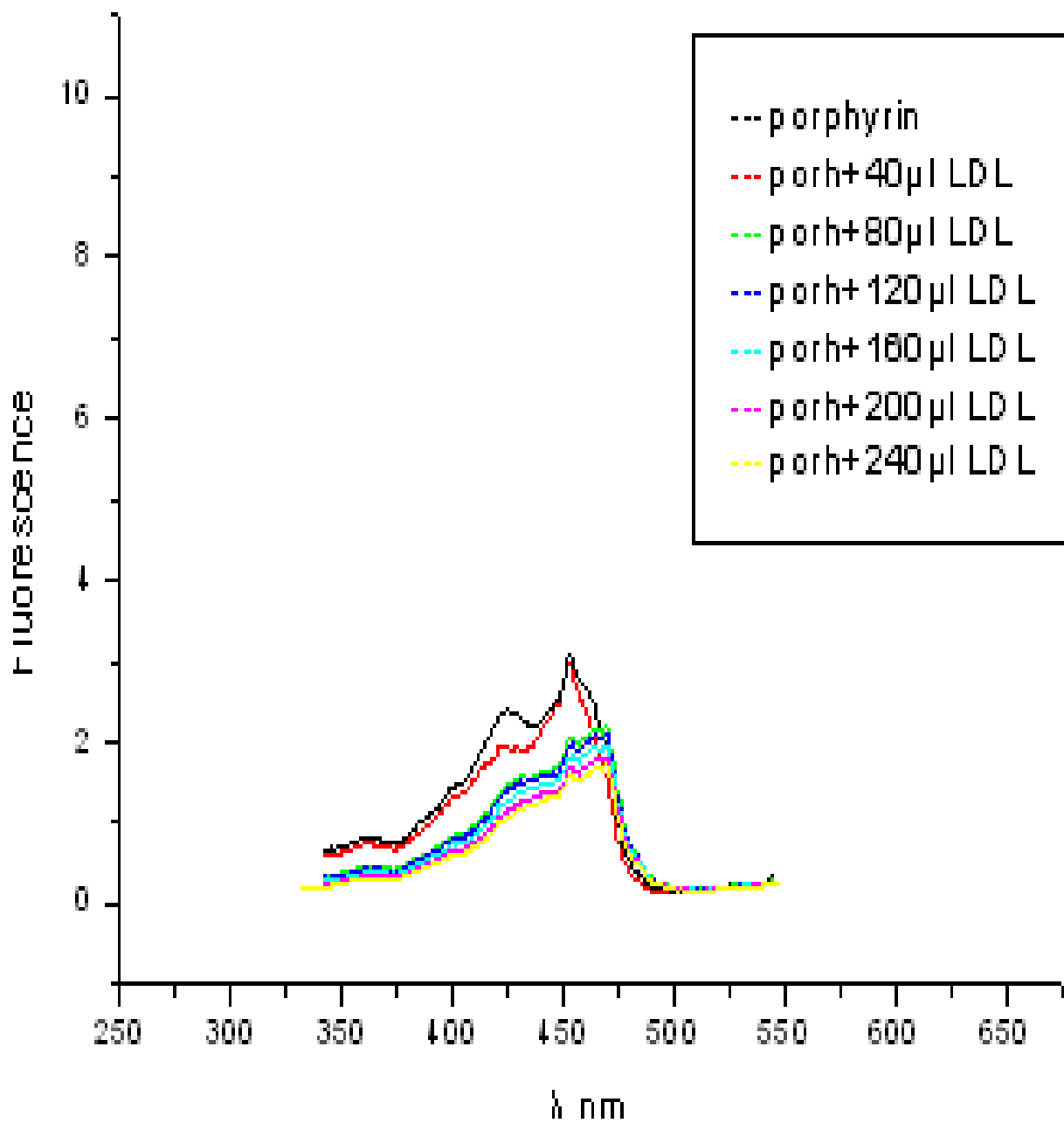
Αρχικά λαμβάνεται η μέτρηση του διαλύματος P_0 με διάλυμα αναφοράς το buffer. Στη συνέχεια και σε συγκεκριμένο χρόνο προστίθενται κατά σειρά συγκεκριμένες ποσότητες του διαλύματος P_x στην κυψελίδα που περιέχει το διάλυμα P_0 και αντίστοιχες ποσότητες A_x στην κυψελίδα που περιέχει το buffer. Με τη σταδιακή προσθήκη P_x στο P_0 επιτυγχάνονται οι επιθυμητές τιμές $1/\tau_0$ στο διάλυμα που μετράτε στην κυψελίδα, ενώ με την προσθήκη του A_x στο διάλυμα αναφοράς κρατάμε σταθερή την γραμμή βάσης του φάσματος. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού που ελήφθησαν των πορφυρινής MeC_4MH .



