

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών
Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΦΕΡΡΟΚΕΝΙΟΥ ΓΙΑ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ
ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

Βασίλειος Σ. Λιάχνης

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ

Συνεπιβλέπουσα: Ελένη Αλεξανδράτου, Ε.Δι.Π. Α΄

Αθήνα, 2022

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών
Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΦΕΡΡΟΚΕΝΙΟΥ ΓΙΑ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ
ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

Βασίλειος Σ. Λιάχνης

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ

Συνεπιβλέπουσα: Ελένη Αλεξανδράτου, Ε.Δι.Π. Α΄

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 25/10/2022

.....

Κ. Πολιτόπουλος

Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....

Ε. Χριστοφόρου

Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....

Η. Γλύτσης

Καθηγητής Ε.Μ.Π

Αθήνα, 2022

.....

Βασίλειος Σ. Λιάχνης

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών ΕΜΠ

Copyright © – Βασίλειος Λιάχνης, 2022

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

.....

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρήση της φωτεινής ακτινοβολίας για την θεραπεία διαφόρων δερματικών παθήσεων όπως η ψωρίαση συναντάται από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα. Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT), συνδυάζοντας μία πηγή φωτός, μία φωτοευαίσθητη ουσία και οξυγόνο επάγει τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα. Αν και οι τρεις αυτοί παράγοντες δεν είναι τοξικοί από μόνοι τους, ο συνδυασμός τους οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Κατά την PDT χορηγείται στον ασθενή, συνήθως ενδοφλέβια, η φωτοευαίσθητη ουσία η οποία συσσωρεύεται επιλεκτικά στους καρκινικούς όγκους. Με την ακτινοβολία του όγκου, σε κατάλληλο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη ζώνη απορρόφησης του, παρουσία οξυγόνου ενεργοποιείται μια σειρά από αντιδράσεις που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών ή στη δημιουργία μονήρους οξυγόνου. Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα θανατώνονται μέσω της τοξικότητας που επάγεται.

Η PDT είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος, το μέλλον της οποίας είναι συνδεδεμένο με την διαρκή έρευνα. Παράγοντες όπως η επιλεκτικότητα συγκέντρωσης της φωτοευαίσθητης ουσίας, ο χρόνος αποβολής της από τον οργανισμό, οι φωτοφυσικές και φωτοχημικές της ιδιότητες, η ικανότητα της για παραγωγή ελευθέρων ριζών, καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της PDT.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται μελέτη της ουσίας δικυανοβινυλοφεροκένιο, για χρήση της κατά την PDT ως φωτοευαίσθητοποιητής. Η εν λόγω ουσία ανήκει στην οργανομεταλλική οικογένεια ουσιών που καλούνται φεροκένια. Ο ιδιαίτερος τρόπος σύνδεσης του ατόμου σιδήρου με τους αρωματικούς δακτυλίους προσδίδει στις παραπάνω ουσίες ποικίλες και χρήσιμες ιδιότητες. Αν και το δικυανοβινυλοφεροκένιο δεν έχει λάβει μεγάλη ερευνητική προσοχή, η μελέτη των φωτοφυσικών του χαρακτηριστικών μπορεί να αποτελέσει ένα πρώτο βήμα για την πιθανή αξιοποίησή του ως φωτοευαίσθητοποιητής.

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση της ένωσης πραγματοποιήθηκαν από την Δρ. Μαρίνα Σαγνού, Ερευνήτρια Γ' Βαθμίδας, στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος»

Αρχικά, πραγματοποιείται μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων τόσο του διαλύματος δικυανοβινυλοφεροκενίου. Πιο συγκεκριμένα, διεξάγονται φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης και φθορισμού για διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαλύτες. Αναπτύσσεται διάταξη ακτινοβολίας, βασισμένη σε πράσινο led, για τη φωτεινή ενεργοποίηση του δικυανοβινυλοφεροκενίου και μελετάται η φωτοσταθερότητα και η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τη μελλοντική χρήση του δικυανοβινυλοφεροκενίου ως φωτοευαίσθητοποιητής, είναι μηκτά, καθώς παρουσιάζεται απορρόφηση και παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά ανεπαίσθητος φθορισμός.

Λέξεις κλειδιά: Φωτοδυναμική θεραπεία, φωτοευαίσθητοποιητής, δικυανοβινυλοφεροκένιο, φάσματα, φωτοφυσικές ιδιότητες, απορρόφηση, φθορισμός, ελεύθερες ρίζες

ABSTRACT

Light irradiation has already been used to treat various skin conditions, such as psoriasis, since antiquity. Photodynamic therapy (PDT), combining a light source, a photosensitive substance and oxygen induces toxicity to the cancer cells. Although all three of these factors are not individually toxic, their combined action leads to cell death. During PDT, photosensitizer is administered to the patient, usually intravenously, and is selectively accumulated in the cancerous tumors. Tumor irradiation, at an appropriate wavelength corresponding to its absorption band, in the presence of oxygen, triggers a series of reactions that lead to the production of free radicals or to the formation of singlet oxygen. Thus, the cancer cells are killed by the induced toxicity.

PDT is a promising method, the future of which is linked to ongoing research. Efficacy of PDT is determined by factors such as the selective accumulation of the photosensitive substance, its elimination time from cells and organisms, its photophysical and photochemical properties and its ability to produce free radicals.

The present thesis focuses on the study of dicyanovinylferrocene for its use during PDT as a photosensitizer. The substance in question belongs to the organometallic family of substances called ferrocenes. The special way of connecting the iron atom to the aromatic rings gives the above substances various and useful properties. Although dicyanovinylferrocene has not received much research attention, the study of its photophysical characteristics can be a first step for its possible use as a photosensitizer.

The design and synthesis of the compound were carried out by Dr. Marina Sagnou, Researcher C' Grade, at the Institute of Biosciences & Applications, of the National Center for Scientific Research "Demokritos"

Initially, the photophysical properties of dicyanovinylferrocene are studied. In particular, absorption and fluorescence spectroscopic studies are performed for different concentrations and solvents. A green-LED based irradiation device is developed for dicyanovinylferrocene light activation and its photostability and free radical production capacity are studied. The results are mixed for the future use of dicyanovinylferrocene as photosensitizer, as it exhibits absorption and free radical production capacity, but almost non-existent fluorescence.

Keywords: Photodynamic therapy, photosensitizers, dicyanovinylferrocene, spectra, photophysical properties, absorption, fluorescence, free radicals

Στους παππούδες μου,
Βασίλειο και Χρήστο

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στον καθηγητή μου Κωνσταντίνο Πολιτόπουλο, Καθηγητή Ε.Μ.Π, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την αμέριστη διάθεση συνεργασίας, τις υποδείξεις και τις συμβουλές του.

Ευχαριστώ την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου, μέλος του εργαστηριακού και διδακτικού προσωπικού (Ε.ΔΙ.Π) του Ε.Μ.Π, για την πολύτιμη καθοδήγηση της καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Με τη στήριξη και το ενδιαφέρον της κατάφερα να πάρω πολύτιμες γνώσεις γύρω από τη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία. Χωρίς τη βοήθεια και την προθυμία της για την αντιμετώπιση των δυσκολιών που προέκυψαν τίποτα δεν θα ήταν εφικτό.

Επιπλέον, δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες στην οικογένεια μου για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη της κατά τη διάρκεια όλων των σπουδών μου. Ευχαριστώ τους γονείς μου, Σωτήρη και Κατερίνα, για την αγάπη τους, την υπομονή τους και την συμπαράσταση τους σε κάθε στάδιο της ζωής μου αλλά και τα αδέρφια μου, Χρήστο, Κωνσταντίνο και Παναγιώτη καθώς ο καθένας με στήριξε και με βοήθησε να εκπληρώσω τους στόχους μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συμφοιτητές μου για τα όμορφα και αξέχαστα φοιτητικά χρόνια που περάσαμε μαζί. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Θοδωρή, τον Νίκο, τον Θανάση, τον Ανδρέα και τον Άρη για τις ξεχωριστές στιγμές που ζήσαμε, που παλέψαμε και που μάθαμε να αντιμετωπίζουμε την κάθε δυσκολία. Δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι οι φίλοι είναι η οικογένεια που εμείς επιλέγουμε.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT.....	8
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	12
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	14
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	17
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	18
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	20
1. ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	20
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	21
1.2 Μηχανισμοί δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας.....	23
1.2.1 Ελεύθερες ρίζες.....	24
1.2.2 Φωτοχημικοί μηχανισμοί.....	24
1.2.3 Φωτοχημικές αντιδράσεις.....	25
1.2.4 Φωτοευαισθητοποιητές.....	27
1.2.4.1 Επιθυμητά χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητή.....	28
1.2.4.2 Φωτοευαισθητοποιητές πρώτης γενιάς.....	29
1.2.4.3 Φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς.....	30
1.2.4.4 Φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς.....	31
1.2.5 Κυτταρικός θάνατος.....	32
1.2.5.1 Νέκρωση.....	33
1.2.5.2 Απόπτωση.....	34
1.2.5.3 Αυτοφαγία.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	36
2. ΤΟ ΦΕΡΡΟΚΕΝΙΟ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΟΥ.....	36
2.1 Εισαγωγή στην οργανομεταλλική χημεία	37

2.1.1	Οργανομεταλλικές	
ενώσεις.....		37
2.2 Το φερροκενίο.....		38
2.2.1 Η ανακάλυψη.....		38
2.2.2 Η δομή.....		39
2.2.3 Δομικοί δεσμοί.....		40
2.2.4 Ιδιότητες.....		40
2.2.5 Εφαρμογές του φερροκενίου και των παραγώγων του.....		41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....		45
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....		45
3.1 Στόχος.....		46
3.2 Πειραματικές διατάξεις.....		46
3.2.1 Φασματομετρική διάταξη απορρόφησης.....		46
3.2.2 Φασματομετρική διάταξη φθορισμού.....		49
3.2.3 Διάταξη ακτινοβόλησης.....		51
3.3 Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν.....		53
3.3.1 Δικυανοβινυλοφερροκένιο.....		53
3.3.2 DMSO.....		53
3.3.3 PBS.....		54
3.3.4 Αιθανόλη.....		54
3.3.5 DMF.....		55
3.3.6 CM-H ₂ DCFDA.....		55
3.3.7 Υδροξείδιο του νατρίου.....		56
3.4 Πειραματικές μέθοδοι.....		56
3.4.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου σε διάφορες συγκεντρώσεις.....		56

3.4.2 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου σε διάφορους διαλύτες.....	58
3.4.3 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού διαλύματος δικυανονινυλοφερροκενίου...58	
3.4.4 Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου.....	58
3.4.5 Μελέτη φωτοκαταστροφής του διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου μετά από ακτινοβολία.....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	61
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	61
4.1 Αποτελέσματα φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.....	62
4.2 Αποτελέσματα φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου σε διαφορετικούς διαλύτες.....	64
4.3 Αποτελέσματα φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου.....	65
4.4 Αποτελέσματα μελέτης της ικανότητας διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου για παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω φασματοφωτομετρίας φθορισμού.....	66
4.5 Αποτελέσματα μελέτης φωτοκαταστροφής διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου μέσω φασματοφωτομετρίας απορρόφησης.....	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	71
5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	71
5.1 Συμπεράσματα φασματοσκοπικών μελετών απορρόφησης και φθορισμού διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου.....	72
5.2 Συμπεράσματα σχετικά με την ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	73
5.3 Συμπεράσματα φωτοκαταστροφής διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου.....	73
5.4 Προτάσεις για το μέλλον.....	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η λάμπα Finsen.....	21
Εικόνα 2: Η διαδικασία της φωτοδυναμικής θεραπείας.....	23
Εικόνα 3: Μηχανισμοί δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας.....	25
Εικόνα 4: Δομή της πορφυρίνης.....	29
Εικόνα 5: Δομή της φθαλοκυανίνης.....	31
Εικόνα 6: Φωτοευαισθητοποιητές 3ης γενιάς.....	32
Εικόνα 7: Διαδικασίες κυτταρικού θανάτου.....	33
Εικόνα 8: Τρισδιάστατη δομή του φερροκενίου.....	38
Εικόνα 9: Σκόνη κρυστάλλου φερροκενίου.....	41
Εικόνα 10: Χημική δομή της φερροκίνης.....	42
Εικόνα 11: Το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Lambda 35 UV/Vis.....	47
Εικόνα 12: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας του Lambda 35 UV/Vis.....	48
Εικόνα 13: Στιγμιότυπο του λογισμικού UV WinLab.....	49
Εικόνα 14: Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS45 Luminescence Spectrometer.....	49
Εικόνα 15: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας του LS45.....	50
Εικόνα 16: Στιγμιότυπο του λογισμικού FL WinLab.....	51
Εικόνα 17: Η διάταξη ακτινοβολήσης.....	52
Εικόνα 18: Χημική δομή δικυανοβινυλοφερροκενίου.....	53
Εικόνα 19: Χημική δομή DMSO.....	54
Εικόνα 20: Χημική δομή αιθανόλης.....	55
Εικόνα 21: Χημική δομή DMF.....	55
Εικόνα 22: Χημική δομή CM-H2DCFDA.....	56
Εικόνα 23: Χημική δομή υδοξειδίου του νατρίου.....	56

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Το φάσμα ακτινοβολίας της φωτεινής πηγής.....	52
Διάγραμμα 2: Φάσματα απορρόφησης διαλύματος δικυανοβινυλοφεροκενίου σε DMSO για διαφορετικές συγκεντρώσεις	63
Διάγραμμα 3: Κορυφές απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης.....	63
Διάγραμμα 4: Φάσματα απορρόφησης δικυανοβινυλοφεροκενίου σε διαφορετικούς διαλύτες	65
Διάγραμμα 5: Φάσματα φθορισμού ($\lambda_{exc}=360\text{nm}$) και διέγερσης ($\lambda_{em}=410\text{nm}$) του δικυανοβινυλοφεροκενίου.....	66
Διάγραμμα 6: Φάσματα φθορισμού της CM-H2DCFDA σε διάλυμα παρουσία δικυανοβινυλοφεροκενίου μετά από φωτοενεργοποίηση για διαφορετικούς χρόνους.....	67
Διάγραμμα 7: Ποσοστιαία μεταβολή του μέγιστου φθορισμού του δικυανοβινυλοφεροκενίου ως αποτέλεσμα της ακτινοβολίας και παραγωγής ελευθέρων ριζών σε συνάρτηση με το χρόνο.....	68
Διάγραμμα 8: Φάσματα απορρόφησης του δικυανοβινυλοφεροκενίου για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολίας με το πράσινο φως.....	69

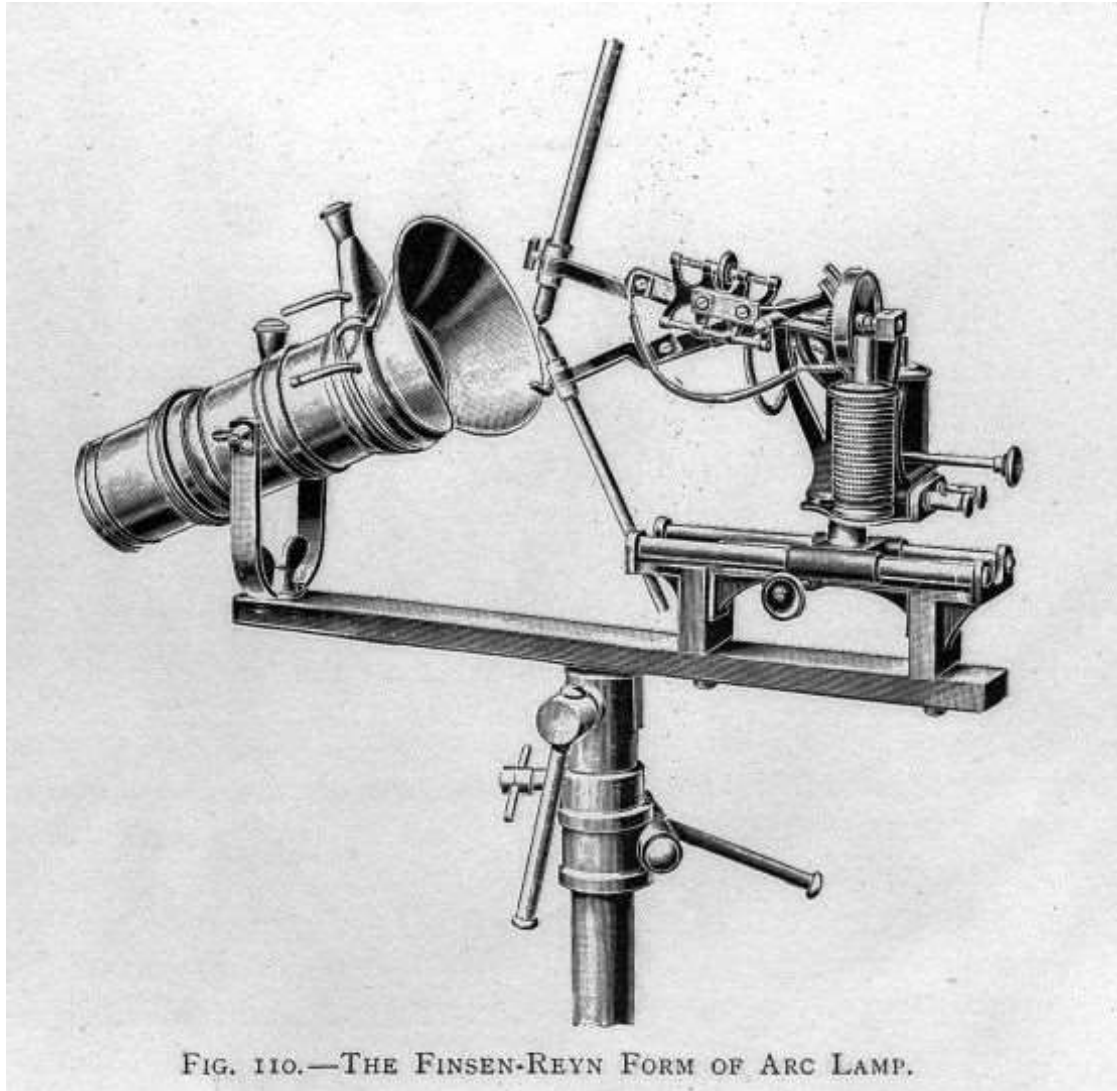
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Στοιχεία αραίωσης διαλυμάτων προς φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης.....57

Κεφάλαιο 1

Φωτοδυναμική Θεραπεία

1.1 Ιστορική αναδρομή



Εικόνα 1: Η λάμπα Finsen

Η χρήση του φωτός στη θεραπεία ασθενειών είναι γνωστή εδώ και πολλούς αιώνες και μπορεί να εντοπιστεί πάνω από 4000 χρόνια στους αρχαίους Αιγύπτιους. Ο αιγυπτιακός λαός χρησιμοποιούσε έναν συνδυασμό του φυτού *Amni Majus* (Ασπροκέφαλο) που λαμβανόταν από το στόμα και του ηλιακού φωτός για να αντιμετωπίσει με επιτυχία τη λεύκη: μια δερματική διαταραχή άγνωστης αιτίας. Το δραστικό συστατικό αυτού του φυτού (ψωραλένιο) χρησιμοποιείται πλέον με επιτυχία παγκόσμια στην θεραπεία της ψωρίασης.

Στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα ο Niels Finsen χρησιμοποίησε επιτυχώς τη φωτοθεραπεία με λάμπα τόξου άνθρακα (η «λάμπα Finsen») στη θεραπεία μιας φυματιώδους πάθησης του δέρματος, γνωστής ως lupus vulgaris, για την οποία κέρδισε το Νομπέλ Φυσιολογίας ή Ιατρικής το 1903.

Το 1913 ένας άλλος Γερμανός επιστήμονας, ο Meyer-Betz, περιέγραψε ένα σημαντικό πρόβλημα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Αφού έκανε ένεση στον εαυτό του με αιματοπορφυρίνη (Hr, φωτοευαισθητοποιητής), βίωσε γρήγορα μια γενική ευαισθησία του δέρματος κατά την έκθεση στο ηλιακό φως - ένα συχνά εμφανιζόμενο πρόβλημα για πολλούς φωτοευαισθητοποιητές.

Η πρώτη απόδειξη ότι οι φωτοευαίσθητες συνθετικές χρωστικές, σε συνδυασμό με πηγή φωτός και οξυγόνο θα μπορούσαν να έχουν πιθανή θεραπευτική δράση, έγινε στις αρχές του 20ου αιώνα στο εργαστήριο του Hermann von Tarpeiner στο Μόναχο της Γερμανίας. Κατά τη μελέτη των επιδράσεων της ακριδίνης στις καλλιέργειες παραμέσιας, ο Oscar Raab, μαθητής του von Tarpeiner παρατήρησε μια τοξική επίδραση. Τυχαία ο Raab παρατήρησε επίσης ότι το φως χρειαζόταν για να σκοτώσει την παραμέσια. Η μεταγενέστερη εργασία στο εργαστήριο του von Tarpeiner έδειξε ότι το οξυγόνο ήταν απαραίτητο για τη «φωτοδυναμική δράση» - όρος που επινοήθηκε από τον von Tarpeiner. Ο Von Tarpeiner και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν την πρώτη δοκιμή φωτοδυναμικής θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνωμα δέρματος χρησιμοποιώντας ως φωτοευαισθητοποιητή, την ηωσίνη.

Το 1924 ο Policard αποκάλυψε τις διαγνωστικές δυνατότητες του φθορισμού της αιματοπορφυρίνης όταν παρατήρησε ότι η υπεριώδης ακτινοβολία διεγείρει τον κόκκινο φθορισμό στα σαρκώματα των εργαστηριακών αρουραίων.[1] Ο Policard υπέθεσε ότι ο φθορισμός συσχετίστηκε με ενδογενή συσσώρευση αιματοπορφυρίνης.

Το 1948 ο Figge και οι συνεργάτες του έδειξαν σε πειραματόζωα ότι οι πορφυρίνες εμφανίζουν προτίμηση στα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κακοήθων, των εμβρυϊκών και των αναγεννητικών κυττάρων. Πρότειναν επίσης ότι οι πορφυρίνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία του καρκίνου.

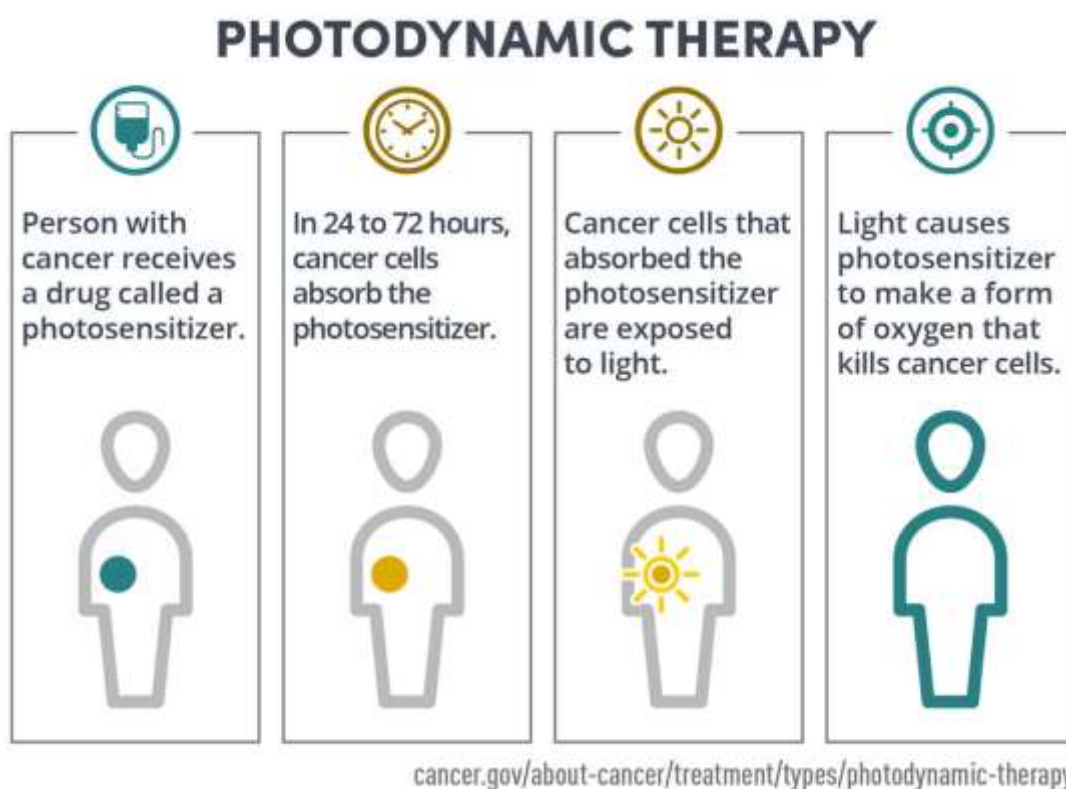
Το 1960 ο Lipson αναζητώντας έναν διαγνωστικό παράγοντα κατάλληλο για την ανίχνευση όγκου, χαρακτήρισε ως φωτοευαισθητοποιητή τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης (HrD). Αυτό του επέτρεψε να πρωτοπορήσει στη χρήση ενδοσκοπίων και του φθορισμού HrD.

Ο Thomas Dougherty και οι συνεργάτες του, εφάρμοσαν κλινικά φωτοδυναμική θεραπεία το 1978. Αντιμετώπισαν 113 δερματικούς ή υποδόριους κακοήθεις όγκους με HrD και παρατήρησαν ολική ή μερική υποχώρηση 111 όγκων. Ο Dougherty βοήθησε στην επέκταση των κλινικών δοκιμών και τον σχηματισμό του International Photodynamic Association, το 1986.

Ο John Toth παρατήρησε το "φωτοδυναμικό χημικό αποτέλεσμα" της θεραπείας και έγραψε την πρώτη εργασία που ονομάζει τη θεραπεία "Photodynamic Therapy" (PDT) περίπου το 1981. Η HrD, με την επωνυμία Photofrin, ήταν ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής που εγκρίθηκε για κλινική χρήση το 1993 για τη θεραπεία μιας μορφής καρκίνου της ουροδόχου κύστης στον Καναδά.

