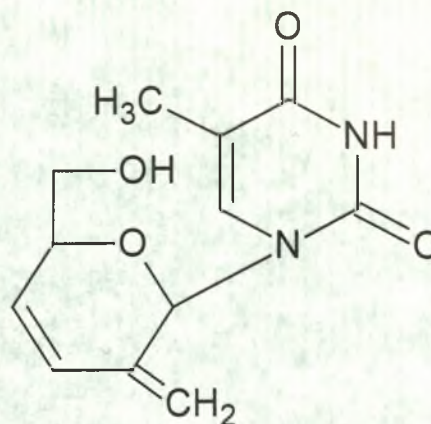
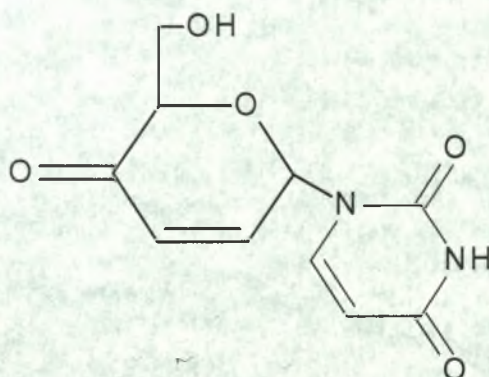


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:
Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής
και περιβάλλοντος**

Διπλωματική Εργασία

**Σύνθεση νουκλεοσιδικών αναλόγων της γαλακτόζης
και της μαννόζης και μελέτη της αντιοξειδωτικής
τους δράσης**



Επιμέλεια Εργασίας : Πορτέσης Νίκος

**Επιβλέποντες καθηγητές : Δ. Κομιώτης
Δ. Κουρέτας**

Λάρισα 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.:	7341/1
Ημερ. Εισ.:	30-07-2009
Δωρεά:	Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός:	Δ
	572.85
	ΠΟΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087207

Στοιχεία Διπλωματικής Εργασίας

Το πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας με τίτλο, **<<Σύνθεση νουκλεοσιδικών αναλόγων της γαλακτόζης και της μαννόζης και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης>>** πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Οργανικής Χημείας και Φυσιολογίας Ζώων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη των καθηγητών κ. Δ. Κομιώτη και κ. Δ. Κουρέτα.

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Δ. Κομιώτης
Δ. Κουρέτας
Κ. Λιαδάκη

Ευχαριστίες

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τους κυρίους Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Δημήτρη Κομιώτη Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας στα Εργαστήριά τους, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσαν να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις για την περαιτέρω πορεία μου.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζώων κ. Χρύσα Σπανού για την επίβλεψή μου κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους στο παραπάνω Εργαστήριο, για την καθοδήγηση και την υπομονή, για τη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διπλωματικής εργασίας, για την προθυμία της να απαντά σε όλες τις απορίες μου καθώς και για τη συμβολή της στις νέες γνώσεις που αποκόμισα κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας κ. Τζιουμάκη Νίκη για την επίβλεψή μου κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους στο παραπάνω Εργαστήριο και τη διδάκτορα του ίδιου Εργαστηρίου κ. Μαντά Στέλα για τη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας, για την προθυμία της να απαντά σε όλες τις απορίες μου καθώς και για τη συμβολή της στις νέες γνώσεις που αποκόμισα κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τις ομάδες και των δύο Εργαστηρίων, για την καλλιέργεια ενός ευχάριστου και ταυτόχρονα παραγωγικού κλίματος συνεργασίας, κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	10
1.1.1 Απεικονίσεις των μονοσακχαριτών: προβολές κατά Fischer - D, L, σάκχαρα	10
1.1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακεταλών	11
1.1.3 Ανωμερή μονοσακχαριτών : πολυστροφισμός	13
1.2 ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΑ	15
1.2.1 Τρόπος δράσης των νουκλεοσιδίων	16
1.2.2 Φουρανονουκλεοσίδια – Πυρανονουκλεοσίδια	18
1.2.3 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με σάκχαρο μία εξόζη	18
1.2.4 Κετονουκλεοσίδια	19
1.2.5 Ακόρεστα κετονουκλεοσίδια	20
1.2.6 Νουκλεοσίδια με εξωκυκλικό μεθυλένιο	21
1.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	22
1.3.1 Ελεύθερες ρίζες	22
1.3.2 Αντιοξειδωτικά συστήματα άμυνας	26
1.3.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	26
1.3.4 Οξειδωτικό στρες	28
1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ – ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	30
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	31
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
2.1 ΥΛΙΚΑ	32
2.1.1 Υλικά Σύνθεσης των Νουκλεοσιδικών αναλόγων	32
2.1.2 Πλασμιδιακό DNA	34
2.1.3 Χημικά αντιδραστήρια μεθόδων εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης των νουκλεοσιδικών αναλόγων	34
2.1.4 Νουκλεοσιδικά Ανάλογα	35
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	36
2.2.1 Σύνθεση προϊόντων	36
2.2.1.1 Σύνθεση προϊόντων με βάση τη θυμίνη (Thy)	36
2.2.1.2 Σύνθεση προϊόντων με βάση την ουρακίλη (Ur)	37
2.2.1.3 Σύνθεση προϊόντος με βάση την ουρακίλη (Ur)	44

2.2.2	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νουκλεοσιδικών αναλόγων μέσω της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με μια σταθερή ρίζα (DPPH')	45
2.2.2.1	Πειραματική διαδικασία	45
2.2.2.2	Στατιστική ανάλυση – Υπολογισμοί	46
2.2.3	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αναστολής τοξικής δράσης ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των περόξυ ριζών (ROO') στο DNA	47
2.2.3.1	Αρχή της Μεθόδου	47
2.2.3.2	Πειραματική διαδικασία	49
2.2.3.3	Στατιστική ανάλυση – Υπολογισμοί	50
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

	Σελ.
Εικόνα 1: Η γλυκόζη στην προβολή κατά Fischer (η καρβονυλομάδα βρίσκεται στην κορυφή).	10
Εικόνα 2: Μερικά D σάκχαρα που απαντούν στη φύση. Στις προβολές κατά Fischer, η υδροξυλομάδα που βρίσκεται στο πλέον απομακρυσμένο στερεογονικό κέντρο, σε σχέση με το καρβονύλιο, έχει διεύθυνση προς τα δεξιά.	11
Εικόνα 3: Η γλυκόζη, η μαννόζη και η γαλακτόζη στην κυκλική δομή της πυρανόζης.	12
Εικόνα 4: Τα α,β ανωμερή της D-γλυκοπυρανόζης	13
Εικόνα 5: Αναπαραστάσεις ανάκλιντρου της α-D-γλυκοπυρανόζης και της β-D-γλυκοπυρανόζης.	14
Εικόνα 6: (α) Φουράνιο, (β) Πυράνιο, (γ) Γλυκόζη	14
Εικόνα 7 : Αδενοσίνη	15
Εικόνα 8 : Νουκλεοσιδικοί αντιμεταβολίτες	16
Εικόνα 9 : 1-(3-deoxy-3-fluoro-2-ulose-glycopyranose)-N ⁴ -benzoylcytosine (κετονουκλεοσίδιο)	19
Εικόνα 10: Ακόρεστα κετονουκλεοσίδια	20
Εικόνα 11 : Νουκλεοσίδιο με εξωκυκλικό μεθυλένιο (DMDC)	21
Εικόνα 12: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS)	23
Εικόνα 13: Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται οι ROS	25
Εικόνα 14: Συσχέτιση των ελευθέρων ριζών με τον καρκίνο.	26
Εικόνα 15: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού	27
Εικόνα 16 : Μετατροπή DPPH [•] σε DPPH – H.	45
Εικόνα 17 : Αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)	48
Εικόνα 18 : Χημική δομή του AAPH και σχηματισμός των περόξυ ριζών (ROO [•]).	48

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Σελ.
Πίνακας 1: Ελεύθερες ρίζες (Reactive species)	22
Πίνακας 2: Τα κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες.	28
Πίνακας 3: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α -D-mannopyranose (II).	37
Πίνακας 4: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl α -D-mannopyranosyl) uracil (III).	38
Πίνακας 5: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(α -D-mannopyranosyl) uracil (IV).	38
Πίνακας 6: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-O-Isopropylidene- α -D-mannopyranosyl) uracil (V).	39
Πίνακας 7: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4,6-Di-O-acetyl-2,3-O-isopropylidene- α -D-mannopyranosyl) uracil (VI)	39
Πίνακας 8: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4,6-Di-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl) uracil (VII).	40
Πίνακας 9: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4,6-Di-O-acetyl-2,3-dideoxy- α -D-erythro-hex-2-enopyranosyl) uracil (VIII)	40
Πίνακας 10: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-dideoxy- α -D-erythro-hex-2-enopyranosyl) uracil (VX).	41
Πίνακας 11: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-dideoxy-6-O-trityl- α -D-erythro-hex-2-enopyranosyl) uracil (X).	41
Πίνακας 12: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-dideoxy-6-O-trityl- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) uracil (XI).	42
Πίνακας 13: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene-6-O-trityl- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl) uracil (XII).	42
Πίνακας 14: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-dideoxy- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) uracil (XIII).	43
Πίνακας 15: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl) uracil (XIV).	43
Πίνακας 16: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων	46

Πίνακας 17: Σειρά προσθήκης υλικών για την πραγματοποίηση της αντίδρασης με το AAPH	49
Πίνακας 18: Αντιοξειδωτική δράση των νουκλεοσιδικών αναλόγων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO [•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	54
Πίνακας 19: Αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO [•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	55

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Νουκλεοσιδικά ανάλογα με ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη	Σελ. 36
Σχήμα 2: Μεθοδολογία σύνθεσης νουκλεοσιδικών αναλόγων με ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη (προϊόντα 6,7 και 8).	51

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- RSC:** Radical scavenging capacity
- DPPH[•]:** 1,1διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο
- AAPH:** 2, 2'– Azobis (2-amidinopropanen hydrochloride)
- ROS:** Δραστικές μορφές οξυγόνου
- ROO[•]:** περόξυ ρίζα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντικαρκινική και αντιική θεραπεία. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοσίδια συνδεδεμένα με ολιγοσακχαρίτες. Τις τελευταίες δεκαετίες, νουκλεοσίδια με εξαμελή υδρογονανθρακικό δακτύλιο έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές και αντιβιοτικές ιδιότητές τους, καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων.

Δύο σημαντικές κατηγορίες πυρανονουκλεοσιδίων αποτελούν τα κετονουκλεοσίδια (ακόρεστα και μη), καθώς και αυτά που φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο. Ειδικότερα αποδείχθηκε ότι τα παραπάνω νουκλεοσίδια παρουσιάζουν σημαντικές αντικαρκινικές και αντιικές ιδιότητες. Βασιζόμενοι στις βιολογικές ιδιότητες των παραπάνω νουκλεοσιδικών αναλόγων, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση, χρησιμοποιώντας δύο *in vitro* δοκιμές, μιας νέας σειράς κετο- και εξωμεθυλενικών πυρανονουκλεοσιδίων (ακόρεστων και μη) της γαλακτόζης και της μαννόζης.

Πρώτα εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των νουκλεοσιδικών αναλόγων μέσω της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με μια σταθερή ρίζα (DPPH') και στη συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA από τη δράση των ελευθέρων ριζών (ROS), μέσω αναστολής τοξικής δράσης ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των περόξυ ριζών (ROO') στο DNA.

Όλα τα προϊόντα, που εξετάστηκαν, δεν παρουσίασαν καμία αλληλεπίδραση με τη ρίζα του DPPH, ενώ τα περισσότερα παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση μέσω αναστολής τοξικής δράσης των περόξυ ριζών (ROO') στο DNA. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε, ότι τα παραπάνω τροποποιημένα νουκλεοσιδικά ανάλογα της γαλακτόζης και της μαννόζης με σημαντικές αντικαρκινικές και αντιικές ιδιότητες παρουσίασαν επιπλέον και αντιοξειδωτική δράση. Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον και θα άξιζε περαιτέρω διερεύνηση η αποτελεσματική ικανότητα αυτού του τύπου των μορίων στην παρεμπόδιση και πιθανόν τη θεραπεία ασθενειών, οι οποίες προκαλούνται από την υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών.

ABSTRACT

Nucleoside analogues display an important role in antitumor and antiviral treatment. It has been demonstrated that a lot of natural antibiotics with important antiviral and anticancer activity contain in their structure these nucleoside analogues. The last decades, nucleosides with a six-membered carbohydrate moiety have been evaluated for their potential antiviral and antibiotic properties and as building blocks in nucleic acid synthesis.

Two important series of pyranonucleosides are the ketonucleosides (unsaturated and saturated) and the nucleosides bearing an exocyclic methylene group. It appeared that these nucleosides exhibit important antiviral and anticancer properties. Based on the above biological activities, a new series of keto- and exomethylene pyranonucleosides (unsaturated and saturated) of galactose and mannose were synthesized and were tested for their antioxidant activity, using two *in vitro* assays.

Firstly, the antioxidant capacity of the products was assessed using the DPPH assay and secondly, in order to examine the ability of the products to protect DNA from the activity of reactive oxygen species (ROS), a peroxy radical (ROO•) induced DNA strand scission assay was used.

None of the molecules showed the ability to scavenge DPPH radical, although, most of the tested molecules had the ability to prevent ROO• radical induced DNA damage. In conclusion, it has been marked, that the above modified nucleoside analogues of galactose and mannose with important anticancer and antiviral properties exhibited antioxidant activity too. It would be interesting and worthy to further investigate the potential effectiveness of this type of molecules in prevention and probably in treatment of diseases caused by the overproduction of radicals.