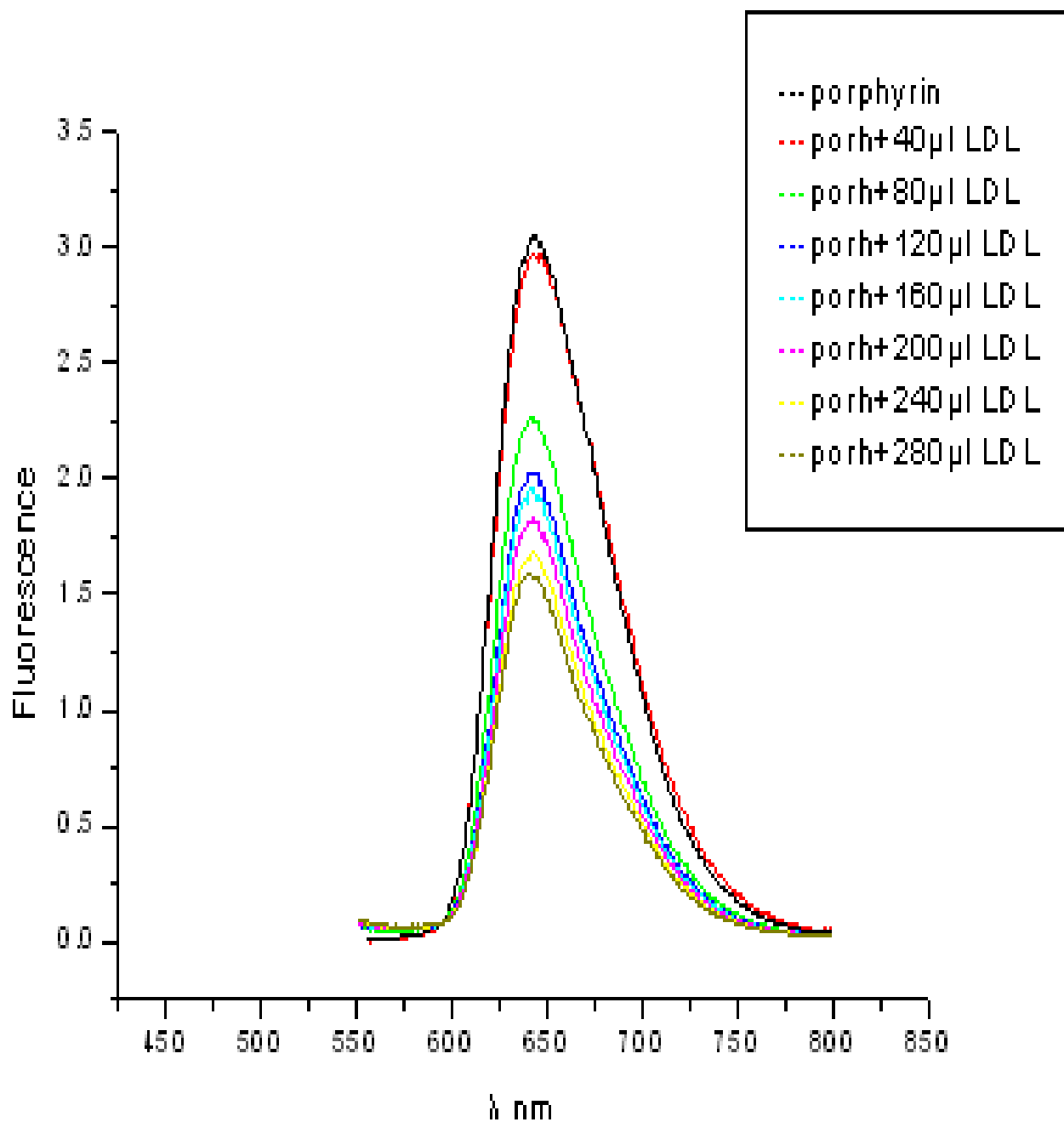
ΦΑΣΜΑ 17 (ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ): MeC_4MH -LIPOSOME