Από το 1990, οι Κινέζοι έχουν αναπτύξει κλινική τεχνογνωσία με την PDT, χρησιμοποιώντας εγχώρια παραγόμενους φωτοευαισθητοποιητές, που προέρχονται από την αιματοπορφυρίνη. Η Κίνα διακρίνεται για την τεχνογνωσία της στην επίλυση δυσπρόσιτων όγκων.[2]

1.2 Μηχανισμοί δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας



Εικόνα 2: Η διαδικασία της φωτοδυναμικής θεραπείας

Όλες οι μορφές φωτοδυναμικής θεραπείας περιλαμβάνουν τρία συστατικά: έναν φωτοευαισθητοποιητή, μια πηγή φωτός και το οξυγόνο των ιστών. Κανένα από τα συστατικά αυτά, στις δόσεις που χρησιμοποιούνται, δεν μπορεί να δράσει μόνο του αλλά ο συνδυασμός τους προκαλεί κυτταροτοξικό αποτέλεσμα. Το μήκος κύματος της φωτεινής πηγής πρέπει να είναι κατάλληλο για τη διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή ο οποίος στη συνέχεια παράγει ρίζες και/ή δραστικές μορφές οξυγόνου. Αυτές είναι ελεύθερες ρίζες που παράγονται μέσω αφαίρεσης ηλεκτρονίων ή μεταφοράς από ένα μόριο υποστρώματος και υψηλής αντιδραστικής κατάστασης οξυγόνου που είναι γνωστό ως μονήρες οξυγόνο. Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες ή το μονήρες οξυγόνο είναι κυτταροτοξικά με αποτέλεσμα να οδηγήσουν τα κύτταρα σε θάνατο.

Η PDT είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων: Πρώτα, ένας φωτοευαισθητοποιητής, ιδανικά με αμελητέα τοξικότητα απουσία φωτός, χορηγείται είτε συστηματικά είτε τοπικά. Όταν εμφανίζεται επαρκής ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή στον ιστό με τη βλάβη, ο φωτοευαισθητοποιητής ενεργοποιείται με έκθεση στο φως για μια καθορισμένη περίοδο. Η δόση φωτός παρέχει αρκετή ενέργεια για να διεγείρει τον φωτοευαισθητοποιητή και, να παράγει ελεύθερες ρίζες. Η θεραπεία θεωρείται τοπική και χωρίς παρενέργειες για τους γειτονικούς υγιείς ιστούς. Αυτό επιτυγχάνεται για διάφορους λόγους. Αρχικά οι φωτοευαισθητοποιητές είναι μόρια με υψηλή επιλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή. Στη συνέχεια, η ακτινοβολήση - ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή πραγματοποιείται επιλεκτικά μόνο στην πάσχουσα περιοχή. Τέλος οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες έχουν μικρό χρόνο ζωής γεγονός που δε τους επιτρέπει να μεταναστεύσουν και τις αναγκάζει να δράσουν εκεί όπου δημιουργήθηκαν, δηλαδή στην πάσχουσα περιοχή.[3]

1.2.1 Ελεύθερες ρίζες

Στον αέρα και στον ιστό, το μοριακό οξυγόνο (O_2) εμφανίζεται σε τριπλή κατάσταση, ενώ σχεδόν όλα τα άλλα μόρια βρίσκονται σε απλή κατάσταση. Οι αντιδράσεις μεταξύ τριπλών και απλών μορίων απαγορεύονται από την κβαντομηχανική, καθιστώντας το οξυγόνο σχετικά μη αντιδραστικό σε φυσιολογικές συνθήκες. Ένας φωτοευαισθητοποιητής είναι μια χημική ένωση που μπορεί να προωθηθεί σε διεγερμένη κατάσταση κατά την απορρόφηση του φωτός, να υποβληθεί σε διεσωτερική μετάβαση (ISC) και να μεταβεί στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση όπου να αντιδράσει είτε με το μοριακό οξυγόνο και να παράγει μονήρες οξυγόνο είτε με το υπόστρωμα παράγοντας ελεύθερες ρίζες. Και οι δύο μηχανισμοί παράγουν προϊόντα εξαιρετικά κυτταροτοξικά, επιτίθενται γρήγορα σε όποιες οργανικές ενώσεις συναντούν.[4]

1.2.2 Φωτοχημικοί μηχανισμοί

Όταν ένας φωτοευαισθητοποιητής βρίσκεται στη διεγερμένη του κατάσταση, μπορεί να αλληλεπιδράσει με το μοριακό τριπλό οξυγόνο (3O_2) και να παράγει ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), ζωτικής σημασίας για τον μηχανισμό Τύπου II. Αυτά τα είδη περιλαμβάνουν μονό οξυγόνο (1O_2), ρίζες υδροξυλίου ($\cdot OH$) και ιόντα υπεροξειδίου (O_2^-). Μπορούν να αλληλεπιδράσουν με κυτταρικά συστατικά συμπεριλαμβανομένων των ακόρεστων λιπιδίων, των υπολειμμάτων αμινοξέων και των νουκλεϊκών οξέων. Εάν επέλθει επαρκής οξειδωτική βλάβη, αυτό θα οδηγήσει σε θάνατο των κυττάρων-στόχων (μόνο εντός της φωτισμένης περιοχής).

Όταν ένα μόριο χρωμοφόρου, όπως ένα κυκλικό τετραπυρρολικό μόριο, απορροφά ένα φωτόνιο, ένα από τα ηλεκτρόνια του προωθείται σε τροχιακό υψηλότερης ενέργειας, ανυψώνοντας το χρωμοφόρο από τη θεμελιώδη κατάσταση (S_0) σε μια βραχύβια, ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση (S_n) που αποτελείται από υποεπίπεδα δόνησης (S_n'). Το διεγερμένο χρωμοφόρο μπορεί να χάσει ενέργεια με ταχεία μετάβαση μέσω αυτών

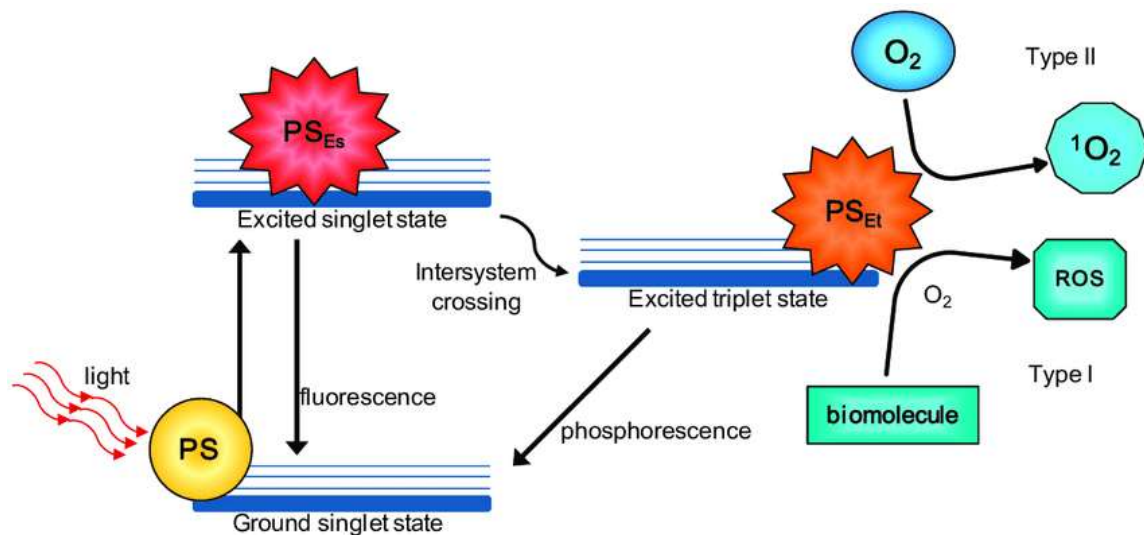
των υποεπιπέδων με το μηχανισμό της εσωτερικής μετατροπής (IC) για να μεταβεί στην πρώτη διεγερμένη μονήρη κατάσταση (S1), πριν χαλαρώσει γρήγορα πίσω στη βασική κατάσταση.

Η μετάβαση από τη πρώτη μονήρη διεγερμένη κατάσταση (S1) στη βασική κατάσταση (S0) γίνεται μέσω φθορισμού (S1 → S0). Η διάρκεια ζωής της διεγερμένης κατάστασης των φθοροφόρων είναι πολύ μικρή (τfl. = 10⁻⁹–10⁻⁶ δευτερόλεπτα) αφού οι μεταβάσεις μεταξύ των ίδιων καταστάσεων σπιν (S → S ή T → T) διατηρούν την πολλαπλότητα σπιν του ηλεκτρονίου και, σύμφωνα με τους κανόνες για τα σπιν, θεωρούνται "επιτρεπόμενες" μεταβάσεις.

Εναλλακτικά, ένα διεγερμένο ηλεκτρόνιο στην πρώτη μονήρη διεγερμένη κατάσταση (S1) μπορεί να υποβληθεί σε αντιστροφή σπιν και να συμπληρώσει την πρώτη διεγερμένη τριπλή κατάσταση (T1) μέσω διεσωτερικής μετάβασης (ISC). Το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί στη συνέχεια να υποβληθεί σε μια δεύτερη μετάβαση και να εγκαταλήψει τη διεγερμένη τριπλή κατάσταση (T1) μεταβαίνοντας στη θεμελιώδη κατάσταση (S0) μέσω φωσφορισμού (T1 → S0). Η διάρκεια ζωής του φωσφορισμού (τP = 10⁻³ – 1 δευτερόλεπτο) είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του φθορισμού.

Οι τετραπυρρολικοί φωτοευαισθητοποιητές στη διεγερμένη μονήρη κατάσταση είναι σχετικά αποτελεσματικοί στην διεσωτερική μετάβαση και μπορούν συνεπώς να έχουν υψηλή κβαντική απόδοση τριπλής διεγερμένης κατάστασης. Η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής αυτού του είδους είναι επαρκής για να επιτρέψει στον διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή τριπλής κατάστασης να αλληλεπιδράσει με τα περιβάλλοντα βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης.[5]

1.2.3 Φωτοχημικές αντιδράσεις



Εικόνα 3: Μηχανισμοί δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας

Οι διεγερμένοι φωτοευαισθητοποιητές τριπλής κατάστασης μπορούν να αντιδράσουν μέσω αντιδράσεων Τύπου-I και Τύπου-II. Οι αντιδράσεις τύπου I μπορεί να περιλαμβάνουν τον διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή μονής ή τριπλής διεγερμένης κατάστασης ($1P_{sen}^*$, $S1$; $3P_{sen}^*$, $T1$), ωστόσο λόγω της μικρής διάρκειας ζωής της μονής διεγερμένης κατάστασης, ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να αντιδράσει μόνο εάν συνδέεται στενά με ένα υποστρώμα. Και στις δύο περιπτώσεις η αλληλεπίδραση είναι με υποστρώματα τα οποία μπορούν άμεσα να οξειδωθούν ή να αναχθούν. Οι διεργασίες τύπου II περιλαμβάνουν την άμεση αλληλεπίδραση του διεγερμένου τριπλού φωτοευαισθητοποιητή με το μοριακό οξυγόνο (3O_2 , $3\Sigma_g$).[6]

Αντιδράσεις τύπου I

Οι αντιδράσεις τύπου I μπορούν να χωριστούν σε Τύπο I(i) και Τύπο I(ii). Ο τύπος I (i) περιλαμβάνει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (οξειδωση) από ένα μόριο υποστρώματος στον φωτοευαισθητοποιητή διεγερμένης κατάστασης (P_{sen}^*), δημιουργώντας ένα ριζικό ανιόν φωτοευαισθητοποίησης ($P_{sen}\bullet^-$) και ένα κατιόν ρίζας υποστρώματος ($Subs\bullet^+$). Η πλειονότητα των ριζών που παράγονται από αντιδράσεις Τύπου I(i) αντιδρούν ακαριαία με το μοριακό οξυγόνο (O_2), δημιουργώντας ένα μείγμα ενδιάμεσων μορφών οξυγόνου. Για παράδειγμα, το ριζικό ανιόν φωτοευαισθητοποιητή μπορεί να αντιδράσει στιγμιαία με το μοριακό οξυγόνο ($3O_2$) για να δημιουργήσει ένα ανιόν ρίζας υπεροξειδίου ($O_2\bullet^-$), το οποίο μπορεί να συνεχίσει να παράγει την εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου ($OH\bullet$), με αλυσιδωτή παραγωγή κυτταροτοξικών ελεύθερων ριζών, διαδικασία κοινή στην οξειδωτική βλάβη των λιπαρών οξέων και άλλων λιπιδίων.

Οι αντιδράσεις τύπου I (ii) περιλαμβάνουν τη μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου (αναγωγή) στον φωτοευαισθητοποιητή διεγερμένης κατάστασης (P_{sen}^*). Αυτό δημιουργεί ελεύθερες ρίζες ικανές να αντιδρούν γρήγορα με το μοριακό οξυγόνο και να δημιουργούν ένα σύνθετο μείγμα δραστικών ενδιάμεσων μορφών οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένων των δραστικών υπεροξειδίων.

Αντιδράσεις τύπου II

Οι αντιδράσεις τύπου II περιλαμβάνουν την άμεση αλληλεπίδραση του διεγερμένου φωτοευαισθητοποιητή τριπλής κατάστασης ($3P_{sen}^*$) με το μοριακό οξυγόνο βασικής κατάστασης ($3O_2$, $3\Sigma_g$) - μια επιτρεπόμενη μετάβαση - ο φωτοευαισθητοποιητής διεγερμένης κατάστασης και το μοριακό οξυγόνο βασικής κατάστασης είναι της ίδιας κατάστασης σπιν (T). Όταν ο διεγερμένος φωτοευαισθητοποιητής συγκρούεται με το μοριακό οξυγόνο, λαμβάνει χώρα μια διαδικασία εκμηδένισης τριπλής-τριπλής ($3P_{sen}^* \rightarrow 1P_{sen}$ και $3O_2 \rightarrow 1O_2$). Αυτό αντιστρέφει το σπιν των εξώτατων αντιδεσμικών ηλεκτρονίων ενός μορίου οξυγόνου ($3O_2$), δημιουργώντας δύο μορφές μονήρους οξυγόνου ($1\Delta_g$ και $1\Sigma_g$), ενώ ταυτόχρονα αποδιεγείρεται η διεγερμένη τριπλή κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή ($T1 \rightarrow S0$). Η κατάσταση υψηλότερης ενέργειας του μονήρους οξυγόνου ($1\Sigma_g$, $157\text{kJ mol}^{-1} > 3\Sigma_g$) είναι πολύ βραχύβια ($1\Sigma_g \leq 0,33$ χιλιοστά του

δευτερολέπτου (μεθανόλη), μη ανιχνεύσιμη σε H₂O/D₂O) και χαλαρώνει γρήγορα στη διεγερμένη κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας (1Δg, 94kJ mol⁻¹ > 3Σg). Είναι, επομένως, αυτή η χαμηλότερης ενέργειας μορφή διοξυγόνου μονής κατάστασης (1Δg) που εμπλέκεται στον κυτταρικό τραυματισμό και τον κυτταρικό θάνατο. Τα εξαιρετικά αντιδραστικά μονήρη οξυγόνα (¹O₂) που παράγονται μέσω της αντίδρασης Τύπου-II δρουν κοντά στην τοποθεσία δημιουργίας τους και σε ακτίνα περίπου 20 nm, με τυπική διάρκεια ζωής περίπου 40 νανοδευτερόλεπτα σε βιολογικά συστήματα. Είναι πιθανό (σε περίοδο 6 μs) το ¹O₂ να μπορεί να διαχέεται έως και περίπου 300 nm in vivo. Το ¹O₂ μπορεί θεωρητικά να αλληλεπιδράσει μόνο με εγγύς μόρια και δομές εντός αυτής της ακτίνας καθιστώντας τη θεραπεία πολύ επιλεκτική και χωρίς παρενέργειες.

Τα ROS ξεκινούν αντιδράσεις με πολλά βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων των υπολειμμάτων αμινοξέων σε πρωτεΐνες, όπως η τρυπτοφάνη, ακόρεστα λιπίδια όπως η χοληστερόλη και οι βάσεις νουκλεϊκών οξέων, ιδιαίτερα τα παράγωγα της γουανοσίνης και της γουανίνης, με την τελευταία βάση να είναι πιο ευαίσθητη στις ROS. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις προκαλούν βλάβη και πιθανή καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και απενεργοποίηση ενζύμων, με αποκορύφωμα τον κυτταρικό θάνατο. Είναι πιθανό ότι παρουσία μοριακού οξυγόνου και ως άμεσο αποτέλεσμα της φωτοακτινοβολίας του μορίου του φωτοευαισθητοποιητή, αμφότερες οι Τύποι I και II διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διαταραχή των κυτταρικών μηχανισμών και της κυτταρικής δομής. Ωστόσο, αρκετά στοιχεία υποδηλώνουν ότι ο μηχανισμός δράσης Τύπου II κυριαρχεί στην πρόκληση κυτταρικής βλάβης, συνέπεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ακτινοβολημένου φωτοευαισθητοποιητή και του μοριακού οξυγόνου.

Τα κύτταρα in vivo μπορεί να προστατεύονται εν μέρει από τις επιδράσεις της φωτοδυναμικής θεραπείας με την παρουσία απλών δεσμευτών οξυγόνου (όπως η ιστιδίνη). Ορισμένα κύτταρα του δέρματος είναι κάπως ανθεκτικά στην PDT απουσία μοριακού οξυγόνου, υποστηρίζοντας περαιτέρω την πρόταση ότι η διαδικασία Τύπου II βρίσκεται στο επίκεντρο του φωτοεκκινημένου κυτταρικού θανάτου.

Η αποτελεσματικότητα των διαδικασιών Τύπου II εξαρτάται από τη διάρκεια ζωής της τριπλής κατάστασης τT και την τριπλή κβαντική απόδοση (ΦT) του φωτοευαισθητοποιητή. Και οι δύο αυτές παράμετροι έχουν εμπλακεί στη φωτοθεραπευτική αποτελεσματικότητα, υποστηρίζοντας περαιτέρω τη διάκριση μεταξύ μηχανισμών Type-I και Type-II. Ωστόσο, η επιτυχία ενός φωτοευαισθητοποιητή δεν εξαρτάται αποκλειστικά από μια αντίδραση τύπου II. Πολλοί φωτοευαισθητοποιητές εμφανίζουν διεγερμένες ζωές τριπλής που είναι πολύ μικρές για να επιτρέψουν την πραγματοποίηση μιας διαδικασίας τύπου II. Για παράδειγμα, ο φωτοευαισθητοποιητής οκτααιθυλοβενζοχλωρίνη με μεταλλικό χαλκό έχει διάρκεια ζωής τριπλής κατάστασης μικρότερη από 20 νανοδευτερόλεπτα και εξακολουθεί να θεωρείται αποτελεσματικός φωτοδυναμικός παράγοντας.

1.2.4 Φωτοευαισθητοποιητές

Υπάρχουν πολλοί φωτοευαισθητοποιητές για την PDT ανάμεσά τους και οι πορφυρίνες, χλωρίνες και χρώσεις. Παραδείγματα περιλαμβάνουν αμινολεβουλινικό οξύ (ALA), πυρίτιο

φθαλοκυανίνη Pc 4, m-τετραϋδροξυφαινυλοχλωρίνη (mTHPC) και μονο-L-ασπαρτυλοχλωρίνη e6 (NPe6). Οι φωτοευαισθητοποιητές που διατίθενται στο εμπόριο για κλινική χρήση περιλαμβάνουν τα Allumera, Photofrin, Visudyne, Levulan, Foscan, Metvix, Hexnix, Cysview και Laserphyrin, με άλλα σε πρώιμο στάδιο, π.χ. Antrin, Photochlor, Photosens, Photrex, Lumacan, Cevira, Visonac, BF-200 ALA, Amphinex και Azadipyrrromethenes.

Η κύρια διαφορά μεταξύ των φωτοευαισθητοποιητών είναι τα μέρη του κυττάρου που στοχεύουν. Σε αντίθεση με την ακτινοθεραπεία, όπου η βλάβη προκαλείται στοχεύοντας το κυτταρικό DNA, οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές στοχεύουν άλλες κυτταρικές δομές. Για παράδειγμα, το mTHPC στοχεύει στο πυρηνικό περίβλημα. Αντίθετα, το ALA στοχεύει στα μιτοχόνδρια και το μπλε του μεθυλενίου στα λυσοσώματα. Μέχρι στιγμής, οι φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία ταξινομούνται σύμφωνα με την ιστορική εξέλιξη και τις εννοιολογικές προσεγγίσεις πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς.[7]

1.2.4.1 Επιθυμητά χαρακτηριστικά φωτοευαισθητοποιητή

Το βασικό χαρακτηριστικό ενός φωτοευαισθητοποιητή είναι η ικανότητα να συσσωρεύεται κατά προτίμηση στον ιστό-στόχο και να προκαλεί ένα επιθυμητό βιολογικό αποτέλεσμα μέσω της δημιουργίας κυτταροτοξικών παραγώγων. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός φωτοευαισθητοποιητή είναι:

-Ισχυρή απορρόφηση με υψηλό συντελεστή απόσβεσης στην κόκκινη/εγγύς υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (600–850 nm) ώστε να έχουμε βαθύτερη διείσδυση στον ιστό. (Ο ιστός είναι πολύ πιο διαπερατός σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (~700–850 nm). Τα μεγαλύτερα μήκη κύματος επιτρέπουν στο φως να διεισδύσει βαθύτερα και να θεραπεύσει μεγαλύτερες δομές.)[8]

-Κατάλληλα φωτοφυσικά χαρακτηριστικά: υψηλή κβαντική απόδοση σχηματισμού τριπλής διεγερμένης ($\Phi_T \geq 0,5$), υψηλή κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου ($\Phi_D \geq 0,5$), σχετικά μεγάλη διάρκεια ζωής τριπλής κατάστασης (τ_T , εύρος μs), και υψηλή ενέργεια τριπλής κατάστασης ($\geq 94 \text{ kJ mol}^{-1}$).

-Χαμηλή σκοτεινή τοξικότητα και αμελητέα κυτταροτοξικότητα απουσία φωτός. (Ο φωτοευαισθητοποιητής δεν πρέπει να είναι επιβλαβής για τον ιστό στόχο μέχρι να εφαρμοστεί η θεραπευτική δόση.)

-Επιλεκτική συγκέντρωση σε άρρωστο/ιστό-στόχο έναντι του υγιούς ιστού

-Γρήγορη απομάκρυνση από το σώμα μετά τη διαδικασία

-Υψηλή χημική σταθερότητα: μεμονωμένες, καλά χαρακτηρισμένες ενώσεις, με γνωστή και σταθερή σύνθεση

-Σύντομη και υψηλής απόδοσης διαδικασία σύνθεσης (με εύκολη μετάβαση σε παραγωγή μεγαλύτερης κλίμακας)

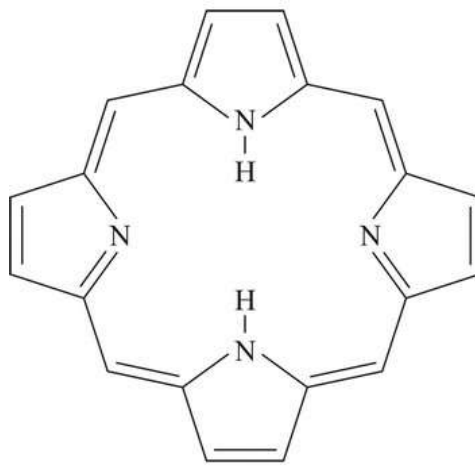
-Απλή και σταθερή σύνθεση

-Διαλυτό σε βιολογικά μέσα, επιτρέποντας την ενδοφλέβια χορήγηση. Διαφορετικά, ένα υδρόφιλο σύστημα παροχής πρέπει να επιτρέπει την αποτελεσματική και αποδοτική μεταφορά του φωτοευαισθητοποιητή στο σημείο στόχο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

-Χαμηλή φωτοκαταστροφή για την πρόληψη της υποβάθμισης του φωτοευαισθητοποιητή, ώστε να μπορεί να συνεχίσει να παράγει ελεύθερες ρίζες.

-Ικανότητα φθορισμού για φωτοδυναμική διάγνωση. Πολλές τεχνικές οπτικής δοσιμετρίας, όπως η φασματοσκοπία φθορισμού, εξαρτώνται από τον φθορισμό.[9]

1.2.4.2 Φωτοευαισθητοποιητές πρώτης γενιάς



Εικόνα 4: Δομή της πορφυρίνης

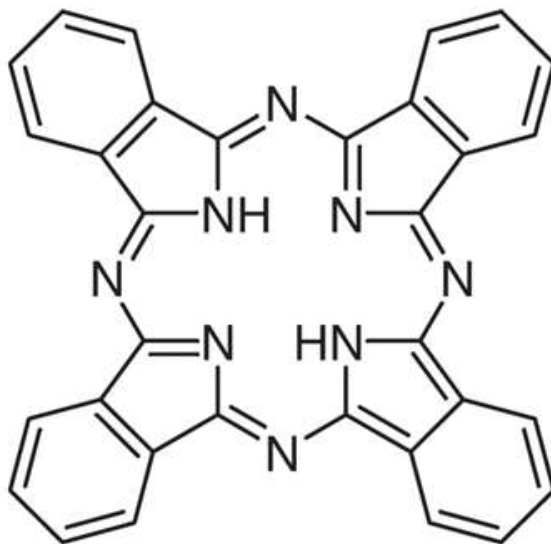
Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των φωτοευαισθητοποιητών πρώτης γενιάς είναι, το παράγωγο αιματοπορφυρίνης (HpD) και η φωτοφρίνη II τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε πρώιμες κλινικές δοκιμές της PDT. Η HPD αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματική σε καρκινώματα του εγκεφάλου, του λάρυγγα, του πνεύμονα, του δέρματος, του στομάχου και του οισοφάγου σε κάποιο βαθμό. Στην πραγματικότητα, η αιματοπορφυρίνη, αλλά όχι τα παράγωγά της, ανακαλύφθηκε κατά την πρώιμη περίοδο. Ενώ δεν ήταν αποτελεσματική για τον εντοπισμό του όγκου η HpD περιείχε μίγματα οξικού-θειικού οξέος με βάση τη δομή προέλευσης.[10] Ωστόσο, μετά από μεγάλο αριθμό κλινικών μελετών, εντοπίστηκαν τα προβλήματα του Photofrin (μία εμπορική ονομασία των παραγώγων της αιματοπορφυρίνης), όπως η πολύπλοκη σύστασή της και ο χαμηλός ρυθμός απορρόφησης φωτός. Επιπροσθέτως, λόγω του σχετικά μικρού μήκους κύματος του φωτός (630 nm), μόνο μια μικρή ποσότητα φωτός μπορεί να εισέλθει στον όγκο μέσω του δέρματος, ενώ το μεγαλύτερο μέρος του φωτός μπλοκάρεται στην επιφάνεια του δέρματος. Αυτό ουσιαστικά έχει ως αποτέλεσμα τη δερματική φωτοτοξικότητα αφού

εμφάνιζε μεγαλύτερη κορυφή κοντά στα 400 nm (ηλιακή ακτινοβολία: 400-600 nm) και μικρότερη στα 630 nm. Αυτά τα μειονεκτήματα προώθησαν την ανάπτυξη φωτοευαισθητοποιητών δεύτερης γενιάς.[11]

1.2.4.3 Φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς

Σε σύγκριση με τον φωτοευαισθητοποιητή πρώτης γενιάς, η σύνθεση και η δομή του φωτοευαισθητοποιητή δεύτερης γενιάς είναι πιο ξεκάθαρη και η φωτοευαισθησία, το φάσμα απορρόφησης και η επιλεκτικότητα των ιστών έχουν βελτιωθεί σημαντικά.[12] Σε κάποιο βαθμό, η πρώτη γενιά φωτοευαισθητοποιητή έχει πολύπλοκα συστατικά, κάτι που είναι πολύ κακό για την επιλεκτικότητα του ιστού και τη σταθερότητα της έντασης της φωτοδυναμικής βλάβης. Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς βασίζονται στη δομή της πορφυρίνης, όπως οι βενζοπορφυρίνες, οι πουργουρίνες, οι τεξαφυρίνες, οι φθαλοκυανίνες, οι ναφθαλοκυανίνες και η πρωτοπορφυρίνη IX (PpIX).[13] Η PpIX αποδείχθηκε ότι έχει μεγαλύτερη απορρόφηση σε μήκος κύματος στα κύτταρα ερυθρολευχαιμίας. Είναι πρόδρομος της αίμης και εμπλέκεται στο μεταβολισμό της αίμης μέσω του συνδυασμού μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μεταφοράς.