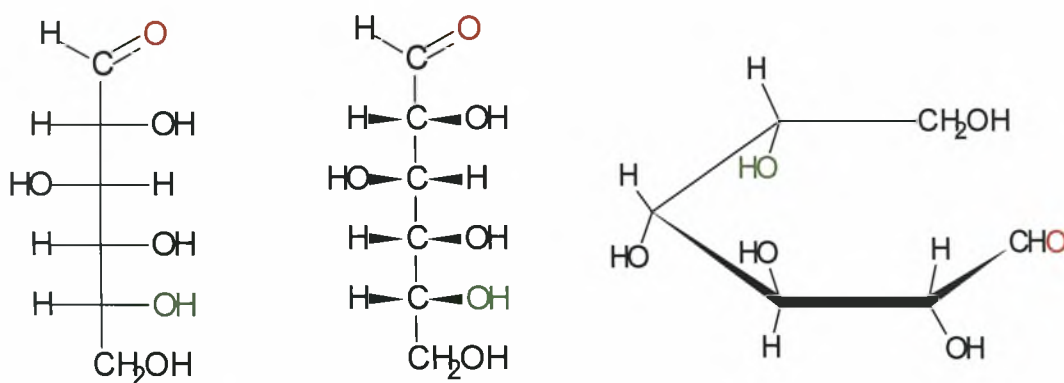
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

1.1.1 Απεικονίσεις των μονοσακχαριτών: προβολές κατά Fischer - D, L, σάκχαρα

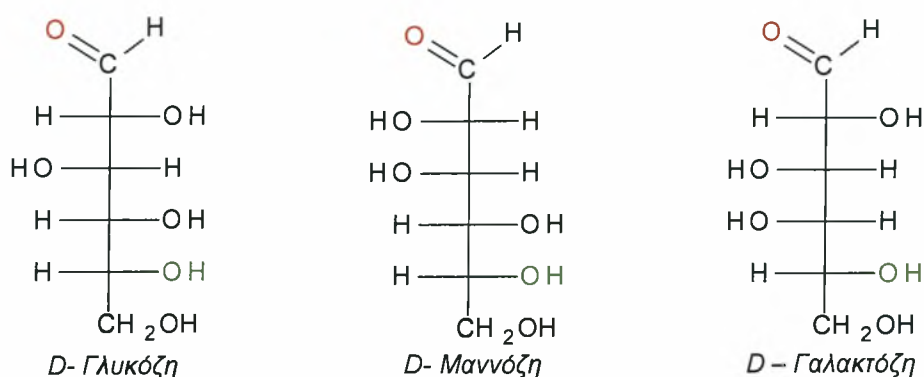
Οι υδατάνθρακες απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Η ζάχαρη και το άμυλο στις τροφές, η κυτταρίνη (κελλουλόζη) στο ξύλο, το χαρτί και το βαμβάκι είναι σχεδόν καθαροί υδατάνθρακες. Τροποποιημένοι υδατάνθρακες συνιστούν μέρος του περιβάλλοντος των κυττάρων, άλλοι απαντούν στα μόρια των DNA που μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες, ενώ άλλοι χρησιμοποιούνται ως φάρμακα. Σήμερα, ο όρος υδατάνθρακας αναφέρεται σε μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών, που ονομάζονται κοινώς σάκχαρα.

Όλοι οι υδατάνθρακες περιέχουν στερεογονικά άτομα άνθρακα και η συνηθέστερη μέθοδος απεικόνισης όλων των στερεογονικών κέντρων σ' ένα επίπεδο πραγματοποιείται με τη χρήση των **προβολών κατά Fischer**. Υδατάνθρακες με πάνω από ένα στερεογονικά κέντρα, αναπαρίστανται τοποθετώντας τα ασύμμετρα κέντρα σε μια κατακόρυφη σειρά με κατεύθυνση από κάτω προς τα πάνω, έτσι ώστε ο καρβονυλικός άνθρακας να βρίσκεται στην κορυφή ή κοντά στην κορυφή της προβολής. Για παράδειγμα, η γλυκόζη στην προβολή κατά Fischer (Εικόνα 1) έχει τέσσερα στερεογονικά κέντρα, ως ακολούθως:



Εικόνα 1: Η γλυκόζη στην προβολή κατά Fischer (η καρβονυλομάδα βρίσκεται στην κορυφή).

Στις προβολές κατά Fischer των περισσότερων φυσικών σακχάρων το υδροξύλιο στο κατώτερο στερεογονικό κέντρο έχει πάντοτε διεύθυνση προς τα δεξιά (Εικόνα 2). Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται D σάκχαρα [McMurry J, 1999].

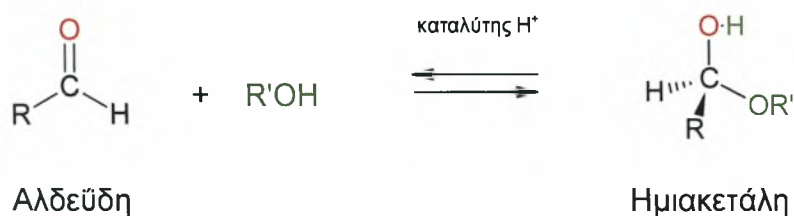


Εικόνα 2: Μερικά D σάκχαρα που απαντούν στη φύση. Στις προβολές κατά Fischer, η υδροξυλομάδα που βρίσκεται στο πλέον απομακρυσμένο στερεογονικό κέντρο, σε σχέση με το καρβονύλιο, έχει διεύθυνση προς τα δεξιά.

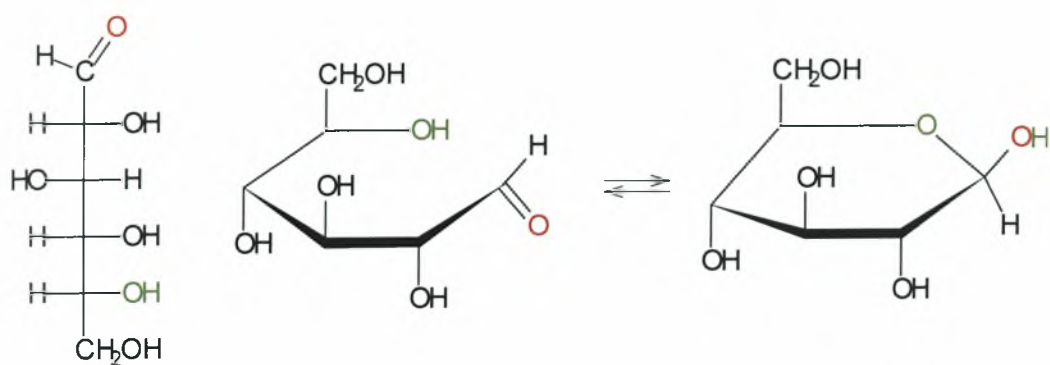
Σε αντίθεση με τα D σάκχαρα, στις προβολές κατά Fischer των L-σακχάρων η υδροξυλομάδα στο κατώτερο στερεογονικό κέντρο έχει διεύθυνση προς τα αριστερά. Έτσι ένα L σάκχαρο αποτελεί κατοπτρικό είδωλο (εναντιομερές) του αντίστοιχου D σακχάρου και διαφέρει από αυτό σε όλα τα υπόλοιπα στερεογονικά κέντρα. Ο συμβολισμός D και L δεν έχει σχέση με την κατεύθυνση προς την οποία ένα σάκχαρο στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός. Έτσι ένα D-σάκχαρο μπορεί να είναι είτε δεξιόστροφο είτε αριστερόστροφο. Το πρόθεμα D υποδηλώνει μόνον ότι η στερεοχημεία του κατώτερου στερεογονικού ατόμου του άνθρακα βρίσκεται στη δεξιά πλευρά της προβολής κατά Fischer, εφόσον το καρβονύλιο βρίσκεται στην κορυφή ή κοντά στην κορυφή [McMurry J, 1999].

1.1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακεταλών

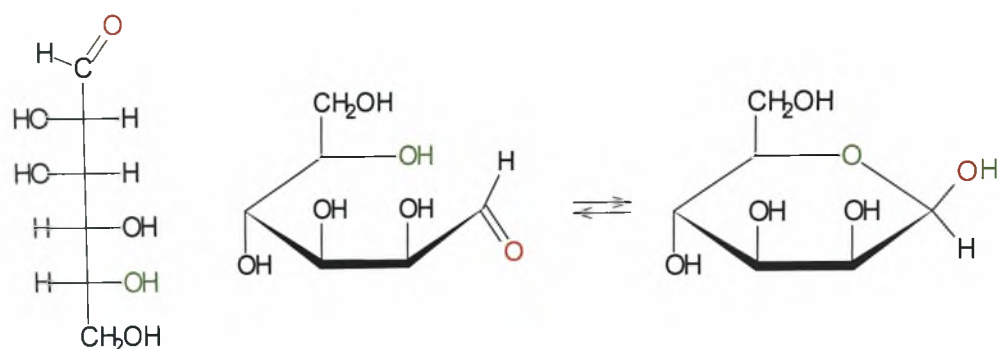
Οι αλκοόλες πραγματοποιούν μια γρήγορη και αντιστρεπτή πυρηνόφιλη προσθήκη σε κετόνες ή αλδεΐδες προς σχηματισμό ημιακεταλών:



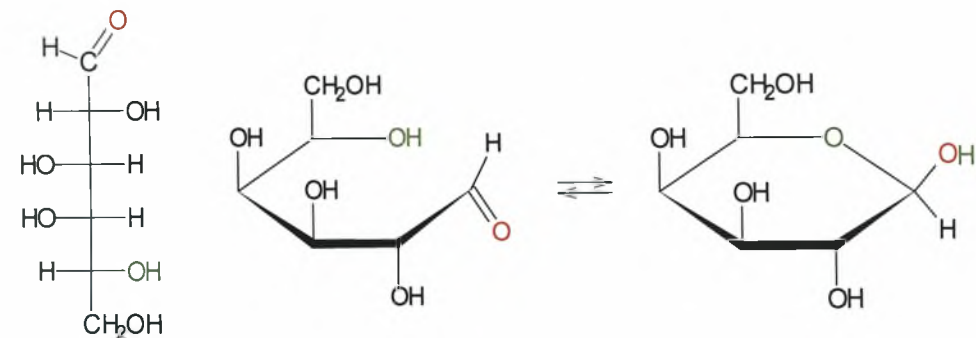
Εάν η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο, μπορεί να λάβει χώρα ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη, που οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι'αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας. Για παράδειγμα, η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα απαντά με τη δομή του εξαμελούς δακτυλίου της **πυρανόζης**, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του -OH του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C1 (Εικόνα 3).



Γλυκόζη



Μαννόζη



Γαλακτόζη

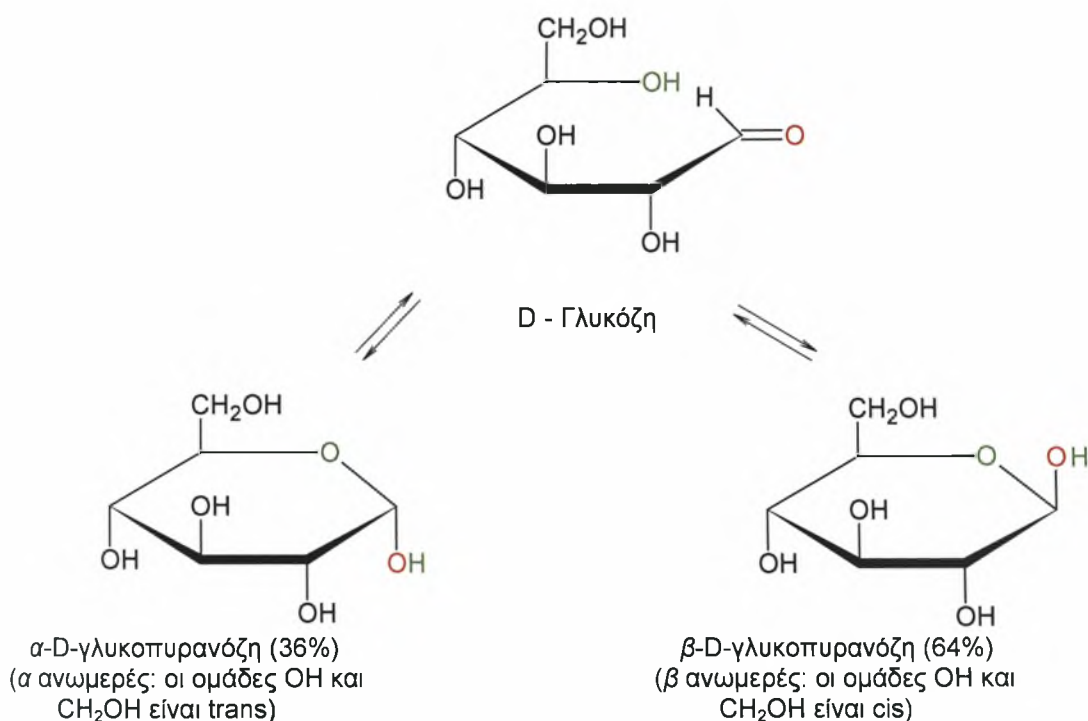
Εικόνα 3: Η γλυκόζη, η μαννόζη και η γαλακτόζη στην κυκλική δομή της πυρανόζης.

Ο δακτύλιος της πυρανόζης αναπαρίστανται κυρίως με την προβολή κατά Haworth, που φαίνεται στην Εικόνα 3, παρά με την προβολή κατά Fischer [McMurry J, 1999].

Στις προβολές κατά Haworth των D σακχάρων, η ακραία ομάδα $-\text{CH}_2\text{OH}$ τοποθετείται πάντοτε προς τα πάνω, ενώ στα L σάκχαρα προς τα κάτω. Στην παραπάνω Εικόνα 3 φαίνεται αυτή η μετατροπή στην περίπτωση της D-γλυκόζης, της D-μαννόζης και της D-γαλακτόζης [McMurry J, 1999].