ΦΑΣΜΑ 18 (ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΟΔΙΕΓΕΡΣΗΣ): MeC₄MH-LIPOSOME



ΦΑΣΜΑ 19(ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ): MeC₄MH-LDL



ΦΑΣΜΑ 20 (ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΟΔΙΕΓΕΡΣΗΣ): MeC₄MH-LDL

Γ) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας UV-Vis παρατηρήσαμε ότι η LDL αλληλεπιδρά καλύτερα με την πορφυρίνη MeC₄MH. Γι αυτό το λόγο και στο δεύτερο στάδιο ελέγχου , με φθορισμό, ασχοληθήκαμε μόνο με αυτή. Το λ_{max} για την ελεύθερη πορφυρίνη στο φάσμα διέγερσης (excitation) βρίσκεται στα λ=452 nm ενώ στο φάσμα αποδιέγερσης (emission) λ= 647 nm.

Από τα φάσματα φθορισμού που λήφθησαν παρατηρούμε ότι όσο προσθέτουμε LDL στο αρχικό διάλυμα της πορφυρίνης το μέγιστο του φάσματος διέγερσης (φάσμα 19) μεταφέρεται ελαφρώς σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, από τα 452 nm μεταφέρεται στα 456 nm ενώ ο φθορισμός μειώνεται σταδιακά. Για το φάσμα αποδιέγερσης (φάσμα 20) παρατηρούμε ότι μετά την προσθήκη της LDL το λ_{max} μειώνεται από τα 647 nm στα 645 nm, καθώς παρατηρούμε και μια σταδιακή μείωση του φθορισμού.

Στην περίπτωση βέβαια της αλληλεπίδρασης της πορφυρίνης με λιποσώματα τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Παρατηρούμε ότι το μέγιστο μήκος κύματος στο φάσμα διέγερσης (φάσμα 17) παραμένει σταθερό στα 452 nm ενώ ο φθορισμός αυξάνεται σταδιακά. Στο φάσμα αποδιέγερσης (φάσμα 18) το λ_{max} παραμένει σταθερό στα 652 nm ενώ ο φθορισμός αυξάνεται σταδιακά. Το σημαντικό μέρος αυτού του πειράματος είναι η ύπαρξη ισοσβεστικού σημείου. Αυτό μας δείχνει ότι η ελεύθερη πορφυρίνη που υπάρχει στο διάλυμα και η πορφυρίνη που είναι ενωμένη με το λιπόσωμα βρίσκονται σε ισορροπία. Επομένως υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δυο μορίων.

6. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ ΜΕ LDL ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Α