Ένας άλλος ευρέως χρησιμοποιούμενος φωτοευαισθητοποιητής είναι το 5-αμινολεβουλικό οξύ (ALA), ο βιολογικός πρόδρομος του PpIX. Μια δοκιμή φάσης I της PDT με τη χορήγηση ALA σε 11 ασθενείς με στοματική λευκοπλακία έδειξε τα οφέλη και η ασφαλής δόση της ALA-PDT μπορούσε να χορηγηθεί με χαμηλή δόση φωτός έως και 4 J/cm². Άλλοι φωτοευαισθητοποιητές, όπως το μονο-ασπαρτυλοχλωρίνη e6 (NPe6), η τεμπορφίνη και το εξυλοπυροφαιοφορβίδιο (HPPH), βασίζονται στη δομή του χλωρίου. Άλλοι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς σχεδιάστηκαν για να ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένες απαιτήσεις, όπως π.χ. τους νέους φωτοευαισθητοποιητές που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια, DLC (αποεντοπισμένα λιπόφιλα κατιόντα) που μπορούν κατά προτίμηση να εντοπιστούν στα μιτοχόνδρια. Με βάση το DLC, παρασκευάστηκαν τρία συζεύγματα DLCs-πορφυρίνης: ένα κατιόν Β πορφυρίνης-ροδαμίνης τροποποιημένο με πυρήνα, ένα κατιόν πορφυρίνης-μονο-τριφαινυλοφωσφονίου τροποποιημένου πυρήνα και ένα κατιόν πορφυρίνης-δι-tPP τροποποιημένου πυρήνα.[14] Η χημική δομή του αρχικού φωτοευαισθητοποιητή τροποποιήθηκε για να βελτιωθεί το πρόβλημα της στόχευσης των οργανιδίων και να αυξηθεί η αντικαρκινική δράση των φαρμάκων. Μετά από αναγωγή διαμιδίου, η δισουλφονωμένη τετραφαινυλοπορφίνη [TPPS(2a)] μεταφέρθηκε σε δισουλφονισμένη τετραφαινυλχλωρίνη [TPCS(2a)] για καλύτερη επαγόμενη ενεργοποίηση της γελονίνης, η οποία καθυστέρησε την ανάπτυξη του όγκου σε αθυμικά ποντίκια σε υποδόρια ακτινοβολία. Οι περισσότερες νέες πορφυρίνες διεγείρονται με ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Επομένως, παρέχουν βαθύτερη διείσδυση φωτός άρα και περιοχή δράσης.[15]



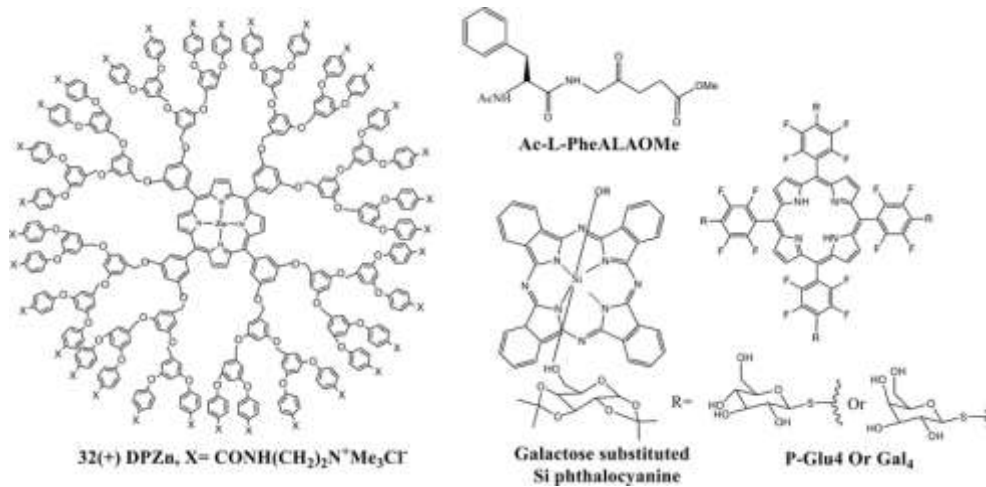
Εικόνα 5: Δομή της φθαλοκυανίνης

1.2.4.4 Φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς

Πολλοί φωτοευαισθητοποιητές είναι ελάχιστα διαλυτοί σε υδατικά μέσα, ιδιαίτερα σε φυσιολογικό pH, περιορίζοντας τη χρήση τους. Οι εναλλακτικές στρατηγικές χορήγησης περιλαμβάνουν τη χρήση γαλακτωμάτων λαδιού σε νερό (o/w) αλλά και ουσίες-φορείς όπως λιποσώματα και νανοσωματίδια. Αν και αυτά τα συστήματα μπορεί να αυξήσουν τα θεραπευτικά αποτελέσματα, το σύστημα φορέα μπορεί να μειώσει ακούσια την «παρατηρούμενη» κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου (ΦΔ): το μονήρες οξυγόνο και οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τον φωτοευαισθητοποιητή πρέπει να μπορούν να διαχέονται έξω από το σύστημα φορέα. Δεδομένου ότι οι ελεύθερες ρίζες και το μονήρες οξυγόνο έχει μια στενή ακτίνα δράσης, μπορεί να μην φτάσει στα κύτταρα-στόχους.[16] Ο φορέας μπορεί να περιορίσει την απορρόφηση φωτός, μειώνοντας την απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου.

Μια άλλη εναλλακτική που δεν εμφανίζει το πρόβλημα σκέδασης είναι η χρήση τμημάτων μορίων, οι στρατηγικές περιλαμβάνουν απευθείας σύνδεση φωτοευαισθητοποιητών σε βιολογικά ενεργά μόρια όπως αντισώματα. Διάφορα μέταλλα σχηματίζουν σύμπλοκα με μακροκυκλικούς φωτοευαισθητοποιητές. Πολλοί φωτοευαισθητοποιητές περιέχουν ένα χηλικό κεντρικό μεταλλικό ιόν.[17] Οι κύριοι υποψήφιοι είναι τα μέταλλα μεταπτώσεως, αν και έχουν συντεθεί φωτοευαισθητοποιητές με μέταλλα της ομάδας 13 (Al, AlPcS4) και της ομάδας 14 (Si, SiNC και Sn, SnEt2). Το μεταλλικό ιόν δεν προσδίδει σαφή φωτοδραστικότητα στο σύμπλοκο. Τα σύμπλοκα της Hρ χαλκού (II), κοβαλτίου (II), σιδήρου (II) και ψευδαργύρου (II) είναι όλα φωτοαδρανή σε αντίθεση με τις πορφυρίνες χωρίς μέταλλα.[18] Το κεντρικό μεταλλικό ιόν, δεσμευμένο από έναν αριθμό φωτοευαισθητοποιητών, επηρεάζει έντονα τις φωτοφυσικές ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή. Η χήλωση των παραμαγνητικών μετάλλων σε ένα χρωμοφόρο

φθαλοκυανίνης φαίνεται να μειώνει τις διάρκειες ζωές τριπλής κατάστασης (έως νανοδευτερόλεπτο), δημιουργώντας διακυμάνσεις στην κβαντική απόδοση και στη διάρκεια ζωής της φωτοδιεγερμένης τριπλής κατάστασης.[19]



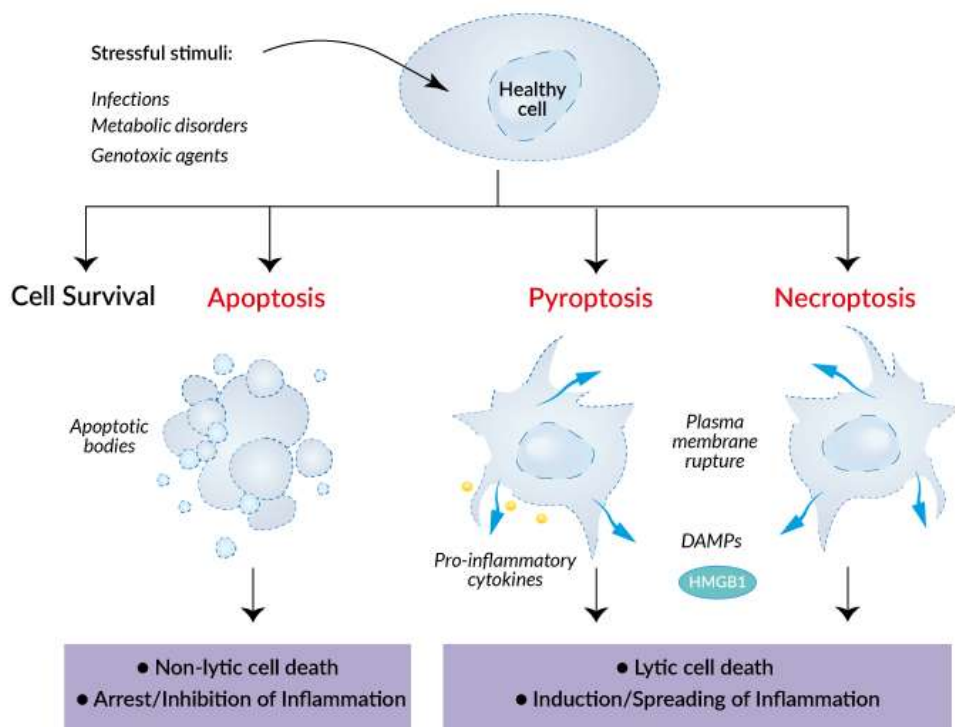
Εικόνα 6: Φωτοευαισθητοποιητές 3ης γενιάς

1.2.5 Κυτταρικός θάνατος

Ο κυτταρικός θάνατος είναι το γεγονός ενός βιολογικού κυττάρου που παύει να εκτελεί τις λειτουργίες του. Αυτό μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της φυσικής διαδικασίας των παλαιών κυττάρων που πεθαίνουν και αντικαθίστανται από νέα, ή μπορεί να οφείλεται σε παράγοντες όπως ασθένεια, εντοπισμένος τραυματισμός ή θάνατος του οργανισμού στον οποίο ανήκουν τα κύτταρα. Η απόπτωση ή ο κυτταρικός θάνατος Τύπου I και η αυτοφαγία ή ο κυτταρικός θάνατος τύπου II είναι και οι δύο μορφές προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ενώ η νέκρωση είναι μια μη φυσιολογική διαδικασία που εμφανίζεται ως αποτέλεσμα μόλυνσης ή τραυματισμού.[20] Η κατανόησή μας για αυτούς τους μηχανισμούς συνεχίζει να επεκτείνεται και ανακαλύπτονται συνεχώς νέοι.

Οι διάφορες μορφές κυτταρικού θανάτου είναι αξιοσημείωτα περίπλοκες και μερικές φορές εν μέρει αλληλοεπικαλύπτονται, γεγονός που καθιστά την αναγνώρισή τους δύσκολη αποστολή ενώ νέοι όροι όπως νεκρόπτωση, φερρόπτωση, πυρόπτωση, παρθανάτος, νέκρωση λόγω μετάβασης στη διαπερατότητα μιτοχονδρίων, κυτταρικός θάνατος εξαρτώμενος από λυσόσωμα, κυτταρική γήρανση, μιτωτική καταστροφή και ανοσογονικός θάνατος έχουν προκύψει. Η απόπτωση, η αυτοφαγία και η νέκρωση είναι, στο πλαίσιο της PDT, πιθανώς οι πιο εκτενώς μελετημένοι τρόποι θανάτωσης. Ο ίδιος φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να προκαλέσει και τους τρεις μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου ανάλογα με τις συνθήκες θεραπείας. Τυπικά, η υψηλή φωτο-βλάβη (υψηλή συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή και/ή υψηλή δόση φωτός) προκαλεί νέκρωση. Η μέτρια βλάβη αναμένεται να προκαλέσει ρυθμισμένους τρόπους κυτταρικού θανάτου (π.χ. απόπτωση). Τέλος, η μικρή βλάβη προκαλεί αυτοφαγία, πιθανότατα προσαρμοστική

αυτοφαγία η οποία, ανάλογα με την επέκταση της βλάβης, μπορεί να πυροδοτήσει περαιτέρω άλλους μηχανισμούς ρυθμισμένου κυτταρικού θανάτου. Λαμβάνοντας αυτά υπόψη, γίνεται αντιληπτό στη συνέχεια ότι, in vivo, διαφορετικές μορφές κυτταρικού θανάτου προκαλούνται ταυτόχρονα σε έναν όγκο που υποβάλλεται σε PDT. Στην επιφάνεια του όγκου, όπου η ροή φωτονίων είναι υψηλότερη, και σε περιοχές πιο κοντά στα αιμοφόρα αγγεία του όγκου, το οξειδωτικό στρες αναμένεται να είναι ισχυρότερο, δημιουργώντας έτσι τυχαία νέκρωση. Αντίθετα, κύτταρα σε βαθύτερες περιοχές, πιο μακριά από τα αιμοφόρα αγγεία μπορεί να πεθάνουν από ρυθμιζόμενες μορφές κυτταρικού θανάτου (π.χ. απόπτωση) και αναμένεται αυτοφαγία σε περιοχές όπου δημιουργούνται λιγότερα ROS.[21]



Εικόνα 7: Διαδικασίες κυτταρικού θανάτου

1.2.5.1 Νέκρωση

Η νέκρωση ή ο τυχαίος κυτταρικός θάνατος είναι μια ταχεία και μη ρυθμισμένη μορφή κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από οξεία, ισχυρή, φυσική ή χημική προσβολή. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε αστοχία των ιοντικών αντλιών στην πλασματική μεμβράνη. Συνοδεύεται από αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης με αποτέλεσμα εισροή νερού και ιόντων, διόγκωση κυττάρων και οργανιδίων, φυσαλίδες του κυτταροπλάσματος και

συσσώρευση χρωματίνης. Η νέκρωση θεωρείται ως μια παθητική διαδικασία καθώς σε αντίθεση με τις ρυθμιζόμενες μεθόδους κυτταρικού θανάτου, δεν απαιτεί πρωτεϊνοσύνθεση, ενέργεια ή ρύθμιση μέσω οδών σηματοδότησης.

Ορισμένες έρευνες επισημαίνουν σημαντικούς ρόλους των μιτοχονδρίων, του ενδοπλασματικού δικτύου και των λυσοσωμάτων στον έλεγχο της νέκρωσης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η υψηλή δόση PDT, είτε με την εφαρμογή υψηλής συγκέντρωσης φωτοευαισθητοποιητή και/ή φωτός υψηλής δόσης τείνει να σκοτώνει κύτταρα με νέκρωση. Η νέκρωση σχετίζεται επίσης με φωτοευαισθητοποιητές που έχουν τροπισμό για την κυτταρική μεμβράνη, οι οποίοι, κατά την φωτοενεργοποίηση, μεσολαβούν για την απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης και στην εξάντληση του ATP. Έχει γίνει κατανοητό ότι οι σύντομες περίοδοι επώασης ευνοούν τη συσσώρευση των φωτοευαισθητοποιητών στην πλασματική μεμβράνη, ενώ οι μεγαλύτερες περίοδοι επώασης επιτρέπουν συσσώρευση των φωτοευαισθητοποιητών στα διάφορα οργάνια.[22]

1.2.5.2 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι ένας πολύ περίπλοκος μηχανισμός, που τυπικά ταξινομείται σε δύο κύριες οδούς, την ενδογενή (ή μιτοχονδριακή) και την εξωγενή. Η πρώτη οδός μπορεί να ενεργοποιηθεί από ενδοκυτταρικές ή εξωκυτταρικές διαταραχές που περιλαμβάνουν τη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Αυτό καταλήγει στην ενεργοποίηση των τελεστικών κασπασών (κασπάση 3 και 7). Η εξωγενής οδός εμφανίζεται όταν η διαταραχή στο εξωκυτταρικό περιβάλλον ανιχνεύεται από υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης, με την ειδική συμμετοχή της κασπάσης 8, και επίσης καταλήγει στην ενεργοποίηση των τελεστικών κασπασών. Και στις δύο οδούς, η ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης διατηρείται πάντα *in vivo*, με τα κύτταρα που πεθαίνουν και τα αποπτωτικά σώματα να καθαρίζονται ταχέως από κύτταρα του ανοσοποιητικού με φαγοκυτταρική δραστηριότητα (π.χ. μακροφάγα), ενώ *in vitro*, λαμβάνει χώρα διάσπαση της μεμβράνης, που τυπικά ορίζεται ως δευτερογενής νέκρωση. Η ενδογενής απόπτωση είναι η πιο κοινή οδός αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου που συζητείται στο πλαίσιο της PDT.[23]

1.2.5.3 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι μια καταβολική διαδικασία που μπορεί να λειτουργήσει ως: α) ένας μηχανισμός επιβίωσης (προσαρμοστική αυτοφαγία) μέσω της κάθαρσης του κατεστραμμένου κυτταρικού υλικού, ή β) ένας μηχανισμός θανάτου, ιδιαίτερα υπό συνθήκες που ενισχύουν μόνιμα τη βλάβη των οργανιδίων (εξαρτώμενος από την αυτοφαγία κυτταρικός θάνατος). Κάθε περίπτωση βασίζεται στον σχηματισμό ενός κυστιδίου μεμβράνης διπλής στιβάδας που καταπίνει κατεστραμμένο υλικό (αυτοφαγοσώματα) διαχωρίζοντάς το από το κυτταρόπλασμα, ακολουθούμενο από σύντηξη με λυσοσώματα (προκαλώντας την πέψη της εσωτερικής μεμβράνης των

αυτοφαγοσωμάτων) σχηματίζοντας το λεγόμενο αυτολυσόσωμα (μονό -μεμβρανικά κυστίδια). Εδώ είναι που το αυτοφαγικό φορτίο αποικοδομείται από λυσοσωμικές υδρολάσες. Η αποδόμηση επιτρέπει τόσο την αφαίρεση κατεστραμμένου υλικού (ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες, κατεστραμμένα οργανίδια, μικροοργανισμούς) όσο και την επαναχρησιμοποίηση των ανακυκλωμένων θρεπτικών ουσιών για κανονικές κυτταρικές διεργασίες.

Ο σχηματισμός αυτοφαγοσωμάτων είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη και ρυθμιζόμενη διαδικασία που περιλαμβάνει πολυάριθμες πρωτεΐνες και μονοπάτια σηματοδότησης. Η παρουσία αυτοφαγοσωμάτων σε κύτταρα που πεθαίνουν δεν είναι σαφής ένδειξη ότι η αυτοφαγία είναι η αιτία θανάτου. Αντίθετα, μπορεί να αντανακλά τις προσπάθειες των κυττάρων να διασώσουν την ομοιόσταση και να επιβιώσουν. Επιπλέον, η αυτοφαγία συνδέεται συχνά με την παρουσία άλλων τύπων ρυθμισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως η απόπτωση ή η νεκρόπτωση, που διαδραματίζουν λιγότερο σημαντικό ρόλο στη διάλυση του κυττάρου. Ο εξαρτώμενος από την αυτοφαγία κυτταρικός θάνατος θεωρείται μια ρυθμιζόμενη μορφή κυτταρικού θανάτου που απαιτεί πλήρως τα διαφορετικά συστατικά του αυτοφαγικού μηχανισμού. Επί του παρόντος, η ανάπτυξη ιστού είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μοντέλο για τη μελέτη αυτού του τύπου κυτταρικού θανάτου. Πρόσφατες προσπάθειες άρχισαν να υπογραμμίζουν τα μοριακά και μορφολογικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού θανάτου που διεγείρεται από την αυτοφαγία και πώς η αυτοφαγική οδός αλλάζει από ρόλο επιβίωσης σε θάνατο.

Η λειτουργία της αυτοφαγίας ως μηχανισμός επιβίωσης ή θανάτου εξαρτάται από το βαθμό της φωτοκαταστροφής που προκλήθηκε. Κατά την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, ο θάνατος μπορεί να συμβεί άμεσα ως αποτέλεσμα της δράσης του αυτοφαγικού μηχανισμού (εξαρτώμενος από την αυτοφαγία κυτταρικός θάνατος) ή με την ενεργοποίηση άλλων τρόπων ρυθμισμένου κυτταρικού θανάτου (συνήθως απόπτωση). Πολυάριθμες μελέτες στον τομέα της PDT δείχνουν ότι η φαρμακολογική ή γενετική αναστολή της αυτοφαγίας συχνά αυξάνει τη φωτοτοξικότητα της βλάβης που προκαλείται από ROS, υποδηλώνοντας έτσι την αυτοφαγία ως μηχανισμό επιβίωσης παρά ως μια οδό κυτταρικού θανάτου.[21]

Κεφάλαιο 2

Το φερροκένιο και τα παράγωγά του

2.1 Εισαγωγή στην οργανομεταλλική χημεία

Η οργανομεταλλική χημεία είναι η μελέτη οργανομεταλλικών ενώσεων, χημικών ενώσεων που περιέχουν τουλάχιστον έναν χημικό δεσμό μεταξύ ενός ατόμου άνθρακα ενός οργανικού μορίου και ενός μετάλλου, συμπεριλαμβανομένων αλκαλίων, αλκαλικών γαιών και μετάλλων μετάπτωσης, και μερικές φορές διευρύνονται ώστε να περιλαμβάνουν μεταλλοειδή όπως βόριο, πυρίτιο και σελήνιο επίσης.[24], [25] Εκτός από τους δεσμούς σε θραύσματα ή μόρια οργανυλίου, οι δεσμοί με «ανόργανο» άνθρακα, όπως το μονοξείδιο του άνθρακα (καρβονύλια μετάλλων), το κυανίδιο ή το καρβίδιο, θεωρούνται γενικά επίσης οργανομεταλλικοί. Μερικές σχετικές ενώσεις όπως τα υδρίδια μετάλλων μεταπτώσεως και τα σύμπλοκα φωσφίνης μετάλλων περιλαμβάνονται συχνά σε συζητήσεις για οργανομεταλλικές ενώσεις, αν και αυστηρά μιλώντας, δεν είναι απαραίτητα οργανομεταλλικές. Ο σχετικός αλλά διακριτός όρος "μεταλλοργανική ένωση" αναφέρεται σε ενώσεις που περιέχουν μέταλλα χωρίς άμεσους δεσμούς μετάλλου-άνθρακα αλλά που περιέχουν οργανικούς συνδέτες. Τα β-δικετονικά μέταλλα, τα αλκοξείδια, τα διακυλαμίδια και τα σύμπλοκα μεταλλικής φωσφίνης είναι αντιπροσωπευτικά μέλη αυτής της κατηγορίας. Ο τομέας της οργανομεταλλικής χημείας συνδυάζει πτυχές της παραδοσιακής ανόργανης και οργανικής χημείας.[26]

Οι οργανομεταλλικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο στοιχειομετρικά σε ερευνητικές και βιομηχανικές χημικές αντιδράσεις, όσο και στο ρόλο των καταλυτών για την αύξηση των ρυθμών τέτοιων αντιδράσεων (π.χ. σε χρήσεις ομογενούς κατάλυσης), όπου τα μόρια στόχοι περιλαμβάνουν πολυμερή, φαρμακευτικά προϊόντα και πολλά άλλα είδη πρακτικών προϊόντων.