1.1.3 Ανωμερή μονοσακχαριτών : πολυστροφισμός

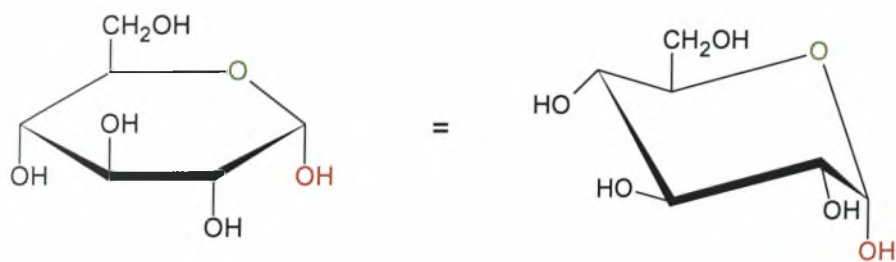
Όταν η ανοικτή αλυσίδα ενός μονοσακχαρίτη υποστεί κυκλοποίηση, αποκτώντας τη δομή της πυρανόζης, σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα διαστερομερή ονομάζονται ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας ανωμερικό κέντρο. Για παράδειγμα, η γλυκόζη κυκλοποιείται αντιστρεπτά σε υδατικό διάλυμα, σχηματίζοντας ένα μίγμα δύο ανωμερών σε αναλογία 36:64. Το δευτερεύον ανωμερές, στο οποίο η ομάδα $-OH$ του C1 βρίσκεται σε θέση *trans* ως προς τον υποκαταστάτη $-CH_2OH$ του C5 (δηλ. με κατεύθυνση προς τα κάτω στην προβολή κατά Haworth), ονομάζεται **α ανωμερές** και η πλήρης ονομασία του είναι α -D-γλυκοπυρανόζη. Το κύριο ανωμερές, στο οποίο η ομάδα $-OH$ του C1 βρίσκεται σε θέση *cis* ως προς τον υποκαταστάτη $-CH_2OH$ του C5 (δηλ. με κατεύθυνση προς τα πάνω στην προβολή κατά Haworth), ονομάζεται **β ανωμερές**. Η πλήρης ονομασία του είναι β -D-γλυκοπυρανόζη (Εικόνα 4).



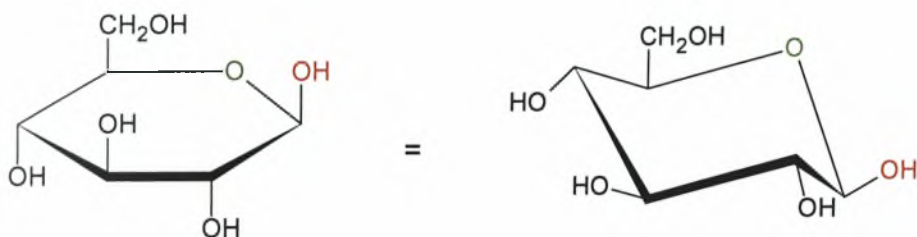
Εικόνα 4: Τα α, β ανωμερή της D-γλυκοπυρανόζης

Και τα δύο ανωμερή της D-γλυκοπυρανόζης μπορούν να κρυσταλλωθούν και να απομονωθούν.

Αν και εύχρηστες, οι προβολές κατά Haworth δε μας παρέχουν την ακριβή τρισδιάστατη εικόνα της διαμόρφωσης του μορίου. Οι δακτύλιοι της πυρανόζης, όπως ακριβώς και οι κυκλοεξανικοί δακτύλιοι, έχουν γεωμετρία τύπου ανάκλιντρου με αξονικούς και ισημερινούς υποκαταστάτες.



α -D-γλυκοπυρανόζη

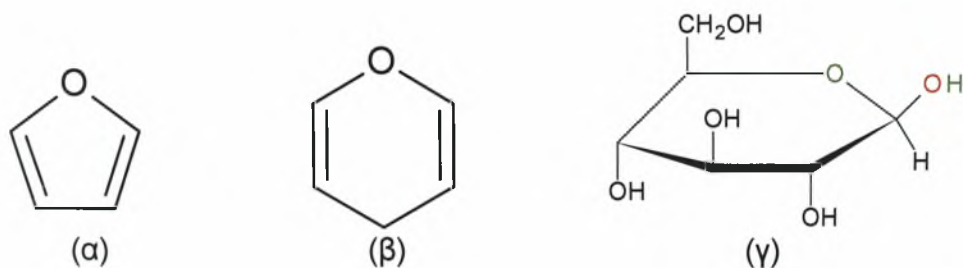


β -D-γλυκοπυρανόζη

Εικόνα 5: Αναπαραστάσεις ανάκλιντρου της α -D-γλυκοπυρανόζης και της β -D-γλυκοπυρανόζης.

Στην παραπάνω Εικόνα 5 φαίνεται, πώς μπορεί να γίνει αυτή η μετατροπή στην περίπτωση της α -D-γλυκοπυρανόζης και της β -D-γλυκοπυρανόζης. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της β -D-γλυκοπυρανόζης, όλοι οι υποκαταστάτες του δακτυλίου βρίσκονται σε ισημερινή θέση. Έτσι, η β -D-γλυκοπυρανόζη είναι η λιγότερο στερεοχημικά παρεμποδισμένη και η πιο σταθερή από τις οκτώ D-αλδοεξόζες [McMurry J, 1999; Berg JM.et al, 2001].

Η παραγωγή του εξαμελούς δακτυλίου του σακχάρου ονομάζεται πυρανόζη, λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο (Εικόνα 6). Στην περίπτωση της φρουκτόζης, η κετονική ομάδα στον C2 του τύπου της ανοικτής αλυσίδας αντιδρά με την υδροξυλική ομάδα του C5 και σχηματίζει μία ενδομοριακή ημιακετάλη. Σαν αποτέλεσμα επέρχεται ο σχηματισμός πενταμελούς δακτυλίου, που ονομάζεται φουρανόζη, λόγω της ομοιότητάς του με το φουράνιο (Εικόνα 6) [Berg JM.et al, 2001].

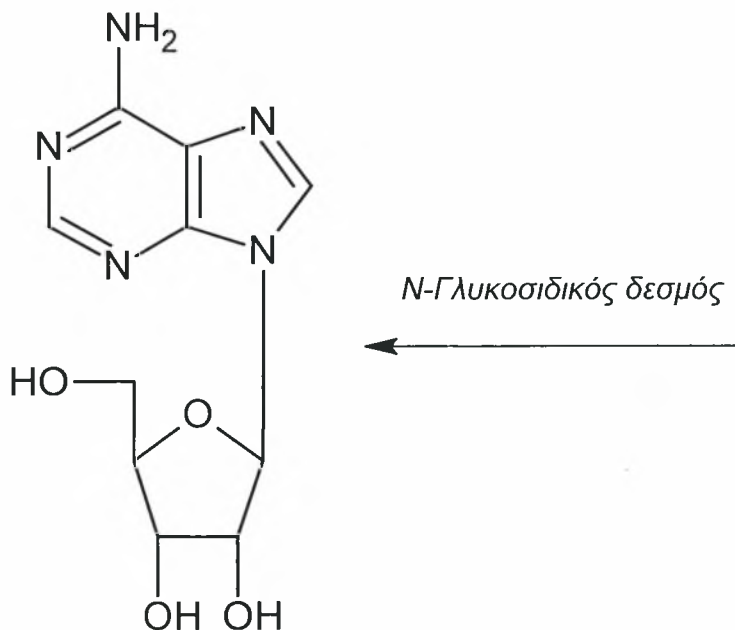


Εικόνα 6: (α) Φουράνιο, (β) Πυράνιο, (γ) Γλυκόζη

1.2 ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΑ

Τα τελευταία χρόνια πληθώρα ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη, σύνθεση και βιολογική ταυτοποίηση νουκλεοσιδίων και νουκλεοσιδικών αναλόγων. Έχει βρεθεί ότι τα νουκλεοσίδια επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντιική δράση [Zhou W. et al, 2004; Perigaud C. et al, 1992; Robins RK. et al, 1990; MacCoss M. et al, 1990]. Συνεπώς έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοσιδίων με απώτερο σκοπό να διεκυσυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους. Ιδίως τις τελευταίες δύο δεκαετίες η σύνθεση και η μελέτη των νουκλεοσιδίων έχει ανέλθει κατακόρυφα με στόχο τη θεραπεία του AIDS [Verheggen I. et al, 1993], του έρπητα [Zhou W. et al, 2004; De Clercq E, 2002] και της ηπατίτιδας [Brady RC. et al, 2004].

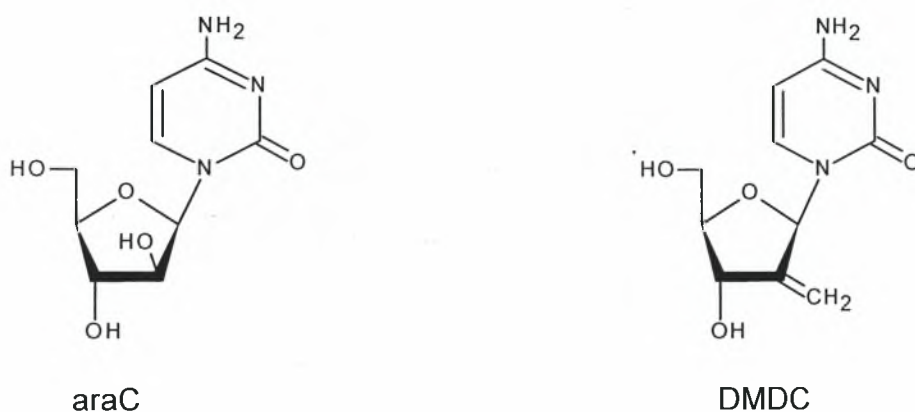
Πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοσίδια συνδεδεμένα με ολιγοσακχαρίτες. Το νουκλεοσίδιο αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενωμένη στη θέση 1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοσιδικό δεσμό [Berg JM. et al, 2001]. Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο μιας αμίνης με ένα N-γλυκοσιδικό δεσμό. Ο συγκεκριμένος τρόπος γλυκοσιδικής σύνθεσης είναι συνήθης σε πολλά βασικά μακρομόρια, όπως νουκλεοτίδια, RNA και DNA. Οι N-γλυκοσιδικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου [Berg JM. et al, 2001] (Εικόνα 7).



Εικόνα 7 : Αδενοσίνη

Τα νουκλεοσίδια και τα ανάλογά τους έχουν μελετηθεί πολύ εντατικά ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες [Elion GB, 1989; Robins RK. et al, 1990; MacCoss M. et al; 1990]. Ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων φυσικών νουκλεοτιδίων χρησιμοποιείται επί πολλά έτη στην ιατρική για τη θεραπεία καρκινικών ασθενειών. Μία εκτενής μελέτη των αντικαρκινικών φαρμάκων που έχουν ήδη εγκριθεί από τη

Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA), έδειξε ότι τα νουκλεοσίδια απαρτίζουν μία σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών μέσων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι από τα εξήντα αντικαρκινικά μόρια που έχουν εγκριθεί μέχρι σήμερα από τον FDA, έντεκα είναι αντιμεταβολίτες και επιπλέον, δέκα από τα έντεκα είναι νουκλεοσίδια ή συγγενικά μόρια, τα οποία επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους. Για αυτό και δεν είναι τυχαίο το γεγονός, ότι το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία το 15% των αντικαρκινικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοσιδικά ανάλογα. Νουκλεοσιδικοί αντιμεταβολίτες, όπως οι 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC, Εικόνα 8) [Matsuda A.et al, 2004], 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC, Εικόνα 8), έχουν μελετηθεί ως προς τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και είναι αποτελεσματικές ενώσεις όχι μόνο ενάντια στη λευχαιμία και τα λεμφώματα, αλλά και σε κακοήθεις όγκους [Takenuki K.et al, 1988; Matsuda A.et al, 1991; Yamagani K.et al, 1991; Lin TS.et al, 1991; Baker CH.et al, 1991; Cory AH.et al, 1994].



Εικόνα 8 : Νουκλεοσιδικοί αντιμεταβολίτες

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα αποτελούν το θεμελιώδη λίθο και για την ανάπτυξη αντιικών παραγόντων [Perigaud C.et al, 1992; Zhou W. et al, 2004; Komiotis D.et al, 1991]. Το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία, το 55% των αντιικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοσιδικά ανάλογα. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός, ότι έξι από τα δεκαπέντε φάρμακα, τα οποία διατίθενται για τη θεραπεία του AIDS (AZT, ddC, ddI, d4T, 3TC και abacavir), είναι νουκλεοσιδικά ανάλογα (νουκλεοσίδια, αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης, NRTIs), μαζί με τρία μη – NRTIs (nevirapine, delavirdine και efavirenz), καθώς και έξι αναστολείς της πρωτεάσης (saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir και lopinavir). Μεταξύ των NRTIs, η 3TC είναι το φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται επίσης και για τη θεραπεία της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και είναι το μόνο που έχει εγκριθεί από τον FDA, εκτός από την ιντερφερόνη-α. Εννέα ακόμη νουκλεοσίδια (idoxuridine, trifluridine, acedurid, vidarabine, acyclovir, valaciclovir, ganciclovir, famciclovir και cidofovir) χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από ερπετοϊούς, όπως από τον ιό απλού έρπητα τύπου 1 (HSV-1) και τύπου 2 (HSV-2), τον κυτταρομεγαλοϊό (HCNV) και τον ιό έρπητα ζωστήρα (VZV) [Zhou W.et al, 2004].

1.2.1 Τρόπος δράσης των νουκλεοσιδίων

Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοσιδικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, είναι ότι μπορούν να τροποποιηθούν δομικά,

έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα [Pastor-Anglada M. et al, 1998].

Τα αντικαρκινικά και τα αντιικά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση [Arner ESJ. et al, 1995]. Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες – μεταφορείς νουκλεοσιδίων. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA.

Είναι γεγονός ότι τα φυσικά νουκλεοσίδια συντίθενται εντός των κυττάρων, αλλά είναι δυνατόν βέβαια, να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επίσης πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοτιδίων. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες γενετικού υλικού DNA και RNA.

Με βάση την παραπάνω αναφορά για παθητική διάχυση, χρησιμοποιήθηκε η παρούσα ιδιότητα για την εφαρμογή των νουκλεοσιδικών αναλόγων, μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοσιδίων, ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες για τη θεραπεία πληθώρας ασθενειών [Zhou W. et al, 2004].

Τα φάρμακα που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοσιδικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι δραστικά. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοσιδικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι δίαυλοι ιόντων, τα ένζυμα και τα μόρια μεταφορείς [Vender MD. et al, 2001].

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Οι ιικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντιικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντιικών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοσιδίων, τα αντιικά φάρμακα νουκλεοσιδίων ενσωματώνονται στο ιικό γονιδίωμα από τις ιικές πολυμεράσες, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιικού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού.