A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

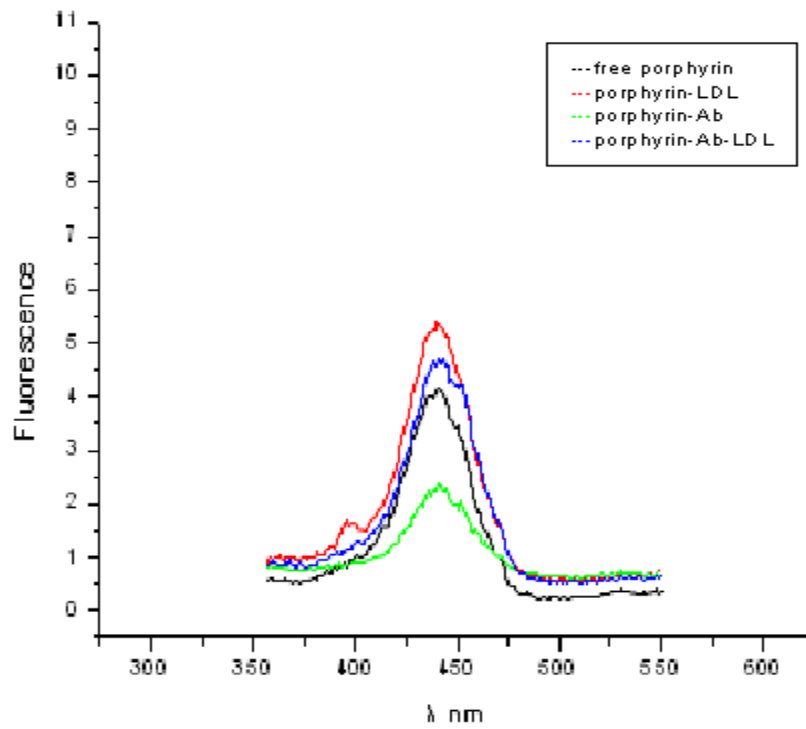
Το πείραμα αυτό είναι μία επιπλέον μέθοδος που επιβεβαιώνει με άμεσο τρόπο την αλληλεπίδραση της LDL με την πορφυρίνη. Σκοπός του πειράματος είναι η ανιχνεύση του συμπλόκου της LDL με την πορφυρίνη με τη βοήθεια του αντισώματος. Με τη βοήθεια των protein A beads δεσμεύεται το σύμπλοκο της LDL με το αντίσωμα ή το σύμπλοκο πορφυρίνη-LDL- αντίσωμα. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι anti-human beta-lipoprotein (LDL), το οποίο απομονώθηκε από κατσίκια.

B) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

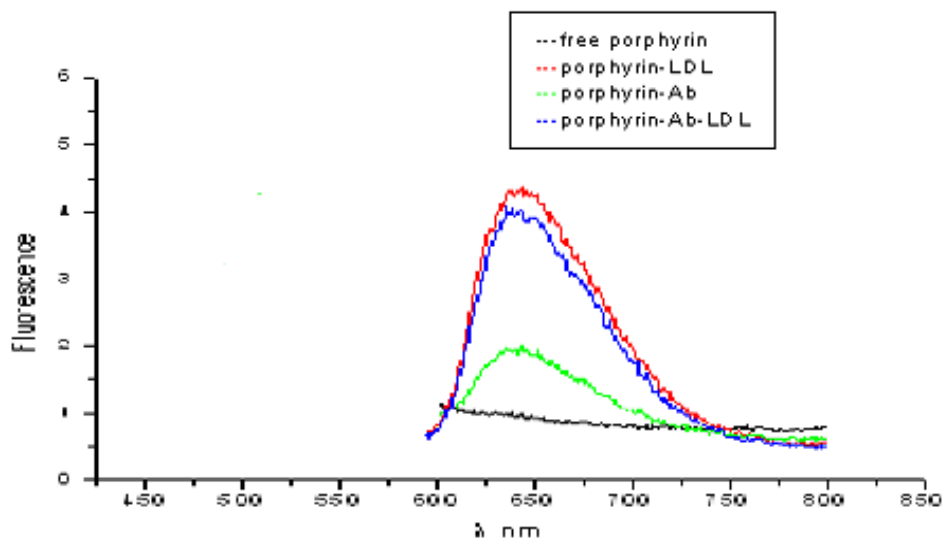
1. Προετοιμάζουμε τα beats που περιέχουν την πρωτεΐνη Α(25μg beats προστίθενται σε 100 μl buffer και 10% BSA, επωάζονται για 2 ώρες και στη συνέχεια ξεπλένονται 5 φορές με 200 μl buffer κάθε φορά και στη συνέχεια τα τοποθετούμε μέσα σε buffer.
2. Προσθέτουμε την πορφυρίνη **MeC₄MH** στα beats.
3. Φτιάχνουμε το διάλυμα πορφυρίνης – LDL 250 μl (το αφήνουμε για 10 min ώστε να γίνει η αλληλεπίδραση)(ο χρόνος που χρειάζεται για να γίνει η αλληλεπίδραση έχει υπολογιστεί πειραματικά).
4. Προετοιμάζουμε ένα διάλυμα μόνο με πορφυρίνη (ίδιας συγκέντρωσης με την πορφυρίνη που χρησιμοποιήσαμε στο διάλυμα 2, $C=12 \times 10^{-6}$)