2.1.1 Οργανομεταλλικές ενώσεις

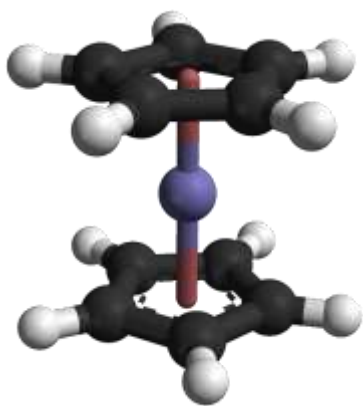
Οι οργανομεταλλικές ενώσεις διακρίνονται από το πρόθεμα «οργανο-» (π.χ. οργανοπαλλαδικές ενώσεις) και περιλαμβάνουν όλες τις ενώσεις που περιέχουν έναν δεσμό μεταξύ ενός ατόμου μετάλλου και ενός ατόμου άνθρακα μιας οργανυλομάδας.[25] Εκτός από τα παραδοσιακά μέταλλα (αλκάλια, μέταλλα αλκαλικών γαιών, μέταλλα μετάπτωσης και μέταλλα μετά τη μετάπτωση), οι λανθανίδες, οι ακτινίδες, τα ημιμέταλλα και τα στοιχεία βόριο, πυρίτιο, αρσενικό και σελήνιο θεωρούνται ότι σχηματίζουν οργανομεταλλικές ενώσεις.[25] Παραδείγματα οργανομεταλλικών ενώσεων περιλαμβάνουν τα αντιδραστήρια Gilman, τα οποία περιέχουν λίθιο και χαλκό, και τα αντιδραστήρια Grignard, τα οποία περιέχουν μαγνήσιο. Το τετρακαρβονυλικό νικέλιο και το σιδηροκένιο είναι παραδείγματα οργανομεταλλικών ενώσεων που περιέχουν μέταλλα μεταπτώσεως. Άλλα παραδείγματα οργανομεταλλικών ενώσεων περιλαμβάνουν ενώσεις οργανολιθίου όπως n-βουτυλολιθιο (n-BuLi), οργανοψευδαργυρικές ενώσεις όπως διαιθυλ ψευδάργυρος (Et₂Zn), οργανοκασσιτερικές ενώσεις όπως υδρίδιο τριβουτυλοκασιτερίου (Bu₃SnH), οργανοβορανικές ενώσεις όπως τριαιθυλοβοράνιο (Et₃B) και οργανικές ενώσεις όπως το τριμεθυλαλουμίνιο (Me₃Al).

Ένα φυσικό οργανομεταλλικό σύμπλεγμα είναι η μεθυλοκοβαλαμίνη (μια μορφή βιταμίνης B12), η οποία περιέχει έναν δεσμό κοβαλτίου-μεθυλίου. Αυτό το σύμπλεγμα, μαζί με άλλα βιολογικά σχετικά σύμπλοκα συζητούνται συχνά στο υποπεδίο της βιοοργανομεταλλικής χημείας.[27]

2.2 Το φερροκένιο

Το φερροκένιο (ή σιδηροκένιο) είναι μια οργανομεταλλική ένωση με τύπο $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Το μόριο είναι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από δύο δακτυλίους κυκλοπενταδιενυλίου συνδεδεμένους με ένα κεντρικό άτομο σιδήρου. Είναι ένα πορτοκαλί στερεό με οσμή καμφοράς, που εξαχνώνεται πάνω από τη θερμοκρασία δωματίου και είναι διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Είναι αξιοσημείωτο για τη σταθερότητά του: δεν επηρεάζεται από τον αέρα, το νερό, τις ισχυρές βάσεις και μπορεί να θερμανθεί στους $400\text{ }^\circ\text{C}$ χωρίς αποσύνθεση. Σε οξειδωτικές συνθήκες μπορεί να αντιδράσει αναστρέψιμα με ισχυρά οξέα για να σχηματίσει το κατιόν φερροκενίου $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)^+_2$. [28]

Η ταχεία ανάπτυξη της οργανομεταλλικής χημείας αποδίδεται συχνά στον ενθουσιασμό που προκύπτει από την ανακάλυψη του φερροκενίου και των πολλών αναλόγων του, όπως τα μεταλλοκένια.



Εικόνα 8: Τρισδιάστατη δομή του φερροκενίου

2.2.1 Η ανακάλυψη

Το φερροκένιο ανακαλύφθηκε τυχαία τρεις φορές. Η πρώτη γνωστή σύνθεση μπορεί να έγινε στα τέλη της δεκαετίας του 1940 από άγνωστους ερευνητές της Union Carbide, οι οποίοι προσπάθησαν να περάσουν ζεστό ατμό κυκλοπενταδιενίου μέσω ενός σιδηρένιου σωλήνα. Ο ατμός αντέδρασε με το τοίχωμα του σωλήνα, δημιουργώντας μια «κίτρινη λάσπη» που έφραξε τον σωλήνα. Χρόνια αργότερα, ένα δείγμα της λάσπης που είχε σωθεί ελήφθη και αναλύθηκε από τον E. Grimm, λίγο μετά την ανάγνωση του άρθρου των Kealy και Pauson, και βρέθηκε ότι αποτελείται από φερροκένιο.[28], [29]

Η δεύτερη φορά ήταν γύρω στο 1950, όταν οι S. Miller, J. Tebboth και J. Tremaine, ερευνητές στο British Oxygen, προσπαθούσαν να συνθέσουν αμίνες από υδρογονάνθρακες και άζωτο σε μια τροποποίηση της διαδικασίας Haber. Όταν προσπάθησαν να αντιδράσουν το κυκλοπενταδιένιο με άζωτο στους 300 °C, σε ατμοσφαιρική πίεση, απογοητεύτηκαν βλέποντας τον υδρογονάνθρακα να αντιδρά με κάποια πηγή σιδήρου, δίνοντας φερροκένιο. Ενώ παρατήρησαν επίσης την αξιοσημείωτη σταθερότητά του, άφησαν την παρατήρηση στην άκρη και δεν τη δημοσίευσαν παρά μόνο αφού ο Pauson ανέφερε τα ευρήματά του.[28], [30], [31] Στην πραγματικότητα, στους Kealy και Pauson δόθηκε ένα δείγμα από τους Miller et al., οι οποίοι επιβεβαίωσαν ότι τα προϊόντα ήταν η ίδια ένωση.[29]

Το 1951, οι Peter L. Pauson και Thomas J. Kealy στο Πανεπιστήμιο Duquesne προσπάθησαν να παρασκευάσουν φουλβαλένιο ((C₅H₄)₂) με οξειδωτικό διμερισμό του κυκλοπενταδιενίου (C₅H₆). Για το σκοπό αυτό, αντέδρασαν την ένωση Grignard κυκλοπενταδιενυλομαγνήσιο βρωμίδιο σε διαιθυλαιθέρα με χλωριούχο σίδηρο ως οξειδωτικό.[28] Ωστόσο, αντί για το αναμενόμενο φουλβαλένιο, έλαβαν μια ανοιχτόχρωμη πορτοκαλί σκόνη «αξιοσημείωτης σταθερότητας», με τον τύπο C₁₀H₁₀Fe.[29], [32]

2.2.2 Η δομή

Οι Pauson και Kealy υπέθεσαν ότι η ένωση είχε δύο ομάδες κυκλοπενταδιενυλίου, η καθμία με έναν μοναδικό ομοιοπολικό δεσμό από το κορεσμένο άτομο άνθρακα προς το άτομο σιδήρου.[28] Ωστόσο, αυτή η δομή ήταν ασυνεπής με τα τότε υπάρχοντα μοντέλα σύνδεσης και δεν εξηγούσε την απροσδόκητη σταθερότητα της ένωσης και οι χημικοί πάλεψαν να βρουν τη σωστή δομή.[31], [33]

Η δομή συνήχθη και αναφέρθηκε ανεξάρτητα από τρεις ομάδες το 1952:[34]

- Οι Woodward και Wilkinson το συμπέραναν παρατηρώντας ότι το σιδηροκένιο υπέστη αντιδράσεις χαρακτηριστικές αρωματικών ενώσεων όπως το βενζόλιο[35]
- Ο E. Fischer συνήγαγε τη δομή (την οποία ονόμασε «διπλό κώνο») και συνέθεσε επίσης άλλα μεταλλοκένια όπως το νικελοκένιο και το κοβαλτοκένιο.[36]–[38]
- Οι P. F. Eiland και R. Pepinsky επιβεβαίωσαν τη δομή μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και αργότερα με NMR.[31], [39]–[41]

Η δομή «σάντουιτς» του σιδηροκενίου ήταν συγκλονιστικά νέα και απαιτούσε νέα θεωρία για να εξηγηθεί. Εφαρμογή της μοριακής τροχιακής θεωρίας με την υπόθεση ενός κέντρου Fe²⁺ μεταξύ δύο ανιόντων κυκλοπενταδιενιδίου C₅H₅⁻ οδήγησε στο επιτυχημένο μοντέλο Dewar-Chatt-Duncanson, επιτρέποντας τη σωστή πρόβλεψη της γεωμετρίας του μορίου καθώς και εξηγώντας την αξιοσημείωτη σταθερότητά του.[42], [43]

2.2.3 Δομικοί δεσμοί

Η φασματοσκοπία Mössbauer δείχνει ότι το κέντρο σιδήρου στο σιδηροκένιο πρέπει να έχει την κατάσταση οξειδωσης +2. Σε κάθε δακτύλιο κυκλοπενταδιενυλίου (Cp) θα πρέπει στη συνέχεια να εκχωρηθεί ένα μόνο αρνητικό φορτίο. Έτσι το σιδηροκένιο θα μπορούσε να περιγραφεί ως σίδηρος (II) δις (κυκλοπενταδιενίδιο), $Fe^{2+}[C_5H_5^-]_2$.

Ο αριθμός των π-ηλεκτρονίων σε κάθε δακτύλιο είναι τότε έξι, γεγονός που τον καθιστά αρωματικό σύμφωνα με τον κανόνα του Hückel. Αυτά τα δώδεκα π-ηλεκτρόνια μοιράζονται στη συνέχεια με το μέταλλο μέσω ομοιοπολικού δεσμού. Δεδομένου ότι το Fe^{2+} έχει έξι ηλεκτρόνια d, το σύμπλεγμα αποκτά μια διαμόρφωση 18 ηλεκτρονίων, η οποία ευθύνεται για τη σταθερότητά του. Στη σύγχρονη σημειογραφία, αυτό το δομικό μοντέλο σάντουιτς του μορίου του σιδηροκενίου συμβολίζεται ως $Fe(\eta^5-C_5H_5)_2$.

Οι αποστάσεις του δεσμού άνθρακα-άνθρακα γύρω από κάθε πενταμελή δακτύλιο είναι όλες 1,40 Å και οι αποστάσεις του δεσμού Fe-C είναι όλες 2,04 Å. Από τη θερμοκρασία δωματίου μέχρι τους 164 K, η κρυσταλλογραφία ακτίνων X αποδίδει τη μονοκλινική χωρο-ομάδα. Οι δακτύλιοι κυκλοπενταδιενιδίου είναι μια κλιμακωτή διαμόρφωση, με αποτέλεσμα ένα κεντροσυμμετρικό μόριο, με ομάδα συμμετρίας D_{5d} . [39] Ωστόσο, κάτω από τους 110 K, το σιδηροκένιο κρυσταλλώνεται σε ένα ορθορομβικό κρυσταλλικό πλέγμα στο οποίο οι δακτύλιοι Cp είναι διατεταγμένοι και επισκιασμένοι, έτσι ώστε το μόριο να έχει ομάδα συμμετρίας D_{5h} . [44] Στην αέρια φάση, η περίθλαση ηλεκτρονίων [45] και οι υπολογιστικές μελέτες [46] δείχνουν ότι οι δακτύλιοι Cp επισκιάζονται.

Οι δακτύλιοι Cp περιστρέφονται με ένα χαμηλό φράγμα γύρω από τον άξονα Cp(κεντροειδές)–Fe–Cp(κεντροειδές), όπως παρατηρείται από μετρήσεις σε υποκατεστημένα παράγωγα του φερροκενίου χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού 1H και ^{13}C . Για παράδειγμα, το μεθυλοφερροκένιο ($CH_3C_5H_4FeC_5H_5$) εμφανίζει ένα μονήρες για τον δακτύλιο C_5H_5 . [47]

2.2.4 Ιδιότητες

Το φερροκένιο είναι ένα σταθερό στον αέρα πορτοκαλί στερεό με οσμή που μοιάζει με καμφορά. Όπως αναμενόταν για ένα συμμετρικό, μη φορτισμένο είδος, το σιδηροκένιο είναι διαλυτό σε κανονικούς οργανικούς διαλύτες, όπως το βενζόλιο, αλλά είναι αδιάλυτο στο νερό. Είναι σταθερό σε θερμοκρασίες έως και 400 °C. [48]

Το σιδηροκένιο εξαχνώνεται εύκολα, ειδικά όταν θερμαίνεται σε κενό. Η τάση ατμών του είναι περίπου 1 Pa στους 25 °C, 10 Pa στους 50 °C, 100 Pa στους 80 °C, 1000 Pa στους 116 °C και 10.000 Pa (σχεδόν 0,1 atm) στους 162 °C. [49], [50]



Εικόνα 9: Σκόνη κρυστάλλου φερροκενίου

2.2.5 Εφαρμογές του φερροκενίου και των παραγώγων του

Το φερροκένιο και τα πολυάριθμα παράγωγά του δεν έχουν εφαρμογές μεγάλης κλίμακας, αλλά έχουν πολλές εξειδικευμένες χρήσεις που εκμεταλλεύονται την ασυνήθιστη δομή (ικριώματα προσδέματος, υποψήφιοι φαρμακευτικοί), στιβαρότητα (αντικτυπήματα, πρόδρομες ουσίες υλικών) και οξειδοαναγωγή (αντιδραστήρια και πρότυπα οξειδοαναγωγής) .

- Συνδεδετικά ικριώματα

Οι χειρόμορφες σιδηροκενυλοφωσφίνες χρησιμοποιούνται ως συνδέτες για αντιδράσεις που καταλύονται από μέταλλα μεταπτώσεως. Μερικά από αυτά έχουν βρει βιομηχανικές εφαρμογές στη σύνθεση φαρμακευτικών και αγροχημικών. Για παράδειγμα, η διφωσφίνη 1,1'-δις(διφαινυλφωσφίνο)σιδηροκένιο (dppf) είναι ένας πολύτιμος συνδέτης για αντιδράσεις σύζευξης παλλαδίου και ο συνδέτης Josiphos είναι χρήσιμος για κατάλυση υδρογόνωσης.[51] Έχουν πάρει το όνομά τους από τον τεχνικό που έφτιαξε το πρώτο, τον Josi Puleo.[52], [53]

- Πρόσθετα καυσίμων

Το φερροκένιο και τα παράγωγά του είναι αντικρουστικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στα καύσιμα για βενζινοκινητήρες. Είναι ασφαλέστερα από το τετρααιθυλομόλυβδο που χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν.[54] Τα διαλύματα πρόσθετων βενζίνης που περιέχουν φερροκένιο μπορούν να προστεθούν στην αμόλυβδη βενζίνη για να καταστεί δυνατή η χρήση της σε vintage αυτοκίνητα σχεδιασμένα να λειτουργούν με βενζίνη μολύβδου.[55] Οι εναποθέσεις σιδήρου που σχηματίζονται από σιδηροκένιο μπορούν να σχηματίσουν μια αγωγή επιστρωση στις επιφάνειες των μπουζί.

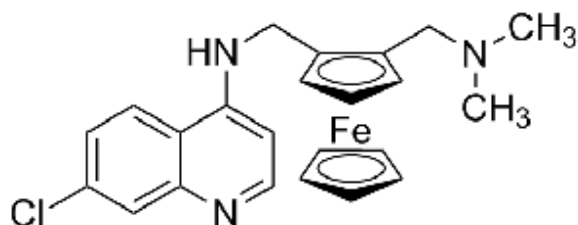
Το σιδηροκένιο έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικό στη μείωση του καπνού και του τριοξειδίου του θείου που παράγονται κατά την καύση άνθρακα. Η προσθήκη με οποιοδήποτε πρακτικό μέσο, εμποτισμός του άνθρακα ή προσθήκη σιδηροκενίου στον θάλαμο καύσης, μπορεί να μειώσει σημαντικά την ποσότητα αυτών των ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, ακόμη και με μια μικρή ποσότητα της ένωσης μετάλλου κυκλοπενταδιενυλίου.[56]

- Φαρμακευτικά

Τα παράγωγα σιδηροκενίου έχουν ερευνηθεί ως φάρμακα,[57] με μια ένωση φερροκερόνης που εγκρίθηκε για χρήση στην ΕΣΣΔ τη δεκαετία του 1970, αν και δεν κυκλοφορεί πλέον σήμερα.[58] Μόνο ένα φάρμακο έχει εισέλθει σε κλινικές δοκιμές τα τελευταία χρόνια, η Ferroquine (7-χλωρο-N-(2-((διμεθυλαμινο)μεθυλ)φερροκενυλ)κινολιν-4-αμίνη), ένα ανθελονοσιακό,[59]–[61] το οποίο έχει φτάσει σε δοκιμές Φάσης IIb.[62] Συστήματα χορήγησης φαρμάκων με βάση πολυμερή που περιέχουν σιδηροκένιο έχουν διερευνηθεί.[63]

Η αντικαρκινική δράση των παραγώγων σιδηροκενίου διερευνήθηκε για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του 1970, όταν τα παράγωγα που έφεραν ομάδες αμίνης ή αμιδίου δοκιμάστηκαν κατά της λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.[64] Ορισμένα άλατα σιδηροκενίου παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση, αλλά καμία ένωση δεν έχει αξιολογηθεί στην κλινική.[65] Τα παράγωγα σιδηροκενίου έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς καρκίνου του πνεύμονα A549, της κυτταρικής σειράς καρκίνου του παχέος εντέρου HCT116 και της κυτταρικής σειράς καρκίνου του μαστού MCF-7.[66] Αναφέρθηκε ένα πειραματικό φάρμακο που είναι μια φερροκενυλική εκδοχή της ταμοξιφαίνης.[67] Η ιδέα είναι ότι η ταμοξιφαίνη θα συνδεθεί με τις θέσεις δέσμησης οιστρογόνων, με αποτέλεσμα την κυτταροτοξικότητα.[67], [68]

Τα Ferrocifens αξιοποιούνται για εφαρμογές καρκίνου από μια γαλλική βιοτεχνολογία, τη Ferrosan, που ιδρύθηκε από τον Pr. Ζεράρ Ζαουέν.



Εικόνα 10: Χημική δομή της φερροκίνης

- Φωτοδυναμική και φωτοαντιμικροβιακή χημειοθεραπεία (PACT)

Έχει αποδειχθεί ότι η ενσωμάτωση του φερροκενίου σε διάφορες βιοδραστικές ενώσεις ενισχύει τη δράση τους. Η μελέτη του 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος υποκατεστημένο με φερροκένιο (FT) ανέδειξε επιτυχώς την ικανότητα της ουσίας να συγκεντρώνεται και να προκαλεί κυτταροτοξικότητα υπό ακτινοβολία 595 nm σε καρκινικά κύτταρα MCF-7, μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών $\cdot\text{OH}$. Απεδείχθει επίσης η φωτοαντιμικροβιακή χημειοθεραπευτική δράση του έναντι των μικροοργανισμών *S. aureus* και *E. Coli*. Τα χαρακτηριστικά αυτά συνοδεύονται και από αδράνεια της ουσίας σε σκοτεινό περιβάλλον καθιστώντας το FT εν δυνάμει φωτοευαισθητοποιητή για PDT και PACT.[69]

- Στερεό προωθητικό πυραύλων

Το σιδηροκένιο και τα σχετικά παράγωγα χρησιμοποιούνται ως ισχυροί καταλύτες ταχύτητας καύσης στο σύνθετο προωθητικό υπερχλωρικό αμμώνιο.[70] Τα συμπολυμερή πολυγλυκόλης σιδηροκενίου, που παρασκευάζονται με την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης πολυσυμπύκνωσης μεταξύ ενός παραγωγού σιδηροκενίου και μιας υποκατεστημένης διυδροξυ αλκοόλης, είναι πολλά υποσχόμενο συστατικό των προωθητικών πυραύλων. Αυτά τα συμπολυμερή παρέχουν στα προωθητικά πυραύλων σταθερότητα στη θερμότητα, χρησιμεύοντας ως συνδετικό προωθητικό και ελέγχοντας τον ρυθμό καύσης του προωθητικού.[71]

- Νανοτεχνολογία και Ημιαγωγοί

Το σιδηροκένιο, ένας πρόδρομος των νανοσωματιδίων σιδήρου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καταλύτης για την παραγωγή νανοσωλήνων άνθρακα.[72] Το βινυλοφερροκένιο μπορεί να παρασκευαστεί με μια αντίδραση Wittig της αλδεΐδης, ενός άλατος φωσφονίου και υδροξειδίου του νατρίου.[73] Το σιδηροκένιο βινυλίου μπορεί να μετατραπεί σε ένα πολυμερές (πολυβινυλοφερροκένιο, PVFc), μια σιδηροκενυλική εκδοχή του πολυστυρολίου (οι φαινυλομάδες αντικαθίστανται με ομάδες σιδηροκενυλίου). Ένα άλλο πολυφερροκένιο που μπορεί να σχηματιστεί είναι το σιδηροκενοκαρβοξυλικό πολυ(2-(μεθακρυλοϋλοξυ)αιθυλεστέρα), PFCMA. Εκτός από τη χρήση σκελετών οργανικού πολυμερούς, αυτές οι εκκρεμείς μορφές σιδηροκενίου έχουν προσαρτηθεί σε ανόργανες ραχοκοκαλιές όπως πολυσιλοξάνες, πολυφωσφαζένια και πολυφωσφινοβοράνια, $(-\text{PH}(\text{R})-\text{BH}_2-\text{n})$, και τα προκύπτοντα υλικά παρουσιάζουν ασυνήθιστες φυσικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες που σχετίζονται στο ζεύγος οξειδοαναγωγής σιδηροκενίου/φερροκινίου.[74] Τόσο το PVFc όσο και το PFCMA έχουν δεθεί σε δισκία πυριτίου και η διαβρεξιμότητα μετρήθηκε όταν οι αλυσίδες πολυμερούς είναι αφόρτιστες και όταν τα τμήματα σιδηροκενίου οξειδώνονται για να παραχθούν θετικά φορτισμένες ομάδες. Η γωνία επαφής με το νερό στα επικαλυμμένα με PFCMA δισκία ήταν 70° μικρότερη μετά την οξείδωση, ενώ στην περίπτωση του PVFc η μείωση ήταν 30° και η αλλαγή της διαβρεξιμότητας είναι αναστρέψιμη. Στην περίπτωση PFCMA, το

αποτέλεσμα της επιμήκυνσης των αλυσίδων, και ως εκ τούτου της εισαγωγής περισσότερων ομάδων σιδηροκενίου, είναι σημαντικά μεγαλύτερες μειώσεις στη γωνία επαφής κατά την οξείδωση.[74], [75]

Κεφάλαιο 3

Πειραματική διαδικασία

3.1 Στόχος

Όπως αναφέραμε και στο κεφάλαιο 1 οι ουσίες που χαρακτηρίζονται ως φωτοευαίσθητοποιητές πρέπει να διαθέτουν μία σειρά ιδιοτήτων για την εξακρίβωση των οποίων είναι απαραίτητες διάφορες μελέτες. Είναι επίσης γνωστό ότι παράγωγα της ίδιας ουσίας εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά καθιστώντας έτσι αναγκαία την αυτόνομη μελέτη καθενός. Μόνο μετά τον ακριβή καθορισμό των φωτοφυσικών και φωτοχημικών ιδιοτήτων μπορούμε να αποφανθούμε για την πιθανή χρήση μιας ουσίας σε φωτοδυναμική θεραπεία και αφού πρώτα προηγηθούν τα στάδια μελέτης σε κύτταρα και σε πειραματόζωα.

Σε αυτή την εργαστηριακή μελέτη θα ασχοληθούμε με το πρωγενέστερο στάδιο, αυτό της μελέτης της ουσίας σε διάλυμα. Σε αυτό το στάδιο, το οποίο είναι απαραίτητο για να ακολουθήσουν *in vitro* και *in vivo* πειράματα, αφαιρούμε αρκετές από τις μεταβλητές οι οποίες εισάγονται από αυτά. Είναι λοιπόν πιο ελέγχξιμες διαδικασίες που επιτρέπουν την εξέταση ξεχωριστά κάθε ιδιότητας και μηχανισμού δράσης μιας ουσίας.

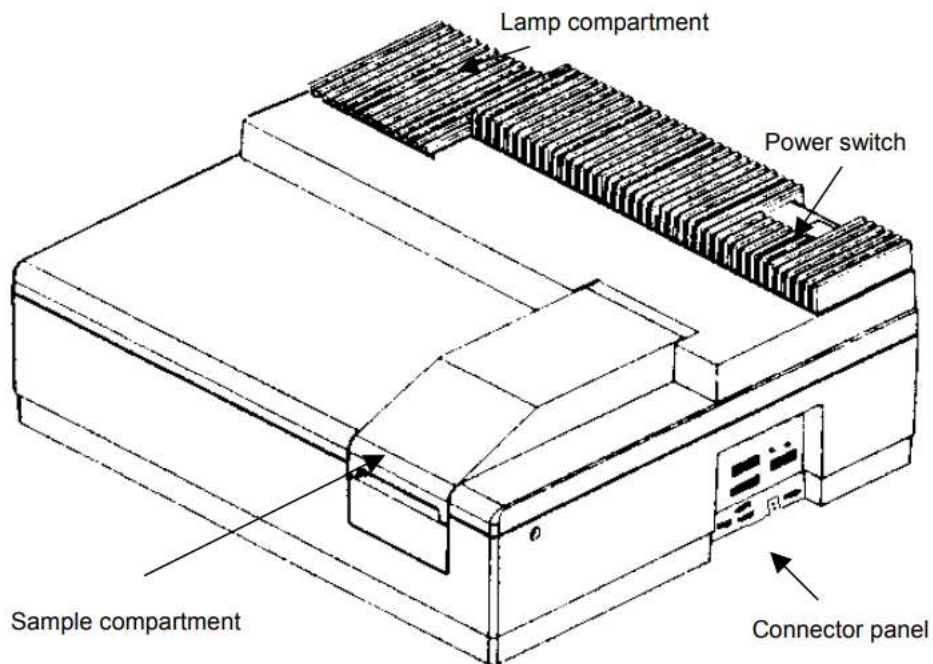
Η διπλωματική αυτή εργασία έχει στόχο τη μελέτη διαλυμάτων δικυανοβινυλοφαιροκενίου προκειμένου να εξετασθεί η ενδεχόμενη χρήση του ως φωτοευαίσθητοποιητής στη φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου. Στο πλαίσιο αυτό περιλαμβάνονται οι εξής μελέτες:

- Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του διαλύματος δικυανοβινυλοφαιροκενίου σε διάφορες συγκεντρώσεις.
- Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του διαλύματος δικυανοβινυλοφαιροκενίου σε διαφορετικούς διαλύτες.
- Φασματοσκοπική μελέτη φθωρισμού διαλύματος δικυανοβινυλοφαιροκενίου.
- Μελέτη της ικανότητας διαλύματος της ουσίας για παραγωγή ελευθέρων ριζών.
- Μελέτη φωτοκαταστροφής της ουσίας μετά από ακτινοβολία.