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ιικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι τα νουκλεοσιδικά ανάλογα ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα, εξαιρετη δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης.

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα στην πραγματικότητα είναι προφάρμακα, δεδομένου ότι πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5'- θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες για να μπορέσουν να δράσουν κι αυτό είναι το «κλειδί» στην επιλεκτικότητά τους. Η φωσφορυλίωση των αναλόγων νουκλεοσιδίων στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και ανταγωνίζονται με τα φυσικά νουκλεοτίδια για τη σύνθεση

νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοσιδίων ενδεχομένως έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντιική θεραπεία [Chong Y.et al, 2003].

1.2.2 Φουρανονουκλεοσίδια – Πυρανονουκλεοσίδια

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοσιδίων που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη και φέρουν τη β-διαμόρφωση. Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως συστατικά των νουκλεϊκών οξέων. Όλα τα νουκλεοσίδια στο DNA και RNA αποτελούνται από ένα D-πεντοφουρανικό σάκχαρο συνδεδεμένο με μία ετεροκυκλική νουκλεοβάση (πουρίνη ή πυριμιδίνη), μέσω ενός β-N-γλυκοσιδικού δεσμού [Saenger W, 1984; Blackburn GM.et al, 1996; Bloomfield VA.et al, 1999]. Όμως, ορισμένα προβλήματα που προέκυψαν από τη χρήση των φουρανονουκλεοσιδικών αναλόγων, όπως ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυματική απενεργοποίησή τους, η τοξικότητα, η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων και τέλος ο μικρός χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια ο χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντιικής δράσης νέων νουκλεοσιδικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μία εξόζη.

1.2.3 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με σάκχαρο μία εξόζη

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοσιδίων με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικών ενεργών νουκλεοσιδίων με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους. Παρόλα αυτά, νουκλεοσίδια με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές [Verheggen I.et al, 1993; Verheggen I.et al, 1995; Maurinsh Y.et al, 1997; Ostrowski T.et al, 1998], αντικαρκινικές [Antonakis K, 1989] και αντιβιοτικές τους ιδιότητες [Haouz A.et al, 2003], καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων [Vastmans K.et al, 2000; Vastmans K.et al, 2001].

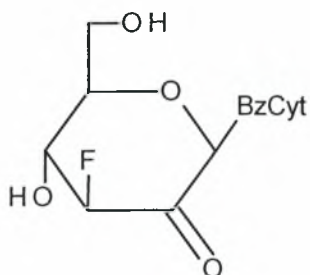
Η χρήση των νουκλεοσιδικών αναλόγων με σάκχαρο μία πεντόζη έδειξε ότι έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και ότι η δράση τους είναι λιγότερο αποτελεσματική απ' ό,τι τα νουκλεοσιδικά ανάλογα με σάκχαρο μία εξόζη. Έτσι λοιπόν άρχισαν να γίνονται έρευνες και μελέτες για την αντιική δράση των νουκλεοσιδίων που έχουν για σάκχαρο μία εξόζη.

Έρευνες έδειξαν ότι το μόριο του εξαμελούς δακτυλίου έχει μεγαλύτερη σταθερότητα λόγω της απουσίας τάσεων (διαμόρφωση ανάκλιντρου), έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και κατά συνέπεια και χρόνο δράσης. Αφενός η ικανότητα ενός τέτοιου μορίου να διαμορφώνεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα τέσσερα άτομα άνθρακα να βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο και αφετέρου κατάλληλη τροποποίηση του σακχάρου (δεοξυ-, αμινοδεοξυ-, ακόρεστο-, κετο-), προσομοιάζει τα παραπάνω μόρια με τις πεντόζες και τα μετατρέπει σε ευέλικτα μόρια ώστε να είναι εφικτή η χρήση τους ως συστατικά των RNA και DNA. Ο συνδυασμός των τροποποιήσεων στο μόριο του σακχάρου, έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση αποτελεσματικών φαρμάκων αναλόγων νουκλεοσιδίων με αντιική δράση [Antonakis K, 1989].

1.2.4 Κετονουκλεοσίδια

Μία ενδιαφέρουσα τάξη πυρανονουκλεοσιδικών αναλόγων αποτελούν τα κετο-πυρανονουκλεοσίδια, τα οποία περιλαμβάνουν μία κετονομάδα στο τμήμα του σακχάρου, ως αποτέλεσμα της οξείδωσης ενός ασύμμετρου ατόμου άνθρακα. Παρόλο που τα κετο-παράγωγα των πεντονουκλεοσιδίων, στις περισσότερες των περιπτώσεων, αποδείχθηκαν ασταθή, τα κετο-παράγωγα των πεντονουκλεοσιδίων με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έδωσαν το έναυσμα για τη μελέτη μιας νέας και ενδιαφέρουσας χημείας. Η διαθεσιμότητα αυτών των μορίων ήταν καθοριστική για τη βιολογική έρευνα, αφού άνοιξε νέους ορίζοντες προς τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των αντιβιοτικών, δεδομένου ότι όπως προαναφέρθηκε, τα κετο-πυρανονουκλεοσίδια αποτελούν απαραίτητα ενδιάμεσα στη βιοσύνθεση πολλών φυσικών νουκλεοσιδικών αντιβιοτικών προϊόντων [Antonakis K, 1989]. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα μόρια εμφανίζουν το πλεονέκτημα ότι οδηγούν σε σύνθετα νουκλεοσίδια μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος. Ειδικότερα, νουκλεοσίδια με διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου, καθώς και νουκλεοσίδια που φέρουν αμινοσάκχαρα, λήφθηκαν από τα κετονουκλεοσίδια με απευθείας πυρηνόφιλη προσθήκη [Antonakis K.et al, 1973; Halmos T.et al, 1975, Antonakis K, 1989]. Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα κετο-πυρανονουκλεοσίδια εμφανίζουν ενδιαφέρουσα αντικαρκινική και αντιική δράση [Antonakis K, 1975; Antonakis K, 1989; Komiotis D.et al, 1991; Khan AR. et al, 2001]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της τάξης των νουκλεοσιδίων βρέθηκε, ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων KB, όπως επίσης και την ανάπτυξη της λευχαιμίας L1210 στα ποντίκια [Antonakis K.et al, 1973].

Τα κετονουκλεοσίδια αποτελούν το κλειδί που μεσολαβεί σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες, πολλές από τις οποίες έχουν ως αποτέλεσμα αντιογκογονική δράση. Έχει βρεθεί ότι τα κετονουκλεοσίδια επιδεικνύουν αξιόλογη αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων [Antonakis K, 1989] (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: 1-(3-deoxy-3-fluoro-2-ulose-glycopyranose)-N⁴-benzoylcytosine
(κετονουκλεοσίδιο)

1.2.5 Ακόρεστα κετονουκλεοσίδια

Μία ασυνήθιστη κατηγορία νουκλεοσιδίων με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο αποτελούν τα ακόρεστα κετονουκλεοσίδια, τα οποία διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών και αντιικών ιδιοτήτων. Στα συγκεκριμένα νουκλεοσιδικά ανάλογα ο δακτύλιος του σακχάρου περιλαμβάνει ένα διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα σε α,β-θέση ως προς την κετο-ομάδα. Τα ακόρεστα κετονουκλεοσίδια έχουν καθιερωθεί για την αντινεοπλασματική δραστηριότητα και τα ανοσοκατασταλτικά τους χαρακτηριστικά [Antonakis K.et al, 1974; Chouroulinkov I.et al, 1977; Antonakis K.et al, 1980; Komiotis D.et al, 1991]. Αποδείχτηκε ότι όχι μόνο παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro* [Antonakis K.et al, 1974; Halmos T.et al, 1983] και της λευχαιμίας L1210 *in vivo* [Chouroulinkov I.et al, 1977; Antonakis K.et al, 1980], αλλά επίσης ότι αποτελούν και σημαντικά συνθετικά ενδιάμεσα στον τομέα των νουκλεοσιδίων, λόγω της χημικής τους σταθερότητας στα διάφορα μέσα [Antonakis K, 1975]. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αυτών των νουκλεοσιδίων, αποτελούν οι ενώσεις της Εικόνας 10.

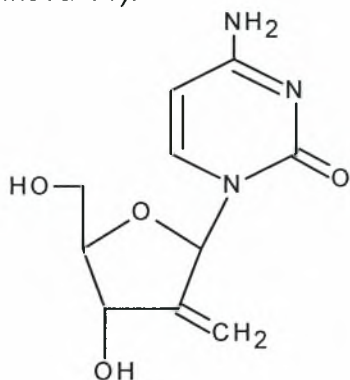


Εικόνα 10: Ακόρεστα κετονουκλεοσίδια

Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για να προσδιοριστεί η σχέση δομής-δράσης των ακόρεστων κετονουκλεοσιδίων, απέδειξαν ότι μοναδική δομική απαίτηση για την εμφάνιση της αντικαρκινικής τους δράσης αποτελεί η ύπαρξη του ηλεκτρονιόφιλου C=C-C=O συστήματος στο τμήμα του σακχάρου [Alaoui M.et al, 1986]. Επιπλέον, η δράση αυτή εμφανίστηκε να είναι ανεξάρτητη από την ανωμερική διαμόρφωση, την αξονική ή ισημερινή θέση της βάσης και τέλος την L ή D διάταξη του σακχάρου. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης αυτών των ενώσεων δεν είναι σαφής, φαίνεται ότι παρεμποδίζουν τη σύνθεση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών [Antonakis K, 1975] και ότι αντιδρούν με τις πρωτεϊνικές ομάδες σουλφυδρυλίου [Halmos T.et al, 1983]. Μία άλλη σημαντική παράμετρος που συνεισφέρει στη βιολογική σπουδαιότητα των ανωτέρω μορίων αποτελεί η ύπαρξη του διπλού δεσμού στο τμήμα του σακχάρου, ο οποίος προκαλεί ακαμψία στο δακτύλιο, όμοια με αυτή ενός φουρανονουκλεοσιδίου, με αποτέλεσμα να μπορούν να θεωρηθούν ως (βιο)ισοστερή των φυσικών νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων [Herdewijn P. et al, 2001].

1.2.6 Νουκλεοσίδια με εξωκυκλικό μεθυλένιο

Τα νουκλεοσίδια με εξωκυκλικό μεθυλένιο είναι μία ομάδα αναλόγων νουκλεοσιδίων που προκύπτουν από την αντικατάσταση μίας καρβονυλικής ομάδας από ένα εξωκυκλικό μεθυλένιο (Εικόνα 11). Η αντικατάσταση αυτή δεν επηρεάζει σημαντικά το μέγεθος ή το σχήμα του μορίου, ενώ το καθιστά πιο σταθερό και αποτελεσματικό στη δράση του. Βάσει μελετών, έχει αποδειχθεί ότι αυτού του είδους τα νουκλεοσίδια επιδεικνύουν ισχυρή αντιική δραστηριότητα καθώς επίσης και αντικαρκινική. Ακόμη είναι σημαντική η ύπαρξη του εξωμεθυλενίου για την εκδήλωση της συγκεκριμένης αντιικής δράσης [Jeong LS.et al, 1998; Yoo SJ.et al, 2002; Gunaga P.et al, 2004] (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Νουκλεοσίδιο με εξωκυκλικό μεθυλένιο (DMDC)

1.3 ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

1.3.1 Ελεύθερες ρίζες

Με τον όρο ελεύθερες ρίζες ορίζονται τα μόρια τα οποία περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στο ατομικό ή μοριακό τροχιακό [Halliwell B, 2001]. Αυτά τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια συνήθως δίνουν μία υψηλή δραστικότητα στις ελεύθερες ρίζες. Οι ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο αντιπροσωπεύουν την σημαντικότερη τάξη ελευθέρων ριζών που παράγονται στους ζωντανούς οργανισμούς [Valko M. et al., 2004].

Με τον όρο ROS (Reactive Oxygen Species) περιλαμβάνονται σχεδόν όλες οι ελεύθερες ρίζες (Πίνακας 1). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) χωρίζονται:

- στις ρίζες που έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο στις οποίες ανήκουν η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) (superoxide radical), του υδροξυλίου (OH^{\bullet}) (hydroxyl radical), και οι ρίζες περοξυλίου (ROO^{\bullet}) (peroxyl radicals)
- στις λεγόμενες μη ρίζες οι οποίες έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο και στις οποίες ανήκουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και η μονήρης κατάσταση του οξυγόνου (1O_2).

Άλλες ελεύθερες ρίζες είναι κάποιες δραστικές μορφές αζώτου όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\bullet}) και το διοξειδίο του αζώτου (NO_2^{\bullet})(Πίνακας 1).