5. Από τα δυο παραπάνω διαλύματα παίρνουμε 93,75 μl (από το καθένα) και προσθέτουμε 6,25 μl αντισώματος στο καθένα. Τα αφήνουμε να επωαστούν για 1 ώρα.
6. Παρασκευάζουμε τέσσερα διαλύματα: στο πρώτο έχουμε beats και πορφυρίνη, στο δεύτερο έχουμε beats-πορφυρίνη-LDL, στο τρίτο beats-πορφυρίνη-αντίσωμα και στο τελευταίο beats-πορφυρίνη-LDL-αντίσωμα (το κάθε διάλυμα έχει τελικό όγκο 110 μl-10 μl beats και 100 μl διαλύματος). Τα αφήνουμε να επωαστούν για 2 ώρες στους 4 ° C, ακολουθεί φυγοκέντριση, στη συνέχεια ξεπλένουμε 3 φορές με buffer, κάνω εκχύλιση με 100 μl γλυκίνης pH=3.0 και ρυθμίζουμε το pH με 1M Tris pH 8.0.
7. Προσθέτουμε buffer μέχρι τα 2 ml και στη συνέχεια τα μελετάμε με φθορισμό.
8. Το buffer που χρησιμοποιούμε είναι NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7.4

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού.



ΦΑΣΜΑ 21(ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ)



ΦΑΣΜΑ 22 (ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΟΔΙΕΓΕΡΣΗΣ)

Γ) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με τη βοήθεια του πειράματος αυτού επιδιώκαμε την απομόνωση του συμπλόκου LDL-πορφυρίνη με τη βοήθεια του αντισώματος. Στο φάσμα 22 παρατηρούμε ότι η ελεύθερη πορφυρίνη δε δίνει φθορισμό, όπως περιμέναμε. Διότι η πορφυρίνη δεν δεσμεύεται από τα beads, οπότε με τις εκπλύσεις και τη φυγοκέντριση ότι ήταν ελεύθερο απομακρύνθηκε. Με τη βοήθεια των protein A beads παρατηρούμε ότι δεσμεύεται το σύμπλοκο της LDL με το αντίσωμα. Προς έκπληξη μας όμως παρατηρούμε ότι υπάρχει μια αλληλεπίδραση μεταξύ αντισώματος και πορφυρίνης το οποίο μας δυσκολεύει στο να καταλήξουμε σε κάποιο συμπέρασμα. Αφού το σύμπλοκο LDL-πορφυρίνης αλληλεπιδρά και εκλύεται από τα Beads και χωρίς την παρουσία του αντισώματος, συμπεραίνουμε ότι δεν έχουμε ειδική αλληλεπίδραση. Η LDL φαίνεται ότι έχει από μόνη της μια δυνατότητα δέσμευσης στα beads. Αφαιρώντας τη ποσότητα της LDL-πορφυρίνης που εκλύεται χωρίς την αλληλεπίδραση με το αντίσωμα, βρίσκουμε τη ποσότητα του συμπλόκου LDL-αντισώματος που οφείλεται σε ειδική δέσμευση (του συμπλόκου LDL-πορφυρίνη-αντίσωμα).

	λ nm	ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ
ΠΟΡΦΥΡΙΝΗ	0	0
ΠΟΡΦΥΡΙΝΗ-LDL	641	4,352
ΠΟΡΦΥΡΙΝΗ- ΑΝΤΙΣΩΜΑ	641	1,981
ΠΟΡΦΥΡΙΝΗ-LDL- ΑΝΤΙΣΩΜΑ	641	4,011

