

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή μελέτη

IR ΚΑΙ UV/VIS ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ C₆₀-BLM
ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΥΣΙΑ DNA

Χαράλαμπος Χριστοδούλου

Λεμεσός 2014

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή μελέτη

IR ΚΑΙ UV/VIS ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ C₀-BLM
ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΥΣΙΑ DNA

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ

Επιβλέποντες καθηγητές

Δρ. Κωνσταντίνος Βαρώτσης

Δρ. Κωνσταντίνος Κουτσουπάκης

Λεμεσός 2014

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Χαράλαμπος Χριστοδούλου, 2014

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κωνσταντίνο Βαρώτση ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με την εν λόγω πτυχιακή διατριβή καθώς και για όλη την βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια αυτής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Κωνσταντίνο Κουτσουπάκη ο οποίος με στήριξε και με βοήθησε σε πολύ μεγάλο βαθμό σε όλα τα στάδια της εν λόγω πτυχιακής μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή αφορά την φασματοσκοπική μελέτη του μορίου της μπλεομυκίνης. Στόχος είναι η μελέτη και ο χαρακτηρισμός του μηχανισμού δράσης της μπλεομυκίνης ως αντικαρκινικού παράγοντα. Για αυτό το σκοπό μελετήθηκαν ιδιαίτερα τα σύμπλοκα κοβαλτίου-μπλεομυκίνης αλλά και η αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά τη διάσπαση του DNA από αυτά τα σύμπλοκα. Καθοριστικό ρόλο στην λειτουργία του συνολικού μηχανισμού διάσπασης του DNA από το σύμπλοκο μετάλλου-μπλεομυκίνης παίζει το υπεροξειδίο του υδρογόνου το οποίο αφού δεσμευτεί από το σύμπλοκο απελευθερώνεται υπό τη μορφή ρίζας, ακολούθως διασπά επιλεκτικά το μόριο του DNA στις θέσεις 5' - GC ή 5' - GT. Το μόριο της μπλεομυκίνης όταν συναρμοστεί με ένα μεταλλικό ιόν κοβαλτίου δημιουργεί ένα σταθερό σύμπλοκο το οποίο δεν μπορεί να αντιδράσει εκτός σε περίπτωση φωτοδιέγερσης, για αυτό η μελέτη του είναι πολύ σημαντική. Εφαρμόστηκαν φασματοσκοπικές μέθοδοι ανάλυσης ορατού-υπεριώδους αλλά και υπέρυθρου μήκους κύματος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Κατά την φασματοσκοπική ανάλυση ορατού υπεριώδους πάρθηκαν φάσματα διάφορων διαλυμάτων τα οποία θα βοηθούσαν στην εκπλήρωση του στόχου. Η φασματοσκοπικές μέθοδοι ορατού-υπεριώδους δεν μπορούν να δώσουν συγκεκριμένες πληροφορίες για τον ακριβή μηχανισμό δράσης της μπλεομυκίνης ως αντικαρκινικό παράγοντα. Παρόλα αυτά μπορούν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις ουσίες που μελετώνται. Πάρθηκαν φάσματα διαλυμάτων μπλεομυκίνης, μπλεομυκίνης – κοβαλτίου, DNA, μπλεομυκίνης - κοβαλτίου - DNA. Τα διαλύματα φτιάχτηκαν με τη χρήση νερού αλλά και ρυθμιστικού διαλύματος ως διαλύτες. Επίσης εκτελέστηκε προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου στα διάφορα δείγματα αφού καθορίζεται ως το μόριο που είναι υπεύθυνο για την διάσπαση του DNA όταν δεσμευθεί στην ενεργή μορφή του συμπλόκου μπλεομυκίνης – κοβαλτίου. Επίσης η αντίδραση μελετήθηκε και σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου με τη χρήση αντλίας κενού, με προσθήκη οξυγόνου στα δείγματα. Με τη χρήση αναγωγικού μελετήθηκε και ο μηχανισμός δράσης του συμπλόκου όταν το μέταλλο του κοβαλτίου βρίσκεται στην ανηγμένη του μορφή.