3.2 Πειραματικές διατάξεις

3.2.1 Φασματομετρική διάταξη απορρόφησης

Το Lambda 35 είναι ευέλικτο φασματόμετρο που λειτουργεί στο φασματικό εύρος υπεριώδους (UV) και ορατού (Vis). Το φασματόμετρο διαθέτει ένα σύστημα διπλής δέσμης, πλήρως ανακλαστικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.

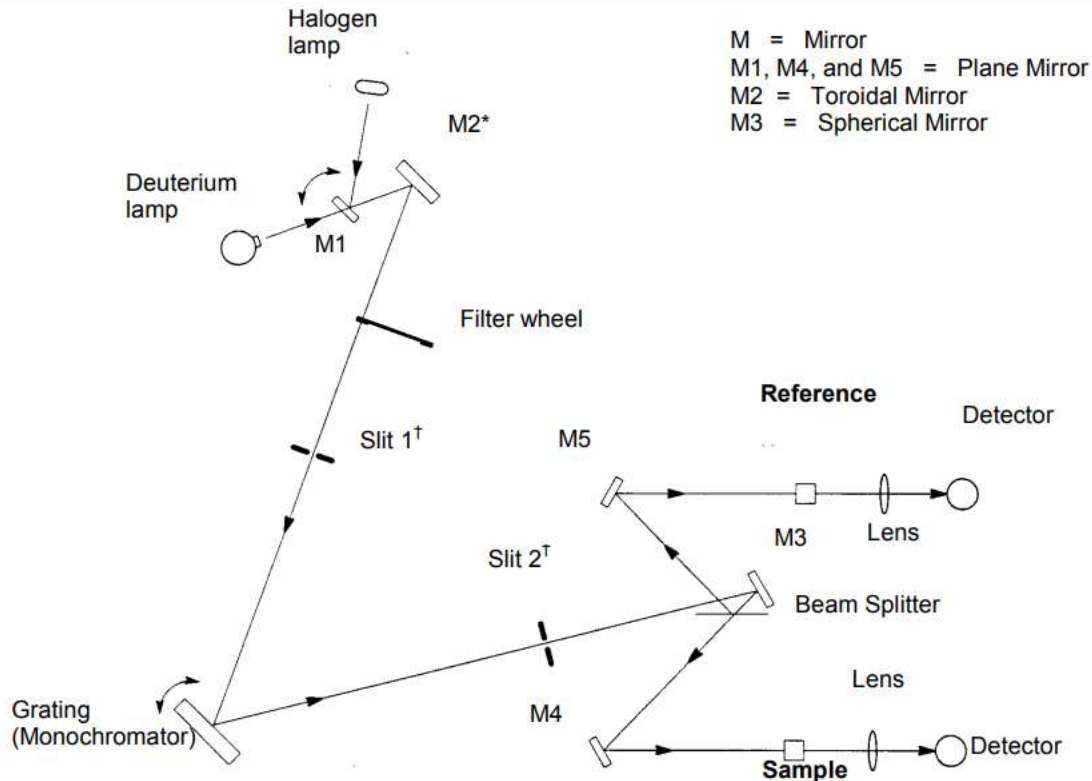


Εικόνα 11: Το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Lambda 35 UV/Vis

Το φασματόμετρο Lambda 35 UV/Vis διαθέτει ένα πλήρως ανακλαστικό οπτικό σύστημα. Τα οπτικά εξαρτήματα είναι επικαλυμμένα με πυρίτιο για ανθεκτικότητα. Στο μονοχρωμάτωρα χρησιμοποιείται ολογραφικό πλέγμα. Το οπτικό σύστημα απεικονίζεται σχηματικά παρακάτω. Ο μονοχρωμάτωρας είναι ένα ολογραφικό κοίλο πλέγμα με 1053 γραμμές/mm στο κέντρο. Δύο πηγές ακτινοβολίας, ένας λαμπτήρας δευτερίου και ένας λαμπτήρας αλογόνου, καλύπτουν το εύρος μήκους κύματος εργασίας του φασματόμετρου. Για λειτουργία στο ορατό εύρος (Vis), ο καθρέφτης M1 αντανακλά την ακτινοβολία από τη λυχνία αλογόνου στο κάτοπτρο της πηγής M2. Ταυτόχρονα το M1 εμποδίζει την ακτινοβολία από τη λυχνία δευτερίου. Για λειτουργία στην περιοχή υπεριώδους (UV), ο καθρέφτης M1 ανυψώνεται για να επιτρέπεται η ακτινοβολία από τη λάμπα δευτερίου να χτυπήσει τον καθρέφτη της πηγής M2. Η αλλαγή πηγής είναι αυτόματη κατά την περιστροφή μονοχρωμάτωρα. Η ακτινοβολία από τη λυχνία πηγής αντανακλάται από τον καθρέφτη πηγής M2 μέσω ενός οπτικού φίλτρου στο συγκρότημα του τροχού φίλτρου.

Ένας βηματικός κινητήρας οδηγεί τον τροχό του φίλτρου να είναι σε συγχρονισμό με το μονοχρωμάτωρα. Ανάλογα με το μήκος κύματος που παράγεται, το κατάλληλο οπτικό φίλτρο βρίσκεται στη διαδρομή της δέσμης για να προφιλτράρει την ακτινοβολία πριν εισέλθει στον μονοχρωμάτωρα. Η αλλαγή του φίλτρου είναι αυτόματη κατά τη διάρκεια της περιστροφής του μονοχρωμάτωρα. Από το οπτικό φίλτρο η ακτινοβολία διέρχεται από τη σχισμή εισόδου (σχισμή 1) του μονοχρωμάτωρα. Η ακτινοβολία διασπείρεται στο πλέγμα για να παραχθεί ένα φάσμα. Η περιστροφική θέση του πλέγματος επιλέγει αποτελεσματικά ένα τμήμα του φάσματος, αντανακλώντας αυτό το τμήμα μέσω της σχισμής εξόδου (σχισμή 2) στον καθρέφτη M3. Η σχισμή εξόδου περιορίζει το τμήμα του φάσματος σε μια σχεδόν μονοχρωματική δέσμη

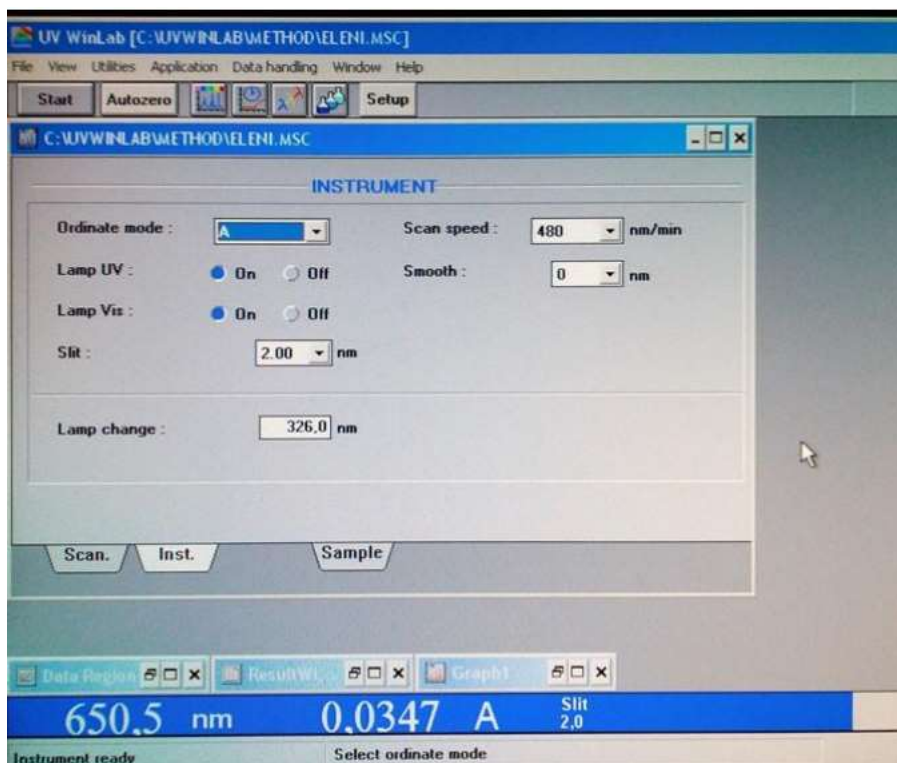
ακτινοβολίας. Οι σχισμές παρέχουν μια φασματική ζώνη διέλευσης 0,5, 1, 2 ή 4 nm. Από τον καθρέφτη M3 η ακτινοβολία ανακλάται σε ένα διαχωριστή δέσμης που επιτρέπει το 50% της ακτινοβολίας να περάσει στο επίπεδο κάτοπτρο M4, και αντανακλά το 50% της ακτινοβολίας στο επίπεδο κάτοπτρο M5. Ο καθρέφτης M4 εστιάζει τη δέσμη ακτινοβολίας στο κελί δείγματος. Στη συνέχεια, η δέσμη περνά μέσα από έναν κυρτό φακό στον ανιχνευτή φωτοδιόδου. Ο καθρέφτης M5 εστιάζει τη δέσμη ακτινοβολίας στο κελί αναφοράς. Στη συνέχεια, η δέσμη περνά μέσα από έναν κυρτό φακό στον ανιχνευτή φωτοδιόδου.



Εικόνα 12: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας του Lambda 35 UV/Vis

Το λογισμικό πακέτο που οδηγεί το φωτοφασματόμετρο στον ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο είναι συνδεδεμένο είναι το UV WinLab, μέσω αυτού μπορούν να ρυθμίζονται παράμετροι του οργάνου, της μέτρησης, της παρουσίασης των αποτελεσμάτων καθώς και να εκτελούνται διεργασίες όπως:

- Επιλογή της περιοχής μηκών κύματος.
- Έλεγχος του εύρους των μηκών κύματος του οποίου η απορρόφηση θα μετρηθεί.
- Έλεγχος του μεγέθους της σχισμής του μονοχρωμάτορα.
- Καθορισμός της ταχύτητας σάρωσης.
- Μηδενισμός του θορύβου του οργάνου και του διαλύτη με την επιλογή Autozero.
- Επεξεργασία και εξομάλυνση των προκυπτώντων φασμάτων.



Εικόνα 13: Στιγμιότυπο του λογισμικού UV WinLab

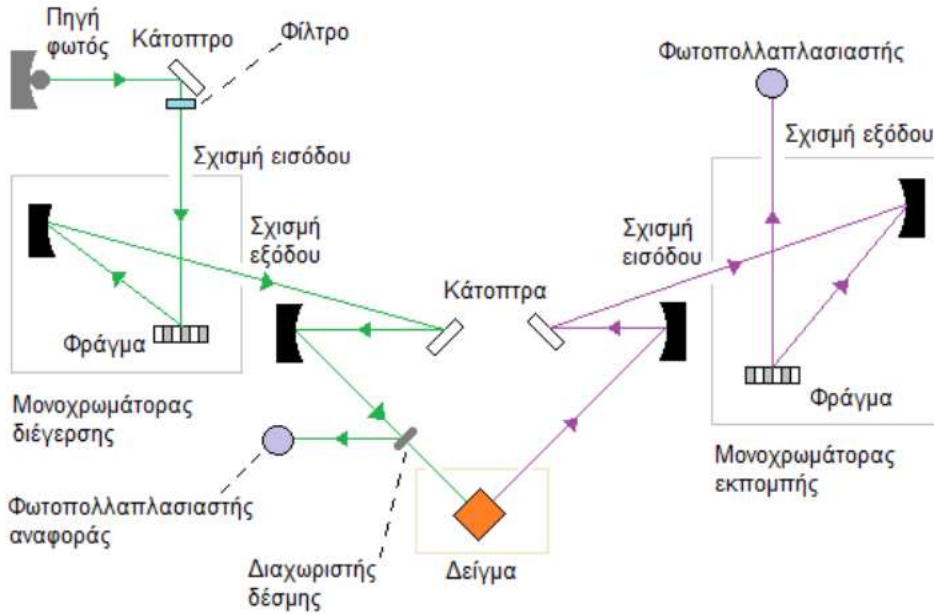
3.2.2 Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού

Η λήψη και η καταγραφή των φασμάτων φθορισμού, απαραίτητα για την περάτωση της εργασίας, έγιναν εφικτές με τη χρήση της φασματοφωτομετρικής διάταξης Perkin-Elmer LS45 Luminescence Spectrometer η οποία μπορεί να πετύχει μετρήσεις φθορισμού από ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος εως και συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος μηκών κύματος του οργάνου.



Εικόνα 14: Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS45 Luminescence Spectrometer

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στο παρακάτω διάγραμμα λειτουργίας, η διάταξη χωρίζεται σε δύο μέρη: την περιοχή διέγερσης και την περιοχή εκπομπής. Η θέση του δείγματος αποτελεί το όριο μεταξύ τους με τις δύο περιοχές να βρίσκονται σε 90 ° γωνία, ώστε στον ανιχνευτή να φτάνει μόνο η ακτινοβολία του φθορισμού.



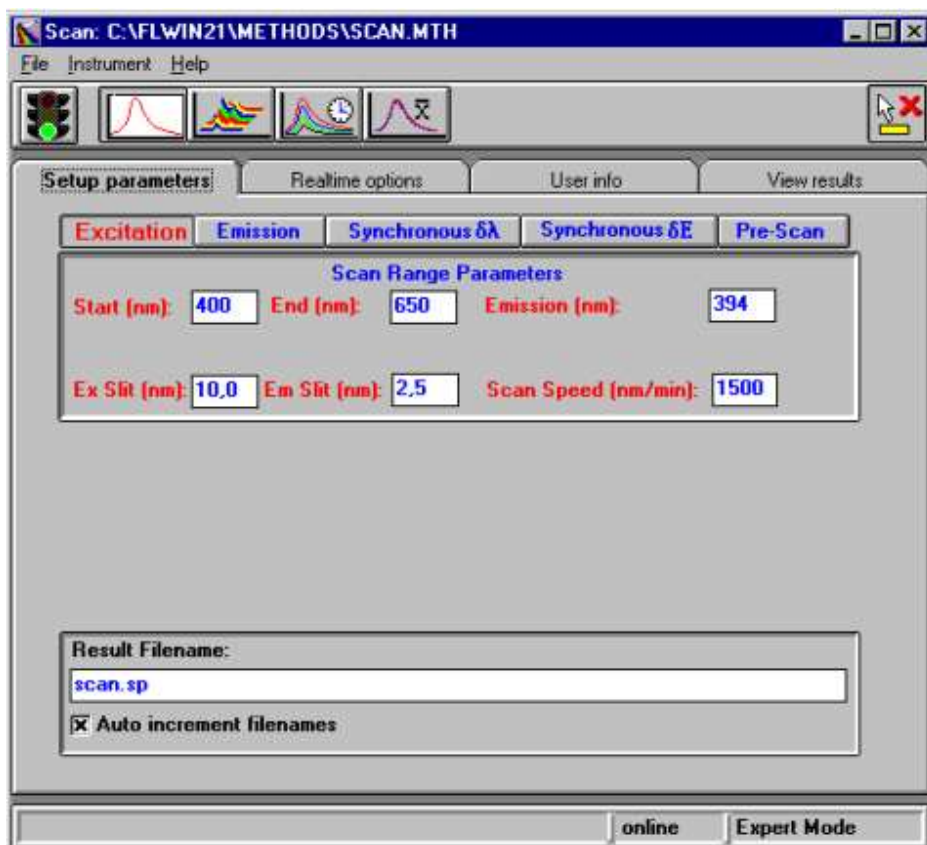
Εικόνα 15: Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας του LS45

Ως φωτεινή πηγή το όργανο διαθέτει λυχνία ξένου μεγάλης έντασης 20 kW, παλμική, 8 μs χρόνο διάρκειας παλμού. Η ακτινοβολία της πηγής εστιάζεται με τη βοήθεια κατόπτρων στην είσοδο του μονοχρωμάτορα διέγερσης διερχόμενη από φίλτρο δεδομένου ότι ο μονοχρωμάτορας αδυνατεί να αναγνωρίσει πολλαπλάσια μήκη κύματος. Ο μονοχρωμάτορας διέγερσης αποτελείται από φράγμα περίθλασης 1440 lines/nm και σφαιρικό κάτοπτρο δίνοντας στην έξοδο του μονοχρωματικό φως, με το κεντρικό μήκος κύματος να ελέγχεται από βηματικό κινητήρα μέσω της γωνιακής θέσης σάρωσης του φράγματος, το εύρος σάρωσης είναι 200-800 nm.

Ένας διαχωριστής δέσμης στέλνει ένα μικρό μέρος της στον φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, με το υπόλοιπο να κατευθύνεται, με χρήση κατόπτρων, στο δείγμα. Από τη σχισμή εξόδου του δείγματος λαμβάνουμε τη δέσμη φθορισμού η οποία, εξερχόμενη σε γωνία 90° με τη δέσμη διέγερσης, εστιάζεται με τη βοήθεια κατόπτρων στην είσοδο του μονοχρωμάτορα. Ο μονοχρωμάτορας εκπομπής περιλαμβάνει φράγμα περίθλασης 1200 lines/nm (το οποίο ελέγχεται επίσης από βηματικό κινητήρα) και σφαιρικό κάτοπτρο, το εύρος σάρωσης είναι 200-900 nm. Η χρήση φίλτρου πριν την είσοδό του δεν είναι πλέον απαραίτητη καθώς η ακτινοβολία φθορισμού έχει μικρό εύρος μηκών κύματος. Τελικά η δέσμη συγκεντρώνεται στο φωτοπολλαπλασιαστή, ο οποίος αποτελεί τον αισθητήρα του οργάνου.

Το λογισμικό πακέτο FL WinLab χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της διάταξης στον ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο συνδέεται. Μέσω του συγκεκριμένου λογισμικού γίνονται ρυθμίσεις των παραμέτρων του οργάνου και των μετρήσεων με διεργασίες όπως οι παρακάτω:

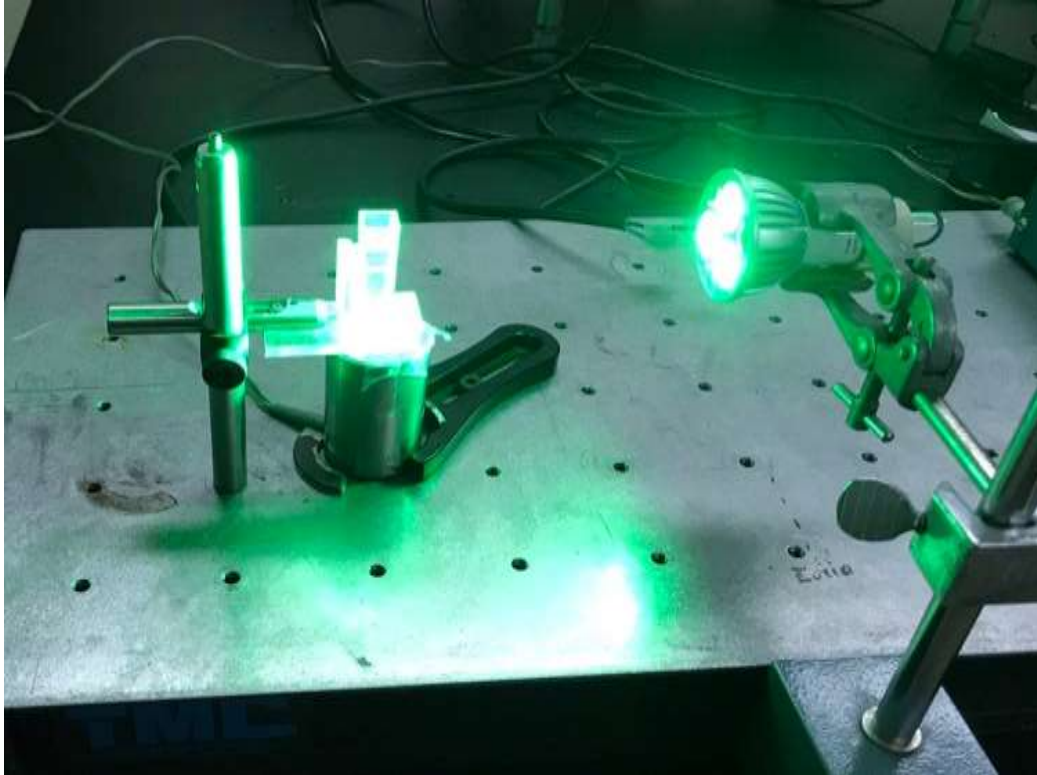
- Η ρύθμιση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης.
- Η επιλογές μήκους κύματος, ταχύτητας σάρωσης και πλάτους σχισμής κάθε μονοχρωμάτορα.
- Ο μηδενισμός των θορύβων του διαλύτη και του οργάνου μέσω αφαίρεσης του φάσματος αναφοράς.
- Η επεξεργασία και η ρύθμιση του τρόπου παρουσίασης των φασμάτων που λαμβάνονται ως αποτελέσματα των μετρήσεων.



Εικόνα 16: Στιγμιότυπο του λογισμικού FL WinLab

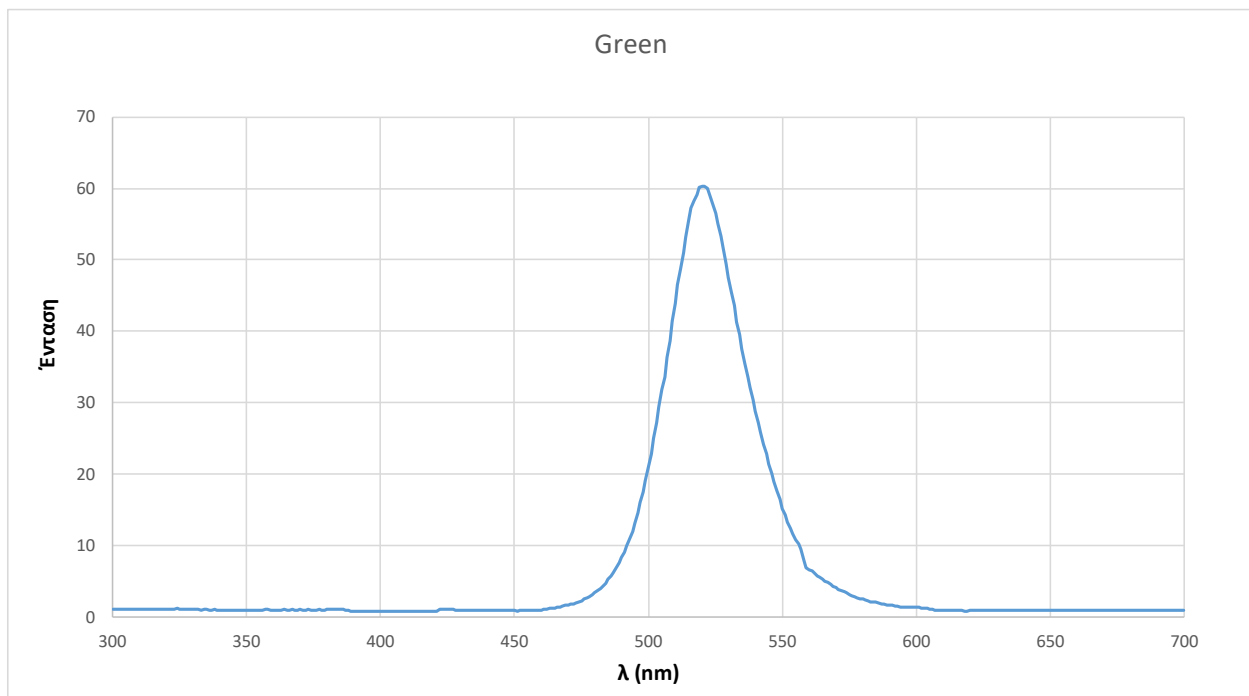
3.2.3 Διάταξη ακτινοβόλησης

Η ακτινοβόληση του δείγματος στα πειράματα παραγωγής ελευθέρων ριζών και φωτοκαταστροφής έγινε εφικτή με την κατασκευή διάταξης κατασκευασμένη αποκλειστικά για τις ανάγκες των πειραμάτων.



Εικόνα 17: Η διάταξη ακτινοβολίας

Ως φωτεινή πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε συστοιχία πράσινου LED, αποτελούμενη από 4 πομπούς και μήκος κύματος περίπου 530 nm.



Διάγραμμα 1: Το φάσμα ακτινοβολίας της φωτεινής πηγής

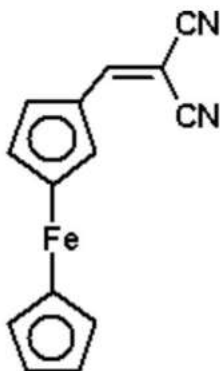
Η διάταξη στερεώνεται σε επίπεδη τράπεζα, με την πηγή στην ίδια ευθεία με τη βάση όπου τοποθετείται το δείγμα. Η βάση του δείγματος, όπου τοποθετείται η κυβέτα με το προς ακτινοβολήση διάλυμα, αποτελείται από μαγνητικό αναδευτήρα ο οποίος με τη βοήθεια μαγνήτη που εισάγεται στην κυβέτα διασφαλίζει την ομοιογένεια του διαλύματος αναδεύοντας διαρκώς τα παραγόμενα κατά την ακτινοβολήση φωτοπροϊόντα.

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων μετρήθηκε με τη χρήση κατάλληλου αισθητήρα η φωτεινή ένταση στη θέση του δείγματος. Ο αισθητήρας συνδέεται με πολύμετρο και η ένδειξη είναι στα 8,8 mW, γνωρίζουμε ότι η επιφάνεια του αισθητήρα είναι 0,709 cm² συνεπώς έχουμε ένταση 12,5 mW/cm².