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abrams, F. S., and E. London. 1993..
2. Ackroyd, R., C. Kelty, N. Brown, and M. Reed. 2001.
3. Ahmed, S. N., D. A. Brown, and E. London. 1997.
4. Allen, C. M., W. M. Sharman, and J. E. Van Lier. 2001.
5. Asuncion-Punzalan, E., K. Kachel, and E. London. 1998.
6. Barenholz, Y., T. Cohen, R. Korenstein, and M. Ottolenghi. 1991.
7. C. E. Johnson, F. A. Bovey, *J. Chem. Phys.*, 1958, 29, 1012.
8. R. J. Abraham, *Mol. Phys.*, 1961, 4, 145.
9. M. Gouterman, in *“The porphyrins”*, D. Dolphin, Academic Press, 1978, Vol.III, Chapt 1.
- 10.K. Kalyanasundaram, *“Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes”*, Academic Press, 1992, 376.
- 11.J. R. Platt, *“Radiation Biology”*, A. Hollaender Ed., Mc Graw-Hill Book Co., 1956, Vol.III, Chapt. 2.
- 12.W. T. Simpson, *J. Chem. Phys.*, 1949, 17,1218.
- 13.M. Gouterman, *J. Chem. Phys.*, 1959, 30, 5.
A. H. Corwin, A. B. Chivvis, R. W. Poor, D. G. Whitten and E. W. Baker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 6577.
- 14.J. A. Shelnutt and V. Ortiz, *J. Phys. Chem.*, 1985, 89, 4733.
- 15.J. W. Buchler, W. Kokisch and P. D. Smith, *Struct. Bonding*, 1978, 34, 80.
- 16.K. S. Suslick, R. A. Watson, *New J. Chem.*, 1992, 16, 633.
- 17.P. Hambright, E. B. Fleischer; *Inorg. Chem.*, 1970, 9, 1757.

18. E. Van Caemelbecke, W. Kutner, K. M. Kadish; *Inorg. Chem.*, 1993, 32, 438.
19. Valeur B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH 2001
20. Berg, K., and J. Moan. 1997.
21. Borochoy, H., and M. Shinitzky. 1976.
22. Chalpin, D. B., and A. M. Kleinfeld. 1983.
23. Chattopadhyay, A., and E. London. 1987.
24. Cranney, M., R. B. Cundall, G. R. Jones, J. T. Richards, and E. W. Thomas 1983.
25. DeRosa, M. C., and R. J. Crutchley. 2002.
26. Dougherty, T. J. 2002.
27. Ehrenberg, B. 1992.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αναζήτηση νέων φωτοευαίσθητων ενώσεων οδήγησε στην σύνθεση νέων πορφυρινικών παραγώγων με υποκαταστάτες ομάδες υδροξαμικού οξέος και μελέτη αυτών κατά την αλληλεπίδραση τους με λιποπρωτεΐνη LDL .

Στο πρώτο μέρος της εργασίας αναφέρθηκαν τα γενικά χαρακτηριστικά των βασικών δομικών στοιχείων. Οι πορφυρίνες είναι μια σημαντική κατηγορία φωτοευαίσθητοποιητών, που υπό ορισμένη μορφή έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με βιομόρια και συγκεκριμένα με την LDL. Τα υδροξαμικά οξέα αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη κατηγορία χηλικών αντιδραστηρίων που σχηματίζουν σύμπλοκα με την πλειονότητα των μετάλλων, παρουσία δε ιόντων λανθανιδών οδηγούν στην υδρόλυση φωσφοδιεστερικών δεσμών. Η σύνδεση, λοιπόν, μίας πορφυρίνης με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξαμικού οξέος επιτρέπει την εξερεύνηση του συμπλόκου τους ως μοντέλο για την αλληλεπίδραση με LDL .

Η στρατηγική της σύνθεσης των πορφυρινών αυτών βασίζεται αρχικά στη σύνθεση των λειτουργικών κατιονικών πορφυρινών. Οι πυρίδινοφαινυλεστέρες της πορφυρίνης χρησιμοποιήθηκαν σαν πρόδρομες ενώσεις για την παρασκευή των πορφυρινικών παραγώγων με υδροξαμικά οξέα. Οι εστέρες αυτοί σαπωνοποιήθηκαν και το αντιδραστήριο BOP έδρασε με επιτυχία ως αντιδραστήριο σύζευξης με την υδροξυλαμίνη. Στο τελευταίο στάδιο της σύνθεσης έλαβε χώρα η μετατροπή των πορφυρινών σε υδατοδιαλυτές ενώσεις με την εισαγωγή μεθυλικών ομάδων και την ανταλλαγή των ιόντων ιωδίου με ιόντα χλωρίου μέσω της ιονανταλλακτικής ρητίνης DOWEX Cl⁻.