Πίνακας 1 : Ελεύθερες ρίζες (Reactive species)

Reactive Oxygen Species (ROS)

Radicals

Superoxide, $O_2^{\bullet-}$
Hydroxyl, OH^{\bullet}
Peroxyl, ROO^{\bullet}
Alkoxyl, RO^{\bullet}
Hydroperoxyl HOO^{\bullet}

Nonradicals

Hydrogen peroxide, H_2O_2
Hypochlorous acid, $HOCl$
Hypobromous acid, $HOBr$
Ozone, O_3
Singlet oxygen 1O_2

Reactive Nitrogen Species (RNS)

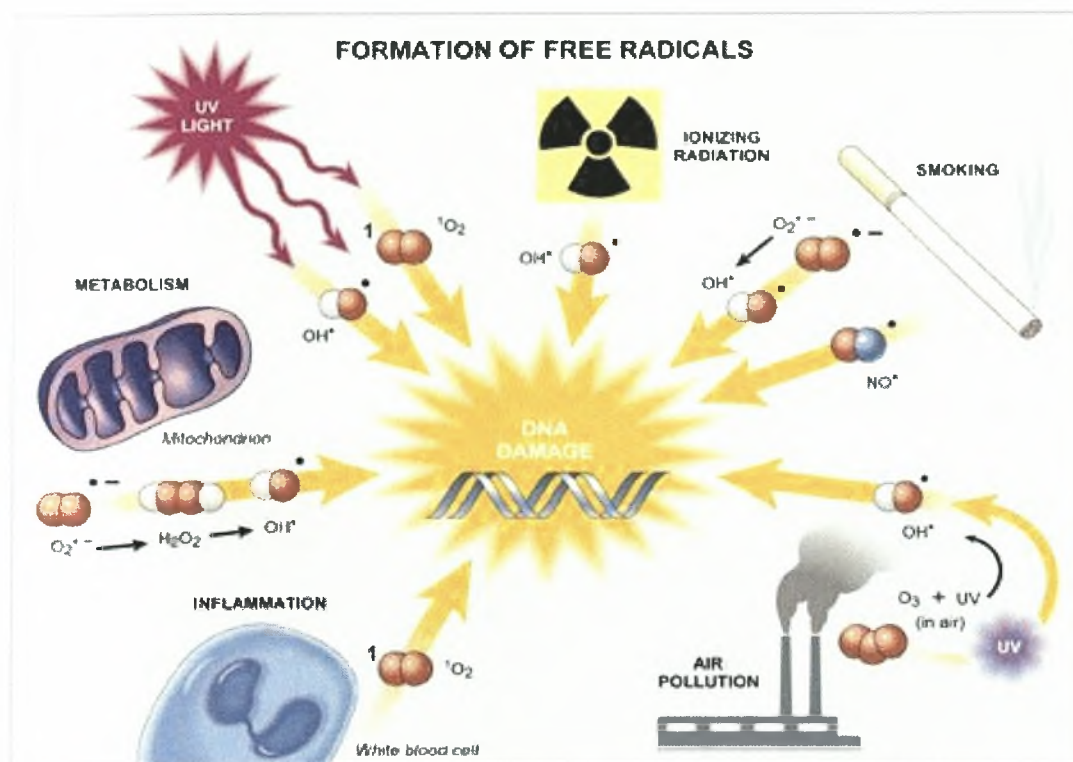
Radicals

Nitric oxide, NO^{\bullet}
Nitrogen dioxide, NO_2^{\bullet}

Nonradicals

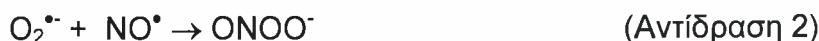
Nitrous acid, HNO_2
Nitrosyl cation, NO^+
Nitroxyl anion, NO^-
Dinitrogen tetroxide, N_2O_4
Dinitrogen trioxide, N_2O_3
Peroxynitrite, $ONOO^-$
Peroxynitrous acid, $ONOOH$
Nitronium (nitryl) cation, NO_2^+
Alkyl peroxynitrites, $ROONO$

Οι διάφορες ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε αρκετά χημικά και βιολογικά συστήματα, όπως κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, παλαίωσης των χρωμάτων, καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό [Halliwell B, 2001]. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν κατά την αναπνευστική αλυσίδα, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, κατά τη λιπιδική οξειδωση, από την ακτινοβολία, τη φλεγμονή, το κάπνισμα και από την μολυσμένη ατμόσφαιρα. (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν μεταξύ τους, αλλά και με βιολογικά ενεργά μακρομόρια, όπως τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οι ελεύθερες ρίζες οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας, η οποία συνήθως είναι λιγότερο δραστήρια σε σχέση με τα αντιδρώντα. Παρόλα αυτά σε ορισμένες περιπτώσεις, η παραγομένη ένωση είναι πιο δραστήρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα για την πρώτη περίπτωση αποτελεί η αντίδραση ανάμεσα σε δύο άτομα υδρογόνου, που οδηγούν στο σχηματισμό του διατομικού υδρογόνου (Αντίδραση 1), ενώ για τη δεύτερη περίπτωση η αντίδραση της ρίζας του σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet -}$ με τη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου NO^{\bullet} που οδηγούν στο σχηματισμό του περοξυνιτρίτη $ONOO^-$ (Αντίδραση 2), ο οποίος είναι δραστικότερος των δύο ελευθέρων ριζών που οδήγησαν στην παραγωγή του.



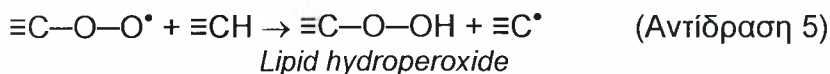
Όταν μία ελεύθερη ρίζα αντιδρά με μία μη ρίζα, μία νέα ελεύθερη ρίζα παράγεται. Για παράδειγμα, η πολύ δραστήρια ρίζα OH^{\bullet} αντιδρά με υδρογονάνθρακες (περιλαμβάνονται τα λιπαρά οξέα – συστατικά των μεμβρανικών λιπιδίων) προς σχηματισμό H^{\bullet} και παράγει μία ρίζα με κεντρικό άτομο C, σύμφωνα με την αντίδραση 3



Αυτή η διαδικασία μπορεί να ξεκινήσει την αλυσιδωτή αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Μία ενεργή ελεύθερη ρίζα, όπως η OH^\bullet αποσπά υδρογόνο από ένα λιπαρό οξύ, όπως φαίνεται παραπάνω. Η παραμένουσα ρίζα με κεντρικό άτομο C αντιδρά με το οξυγόνο (Αντίδραση 4)

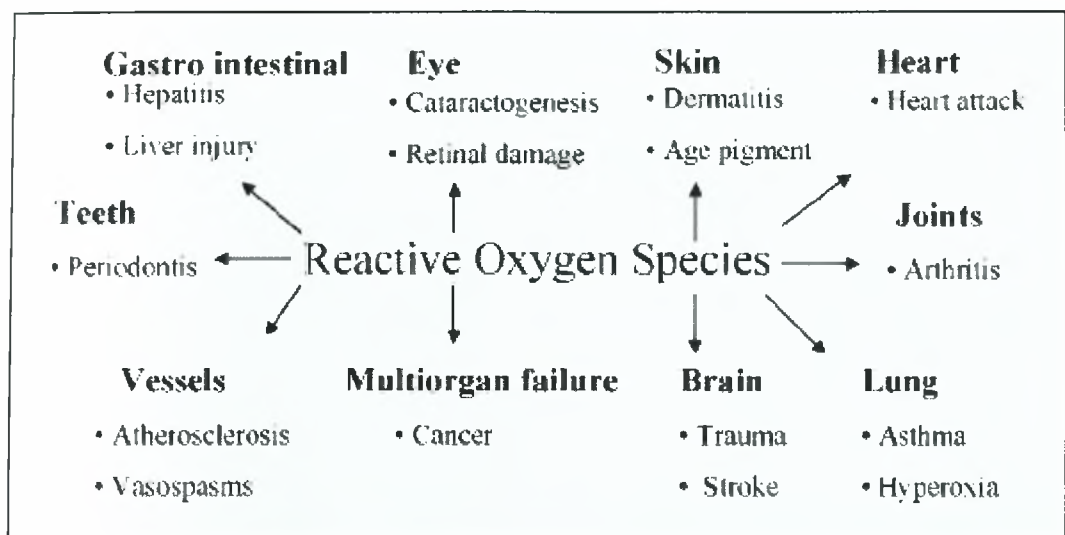


Οι περόξυ – ρίζες προσβάλλουν τις πρωτεΐνες των μεμβρανών, και μπορούν επίσης να προσβάλλουν και γειτονικές αλυσίδες λιπαρών οξέων (Αντίδραση 5).



Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με βιολογικά παραγόμενα μόρια, είναι δυνατόν να δημιουργηθούν νέες ρίζες, οι οποίες στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσουν και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η αλυσιδωτή αυτή διαδικασία μπορεί να επαναλαμβάνεται, καταλήγοντας σε επιβλαβείς συνέπειες για τον οργανισμό. Οι ελεύθερες ρίζες είναι δυνατό να αντιδράσουν με πρωτεΐνες και να τις μετουσιώσουν. Επιπλέον, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες πρόκλησης βλαβών στο DNA οδηγώντας στη δημιουργία μεταλλάξεων. Τέλος, είναι δυνατό να αντιδράσουν με τα λιπίδια και αφού τα οξειδώσουν, καταστρέφουν με αυτό τον τρόπο τη δομή των μεμβρανών. [Halliwell B, 2001; Mylonas and Kouretas, 1999].

Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού των κυττάρων. Έχει υπολογιστεί ότι κατά μέσο όρο παράγονται 10000 – 20000 ελεύθερες ρίζες σε ένα σωματικό κύτταρο για μία μέρα σε έναν άνθρωπο. Για έναν αθλητή, αυτό το ποσό μπορεί να αυξηθεί έως και 50%. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ειδικά να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ, σε άλλες περιπτώσεις, αυτές παράγονται σαν παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών. Παρά το ότι το κύτταρο διαθέτει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας για να εξουδετερώσει τη ζημιά από τις ελεύθερες ρίζες, αυτές σχετίζονται με βλάβες στο DNA και τις πρωτεΐνες και είναι υπεύθυνες για πολλές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, η αρτηριοσκλήρυνση, η αρθρίτιδα κ.ά. Όλες οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με κυτταρικά στοιχεία και ιδιαίτερα με τις βάσεις του DNA ή το σκελετό του DNA και να προκαλούν αλλαγή στις βάσεις ή σπασίματα στις νουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ενεργές μορφές οξυγόνου μπορούν επίσης να οξειδώσουν τα λιπίδια ή τις πρωτεΐνες και να προκαλέσουν βλάβες στο DNA. Τέτοιες οξειδώσεις στο DNA μπορεί να είναι προκαρκινικές και η οξειδωτική βλάβη προτίθεται να παίξει ένα ρόλο στην ανάπτυξη διάφορων μορφών καρκίνου [Valko M. et al, 2004]. Στην Εικόνα 13 παρατίθενται μερικές κλινικές καταστάσεις στις οποίες εμπλέκονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου [Lee J. et al, 2003].



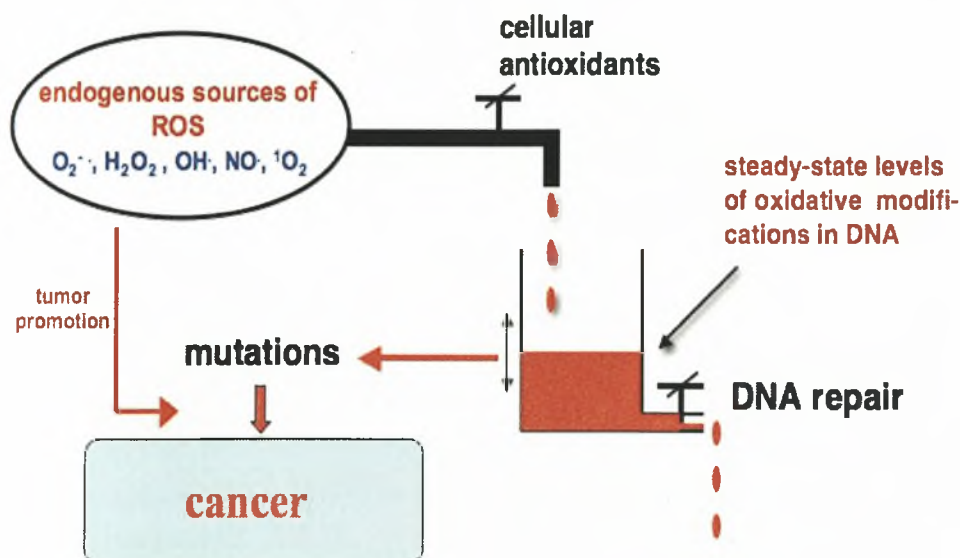
Εικόνα 13: Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται οι ROS

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι μία συνέπεια της αερόβιας διεργασίας. Οι ελεύθερες ρίζες είναι επιβλαβείς για το DNA και η επίδρασή τους αυτή μπορεί, είτε να ενισχυθεί, είτε να μειωθεί από διατροφικούς, ορμονικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Προς το παρόν, δεν είναι γνωστός ο ακριβής ρόλος που παίζουν οι ελεύθερες ρίζες στην καρκινογένεση και ο συνεργιστικός τους ρόλος με άλλους τύπους γενετικών συμβάντων που επιταχύνουν το μετασχηματισμό των κυττάρων και την πρόοδο των κακοήθων όγκων. Πάντως, είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να συμμετέχει στην έναρξη του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Η επίδραση του οξειδωτικού στρες στην καρκινογένεση έχει άμεση σχέση με τον τύπο και την ικανότητα αντίδρασης των ελευθέρων ριζών [Valko M. et al, 2004].

Κατά τη διάρκεια της θεραπείας κακοήθων όγκων είναι επιθυμητό οι παράγοντες που προσβάλλουν επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα να μην προκαλούν επιζήμιες επιδράσεις στα φυσιολογικά κύτταρα. Αλλά, αυτό συνήθως είναι κατορθωτό με τα πρόσφατα διαθέσιμα φάρμακα και την ακτινοβολία. Ιονισμένη ακτινοβολία και ορισμένα φάρμακα, όπως οι ανθρακυκλίνες και η μπλεομυκίνη, παράγουν ελεύθερες ρίζες, κι εκεί οφείλουν την αντικαρκινική τους δράση. Από την άλλη μεριά οι ελεύθερες ρίζες είναι υπεύθυνες για «παράπλευρες απώλειες» και σχετίζονται με αυτούς τους παράγοντες. Έτσι, και η ακτινοβολία και οι ανθρακυκλίνες μπορούν να επάγουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών και στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα.

Υπάρχει μία στενή σχέση μεταξύ ελευθέρων ριζών, λιπιδικής υπεροξειδωσής και απόπτωσης (Εικόνα 14). Σε γενικές γραμμές, τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να έχουν σχετικά περισσότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μικρότερους ρυθμούς λιπιδικής υπεροξειδωσής, πράγμα που ευνοεί τον πολλαπλασιασμό τους. Η άποψη, ότι το σύστημα των ελευθέρων ριζών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να «σκοτώσει» τα καρκινικά κύτταρα επιλεκτικά, δεν είναι αντίθετη με την πεποίθηση ότι οι ελεύθερες ρίζες καταστρέφουν το DNA κι έτσι συμμετέχουν στη μεταλλαξιγένεση και την καρκινογένεση. Φαίνεται σαν οι επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα να είναι εκ διαμέτρου αντίθετες. Όταν οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν φυσιολογικά κύτταρα, μπορεί να συμβεί βλάβη στο DNA, η οποία οδηγεί σε ανάπτυξη των όγκων, ενώ, όταν οι ίδιες ελεύθερες ρίζες παράγονται υπερβολικά στα καρκινικά κύτταρα, συμβαίνει να έχουν απροσδόκητα πολύ

ευεργετική δράση, η οποία οδηγεί συγκεκριμένα στην εξόντωση αυτών των κυττάρων [Undurti N. Das, 2002].