3.3 Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν

3.3.1 Δικυανοβινυλοφερροκένιο

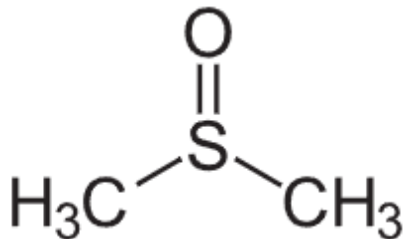
Με πλήρη ονομασία (1,1)-δικυανοβινυλο-(2)-φερροκένιο και χημικό τύπο C₁₄H₁₀N₂Fe είναι οργανομεταλλική ένωση σε μορφή βαθύ καφεκόκκινου κρυστάλλου. Το μοριακό βάρος είναι 262,16 και το σημείο τήξης στους 232 °C. Παρακάτω φαίνεται η χημική του δομή:



Εικόνα 18: Χημική δομή δικυανοβινυλοφερροκενίου

3.3.2 DMSO

Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) είναι μια οργανοσουλφουρική ένωση με τον τύπο (CH₃)₂SO. Αυτό το άχρωμο υγρό είναι το σουλφοξείδιο που χρησιμοποιείται περισσότερο στο εμπόριο. Είναι ένας σημαντικός πολικός απρωτικός διαλύτης που διαλύει τόσο πολικές όσο και μη πολικές ενώσεις και είναι αναμίξιμος με ένα ευρύ φάσμα οργανικών διαλυτών καθώς και με νερό. Έχει σχετικά υψηλό σημείο βρασμού. Όσον αφορά τη χημική δομή, το μόριο έχει εξιδανικεύσει τη συμμετρία Cs. Έχει μια τριγωνική πυραμιδική μοριακή γεωμετρία σύμφωνη με άλλες ενώσεις S(IV) τριών συντεταγμένων, με ένα μη δεσμευμένο ζεύγος ηλεκτρονίων στο περίπου τετραεδρικό άτομο θείου. Χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης του δικυανοβινυλοφερροκενίου κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.



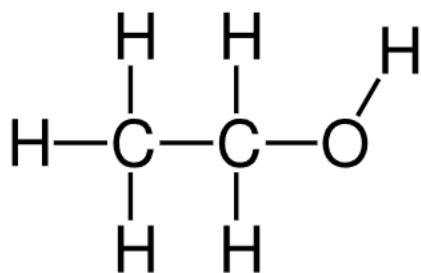
Εικόνα 19: Χημική δομή DMSO

3.3.3 PBS

Ο ορός ρυθμισμένος με φωσφορικά (συντομογραφία PBS) είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα (pH ~ 7,4) που χρησιμοποιείται συνήθως στη βιολογική έρευνα. Είναι ένα διάλυμα άλατος με βάση το νερό που περιέχει όξινο φωσφορικό δινάτριο, χλωριούχο νάτριο και, σε ορισμένες συνθέσεις, χλωριούχο κάλιο και διόξινο φωσφορικό κάλιο. Το ρυθμιστικό βοηθά στη διατήρηση ενός σταθερού pH. Η ωσμωτικότητα και οι συγκεντρώσεις ιόντων των διαλυμάτων ταιριάζουν με αυτές του ανθρώπινου σώματος (ισότονες). Το PBS έχει πολλές χρήσεις επειδή είναι ισοτονικό και μη τοξικό για τα περισσότερα κύτταρα. Αυτές οι χρήσεις περιλαμβάνουν την αραίωση ουσιών και το ξέπλυμα δοχείων κυττάρων. Το PBS με EDTA χρησιμοποιείται επίσης για την απεμπλοκή συνδεδεμένων και συσσωρευμένων κυττάρων. Δισθενή μέταλλα όπως ο ψευδάργυρος, ωστόσο, δεν μπορούν να προστεθούν καθώς αυτό θα οδηγήσει σε καθίζηση. Το PBS έχει αποδειχθεί ότι είναι μια αποδεκτή εναλλακτική λύση ως μέσο μεταφοράς ιών όσον αφορά τη μεταφορά και αποθήκευση ιών RNA, όπως ο SARS-CoV-2. Χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτικός διαλύτης του δικυανοβινυλοφερροκενίου κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μας.

3.3.4 Αιθανόλη

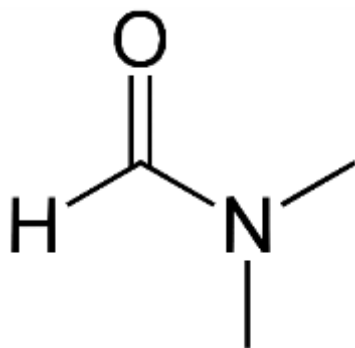
Η αιθανόλη (ονομάζεται επίσης αιθυλική αλκοόλη, αλκοόλ κατανάλωσης ή απλώς αλκοόλ) είναι μια οργανική χημική ένωση. Είναι μια απλή αλκοόλη με χημικό τύπο C₂H₆O. Συχνά συντομεύεται ως EtOH. Η αιθανόλη είναι ένα πτητικό, εύφλεκτο, άχρωμο υγρό με χαρακτηριστική οσμή που μοιάζει με κρασί και πικάντικη γεύση. Είναι ένα ψυχοδραστικό ναρκωτικό, ψυχαγωγικό φάρμακο και το δραστικό συστατικό των αλκοολούχων ποτών. Η αιθανόλη παράγεται φυσικά από τη ζύμωση σακχάρων από ζυμομύκητες ή μέσω πετροχημικών διεργασιών όπως η ενυδάτωση με αιθυλένιο. Έχει ιατρικές εφαρμογές ως αντισηπτικό και απολυμαντικό. Χρησιμοποιείται ως χημικός διαλύτης και στη σύνθεση οργανικών ενώσεων, καθώς και ως πηγή καυσίμου. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτικός διαλύτης της ουσίας μας και ως διαλύτης στην υδρόλυση CM-H₂DCFDA και NaOH.



Εικόνα 20: Χημική δομή αιθανόλης

3.3.4 DMF

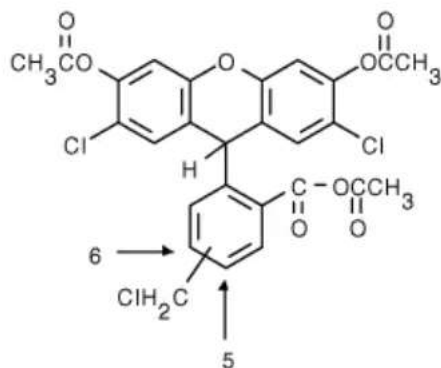
Το διμεθυλοφορμαμίδιο είναι μια οργανική ένωση με τύπο $(\text{CH}_3)_2\text{NC}(\text{O})\text{H}$, συνήθως συντομογραφείται ως DMF. Αυτό το άχρωμο υγρό είναι αναμίξιμο με το νερό και τα περισσότερα οργανικά υγρά. Το DMF είναι ένας κοινός διαλύτης για χημικές αντιδράσεις. Το διμεθυλοφορμαμίδιο είναι άοσμο, αλλά τα τεχνικής ποιότητας ή τα αλλοιωμένα δείγματα συχνά έχουν μυρωδιά ψαριού λόγω ρύπανσης από διμεθυλαμίνη. Οι ρύποι διμεθυλαμίνης μπορούν να αφαιρεθούν με ψεκάσμο δειγμάτων με ένα αδρανές αέριο όπως αργό ή με υπερήχους των δειγμάτων υπό μειωμένη πίεση. Όπως υποδηλώνει το όνομά του, σχετίζεται δομικά με το φορμαμίδιο. Το DMF είναι ένας πολικός (υδρόφιλος) απρωτικός διαλύτης με υψηλό σημείο βρασμού. Διευκολύνει αντιδράσεις που ακολουθούν πολικούς μηχανισμούς, όπως οι αντιδράσεις $\text{S}_{\text{N}}2$. Χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα παραγωγής ελευθέρων ριζών σε 1/1 αναλογία με νερό ως διαλύτης του δικυανοβινυλοφεροκενίου.



Εικόνα 21: Χημική δομή DMF

3.3.5 CM-H₂DCFDA

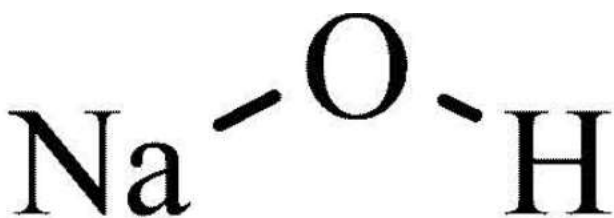
Ο γενικός δείκτης οξειδωτικού στρες είναι μια οργανική ένωση που χρησιμοποιείται στην έρευνα λόγω της ιδιότητας της να φθορίζει σε περιβάλλον ελευθέρων ριζών. Διατίθεται σε μορφή εστέρα είναι ευαίσθητη στην επαφή με τον αέρα. Ο χημικός τύπος είναι $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{O}_8$ ενώ το μοριακό του βάρος ανέρχεται στα 577,8. Η χημική δομή φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 22: Χημική δομή CM-H₂DCFDA

3.3.6 Υδροξείδιο του νατρίου

Το υδροξείδιο του νατρίου, επίσης γνωστό ως αλισίβα και καυστική σόδα, είναι μια ανόργανη ένωση με τον τύπο NaOH. Είναι μια λευκή στερεά ιοντική ένωση που αποτελείται από κατιόντα νατρίου Na⁺ και ανιόντα υδροξειδίου OH⁻. Το υδροξείδιο του νατρίου είναι μια πολύ καυστική βάση και αλκάλιο που αποσυνθέτει πρωτεΐνες σε συνηθισμένες θερμοκρασίες περιβάλλοντος και μπορεί να προκαλέσει σοβαρά χημικά εγκαύματα. Είναι πολύ διαλυτό στο νερό και απορροφά εύκολα την υγρασία και το διοξείδιο του άνθρακα από τον αέρα. Σχηματίζει μια σειρά από ένυδρα NaOH·nH₂O. Το μονοένυδρο NaOH·H₂O κρυσταλλώνεται από υδατικά διαλύματα μεταξύ 12,3 και 61,8 °C. Το εμπορικά διαθέσιμο "υδροξείδιο του νατρίου" είναι συχνά αυτό το μονοένυδρο και τα δημοσιευμένα δεδομένα μπορεί να αναφέρονται σε αυτό αντί για την άνυδρη ένωση. Χρησιμοποιήθηκε για την υδρόλυση του CM-H₂DCFDA.



Εικόνα 23: Χημική δομή υδροξειδίου του νατρίου

3.4 Πειραματικές μέθοδοι

3.4.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου σε διάφορες συγκεντρώσεις

Πρώτη ενέργεια είναι η παρασκευή μητρικού διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου. Η ουσία μας βρίσκεται σε μορφή σκούρου καφεκόκκινου κρυστάλλου και διαλύεται εν συνεχεία

σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Για τον υπολογισμό της τελικής συγκέντρωσης του μητρικού διαλύματος, γίνεται χρήση του τύπου:

$$C = \frac{m \cdot 1000}{V \cdot Mr}$$

Όπου:

- m: μάζα ουσίας σε gr.
- V: όγκος διαλύματος σε mL.
- Mr: μοριακό βάρος ουσίας.

Η ουσία μας έχει μοριακό βάρος 262,16, σε ζυγαριά ακριβείας μετράω 1,3 mg και με την προσθήκη 1 mL DMSO έχω τελική συγκέντρωση διαλύματος 0,005 M. Θέλω να μελετήσω φάσματα απορρόφησης για διάφορες συγκεντρώσεις. Για να το πετύχω πραγματοποιώ διαδοχικές αραιώσεις προσθέτοντας κάθε φορά την κατάλληλη ποσότητα αρχικού διαλύματος σε DMSO βάσει του τύπου:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Ο παρακάτω πίνακας παρέχει αναλυτικά τα στοιχεία των αραιώσεων και των προκυπτώντων διαλυμάτων:

	Αρχική συγκέντρωση (M)	Τελική συγκέντρωση (M)	Αρχικός όγκος (μL)	Τελικός όγκος διαλυμάτων (μL)
Αραίωση 1	0,005	0,0001	60	3000
Αραίωση 2	0,0001	0,00007	2100	3000
Αραίωση 3	0,00007	0,00005	2143	3000
Αραίωση 4	0,00005	0,00003	1800	3000
Αραίωση 5	0,00003	0,00001	1000	3000

Πίνακας 1

Τα διαλύματα εισάγονται σε κυβέτα 3 mL και κατόπιν κάθε αραιώσης η κυβέτα του διαλύματος καθώς και μια κυβέτα με σκέτο DMSO εισέρχονται στο φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda 35 UV-Vis, στις θέσεις δείγματος και αναφοράς αντίστοιχα. Πρέπει να σημειωθεί ότι πριν την πρώτη εισαγωγή διαλύματος, πρέπει να πραγματοποιηθεί μηδενισμός των παραμέτρων της διάταξης. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση σκέτου διαλύτη στην κυβέτα στη θέση δείγματος και χρήση της επιλογής Autozero από το περιβάλλον της εφαρμογής UV WinLab στον ηλεκτρονικό υπολογιστή από τον οποίο πραγματοποιούνται οι χειρισμοί των διατάξεών μας.

3.4.2 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου σε διάφορους διαλύτες

Σε αυτό το στάδιο της μελέτης, θέλουμε να εξετάσουμε τη συμπεριφορά της ουσίας μας σε διαλύτες πέραν του DMSO. Συγκεκριμένα θα χρησιμοποιηθούν αιθανόλη και PBS. Από το μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης $C=5 \cdot 10^{-3}$ M αραιώνω διαδοχικά 42 μ L στους τρεις διαλύτες για τελικό όγκο 3ml, όσο η χωρητικότητα της κυβέτας μας. Τα τρία διαλύματα έχουν συγκέντρωση $C=7 \cdot 10^{-5}$ M.

Οι κυβέτες με τα διαλύματα εισάγονται στο φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda 35 UV-Vis συνοδευόμενες από την αντίστοιχη κυβέτα στη θέση αναφοράς που περιέχει μόνο τον διαλύτη. Οι χειρισμοί της διάταξης πραγματοποιούνται μέσω του πακέτου λογισμικού UV WinLab.

3.4.3 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού διαλύματος δικυανονινυλοφερροκενίου

Για τη μελέτη φθορισμού θα εργαστούμε με δύο διαφορετικούς διαλύτες. Αρχικά, από το μητρικό διάλυμα χρησιμοποιώ 6 μ L τα οποία διαλύονται σε DMSO. Το διάλυμα που προκύπτει είναι συγκέντρωσης 10^{-5} M και όγκου 3 mL και εισάγεται στην κατάλληλη κυβέτα. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι οι κυβέτες συμβατές με το φασματοφωτόμετρο φθορισμού είναι διαφορετικές ως προς τις αντίστοιχες απορρόφησης, αφού οι πρώτες έχουν το ένα ζεύγος απέναντι εδρών τους αδιαφανές σε αντίθεση με τις δεύτερες που έχουν διαφανείς και τις τέσσερις έδρες.

Για το διάλυμα σε PBS ακολουθώ την ίδια ακριβώς μεθοδολογία. Η διάταξη που θα μας επιτρέψει την μελέτη φθορισμού είναι το φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer LS-45 Luminescence Spectrometer το οποίο απαιτεί μηδενισμό παραμέτρων για αποφυγή του θορύβου φθορισμού που οφείλεται στους διαλύτες. Για την πραγματοποίηση του μηδενισμού απαιτείται πριν την τοποθέτηση της κυβέτας με το διάλυμα, τοποθέτηση κυβέτας με σκέτο διαλύτη στο όργανο. Το φάσμα φθορισμού του σκέτου διαλύτη αποθηκεύεται και εν συνεχεία αφαιρείται από τα φάσματα των διαλυμάτων δικυανοβινυλοφερροκενίου, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει μελέτη του φθορισμού που προέρχεται αποκλειστικά από την ουσία μας.

Ο μηδενισμός του οργάνου και όλοι οι υπόλοιποι χειρισμοί πραγματοποιούνται από ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου FL WinLab. Τα διαλύματα διεγείρονται διαδοχικά στα 330, 360, 370, 400, 535 nm, ενώ τα αντίστοιχα φάσματα εκπομπής λαμβάνονται στα 350-630, 380-700, 390-700, 420-700, 555-700 nm.

3.4.4 Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου

Προτού ξεκινήσει η μελέτη κρίνεται απαραίτητη η παρασκευή νέου μητρικού διαλύματος για αποφυγή υποβίβασης των αποτελεσμάτων παραγωγής ελευθέρων ριζών από τυχόν

αλλοιώσεις του διαλύματος. Η διαδικασία είναι ίδια, από το απόθεμά μας το οποίο βρίσκεται σε κρυσταλλική μορφή ζυγίζουμε σε ηλεκτρονική ζυγαριά ακριβείας 1,2 mg και τα διαλύουμε σε 915 μL DMF. Βάσει του τύπου που προαναφέραμε η συγκέντρωση είναι $5 \cdot 10^{-5}$ M. Σε αυτό το στάδιο μελέτης επιλέγουμε να αλλάξουμε διαλύτη από DMSO σε DMF καθώς σε αντίστοιχα πειράματα που διεξήχθησαν με παρόμοιες ουσίες φάνηκε το DMF να ευνοεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών περισσότερο από το DMSO.

Σκοπός του πειράματος είναι ο προσδιορισμός της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού, ωστόσο οι ελεύθερες ρίζες δεν είναι φθορίζουσες ουσίες. Επομένως για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ύπαρξης τους ή μη χρειάζεται κάποια ουσία δείκτης, που να φθορίζει δηλαδή σε περιβάλλον ελευθέρων ριζών. Η ουσία που θα χρησιμοποιηθεί είναι η CM-H₂DCFDA, διατίθεται σε φιαλίδιο που περιέχει 50 mg, ποσότητα η οποία διαλυμένη σε 1 mL δίνει διάλυμα συγκέντρωσης $87 \cdot 10^{-6}$ M. Ωστόσο η ουσία αυτή βρίσκεται σε μορφή εστέρα γεγονός που δεν θα επιτρέψει το φθορισμό της. Για να διορθώσουμε αυτή την κατάσταση απαιτείται υδρόλυση της ουσίας η οποία πραγματοποιείται ως εξής:

- Χρησιμοποιώ αιθανόλη ως διαλύτη, εισάγω 40 μL σε φιαλίδιο.
- Προσθέτω 15 μL του διαλύματος CM-H₂DCFDA.
- Προσθέτω 5 μL NaOH 4N.
- Το διάλυμα τοποθετείται σε σκοτεινό μέρος.

Μετά το πέρας των 30 λεπτών που απαιτούνται για την υδρόλυση παρασκευάζω το προς ακτινοβολήση διάλυμα, το οποίο αποτελείται από:

- 30 μL διαλύματος δικυανοβινυλοφαιροκενίου (από το μητρικό συγκέντρωσης $5 \cdot 10^{-3}$ M).
- 35 μL υδρολυμένου διαλύματος CM-H₂DCFDA.
- 2935 μL 1/1 H₂O-DMF.

Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό, τελικής συγκέντρωσης $5 \cdot 10^{-5}$ M, μεταφέρεται στη διάταξη ακτινοβολήσης όπου εκτίθεται σε φωτεινή ένταση 12,52 mW/cm² με βήματα ενός λεπτού μέχρι τα 10 λεπτά και 5 λεπτών έως τα 30 λεπτά.

Το φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer είναι η διάταξη η οποία θα επιτρέψει την καταγραφή των αποτελεσμάτων φθορισμού. Για την προετοιμασία του οργάνου χρειάζεται μηδενισμός για αποφυγή θορύβου λόγω φθορισμού του διαλύτη ή ατελειών της συσκευής. Με εισαγωγή κυβέτας που περιέχει μόνο 1/1 διάλυμα DMF-H₂O και τους κατάλληλους χειρισμούς στο λογισμικό πακέτο FL WinLab επιτυγχάνω τον μηδενισμό

αυτό. Μετά από κάθε γύρο ακτινοβολήσης, η κυβέτα με το διάλυμα εισάγεται στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού, όπου με χρήση του FL WinLab διεγείρω στα 490 nm και καταγράφω τα φάσματα εκπομπής μεταξύ 510-650 nm.

3.4.5 Μελέτη φωτοκαταστροφής του διαλύματος δικουανοβινυλοφερροκενίου μετά από ακτινοβολήση

Για να αρχίσει αυτό το στάδιο μελέτης της ουσίας μας παρασκευάζω καινούριο μητρικό διάλυμα της προς μελέτη ουσίας. Η επιθυμητή συγκέντρωση είναι και πάλι $5 \cdot 10^{-3}$ M και για να την επιτύχω 1,1 mg δικουανοβινυλοφερροκενίου - ζυγισμένα σε ζυγό ακριβείας- διαλύθηκαν σε 0,84 mL H₂O-DMF 1/1.

Εν συνεχεία, παρασκευάζω το προς ακτινοβολήση διαλύοντας 30 μL του μητρικού διαλύματος σε 1/1 DMF-H₂O με τελική συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-5}$ M στην κυβέτα των 3 mL. Προτού αρχίσει η ακτινοβολήση θα πρέπει να ληφθεί το φάσμα απορρόφησης του διαλύματος πριν την έκθεση στο φως βάσει του οποίου θα κριθούν τα επόμενα αποτελέσματα. Στη θέση αναφοράς του φασματοφωτομέτρου απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/Vis τοποθετώ κυβέτα με σκέτο τον διαλύτη. Πριν τη λήψη της μέτρησης είναι απαραίτητος ο μηδενισμός του οργάνου με προσθήκη σκέτου διαλύτη και στη θέση δείγματος του οργάνου και χρήση της επιλογής Autozero από το μενού της εφαρμογής UV WinLab.

Μετά από το μηδενισμό της διάταξης και τη λήψη του φάσματος του μη ακτινοβολημένου διαλύματος, μεταφέρω την κυβέτα στη διάταξη ακτινοβολήσης, η οποία παραμένει η ίδια με το προηγούμενου πειράματος, και ακτινοβολώ με ισχύ $12,62 \text{ mW/cm}^2$ λαμβάνοντας φάσμα απορρόφησης αμέσως μετά. Η έκθεση στην ακτινοβολία γίνεται με βήμα ένα λεπτό μέχρι τα 10 λεπτά και πέντε λεπτά από τα 10 έως τα 25 λεπτά.

Κεφάλαιο 4

Αποτελέσματα και συμπεράσματα

4.1 Αποτελέσματα φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αναλύθηκε η διαδικασία που ακολουθείται. Με διαδοχικές διαλύσεις σε DMSO από το μητρικό διάλυμα προκύπτουν 5 διαλύματα με συγκεντρώσεις: 10^{-4} M, $7 \cdot 10^{-5}$ M, $5 \cdot 10^{-5}$ M, $3 \cdot 10^{-5}$ M και 10^{-5} M. Στη συνέχεια, το κάθε διάλυμα τοποθετείται σε κυβέτα φασματοφωτομέτρου απορρόφησης χωρητικότητας 3 ml για να εισαχθεί στο όργανο. Πριν τη λήψη μετρήσεων απαιτείται μηδενισμός του σήματος θορύβου που οφείλεται στο όργανο και το διαλύτη, για αυτό το σκοπό εκτελούμε την εντολή Autozero από το περιβάλλον του λογισμικού πακέτου UNWinLab.

Η φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer επιτρέπει τη λήψη των επιθυμητών φασμάτων απορρόφησης. Το εν λόγω όργανο πραγματοποιεί σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή από τα 300 έως και τα 700 nm.