Η φασματοσκοπική μελέτη υπέρυθρης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας εκτελέστηκε με στόχο την εξαγωγή πιο εξειδικευμένων πληροφοριών σχετικά με τα αρχικά, ενδιάμεσα, και τελικά προϊόντα που δημιουργούνται κατά το μηχανισμό δράσης της μπλεομυκίνης. Η

φασματοσκοπία IR είναι σε θέση να παρέχει πιο εξειδικευμένες πληροφορίες σχετικά με τις κύριες λειτουργικές ομάδες κάποιας ουσίας η οποία βρίσκεται σε κάποιο διάλυμα. Έλαβε χώρα φασματοσκοπική μελέτη των ίδιων διαλυμάτων τα οποία μελετήθηκαν στη φασματοσκοπική ανάλυση ορατού υπεριώδους. Οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των λειτουργικών ομάδων στα φάσματα IR βοήθησαν στον χαρακτηρισμό και την μελέτη του μηχανισμού δράσης του συμπλόκου μπλεομυκίνης – κοβαλτίου.

Παρατηρήθηκε η διαδικασία συμπλοκοποίησης του κοβαλτίου από τη μπλεομυκίνη, καθώς και η δέσμευση του υπεροξειδίου από το μέταλλο του συμπλόκου ως υποκαταστάτη στην αξονική θέση. Αυτή η αντίδραση λαμβάνει χώρα ακόμα και με την δέσμευση του οξυγόνου το οποίο βρίσκεται στην ατμόσφαιρα με αποτέλεσμα να δημιουργεί ένα μίγμα μεταξύ δύο συμπλόκων μπλεομυκίνης – κοβαλτίου, αναλογίας 50:50. Παρατηρήθηκε επίσης η αγκίστρωση του συμπλόκου στο μόριο του DNA και η μεταβολή που λαμβάνει χώρα όταν προστεθεί υπεροξείδιο του υδρογόνου στα διαλύματα.

ABSTRACT

The present thesis involves the spectroscopic analysis of bleomycin's molecule. The main target was the study and characterization of the mode of action by the use of the certain substance as an antitumor agent. For this purpose further investigation took place involving the study of the metal complexes of cobalt - bleomycin. Furthermore the double and single strand DNA cleavages were studied. Main role to the whole mechanism of action holds the hydrogen peroxide which reacts with the metal - complexes, eventually forming activated species of oxygen leading to the selective cleavage of the DNA at 5'-GC and 5'-GT dinucleotide sites. Bleomycin has the ability to bind a cobalt ion forming non-activated metalbleomycin species, not capable of cleaving DNA, the cleavage is only achieved through photoactivation. The stability of the cobalt-bleomycin complex provides the opportunity for an easy study and observation of the reaction mechanism intermediates. The analysis was achieved through spectroscopic analysis of different samples using infrared and ultraviolet-visible electromagnetic radiation.

With the use of UV/Vis spectroscopy many samples were analyzed, collecting the equivalent spectra for each one. UV/Vis spectroscopic analysis provides key information for the individual products of the mode of action. It is not able to provide specific information about the mechanism and the products, meaningful the mechanism cannot be fully determined. The molecules of bleomycin, cobalt-bleomycin, DNA, cobalt-bleomycin-DNA with the addition of molecular oxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were studied. The stable structural forms of the cobalt-bleomycin complexes were studied using the oxidized and the non-oxidized form of the cobalt ion. Absorption of UV/Vis radiation by the molecules leads to transitions of the electrons, and the produced spectra provide the desired information.

The IR spectroscopic analysis is a much more sensitive technique which is in position to provide specific details about each individual product of the whole mechanism due to the absorption of the infrared radiation by the main chemical compounds that consists the whole molecule. The same samples that were analyzed with the use of UV/Vis spectroscopic analysis were analyzed with the use of IR spectroscopy. The characteristic absorption of each bond helped to accomplish the general purpose of the thesis.

The process that the metallocomplex is formed was successfully observed, furthermore the binding of the peroxide on the cobalt was studied, which afterwards is believed to form a solution consisted of two different analogues of the complex in a 1:1 ratio. In addition the intercalation of bleomycin on the DNA molecule was observed and studied.