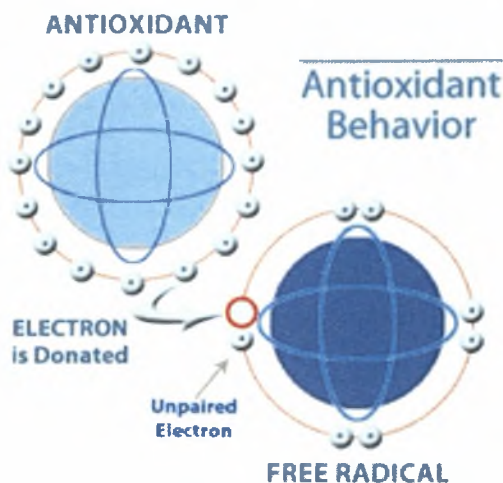
Εικόνα 14: Συσχέτιση των ελευθέρων ριζών με τον καρκίνο.

1.3.2 Αντιοξειδωτικά συστήματα άμυνας

Τα αντιοξειδωτικά συστήματα άμυνας δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και ελαχιστοποιούν το σχηματισμό τους, αλλά δεν είναι 100% αποτελεσματικά. Βλάβες στο DNA από τις OH^{\cdot} προκαλούνται σε όλα τα αερόβια κύτταρα και μάλιστα είναι ένας σημαντικός συντελεστής ανάπτυξης του καρκίνου. Το αντιοξειδωτικό κύκλωμα είναι σύνθετο. Στο υγιές ανθρώπινο σώμα, υπάρχει μία παραπλήσια ισορροπία μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας.

1.3.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος [Halliwell B, 2001]. Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους, είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών [Scalbert A. et al, 2005]. Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και έτσι εμποδίζουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα [Halliwell B, 2001] (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού

Ρόλος των αντιοξειδωτικών

1. Προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου [Halliwell B, 2001].
2. Δρουν καρδιοπροστατευτικά, αυξάνοντας την ανθεκτικότητα των αγγείων, περιορίζοντας τους φλεγμονώδεις παράγοντες, αποτρέποντας την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και συμβάλλοντας στον έλεγχο των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης [Halliwell B, 2001].
3. Ασκούν αντικαρκινική δράση, μπλοκάροντας ή εμποδίζοντας την προσκόλληση επικίνδυνων ενζύμων στους ιστούς, αδρανοποιώντας καρκινογόνες ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις σε υγιή κύτταρα και επιβραδύνοντας τους μηχανισμούς καρκινογένεσης [Valko M. et al, 2004].
4. Βελτιώνουν τις πνευματικές ικανότητες και την ψυχική διάθεση, προστατεύοντας τους νευροδιαβιβαστές από την οξείδωση και βελτιώνοντας την εγκεφαλική μικροκυκλοφορία [Undurti ND, 2002].
5. Διατηρούν το δέρμα ελαστικό και το προφυλάσσουν από την πρόωρη γήρανση, περιορίζοντας τη διάσπαση του κολλαγόνου [Halliwell B, 2001].
6. Προστατεύουν οστά και αρθρώσεις, περιορίζοντας οιδήματα, φλεγμονές κι εκφυλιστικές αλλοιώσεις [Halliwell B, 2001].
7. Βελτιώνουν τη λειτουργική κατάσταση του αμφιβληστροειδούς χιτώνα των ματιών κι ενισχύουν την όραση [Halliwell B, 2001].
8. Δρουν αντιαλλεργικά σε μεγάλο φάσμα αλλεργιών [Halliwell B, 2001].
9. Διαφυλάσσουν τα αποθέματα άλλων απαραίτητων θρεπτικών ουσιών στον οργανισμό, αποτρέποντας την καταστροφή τους και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ενισχύοντας τη δράση τους [Undurti ND, 2002].

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και μη. Στους ενζυμικούς ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνοντας την παραγωγή τους. Τα πιο σημαντικά, αυτής της κατηγορίας είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και η καταλάση. Οι αντιδράσεις που καταλύουν τα ένζυμα αυτά φαίνονται στον Πίνακα 2 [Blokhina O. et al, 2003].

Πίνακας 2: Τα κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες.

Ένζυμο	Αντίδραση που καταλύει
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	$2\text{O}_2^{\bullet -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHP _x)	$\text{GSH}^1 + \text{R}^{\bullet} \rightarrow \text{GSSG} + \text{R}$
Ρεδουκτάση της γλουταθειόνης	$\text{NADPH} + \text{GSSG}^2 \rightleftharpoons \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$
Καταλάση	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$

¹GSH: ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης; ²GSSG: οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης

Στους μη ενζυμικούς ανήκουν κάποιες πρωτεΐνες, βιταμίνες (ασκορβικό οξύ, βιταμίνη Ε), λιπίδια, μέταλλα και ουσίες όπως οι πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι οι διάφορες πολυφαινόλες στηρίζουν την αντιοξειδωτική τους δράση στις φαινολικές τους ομάδες, οι οποίες λειτουργούν σαν δέκτες ηλεκτρονίων για να σχηματίσουν σταθερές φαινοξυλικές ρίζες, σταματώντας με αυτό τον τρόπο τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης των πολυφαινολών περιλαμβάνουν και την ικανότητά τους να δρουν σαν δότες υδρογόνου και να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα, όπως ο Fe, ο οποίος δρα ως συμπαραάγοντας στο σχηματισμό των ελευθέρων ριζών [Scalbert A.et al, 2005].

1.3.4 Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες υποδηλώνει τη σοβαρή ανισορροπία μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικής άμυνας. Σε γενικές γραμμές, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από:

1. Μειωμένα αντιοξειδωτικά, π.χ. μεταλλάξεις που καταστρέφουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα άμυνας (όπως τα CuZnSOD, MnSOD και GSHP_x) ή τοξικοί παράγοντες, οι οποίοι μειώνουν τέτοιες άμυνες. Για παράδειγμα, πολλά ξеноβιοτικά μεταβολίζονται με σύζευξη με GSH. Υψηλές δόσεις μπορούν να μειώσουν τη GSH και να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες ακόμη και αν το ξеноβιοτικό δεν είναι το ίδιο μία πηγή ελευθέρων ριζών. Μειώσεις των διαιτητικών αντιοξειδωτικών και άλλων βασικών διαιτητικών συστατικών μπορούν να οδηγήσουν επίσης σε οξειδωτικό στρες.
2. Αυξημένη παραγωγή των ROS/RNS, π.χ. με έκθεση σε αυξημένα επίπεδα τοξινών, οι οποίες από μόνες τους είναι ελεύθερες ρίζες (αέριο NO₂•) ή μεταβολίζονται γενικώς σε τέτοιες ρίζες, ή με ενεργοποίηση των «φυσικών» συστημάτων παραγωγής ROS/RNS (π.χ. ακατάλληλη ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων σε χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα και ελκώδη κολίτιδα) [Halliwell B, 2001].

Συνέπειες του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε:

1. Προσαρμογή με απορρύθμιση των αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας
2. Βλάβες σε όλους τους μοριακούς στόχους (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια)
3. Κυτταρικό θάνατο (νέκρωση και απόπτωση)

Το οξειδωτικό στρες ευθύνεται σχεδόν για όλες τις εκφυλιστικές παθήσεις, καθώς και την πρόωρη γήρανση. Με τις οξειδώσεις που δημιουργούν οι παραπάνω παράγοντες (εξαιτίας των αυξημένων επιπέδων των ελευθέρων ριζών) επέρχονται αλλοιώσεις στην κυτταρική μεμβράνη και σε άλλα δομικά συστατικά του κυττάρου. Έτσι, προσβάλλονται διάφορα βιομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, σάκχαρα, DNA κ.ά.) από τις ελεύθερες ρίζες, προκαλώντας οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων, δυσλειτουργία των μεμβρανών, τροποποίηση πρωτεϊνών, απενεργοποίηση ενζύμων και σχάση ή τροποποίηση των βάσεων του DNA. Αυτό έχει σαν συνέπεια πρόωρη γήρανση και μία σειρά παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών, όπως καρκίνο, καρδιαγγειακές παθήσεις, ρευματικά νοσήματα, αρθρίτιδες, καταρράκτη, γεροντική άνοια, Alzheimer, νόσο του Parkinson, διαβήτη, αλλεργίες, άσθμα, παχυσαρκία, ηπατοπάθειες, λοιμώξεις και φλεγμονές, σχιζοφρένεια, κατάθλιψη κ.ά. [Halliwell B, 2001].

1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ – ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Έρευνες των τελευταίων ετών έδειξαν ότι:

- Νουκλεοσιδικά ανάλογα με εξαμελή δακτύλιο σακχάρου έχουν επιδείξει σημαντική αντιική και αντιβιοτική δράση. Αυτό συμβαίνει, επειδή έχουν μεγαλύτερη σταθερότητα λόγω της απουσίας τάσεων, βάσει της διαμόρφωσης ανάκλιντρου, καθώς επίσης έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και κατά συνέπεια και χρόνο δράσης. Το γεγονός αυτό έκανε ιδιαίτερα ελκυστική την παραγωγή πυρανονουκλεοσιδίων.
- Η ύπαρξη κετο-ομάδας στο τμήμα του σακχάρου ενός τροποποιημένου νουκλεοσιδίου, ως αποτέλεσμα της οξειδωσης του ασύμμετρου ατόμου του άνθρακα, είναι σημαντική για την εκδήλωση αντικαρκινικής ή αντιικής δράσης. Ουσιαστικά λόγω της οξειδωσης δημιουργείται θέση δεκτική σε πυρηνόφιλη προσβολή. Τα κετονουκλεοσιδία επιδεικνύουν αξιόλογη αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης αποτελούν το κλειδί που μεσολαβεί σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες, πολλές από τις οποίες έχουν ως αποτέλεσμα αντιογκογονική δράση.
- Νουκλεοσιδικά ανάλογα που περιέχουν εξωκυκλικό μεθυλένιο, επέδειξαν εξαιρετική αντικαρκινική και αντιική δράση. Η αντικατάσταση μίας κετονομάδας από ένα εξωμεθυλένιο δε μεταβάλλει σημαντικά το μέγεθος ή το σχήμα του μορίου, αλλά ενισχύει τη δράση του.
- Φθοριωμένα πυρανο-νουκλεοσιδικά ανάλογα, άλλα με ύπαρξη κετο-ομάδας και άλλα με συνδυασμό κετο-ομάδας με διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση. Ελάχιστες έρευνες έχουν γίνει για να βρεθεί αν τα παραπάνω νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι και αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα, η μόνη έρευνα στο ίδιο θέμα, έχει γίνει πάλι από το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και αφορά την αντιοξειδωτική δράση μιας σειράς από φθοριωμένα πυροανο-νουκλεοσιδικά ανάλογα της N^4 -benzoyl cytosine και N^6 -benzoyl adenine [Spanou C. et al, 2007].

Βασιζόμενοι, λοιπόν, στα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε πολύ σημαντική :

α) η σύνθεση πυρανονουκλεοσιδίων που έχουν ουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση και κετο-ομάδα ή εξωμεθυλένιο στη θέση 4 του σακχάρου (μαννόζης). Αυτά τα νουκλεοσιδικά ανάλογα παρουσιάζουν σημαντική αντικαρκινική και αντιική δράση [Agelis G. et al, 2008].

β) η μελέτη πυρανονουκλεοσιδίων που έχουν θυμίνη ως ετεροκυκλική βάση και κετο-ομάδα ή εξωμεθυλένιο στη θέση 2 του σακχάρου (γαλακτόζης). Αυτά τα νουκλεοσιδικά ανάλογα παρουσιάζουν σημαντική αντικαρκινική και αντιική δράση [Agelis G. et al, 2007].

γ) η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης και των δύο κατηγοριών νουκλεοσιδικών αναλόγων μέσω της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με μια σταθερή ρίζα ($DPPH^{\bullet}$) και μέσω αναστολής τοξικής δράσης ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των περόξυ ριζών (ROO^{\bullet}) στο DNA.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ραγδαία ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας σε συνδυασμό με τις ανακαλύψεις που έγιναν σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία του γενετικού υλικού των οργανισμών, επέτρεψαν τη σύνθεση, μελέτη, εφαρμογή και προώθηση στην αγορά πληθώρας φαρμάκων που ως δραστική ουσία περιέχουν κάποιο νουκλεοσιδικό ανάλογο. Τα αντιβακτηριδιακά, αντιικά και αντιογκογονικά φάρμακα περιλαμβάνονται μεταξύ των πιο σημαντικών θεραπευτικών ανακαλύψεων του εικοστού αιώνα και έχουν αλλάξει τη θεραπευτική αγωγή πολλών ασθενειών, μειώνοντας τη θνησιμότητα.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας φαίνεται ότι ελάχιστες έρευνες έχουν γίνει για να βρεθεί αν τα ίδια νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι και αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα, η μόνη έρευνα στο ίδιο θέμα, έχει γίνει πάλι από το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και αφορά την αντιοξειδωτική δράση μιας σειράς από φθοριωμένα πυρανο-νουκλεοσιδικά ανάλογα [Spanou C. et al, 2007].