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα φάσματα που λαμβάνονται εκφράζουν την απορρόφηση σε σχέση με το μήκος κύματος η οποία σχετίζεται με την ένταση της προσπίπτουσας και της εξερχόμενης δέσμης μέσω του νόμου Lambert – Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon * b * c$$

Όπου:

A: η απορρόφηση

I_0 : η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

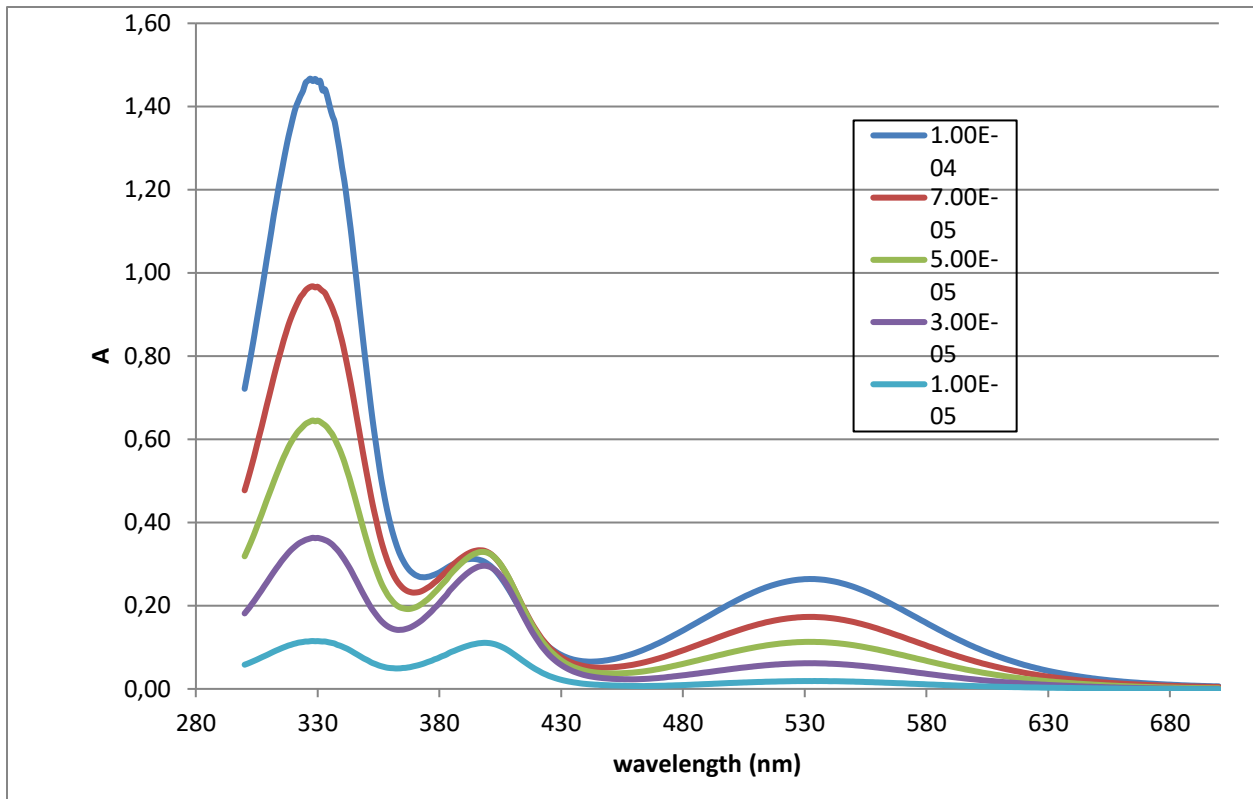
I: η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας

ε : η μοριακή απορροφητικότητα ($l/mol \times cm$)

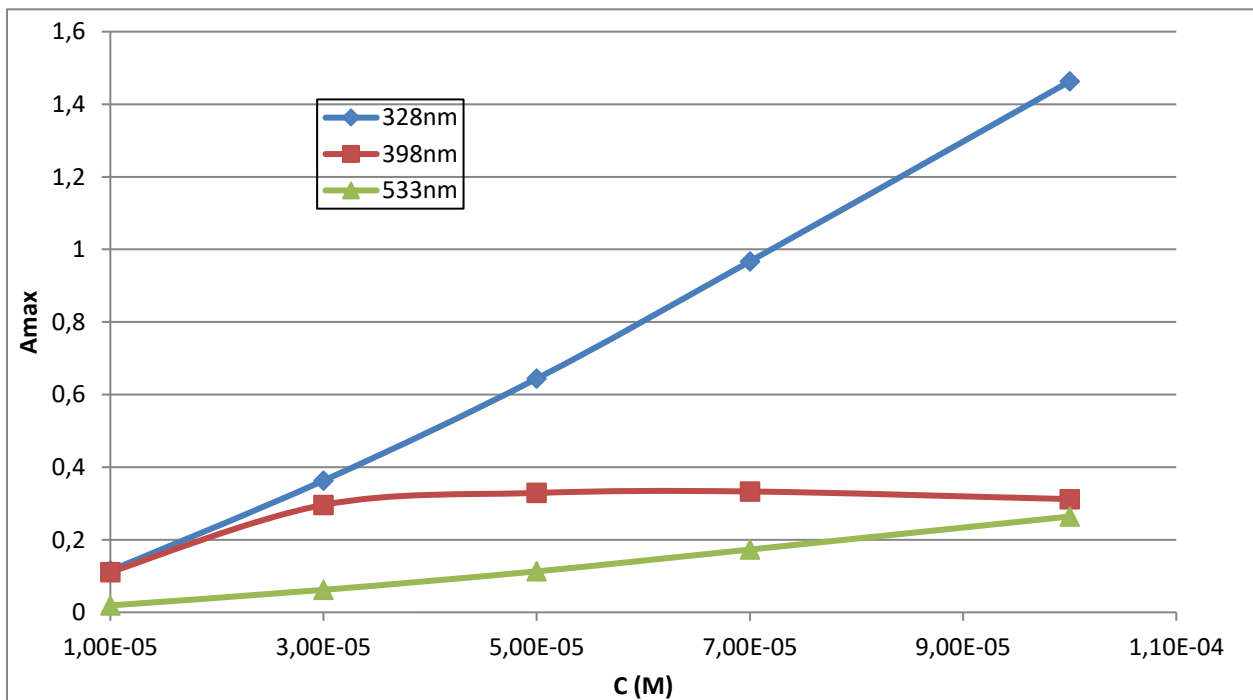
b: το πάχος της κυβέτας (cm)

c: η συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας (mol/l)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί καταγράφονται τα φάσματα απορρόφησης διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου για τις διάφορες τιμές συγκέντρωσης που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Επιπλέον, παρατίθεται και το διάγραμμα εξέλιξης των μεγίστων απορρόφησης με τη συγκέντρωση:



Διάγραμμα 2: Φάσματα απορρόφησης διαλύματος δικυανοβινυλοφαιροκενίου σε DMSO για διαφορετικές συγκεντρώσεις



Διάγραμμα 3: Κορυφές απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης

Από το διάγραμμα 1 παρατηρούνται 3 διακριτά μέγιστα απορρόφησης κοντά στα μήκη κύματος 328 nm, 398 nm και 535 nm. Συμπεραίνεται επίσης από το διάγραμμα 2 ότι οι κορυφές μέγιστης απορρόφησης στα 328 και 533 nm μεταβάλλονται με τη συγκέντρωση γραμμικά ικανοποιώντας το νόμο Lambert–Beer. Αντίθετα παρατηρείται ότι για την κορυφή απορρόφησης στα 398 nm δεν υπάρχει εξάρτηση από τη συγκέντρωση καθώς παρατηρούμε ότι από μία συγκέντρωση και μετά η απορρόφηση διατηρείται σχεδόν σταθερή.

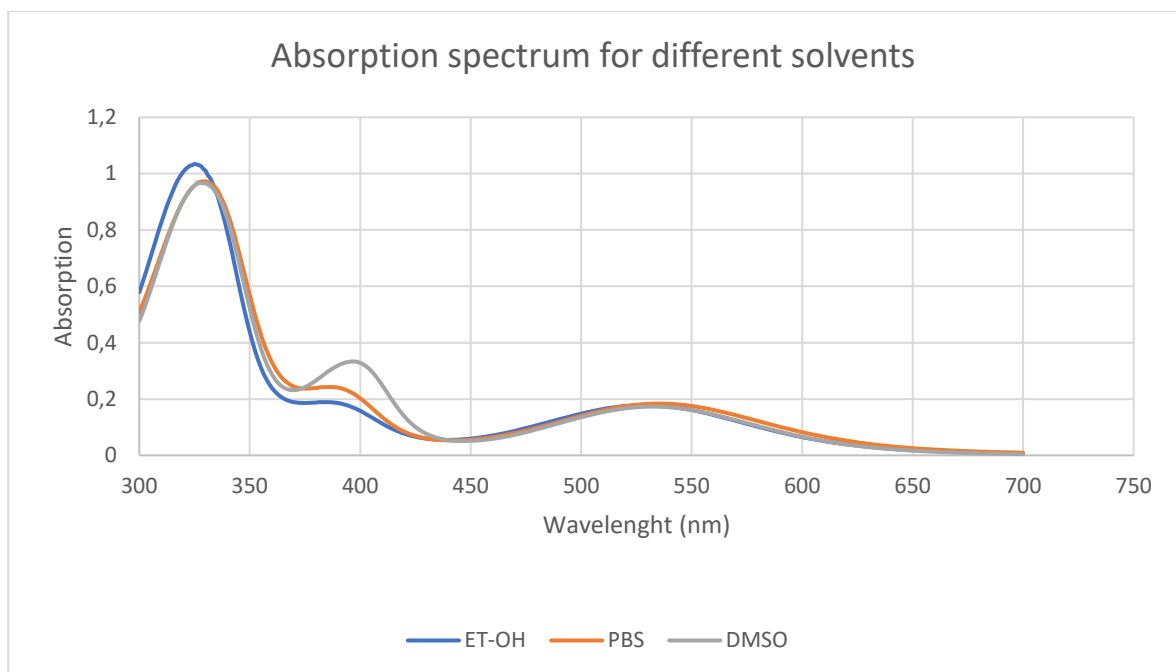
4.2 Αποτελέσματα φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου σε διαφορετικούς διαλύτες

Ακολουθείται η διαδικασία που περιεγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Σκοπός είναι να μελετήσουμε τα φάσματα απορρόφησης της ουσίας μας στην ίδια συγκέντρωση αλλά σε 3 διαφορετικούς διαλύτες οι οποίοι θα είναι: το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), η αιθανόλη (EtOH) και το αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά (PBS).

Η επιθυμητή συγκέντρωση για τη διεξαγωγή του πειράματος είναι $7 \cdot 10^{-5}$ M και επιτυγχάνεται με τη διάλυση 42 μ L του μητρικού διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου σε καθένα από τους 3 διαλύτες για τελικό όγκο 3 mL όσο δηλαδή και ο όγκος της κυβέτας του φασματοφωτομέτρου απορρόφησης.

Η πειραματική διάταξη που επιτρέπει τη λήψη αποτελεσμάτων είναι το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin – Elmer Lambda 35 UV/Vis μέσω του λογισμικού UV WinLab. Κατά τα γνωστά το όργανο απαιτεί μηδενισμό για κάθε έναν από τους διαλύτες και εισαγωγή μιας δεύτερης κυβέτας με σκέτο διαλύτη.

Ακολουθεί το κοινό γράφημα των φασμάτων απορρόφησης των διαλυμάτων της προς μελέτη ουσίας στους 3 διαλύτες:



Διάγραμμα 4: Φάσματα απορρόφησης δικυανοβινυλοφερροκενίου σε διαφορετικούς διαλύτες

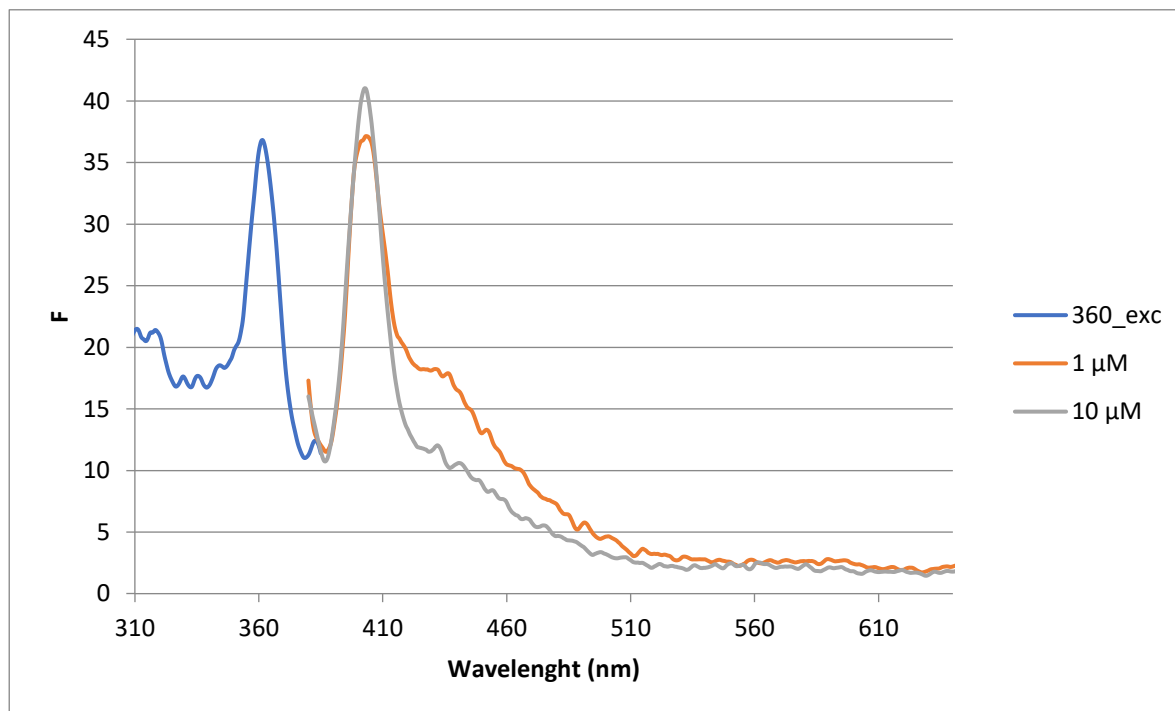
Προκύπτει ότι το αλκοολικό διάλυμα εμφανίζει την πρώτη του κορυφή σε ελαφρώς μικρότερο μήκος κύματος όπου και παρουσιάζει αυξημένη απορρόφηση συγκριτικά με τα άλλα δύο. Στη δεύτερη κορυφή των φασμάτων απορρόφησης των διαλυμάτων, το διάλυμα σε DMSO προηγείται με διαφορά και εμφανίζεται με μικρή μετατόπιση δεξιά και ακολουθείται από το μέγιστο απορρόφησης του διαλύματος σε PBS, με τη μικρότερη κορυφή να ανήκει στο αλκοολικό διάλυμα. Από τα ~440 nm και μετά τα 3 φάσματα σχεδόν ταυτίζονται σχηματίζοντας και την 3 κορυφή απορρόφησης όπως ήταν αναμενόμενο δεδομένης της μορφής των φασμάτων που ελήφθησαν έως αυτό το στάδιο της μελέτης.

4.3 Αποτελέσματα φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου

Για τη διεξαγωγή αυτού του σταδίου της μελέτης ακολουθούνται τα βήματα που αναλύθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Παρασκευάζω διαλύματα συγκεντρώσεων 10^{-5} M και 10^{-6} M σε DMSO. Τα διαλύματα αυτά τοποθετούνται στις κατάλληλες κυβέτες χωρητικότητας 3 ml της φασματοφωτομετρικής διάταξης φθορισμού Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer.

Για τη λήψη μετρήσεων μέσω του οργάνου, χωρίς θόρυβο λόγω του διαλύτη ή της συσκευής, απαιτείται μηδενισμός λαμβάνοντας το φάσμα φθορισμού σκέτου διαλύτη και αφαιρώντας αυτό το υπόβαθρο από κάθε επόμενη μέτρηση μέσω του προγράμματος FL WinLab.

Η λήψη των φασμάτων φθορισμού για κάθε διάλυμα πραγματοποιείται με σάρωση στην περιοχή μεταξύ 380 nm και 650 nm και διέγερση στα 360 nm. Επίσης συλλέχθηκε και το φάσμα διέγερσης της ουσίας για εκπομπή στα 410 nm.



Διάγραμμα 5: Φάσματα φθορισμού ($\lambda_{exc}=360nm$) και διέγερσης ($\lambda_{em}=410nm$) του δικυανοβινυλοφερροκενίου.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4, το δικυανοβινυλοφερροκένιο παρουσιάζει φθορισμό για διέγερση στα 360 nm. Ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός παρατηρείται στα 410 nm. Ωστόσο και στις δύο συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (1 μM και 10 μM) η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού είναι πολύ μικρή.

4.4 Αποτελέσματα μελέτης της ικανότητας διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου για παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω φασματοφωτομετρίας φθορισμού

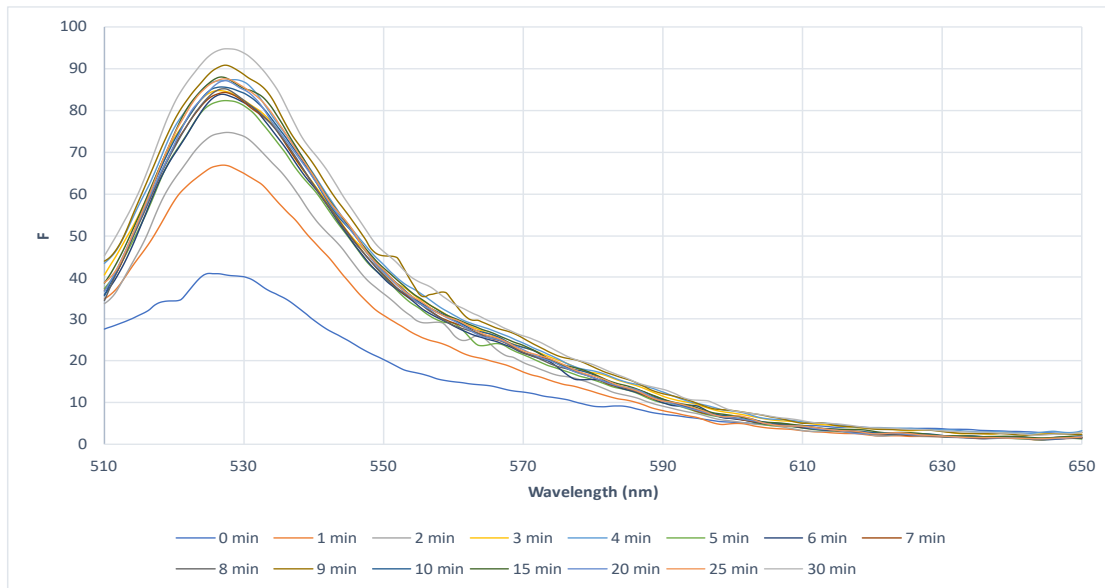
Σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ξεκινούμε αυτό το στάδιο της μελέτης υδrolύοντας την ουσία-δείκτη CM-H₂DCFDA με NaOH σε αιθανόλη. Εν συνεχεία, αραιώνω το υδrolυμένο διάλυμα της ουσίας-δείκτη με 1:1 DMF/H₂O σε διάλυμα τελικού όγκου 3 mL και συγκέντρωσης $5 \cdot 10^{-5}$ M. Το διάλυμα τοποθετείται σε κυβέτα φθορισμού ίδιου όγκου.

Πριν ξεκινήσει η λήψη των μετρήσεων προηγείται μηδενισμός παραμέτρων της συσκευής Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer για την αποφυγή μέτρησης του θορύβου που οφείλεται στον διαλύτη ή γενικά στο όργανο. Ο μηδενισμός πραγματοποιείται με λήψη και

αποθήκευση του φάσματος φθορισμού που δίνει ο διαλύτης από μόνος του και χρήση του ως υπόβαθρο αφαιρούμενο από τα επόμενα φάσματα.

Η ακτινοβολία γίνεται σε ειδικά κατασκευασμένη διάταξη από πηγή πράσινου LED με ένταση $12,52 \text{ mW/cm}^2$. Γίνεται επίσης χρήση συστήματος διαρκούς μαγνητικής ανάδευσης καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης του διαλύματος στην ακτινοβολία.

Αρχικά, λαμβάνεται το φάσμα φθορισμού χωρίς ακτινοβολία και εν συνεχεία κάθε διάστημα έκθεσης στο φως ακολουθείται από λήψη του αντίστοιχου φάσματος. Το διάλυμα ακτινοβολείται με βήμα το ένα λεπτό έως τα 10 λεπτά και τα 5 λεπτά από τα 10 έως τα 30 λεπτά.

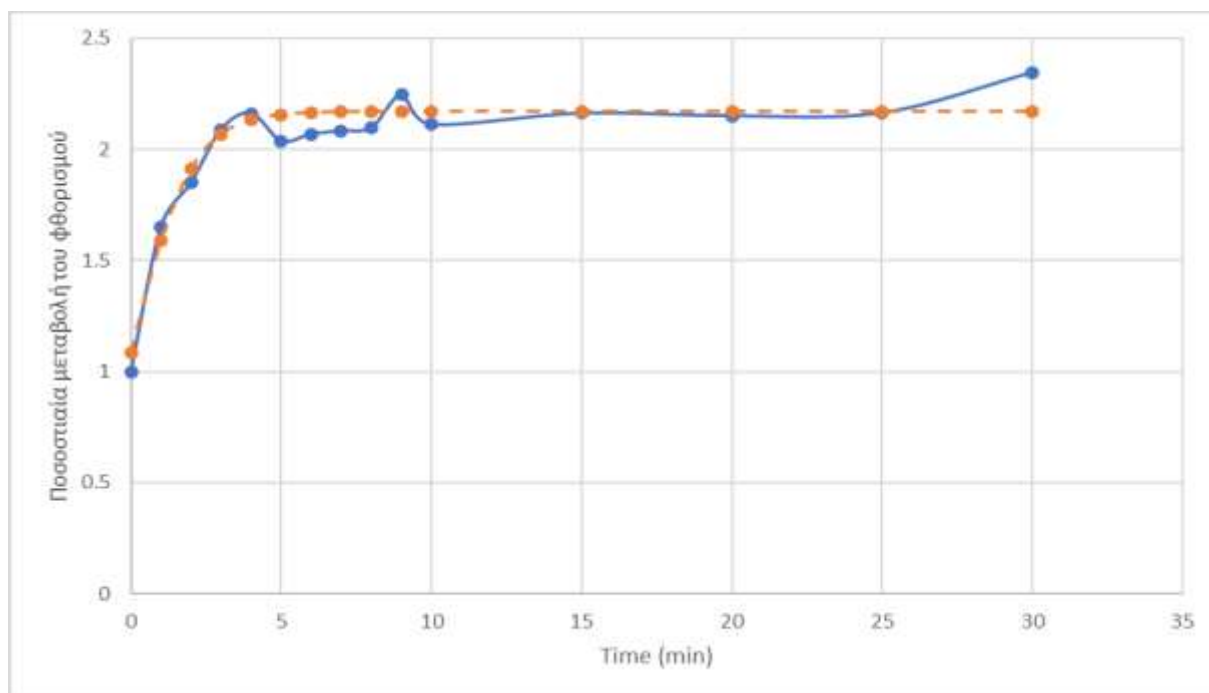


Διάγραμμα 6: Φάσματα φθορισμού της CM-H2DCFDA σε διάλυμα παρουσία δικυανοβινυλοφερροκενίου μετά από φωτοενεργοποίηση για διαφορετικούς χρόνους.

Ακολουθεί το διάγραμμα της ποσοστιαίας μεταβολής των μεγίστων των φασμάτων φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο, τα οποία σημειώνονται στα 538 nm. Έγινε προσέγγιση με ελάχιστο τετραγωνικό σφάλμα με σιγμοειδή καμπύλη

$$y = \frac{2.17}{1 + e^{-t}}$$

με $R^2=0.9073$.



Διάγραμμα 7: Ποσοστιαία μεταβολή του μέγιστου φθορισμού του δικυανοβινυλοφερροκενίου ως αποτέλεσμα της ακτινοβόλησης και παραγωγής ελευθέρων ριζών σε συνάρτηση με το χρόνο.

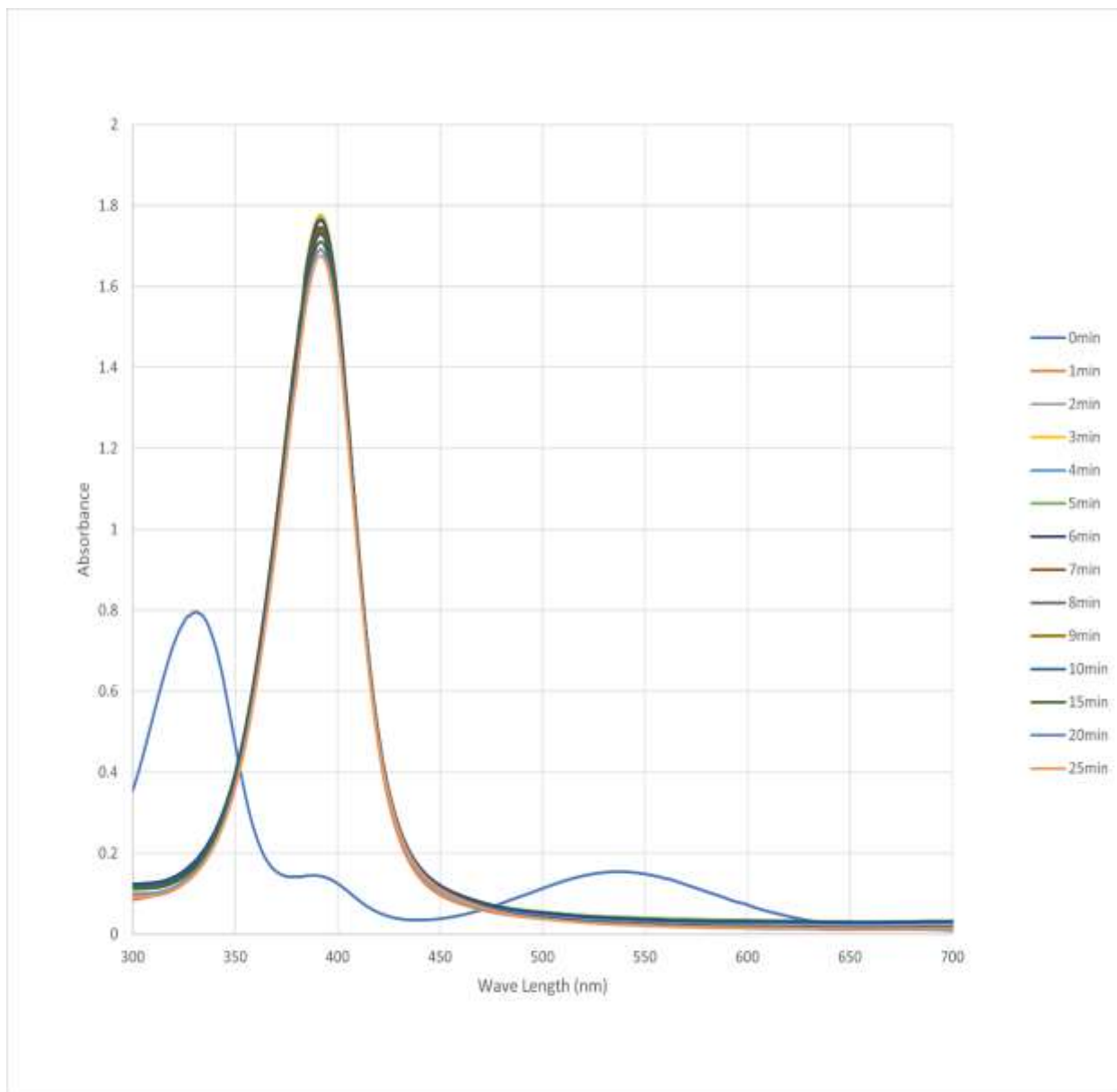
Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται ότι ο μέγιστος φθορισμός του διαλύματος σχεδόν διπλασιάζεται μέχρι το 4^ο λεπτό της ακτινοβόλησης και έπειτα τείνει να σταθεροποιηθεί. Ο φθορισμός του διαλύματος οφείλεται στην CM-H₂DCFDA η οποία είναι κατασκευασμένη για να φθορίζει σε περιβάλλον ελευθέρων ριζών. Επομένως θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το διάλυμα δικυανοβινυλοφερροκενίου παράγει πολύ γρήγορα ελεύθερες ρίζες ως αποτέλεσμα της φωτοενεργοποίησής του. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς σχετίζεται άμεσα με το χρόνο ακτινοβόλησης του ασθενή κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Σχεδόν στα 4 λεπτά έχει παραχθεί το σύνολο των ελευθέρων ριζών του δικυανοβινυλοφερροκενίου και δε χρειάζεται ο ασθενής να ακτινοβοληθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

4.5 Αποτελέσματα μελέτης φωτοκαταστροφής διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου μέσω φασματοφωτομετρίας απορρόφησης

Για τη μελέτη φωτοκαταστροφής της ουσίας, σύμφωνα με τη διαδικασία που εξηγήθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, παρασκευάζεται διάλυμα συγκέντρωσης $5 \cdot 10^{-5}$ M σε 1:1 DMF/H₂O και όγκου 3ml. Για την λήψη των φασμάτων απορρόφησης γίνεται χρήση του φασματοφωτομέτρου απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/Vis. Αφού πρώτα πραγματοποιηθεί μηδενισμός της διάταξης, λαμβάνω το φάσμα του μη ακτινοβολημένου διαλύματος.