Η επιτυχία της συνθετικής πορείας επιβεβαιώθηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους. Με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού ταυτοποιούνται οι πορφυρίνες έναντι των παραπροϊόντων της αντίδρασης συμπύκνωσης. Με την υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο δεν εμφανίζονται σημαντικές αλλαγές στα φάσματα, ενώ αντίθετα η μεθυλίωση των πυριδινικών ομάδων προκαλεί τη διαπλάτυνση και τη μετατόπιση των ταινιών απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Για την ταυτοποίηση των συντιθέμενων πορφυρινικών εστέρων χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία NMR. Όπως φάνηκε από τα φάσματα η χημική μετατόπιση και η πολλαπλότητα του σήματος των πυρρολικών πρωτονίων ανάλογα με τη φύση των μέσο-υποκαταστατών επιτρέπουν την ταυτοποίηση των πορφυρινών της ίδιας σειράς. Αντίθετα, η θέση και το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων. Η παρακολούθηση της πορείας της σύνθεσης της ομάδας του υδροξαμικού οξέος επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της μετατόπισης των πρωτονίων που βρίσκονται στο γειτονικό άτομο άνθρακα της χαρακτηριστικής ομάδας σε υψηλότερες τιμές πεδίου.

Στο πρώτο μέρος της βιοχημικής μελέτης των συντιθέμενων ενώσεων αναφέρονται ορισμένα στοιχεία για το μόριο της LDL και την αθηρωματική πλάκα τα οποία είναι απαραίτητα για την κατανόηση της μεθοδολογίας που χρησιμοποιείται στα πειράματα. Αρχικά λαμβάνουν χώρα τα πειράματα που έχουν ως σκοπό τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης των συντιθέμενων πορφυρινών με την LDL. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η πορφυρίνη MeC₄pCISH και η πορφυρίνη MeC₄pTRAH δεν αλληλεπιδρά επιτυχώς με την LDL. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι έχουν μόνο δύο θετικά φορτία στην περιφέρεια. Αντίθετα, η πορφυρίνη MeC₄pMH, η οποία έχει τρία θετικά

φορτία στην περιφέρεια της, αλληλεπιδρά με την λιποπρωτεΐνη. Επίσης, πιθανόν οι δύο μεγάλοι φαινυλικοί υποκατάστατες με την επιμηκής αλειφατική αλυσίδα και την ομάδα υδροξυαμικού οξέος προκαλούν μια αυξημένη στερική παρεμπόδιση στην προσπάθεια των πορφυρινών αυτών να αλληλεπιδράσουν με την LDL.

Η πορφυρίνη MeC₄pMH από τις πληροφορίες που πήραμε από τη φασματοσκοπική μελέτη αλληλεπιδρά με την LDL και επειδή η πορφυρίνη που χρησιμοποιήσαμε είναι υδρόφιλη πιθανόν ενώνεται με το υδρόφιλο τμήμα της LDL το οποίο βρίσκεται στο εξωτερικό τμήμα του μορίου (το εσωτερικό τμήμα της LDL είναι υδρόφοδο).

Προσπαθήσαμε να απομονώσουμε το σύμπλοκο πορφυρίνη-LDL με τη βοήθεια αντισώματος αλλά δεν πετύχαμε ειδική αλληλεπίδραση διότι η LDL δεσμεύεται στα beads και χωρίς την παρουσία αντισώματος.

Οι πορφυρίνες που μελετήθηκαν (και αυτές που ίσως μελετηθούν στο μέλλον) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες εφαρμογές, όπως στην θεραπεία της αθηρωματικής πλάκας, σαν δείκτες φθορισμού μετά την ένωσή τους με κάποιο βιομόριο ή φάρμακο.