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

- η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοσιδίων και συγκεκριμένα κετονουκλεοσιδίων καθώς επίσης και νουκλεοσιδίων με εξωκυκλικό μεθυλένιο της γαλακτόζης και της μαννόζης, και
- η μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Υλικά Σύνθεσης των Νουκλεοσιδικών αναλόγων

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των 3 νουκλεοσιδικών αναλόγων ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

- D-mannose (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac-Ισπανία)
- Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) (Aldrich, Γερμανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) (Merck, Γερμανία)
- Οξινο θειικό νάτριο (NaHSO_4) (Merck, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate (NaHCO_3) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο magnesium sulphate (MgSO_4) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) (Merck, Γερμανία)
- Sodium thiosulfate (Merck, Γερμανία)
- Ουρακίλη (Sigma, Γερμανία)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane-sulfonate ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- 2,2- dimethoxypropane (Aldrich, Γερμανία)
- p-toluenesulfonic acid monohydrate (Aldrich, Γερμανία)
- Διάλυμα formic acid (Panreac-Ισπανία)
- Imidazole (Fluca, Γερμανία)
- Ph_3P (Fluca, Γερμανία)
- Iodoform (Aldrich, Γερμανία)
- Triphenylmethyl chloride (Aldrich, Γερμανία)
- Καταλύτης 4-dimethylaminopyridine (Acros Organics, Η.Π.Α.)
- PDC (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Methyl triphenyl-phosphonium bromide (Aldrich, Γερμανία)
- Υδρίδιο του νατρίου (NaH) (Fluca, Γερμανία)

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ (TLC:Thin Layer Chromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχονται με χρωματογραφία χάρτου, με πλάκες Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₅₄). Τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με διάλυμα θειικού οξέος 30% ή με ανίχνευση από ακτινοβολία UV (254nm). Τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Διάλυμα	A :	οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 6/4
Διάλυμα	B :	οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 8/2
Διάλυμα	Γ :	οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8/2
Διάλυμα	Δ :	οξικός αιθυλεστέρας
Διάλυμα	E :	οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 7/3
Διάλυμα	ΣΤ :	οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 9/1
Διάλυμα	Z :	οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 9.5/0.5
Διάλυμα	H :	οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 5/5

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Η χρωματογραφία στήλης επιτεύχθηκε με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση σε silica gel (Merck grade) (flash chromatography) και οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

Διάλυμα Θ :	οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 7/3
Διάλυμα Ι :	οξικός αιθυλεστέρας/ μεθανόλη 8/2
Διάλυμα Κ :	οξικός αιθυλεστέρας
Διάλυμα Λ :	οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 6/4
Διάλυμα Μ :	οξικός αιθυλεστέρας/ μεθανόλη 9/1
Διάλυμα Ν :	οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 5/5

ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Οι αντιδράσεις που περιλάμβαναν άνυδρους διαλύτες ή ουσίες ευαίσθητες στην ατμόσφαιρα έλαβαν χώρα κάτω από αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου.

Το διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου (P_2O_5) και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4A^0 , όπου και αποθηκεύτηκε. Το ακετονιτρίλιο (CH_3CN), το τολουόλιο (Tol) και το dimethylformamide (DMF) αποστάχθηκαν παρουσία υδριδίου του ασβεστίου και τα απόσταγματα συλλέχθηκαν σε φιάλες με μοριακά κόσκινα 4A^0 , όπου και αποθηκεύτηκαν. Το Tetrahydrofuran (THF) αποστάχθηκε από νάτριο/βενζοφαινόνη, αμέσως πριν από τη χρήση. Τέλος, η πυριδίνη αποθηκεύτηκε σε φιάλη με σφαιρίδια KOH (pellets).

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με Bruker 250 MHz.

Επίσης χρησιμοποιήθηκε φασματομετρία μάζας (Mass spectra). Τα φάσματα μετρήθηκαν με Micromass Platform LC (ESI-MS).

2.1.2 Πλασμιδιακό DNA

Πλασμίδιο Bluescript SK-(+), το οποίο απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα.

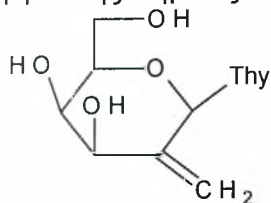
2.1.3 Χημικά αντιδραστήρια μεθόδων εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης των νουκλεοσιδικών αναλόγων

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις μεθόδους εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

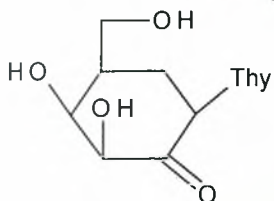
- 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) (Sigma-Aldrich- St Louis, MO, USA)
- Μεθανόλη (MeOH) (Merck-Γερμανία)
- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)
- Γλυκερόλη (Glycerol) (Panreac-Ισπανία)
- Tris-HCl (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Panreac-Ισπανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)
- Αγαρόζη (agarose) (Seakem-H.Π.Α)
- Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics-H.Π.Α)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl) (Merck-Γερμανία)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) (Merck-Γερμανία)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄) (Merck-Γερμανία)

2.1.4 Νουκλεοσιδικά Ανάλογα

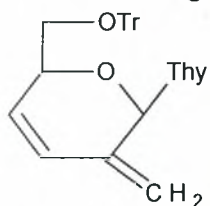
Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα (προϊόντα) παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω:



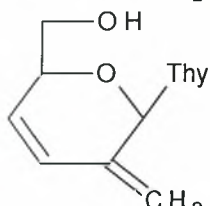
Προϊόν 1



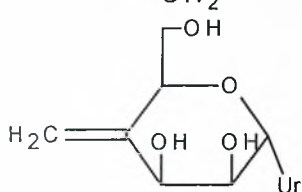
Προϊόν 2



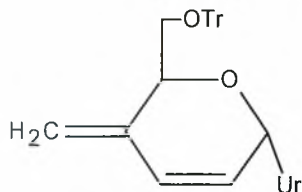
Προϊόν 3



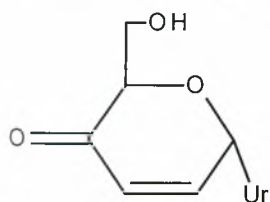
Προϊόν 4



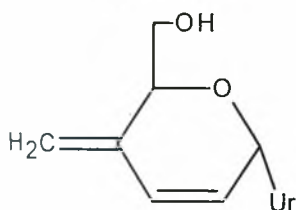
Προϊόν 5



Προϊόν 6

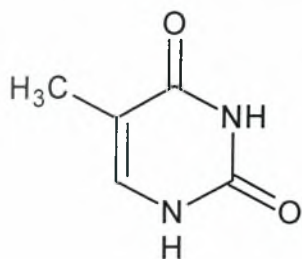


Προϊόν 7

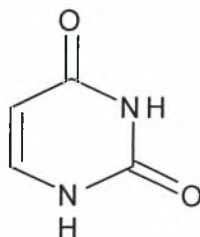


Προϊόν 8

όπου



Thy (Θυμίνη)



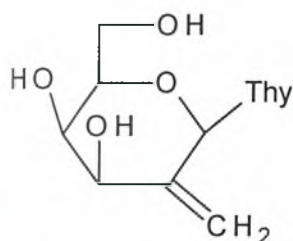
Ur (Ουρακίλη)

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

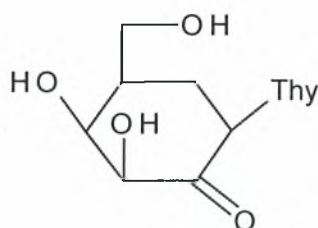
2.2.1 Σύνθεση προϊόντων

2.2.1.1 Σύνθεση προϊόντων με βάση τη θυμίνη (Thy)

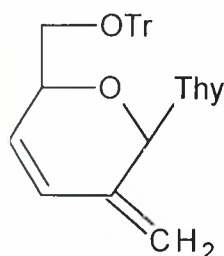
Με πρώτη ύλη την εμπορικά διαθέσιμη D-γαλακτόζη παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο της Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τα παρακάτω τέσσερα νουκλεοσιδικά ανάλογα της θυμίνης [Agelis G. et al, 2007] (Σχήμα 1).



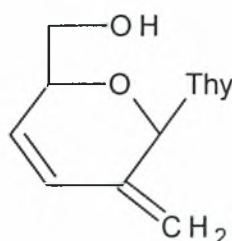
Προϊόν 1



Προϊόν 2



Προϊόν 3

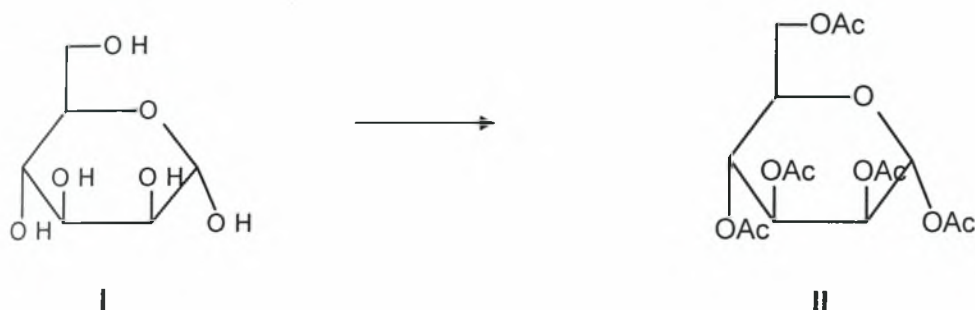


Προϊόν 4

Σχήμα 1: Νουκλεοσιδικά ανάλογα με ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη

2.2.1.2 Σύνθεση προϊόντων με βάση την ουρακίλη (Ur)

Σύνθεση της 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α -D-mannopyranose

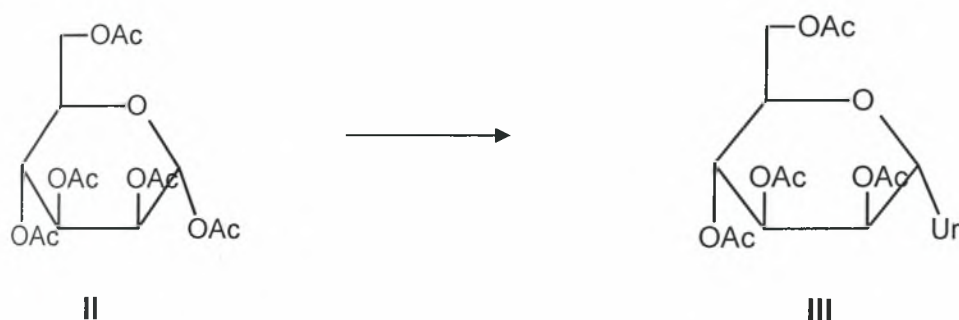


Διάλυμα της D-μαννόζης **I** (6.32g, 35.06mmol) σε πυριδίνη (150mL) και Ac_2O (76mL) αναδεύεται ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 3). Η αντίδραση σταματά με προσθήκη MeOH (38mL). Ακολουθεί συμπύκνωση, διάλυση σε CH_2Cl_2 και πλύσιμο της οργανικής φάσης με NaHSO_4 , NaHCO_3 και H_2O . Γίνεται ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4 . Έπειτα διηθείται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται η ένωση **II** (12.32g, 31.56mmol).

Πίνακας 3: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α -D-mannopyranose (**II**).

TLC (Διάλυμα A)	$R_f=0.7$
Απόδοση	90%

Σύνθεση της 1-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl) uracil

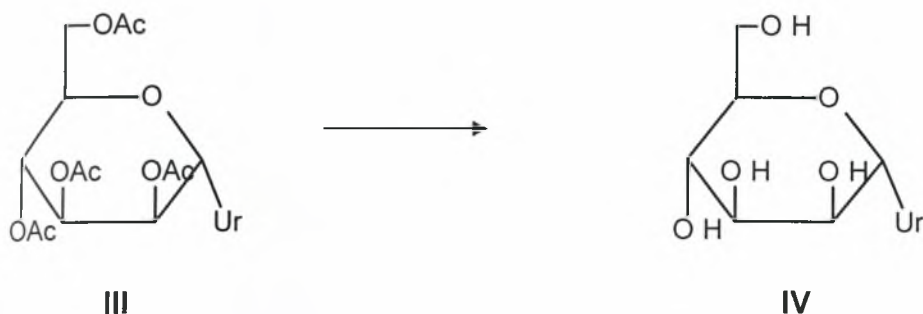


Μείγμα της ουρακίλης (4.96g, 44.25mmol), του hexamethyldisilazane (HMDS) (11mL, 52.75mmol) και της saccharin (0.37g, 2.03mmol) σε άνυδρο CH_3CN (152mL) υποβάλλεται σε reflux στους 120°C υπό άζωτο. Αφότου γίνει διαυγές προστίθεται η 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α -D-mannopyranose **II** (12.32g, 31.56mmol) και το trimethylsilyltrifluoromethane-sulfonate ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) (8mL, 44.2mmol). Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 2h στους 80°C (reflux) υπό άζωτο. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC (πίνακας 4). Το μείγμα εξουδετερώνεται με υδατικό διάλυμα NaHCO_3 , αραιώνεται με νερό και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται με Na_2SO_4 , διηθείται και συμπυκνώνεται σε σιρόπι, το οποίο καθαρίζεται σε χρωματογραφία στήλης με το διάλυμα Θ (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο, 7/3), δίνοντας την ένωση **III** (12.56g, 90%, $R_f=0.44$) σαν λάδι.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl) uracil (III).

TLC (Διάλυμα Β)	$R_f=0.44$
Απόδοση	90%

Σύνθεση της 1-(α -D-mannopyranosyl) uracil

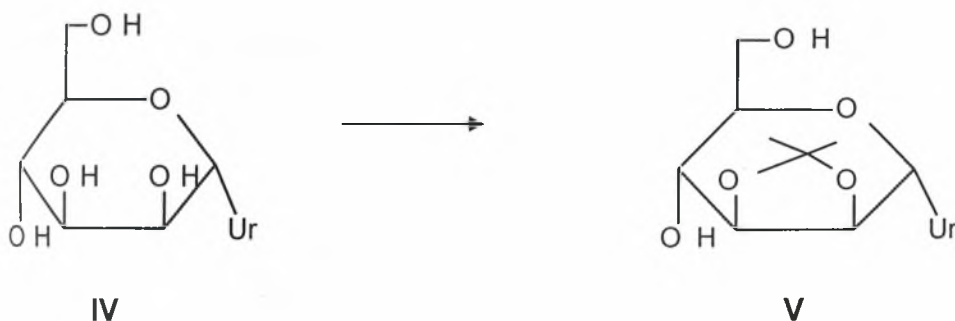


Το προϊόν **III** (12.56g, 28.42mmol) αναμιγνύεται με αμμωνία/MeOH (κορεσμένο στους 0°C, 1L). Το διάλυμα αναδεύεται ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώνεται υπό μειωμένη πίεση. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το διάλυμα **I** (οξικού αιθυλεστέρα/MeOH, 8/2), δίνοντας την ένωση **IV** (6.80g, 88%, $R_f=0.24$).