Στη συνέχεια, μεταφέρω το διάλυμα στη διάταξη ακτινοβολίας η οποία παραμένει η ίδια με την προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε. Το διάλυμα ακτινοβολείται με ένταση $12,62 \text{ mW/cm}^2$ πραγματοποιώντας συνεχή ανάδευση. Κάθε κύκλος ακτινοβολίας ακολουθείται από λήψη του αντίστοιχου φάσματος απορρόφησης. Η έκθεση στην ακτινοβολία είναι διάρκειας 1 λεπτού μέχρι τα 10 λεπτά και 5 λεπτών μέχρι τα 25 λεπτά.

Ακολουθούν τα φάσματα απορρόφησης που ελήφθησαν στη διάρκεια της μελέτης.



Διάγραμμα 8: Φάσματα απορρόφησης του δικυανοβινυλοφερροκενίου για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολίας με το πράσινο φως.

Το συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από τη μελέτη των προκύπτων φασμάτων είναι ότι η ουσία επηρεάζεται από φωτοκαταστροφή από την έναρξη της ακτινοβολίας. Πιο

συγκεκριμένα , μετά από το 1ο λεπτό ακτινοβολήσης παρατηρούμε ότι και οι τρεις κορυφές απορρόφησης του δικυανοβινυλοφαιροκενίου (διάγραμμα 1) εξαφανίζονται και δημιουργείται μία νέα στα 390 nm Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη δημιουργία ενός τελείως διαφορετικού προϊόντος από το αρχικό ως αποτέλεσμα της φωτοενεργοποίησης της ουσίας. Το νέο αυτό προϊόν απορροφά πολύ πιο έντονα από το αρχικό και είναι αρκετά φωτοσταθερό τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα των 25 min που ακτινοβολήθηκε.

Κεφάλαιο 5

Γενικά συμπεράσματα

5.1 Συμπεράσματα φασματοσκοπικών μελετών απορρόφησης και φθορισμού διαλύματος δικουανοβινυλοφερροκενίου

Τα πειράματα απορρόφησης που διεξήχθησαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κατέδειξαν μια ικανοποιητική συμπεριφορά για το δικουανοβινυλοφερροκένιο. Η ουσία αυτή, παρά τη μεταβολή της συγκέντρωσης, φαίνεται να διαθέτει την ικανότητα να διατηρεί τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματός της, το οποίο παρουσιάζει τρεις διακριτές κορυφές απορρόφησης στα 328 nm, 398 nm και 535 nm. Σε όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν οι κορυφές αυτές εμφανίζονται στα ίδια μήκη κύματος. Οι μέγιστες τιμές των απορροφήσεων στα 328 και 533 nm ακολουθούν γραμμική μεταβολή ενώ η κορυφή στα 398 nm δεν παρουσιάζει δόσοεξάρτηση.

Η συμπεριφορά μιας ουσίας στην απορρόφηση ακτινοβολίας είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη χρησιμότητα της στην φωτοδυναμική θεραπεία. Αν και η φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης έδωσε αξιόλογες ενδείξεις για πιθανή χρήση της εξεταζόμενης ουσίας προς αυτό τον σκοπό, η έλλειψη απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος συρρικνώνει σημαντικά το πεδίο εφαρμογών της. Συγκεκριμένα, η χρήση φωτοδυναμικής θεραπείας σε όγκους και άλλες αλλοιώσεις σε κάποιο βάθος ιστού απαιτεί ακτινοβολία μήκους κύματος 600-800 nm έτσι ώστε το μεγαλύτερο μήκος κύματος να επιτρέψει μεγαλύτερη διείσδυση. Το δικουανοβινυλοφερροκένιο εμφανίζει μηδαμινή απορρόφηση σε αυτή την περιοχή περιορίζοντας την ενδεχόμενη χρήση του σε φωτοδυναμική θεραπεία επιφανειακών όγκων.

Η διεξαγωγή της μελέτης συνεχίστηκε με την εναλλαγή τόσο οργανικών διαλυτών (DMSO, EtOH) όσο και πολικού (PBS). Παρατηρήθηκε ότι το δικουανοβινυλοφερροκένιο διατηρεί σε γενικές γραμμές τη μορφή του φάσματος απορρόφησης του και στις τρεις περιπτώσεις. Οι μέγιστες απορροφήσεις στα 400 nm παρουσίασαν μείωση στις περιπτώσεις που έγινε χρήση EtOH και PBS ως διαλύτης σχετικά με την τιμή που έλαβε η αντίστοιχη απορρόφηση με DMSO. Το φάσμα απορρόφησης με διαλύτη την αιθανόλη εμφανίζει επίσης μια μικρή μετατόπιση προς τα αριστερά ως προς τις τιμές μήκους κύματος.

Τα πειράματα που διεξήχθησαν σχετικά με το φθορισμό του διαλύματος δικουανοβινυλοφερροκενίου, κατέδειξαν τη μη ικανοποιητική συμπεριφορά της ουσίας αυτής. Τα αποτελέσματα με διέγερση κοντά στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης έδειξαν πολύ χαμηλό φθορισμό οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η ουσία δεν φθορίζει. Το τελευταίο συμπέρασμα δεν θέτει μόνο υπό αμφιβολία την καταλληλότητα της ουσίας για χρήση σε φωτοδυναμική θεραπεία αλλά αποκλείει και την χρήση της στη διάγνωση καρκινικών όγκων, όπου ο υψηλός φθορισμός είναι απαραίτητη προϋπόθεση.

5.2 Συμπεράσματα σχετικά με την ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών

Με την ολοκλήρωση της πειραματικής μελέτης του δικυανοβινυλοφερροκενίου ως προς την παραγωγή ελευθέρων ριζών προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα. Η αύξηση του μέγιστου φθορισμού στο διάλυμα, λόγω της ουσίας-δείκτη CM-H₂DCFDA, είναι σημαντική για τα πρώτα πέντε λεπτά της ακτινοβολήσης ενώ εν συνεχεία τείνει να παραμένει σταθερή. Η φωτοδυναμική θεραπεία αξιοποιεί την κυτταροτοξικότητα των δραστικών μορφών του οξυγόνου για να πετύχει τη δράση της, τέτοιες μορφές οξυγόνου οφείλει να παράγει η φωτοευαίσθητη ουσία μετά από ακτινοβολήση. Σύμφωνα λοιπόν με το αποτέλεσμα του πειράματος, όπου παρατηρήθηκε αύξηση των ελευθέρων ριζών μετά από ακτινοβολήση, είναι αναμενόμενο το δικυανοβινυλοφερροκένιο να μειώσει τη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων.

Επίσης η πολύ γρήγορη παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό μιας ουσίας ως υποψήφιος φωτοευαίσθητοποιητής καθώς σχετίζεται με το χρόνο που θα πρέπει να ακτινοβοληθεί ο ασθενής ώστε η φωτοδυναμική θεραπεία να είναι αποτελεσματική.

5.3 Συμπεράσματα φωτοκαταστροφής διαλύματος δικυανοβινυλοφερροκενίου

Κατά τη διάρκεια φωτοδυναμικής θεραπείας, είναι η σημαντική η σταθερότητα του φωτοευαίσθητοποιητή ως προς την απορρόφηση ακτινοβολίας. Η φωτοαποικοδόμηση της ουσίας είναι επίσης κρίσιμης σημασίας καθώς αποτρέπει την παραμένουσα φωτοευαίσθησία στον οργανισμό του ασθενή και την κυτταροτοξικότητα απουσία φωτός. Τα αποτελέσματα αυτού του σταδίου της μελέτης συνηγορούν στο ότι το δικυανοβινυλοφερροκένιο αλλάζει σημαντικά τη μορφή και τη μέγιστη τιμή του φάσματος απορρόφησης με την ακτινοβολήση. Το μείγμα φωτοπαραγώγων που προκύπτει φαίνεται φωτοσταθερό καθώς 25 λεπτά ακτινοβολήσης μειώνουν ελάχιστα την απορρόφηση.

5.4 Προτάσεις για το μέλλον

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρα σχετικά με την ικανότητα του δικυανοβινυλοφερροκενίου να αποτελέσει φωτοευαίσθητοποιητή φωτοδυναμικής θεραπείας. Ο περιορισμένος φθορισμός της ουσίας περιορίζει τη δυνατότητα της να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για θεραπεία αλλά και για διάγνωση. Ωστόσο περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να αξιολογηθεί καλύτερα το δυναμικό της ουσίας ως φωτοευαίσθητοποιητής.

Πιο συγκεκριμένα, κάποιες προτάσεις για μελλοντική διερεύνηση είναι:

- Η μελέτη χωρικού εντοπισμού και επιλεκτικότητας του δικυανοβινυλοφερροκενίου σε υγιή και καρκινικά κύτταρα.
- Η εξέταση της βιωσιμότητας καρκινικών κυττάρων μετά από χορήγηση δικυανοβινυλοφερροκενίου και ακτινοβολήση.

- Η περαιτέρω μελέτη των φωτοπαραγόμενων ουσιών σε διάλυμα δικυανοβινυλοφερροκενίου μετά από ακτινοβολία.
- Η βιοτοξικότητα και η παραμένουσα φωτοευαισθησία σε κύτταρα.
- Η φαρμακοκινητική μελέτη σχετικά με τον χρόνο αποδέσμευσης από υγιείς ιστούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] H. Kostron *et al.*, *Photodynamic Therapy*. The Royal Society of Chemistry, 2003. doi: 10.1039/9781847551658.
- [2] Z. Huang, "Photodynamic therapy in China: Over 25 years of unique clinical experience: Part One—History and domestic photosensitizers," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 3, no. 1, pp. 3–10, Mar. 2006, doi: 10.1016/S1572-1000(06)00009-3.
- [3] T. J. Dougherty, J. E. Kaufman, A. Goldfarb, K. R. Weishaupt, D. Boyle, and A. Mittleman, "Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors," *Cancer Res*, vol. 38, no. 8, 1978.
- [4] T. K. Lee, E. D. Baron, and T. H. Foster, "Monitoring Pc 4 photodynamic therapy in clinical trials of cutaneous T-cell lymphoma using noninvasive spectroscopy," *J Biomed Opt*, vol. 13, no. 3, pp. 1–3, May 2008, doi: 10.1117/1.2939068.
- [5] B. C. Wilson and M. S. Patterson, "The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy," *Phys Med Biol*, vol. 53, no. 9, pp. R61–R109, 2008, doi: 10.1088/0031-9155/53/9/r01.
- [6] E. Skovsen, J. W. Snyder, J. D. C. Lambert, and P. R. Ogilby, "Lifetime and Diffusion of Singlet Oxygen in a Cell," *J Phys Chem B*, vol. 109, no. 18, pp. 8570–8573, May 2005, doi: 10.1021/jp051163i.
- [7] R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C. J. H. Childs, and C. H. Sibata, "Photosensitizers in clinical PDT," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 1, no. 1, pp. 27–42, 2004, doi: [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9).
- [8] J. Chen *et al.*, "New Technology for Deep Light Distribution in Tissue for Phototherapy," *The Cancer Journal*, vol. 8, no. 2, 2002, [Online]. Available: https://journals.lww.com/journalppo/Fulltext/2002/03000/New_Technology_for_Deep_Light_Distribution_in.9.aspx
- [9] T. H. Foster, B. D. Pearson, S. Mitra, and C. E. Bigelow, "Fluorescence Anisotropy Imaging Reveals Localization of meso-Tetrahydroxyphenyl Chlorin in the Nuclear Envelope," *Photochem Photobiol*, vol. 81, no. 6, pp. 1544–1547, Nov. 2005, doi: <https://doi.org/10.1562/2005-08-11-RN-646>.
- [10] R. L. Lipson, E. J. Baldes, and M. J. Gray, "Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer," *Cancer*, vol. 20, no. 12, pp. 2255–2257, Dec. 1967, doi: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(196712\)20:12<2255::AID-CNCR2820201229>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-0142(196712)20:12<2255::AID-CNCR2820201229>3.0.CO;2-U).
- [11] R. L. Lipson, E. J. Baldes, and A. M. Olsen, "The Use of a Derivative of Hematoporphyrin in Tumor Detection²³," *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 26, no. 1, pp. 1–11, Jan. 1961, doi: 10.1093/jnci/26.1.1.
- [12] R. L. LIPSON and E. J. BALDES, "The Photodynamic Properties of a Particular Hematoporphyrin Derivative," *Arch Dermatol*, vol. 82, no. 4, pp. 508–516, Oct. 1960, doi: 10.1001/archderm.1960.01580040026005.

- [13] J. Kou, D. Dou, and L. Yang, "Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications," *Oncotarget*, vol. 8, no. 46, pp. 81591–81603, Aug. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.20189.
- [14] A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, and A. T. Byrne, "Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy," *Photochem Photobiol*, Oct. 2009.
- [15] F. H. J. FIGGE, G. S. WEILAND, and L. O. J. MANGANIELLO, "Studies on cancer detection and therapy; the affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissue for porphyrins, metalloporphyrins, and radioactive zinc hematoporphyrin," *Anat Rec*, vol. 101, no. 4, 1948.
- [16] K. J. Mellish, R. D. Cox, D. I. Vernon, J. Griffiths, and S. B. Brown, "In Vitro Photodynamic Activity of a Series of Methylene Blue Analogues¶," *Photochem Photobiol*, vol. 75, no. 4, 2002, doi: 10.1562/0031-8655(2002)075<0392:ivpaoa>2.0.co;2.
- [17] I. S. Mfouo-Tynga, L. D. Dias, N. M. Inada, and C. Kurachi, "Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 34, p. 102091, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102091>.
- [18] L. B. Josefsen and R. W. Boyle, "Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers," *Met Based Drugs*, vol. 2008, p. 276109, 2008, doi: 10.1155/2008/276109.
- [19] Z. Huang, "A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy," *Technol Cancer Res Treat*, vol. 4, no. 3, pp. 283–293, Jun. 2005, doi: 10.1177/153303460500400308.
- [20] J. D. Wilson, C. E. Bigelow, D. J. Calkins, and T. H. Foster, "Light scattering from intact cells reports oxidative-stress-induced mitochondrial swelling," *Biophys J*, vol. 88, no. 4, pp. 2929–2938, Apr. 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.054528.
- [21] C. Donohoe, M. O. Senge, L. G. Arnaut, and L. C. Gomes-da-Silva, "Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1872, no. 2, p. 188308, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.003>.
- [22] M. P. del Grande *et al.*, "Methylene blue and photodynamic therapy for melanomas: Inducing different rates of cell death (necrosis and apoptosis) in B16-F10 melanoma cells according to methylene blue concentration and energy dose," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 37, p. 102635, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102635>.
- [23] A. Kierzenbaum, "Histology and Cell Biology - An Introduction to Pathology," *Philadelphia: ELSEVIER SAUNDERS*, 2012.
- [24] P. Craig, "Robert H. Crabtree The Organometallic Chemistry of the Transition Metals, 5th edn John Wiley and Sons, 2009, 520 pp. (hardback) ISBN 978-0-470-25762-3," *Appl Organomet Chem*, vol. 24, no. 9, p. 667, Sep. 2010, doi: <https://doi.org/10.1002/aoc.1716>.
- [25] "organometallic compounds," in *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2008. doi: 10.1351/goldbook.o04328.

- [26] C. Elschenbroich, *Organometallics*. John Wiley & Sons, 2016.
- [27] F. Vella, "Principles of bioinorganic chemistry: By S J Lippard and J M Berg. pp 411. University Science Books, Mill Valley, California. 1994. \$30 ISBN 0-935702-73-3 (paper)," *Biochem Educ*, vol. 23, no. 2, p. 115, Apr. 1995, doi: [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(95\)90685-1](https://doi.org/10.1016/0307-4412(95)90685-1).
- [28] H. Werner, "At Least 60 Years of Ferrocene: The Discovery and Rediscovery of the Sandwich Complexes," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 51, no. 25, pp. 6052–6058, Jun. 2012, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201201598>.
- [29] P. L. Pauson, "Ferrocene—how it all began," *J Organomet Chem*, vol. 637–639, pp. 3–6, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(01\)01126-3](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(01)01126-3).
- [30] S. A. Miller, J. A. Tebboth, and J. F. Tremaine, "114. Dicyclopentadienyliron," *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, no. 0, pp. 632–635, 1952, doi: 10.1039/JR9520000632.
- [31] P. Laszlo and R. Hoffmann, "Ferrocene: Ironclad History or Rashomon Tale?," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 39, no. 1, pp. 123–124, Jan. 2000, doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(20000103\)39:1<123::AID-ANIE123>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(20000103)39:1<123::AID-ANIE123>3.0.CO;2-Z).
- [32] T. J. KEALY and P. L. PAUSON, "A New Type of Organo-Iron Compound," *Nature*, vol. 168, no. 4285, pp. 1039–1040, 1951, doi: 10.1038/1681039b0.
- [33] A. F. Neto, A. C. Pelegrino, and V. A. Darin, "Ferrocene - fifty years of transition metal organometallic chemistry - from organic and inorganic to supramolecular chemistry," *Trends in Organometallic Chemistry*, vol. 4, pp. 147–169, 2002.
- [34] H. Werner, *Landmarks in Organo-Transition Metal Chemistry: A personal View*. Springer Science & Business Media, 2008.
- [35] G. Wilkinson, M. Rosenblum, M. C. Whiting, and R. B. Woodward, "THE STRUCTURE OF IRON BIS-CYCLOPENTADIENYL," *J Am Chem Soc*, vol. 74, no. 8, pp. 2125–2126, Apr. 1952, doi: 10.1021/ja01128a527.
- [36] W. Pfab and E. O. Fischer, "Zur Kristallstruktur der Di-cyclopentadienyl-verbindungen des zweiwertigen Eisens, Kobalts und Nickels," *Z Anorg Allg Chem*, vol. 274, no. 6, pp. 316–322, Dec. 1953, doi: <https://doi.org/10.1002/zaac.19532740603>.
- [37] E. O. Fischer and W. Pfab, "Cyclopentadien-Metallkomplexe, ein neuer Typ metallorganischer Verbindungen," vol. 7, no. 7, pp. 377–379, 1952, doi: doi:10.1515/znb-1952-0701.
- [38] J. Okuda, "Ferrocene – 65 Years After," *Eur J Inorg Chem*, vol. 2017, no. 2, pp. 217–219, Jan. 2017, doi: <https://doi.org/10.1002/ejic.201601323>.
- [39] P. F. Eiland and R. Pepinsky, "X-RAY EXAMINATION OF IRON BIS-CYCLOPENTADIENYL," *J Am Chem Soc*, vol. 74, no. 19, p. 4971, Oct. 1952, doi: 10.1021/ja01139a527.
- [40] J. D. DUNITZ and L. E. ORGEL, "Bis-cyclopentadienyl Iron: a Molecular Sandwich," *Nature*, vol. 171, no. 4342, pp. 121–122, 1953, doi: 10.1038/171121a0.

- [41] J. D. Dunitz, L. E. Orgel, and A. Rich, "The crystal structure of ferrocene," *Acta Crystallogr*, vol. 9, no. 4, pp. 373–375, Apr. 1956, doi: 10.1107/S0365110X56001091.
- [42] D. M. P. Mingos, "A historical perspective on Dewar's landmark contribution to organometallic chemistry," *J Organomet Chem*, vol. 635, no. 1, pp. 1–8, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(01\)01155-X](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(01)01155-X).
- [43] R. C. Mehrota, *Organometallic Chemistry*. New Age International, 2007.
- [44] P. Seiler and J. D. Dunitz, "Low-temperature crystallization of orthorhombic ferrocene: structure analysis at 98 K," *Acta Crystallographica Section B*, vol. 38, no. 6, pp. 1741–1745, Jun. 1982, doi: 10.1107/S0567740882007080.
- [45] "acta_vol_22_p2653-2670".
- [46] S. Coriani, A. Haaland, T. Helgaker, and P. Jørgensen, "The Equilibrium Structure of Ferrocene," *ChemPhysChem*, vol. 7, no. 1, pp. 245–249, Jan. 2006, doi: <https://doi.org/10.1002/cphc.200500339>.
- [47] E. W. Abel, N. J. Long, K. G. Orrell, A. G. Osborne, and V. Šik, "Dynamic NMR studies of ring rotation in substituted ferrocenes and ruthenocenes," *J Organomet Chem*, vol. 403, no. 1, pp. 195–208, 1991, doi: [https://doi.org/10.1016/0022-328X\(91\)83100-I](https://doi.org/10.1016/0022-328X(91)83100-I).
- [48] G. Solomons and F. Craig, *Organic Chemistry*, 9th ed. John Wiley & Sons.
- [49] M. J. S. Monte, L. M. N. B. F. Santos, M. Fulem, J. M. S. Fonseca, and C. A. D. Sousa, "New Static Apparatus and Vapor Pressure of Reference Materials: Naphthalene, Benzoic Acid, Benzophenone, and Ferrocene," *J Chem Eng Data*, vol. 51, no. 2, pp. 757–766, Mar. 2006, doi: 10.1021/je050502y.
- [50] M. Fulem, K. Růžička, C. Červinka, M. A. A. Rocha, L. M. N. B. F. Santos, and R. F. Berg, "Recommended vapor pressure and thermophysical data for ferrocene," *J Chem Thermodyn*, vol. 57, pp. 530–540, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2012.07.023>.
- [51] H.-U. Blaser, W. Brieden, B. Pugin, F. Spindler, M. Studer, and A. Togni, "Solvias Josiphos Ligands: From Discovery to Technical Applications," *Top Catal*, vol. 19, no. 1, pp. 3–16, 2002, doi: 10.1023/A:1013832630565.
- [52] C. Mazet, "Privileged Chiral Ligands and Catalysts. Edited by Qi-Lin Zhou.," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 51, no. 2, p. 305, Jan. 2012, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201106819>.
- [53] P. Stepnicka, *Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules*. John Wiley & Sons, 2008.
- [54] J. Bennett and F. M. Company, "Automotive Fuel Requirements-Current and Future."
- [55] "US4104036A_Original_document_20221016170052".
- [56] "3,927,992 1. COAL COMBUSTION PROCESS AND."

- [57] D. R. van Staveren and N. Metzler-Nolte, "Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene," *Chem Rev*, vol. 104, no. 12, pp. 5931–5986, Dec. 2004, doi: 10.1021/cr0101510.
- [58] Y. C. Ong and G. Gasser, "Organometallic compounds in drug discovery: Past, present and future," *Drug Discov Today Technol*, vol. 37, pp. 117–124, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2019.06.001>.
- [59] C. Biot, F. Nosten, L. Fraisse, D. Ter-Minassian, J. Khalife, and D. Dive, "The antimalarial ferroquine: from bench to clinic," *Parasite*, vol. 18, no. 3, pp. 207–214, Aug. 2011, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1051/parasite/2011183207>
- [60] C. Roux and C. Biot, "Ferrocene-based antimalarials," *Future Med Chem*, vol. 4, no. 6, pp. 783–797, Apr. 2012, doi: 10.4155/fmc.12.26.
- [61] W. A. Wani, E. Jameel, U. Baig, S. Mumtazuddin, and L. T. Hun, "Ferroquine and its derivatives: New generation of antimalarial agents," *Eur J Med Chem*, vol. 101, pp. 534–551, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.009>.
- [62] Y. Adoke *et al.*, "A randomized, double-blind, phase 2b study to investigate the efficacy, safety, tolerability and pharmacokinetics of a single-dose regimen of ferroquine with artefenomel in adults and children with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria," *Malar J*, vol. 20, no. 1, p. 222, 2021, doi: 10.1186/s12936-021-03749-4.
- [63] H. Gu *et al.*, "Redox-stimuli-responsive drug delivery systems with supramolecular ferrocenyl-containing polymers for controlled release," *Coord Chem Rev*, vol. 364, pp. 51–85, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.013>.
- [64] C. Ornelas, "Application of ferrocene and its derivatives in cancer research," *New Journal of Chemistry*, vol. 35, no. 10, pp. 1973–1985, 2011, doi: 10.1039/C1NJ20172G.
- [65] V. N. Babin *et al.*, "Ferrocenes as potential anticancer drugs. Facts and hypotheses," *Russian Chemical Bulletin*, vol. 63, no. 11, pp. 2405–2422, 2014, doi: 10.1007/s11172-014-0756-7.
- [66] Yong, "THAI W A N I T A T A N A M A N D A N M A N U O N I H A T M A N W A T U S O 0 9 7 3 8 6 7 3 B 1 (1 2) United States Patent e? (5 4) FERROCENE DERIVATIVE , PREPARATION METHOD AND USE THEREOF (7 1) Applicant : XIAMEN INSTITUTE OF RARE," 2017.
- [67] S. Top *et al.*, "Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on both Hormone-Dependent and Hormone-Independent Breast Cancer Cell Lines," *Chemistry – A European Journal*, vol. 9, no. 21, pp. 5223–5236, Nov. 2003, doi: <https://doi.org/10.1002/chem.200305024>.
- [68] "THE BIO SIDE OF ORGANOMETALLICS," *Chemical & Engineering News Archive*, vol. 80, no. 37, pp. 23–29, Sep. 2002, doi: 10.1021/cen-v080n037.p023.
- [69] B. Babu, T. Ochappan, T. Asraf Ali, J. Mack, T. Nyokong, and M. Gopalakrishnan Sethuraman, "Photodynamic activity and photoantimicrobial chemotherapy studies of ferrocene-substituted

- 2-thiobarbituric acid," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 40, p. 127922, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127922>.
- [70] "Ferrocene Burn Rate Catalyst."
- [71] "United States Patent Office," 1971.
- [72] D. Conroy, A. Moisala, S. Cardoso, A. Windle, and J. Davidson, "Carbon nanotube reactor: Ferrocene decomposition, iron particle growth, nanotube aggregation and scale-up," *Chem Eng Sci*, vol. 65, no. 10, pp. 2965–2977, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.01.019>.
- [73] W. Liu, Q. Xu, Y. Ma, Y. Liang, N. Dong, and D. Guan, "Solvent-free synthesis of ferrocenylethene derivatives," *J Organomet Chem*, vol. 625, no. 1, pp. 128–131, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)00927-X](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)00927-X).
- [74] R. Pietschnig, "Polymers with pendant ferrocenes," *Chem Soc Rev*, vol. 45, no. 19, pp. 5216–5231, 2016, doi: [10.1039/C6CS00196C](https://doi.org/10.1039/C6CS00196C).
- [75] J. Elbert *et al.*, "Ferrocene Polymers for Switchable Surface Wettability," *Organometallics*, vol. 32, no. 20, pp. 5873–5878, Oct. 2013, doi: [10.1021/om400468p](https://doi.org/10.1021/om400468p).