Πίνακας 5: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(α -D-mannopyranosyl) uracil (IV).

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f=0.24$
Απόδοση	88%

Σύνθεση της 1-(2,3-O-Isopropylidene- α -D-mannopyranosyl) uracil

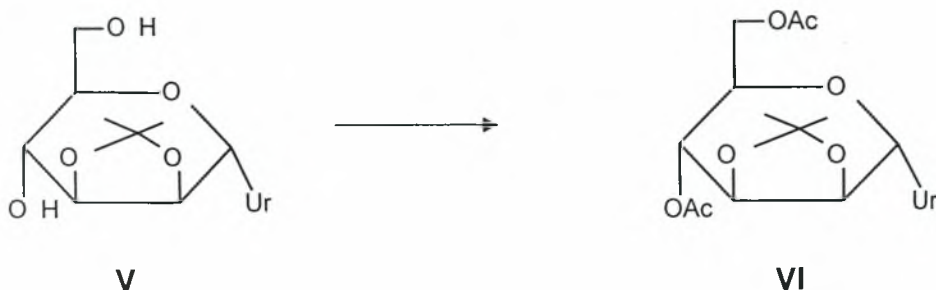


Σε ένα υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης 1-(α -D-mannopyranosyl) uracil (**IV**) (6.80g, 25mmol) με άνυδρη ακετόνη (anhydrous acetone 50mL) και 2,2 dimethoxypropane (50mL) προστίθεται p-toluenesulfonic acid monohydrate (0.98g, 5.15mmol). Μετά από 30min προστίθεται νερό (100mL) και το μείγμα αναδεύεται για 16h. Το τελικό διάλυμα εξουδετερώνεται με κορεσμένο NaHCO_3 , έτσι ώστε το pH του να μην ξεπεράσει την τιμή 7, συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα **K** (οξικός αιθυλεστέρας), δίνοντας την ένωση **V** (6.30g, 81%, $R_f=0.14$) σαν άσπρο αφρό.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-O-Isopropylidene- α -D-mannopyranosyl) uracil (V).

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f=0.14$
Απόδοση	81%

Σύνθεση της 1-(4,6-Di-O-acetyl-2,3-O-isopropylidene- α -D-mannopyranosyl) uracil

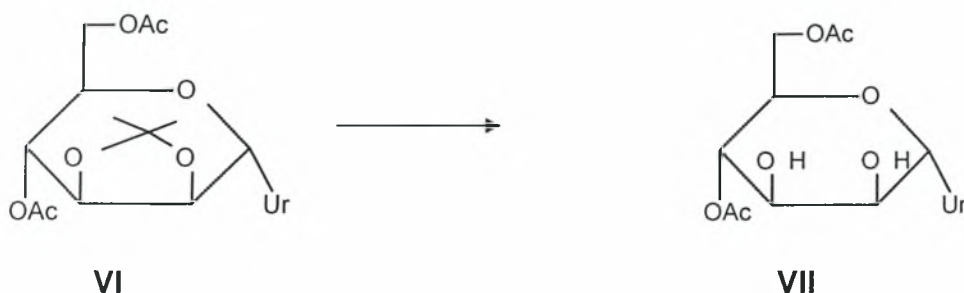


Σε ποσότητα της ένωσης V (1.20g, 3.82mmol) διαλύεται πυριδίνη (14mL) και Ac_2O (2mL, 21.20mmol). Το μείγμα μεταφέρεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2h, κατόπιν αναμιγνύεται με MeOH στους 0°C και συμπυκνώνεται. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Θ (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο, 7/3), δίνοντας την ένωση VI (1.26g, 83%, $R_f=0.6$) σαν λάδι.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4,6-Di-O-acetyl-2,3-O-isopropylidene- α -D-mannopyranosyl) uracil (VI)

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f=0.6$
Απόδοση	83%

Σύνθεση της 1-(4,6-Di-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl) uracil

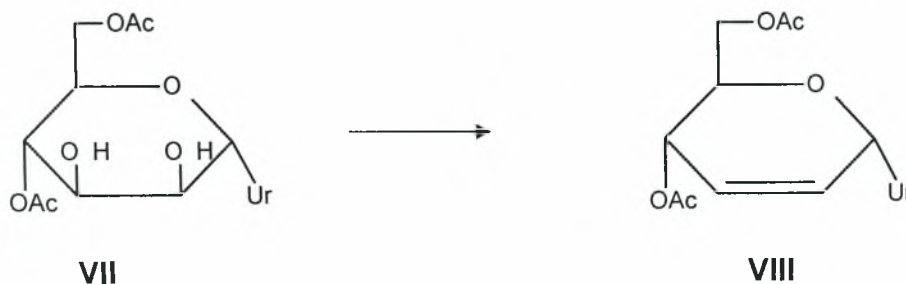


Σε ποσότητα της ένωσης VI (1.26g, 3.18mmol) διαλύεται ένα μείγμα από CH_2Cl_2 (11mL) και formic acid (11mL, 90%). Το διάλυμα αναδεύεται όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και μετά συμπυκνώνεται με μειωμένη πίεση. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το διάλυμα K (οξικός αιθυλεστέρας), δίνοντας την ένωση VII (1.0g, 88%, $R_f=0.25$) σαν άσπρο στερεό.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4,6-Di-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl) uracil (VII).

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f=0.25$
Απόδοση	88%

Σύνθεση της 1-(4,6-Di-O-acetyl-2,3-dideoxy- α -D-erythro-hex-2-enopyranosyl) uracil

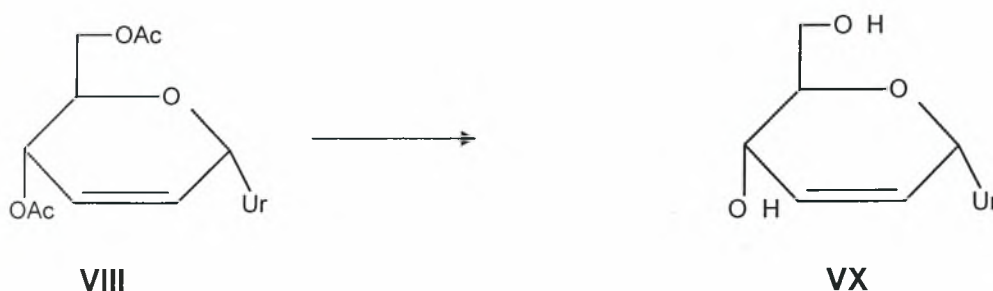


Σε μείγμα που αποτελείται από την ένωση VII (1g, 2.80mmol) σε 40mL ξηρού διαλύματος Tol/DMF (4:1), προστίθεται imidazole (0.40g, 5.88mmol), Ph_3P (3.08g, 11.75mmol) και iodoform (2.31g, 5.88mmol). Το μείγμα θερμαίνεται στους 120°C υπό άζωτο για 2.5h, συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα, πλένεται με κορεσμένο NaHCO_3 , sodium thiosulfate και νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na_2SO_4 , ο διαλύτης απομακρύνεται με κενό και ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης με διάλυμα Λ (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 6/4), δίνοντας την ένωση VIII (0.69g, 76%, $R_f=0.5$) σαν άχρωμο λάδι.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4,6-Di-O-acetyl-2,3-dideoxy- α -D-erythro-hex-2-enopyranosyl) uracil (VIII)

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f=0.5$
Απόδοση	76%

Σύνθεση της 1-(2,3-dideoxy- α -D-erythro-hex-2-enopyranosyl) uracil

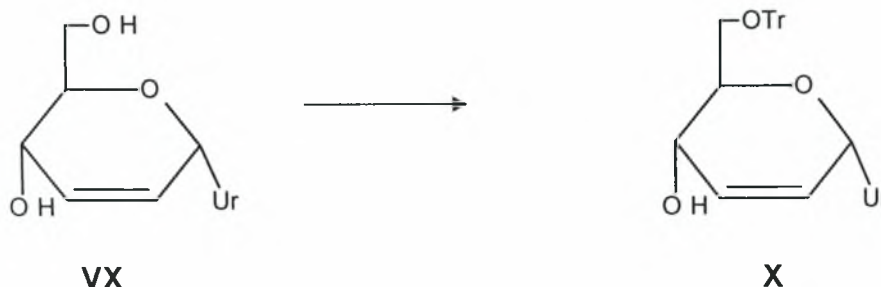


Σε ποσότητα της ένωσης VIII (0.69g, 2.13mmol) προστίθεται διάλυμα αμμωνία/MeOH (κορεσμένο στους 0°C , 120mL). Το διάλυμα αναδεύεται όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και μετά συμπυκνώνεται υπό μειωμένη πίεση. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με διάλυμα Μ (οξικός αιθυλεστέρας/MeOH, 9/1), δίνοντας την ένωση VX (0.33g, 64%, $R_f=0.4$) σαν λάδι.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-dideoxy- α -D-erythro-hex-2-enopyranosyl) uracil (VX).

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	$R_f=0.4$
Απόδοση	64%

Σύνθεση της 1-(2,3-dideoxy-6-O-trityl- α -D-erythro-hex-2-enopyranosyl) uracil

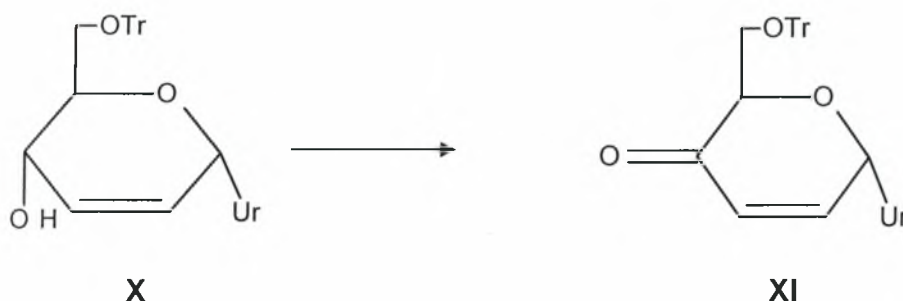


Σε ένα διάλυμα της ένωσης VX (0.33g, 1.36mmol) σε πυριδίνη (7mL), προστίθεται triphenylmethyl chloride (0.49g, 1.77mmol) και καταλυτική ποσότητα 4-dimethylaminopyridine. Το μείγμα αναδεύεται όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού το μείγμα διαλυθεί με MeOH και συμπυκνωθεί, το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Θ (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο, 7/3), δίνοντας την ένωση X (0.49g, 75%, $R_f=0.65$) σαν κίτρινο στερεό.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-dideoxy-6-O-trityl- α -D-erythro-hex-2-enopyranosyl) uracil (X).

TLC (Διάλυμα Ζ)	$R_f=0.65$
Απόδοση	75%

Σύνθεση της 1-(2,3-dideoxy-6-O-trityl- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) uracil

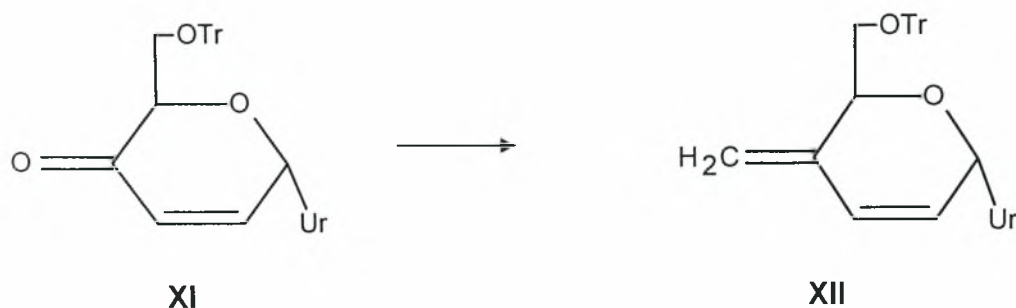


Ένα μείγμα της ένωσης X (0.49g, 1.02mmol), PDC (0.46g, 1.22mmol) και Ac_2O (0.29g, 3.06mmol) αναδεύεται σε dry CH_2Cl_2 (12mL) για 4h, υπό άζωτο σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Λ (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο, 6/4), δίνοντας καθαρή την ένωση XI (0.41g, 83%, $R_f=0.55$) σαν άσπρο στερεό.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-dideoxy-6-O-trityl- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) uracil (XI).

TLC (Διάλυμα Ε)	$R_f=0.55$
Απόδοση	83%

Σύνθεση της 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene-6-O-trityl- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl) uracil

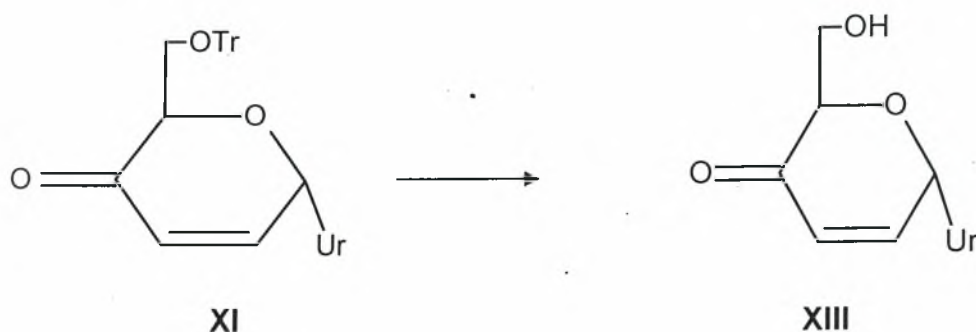


Σε ένα υπό ανάδευση μείγμα αποτελούμενο από methyl triphenyl-phosphonium bromide (0.49g, 1.37mmol) και t-amyl alcohol (0.16mL, 1.5mmol) σε dry THF (4mL) προστίθεται NaH (0.04g, 60% in oil, 1.5mmol) στους 0°C υπό άζωτο και το μείγμα αναδεύεται για 2h σε θερμοκρασία δωματίου υπό άζωτο. Σ' αυτό το κίτρινο υλίδιο του φωσφόρου προστίθεται στάγδην διάλυμα της ένωσης XI (0.20g, 0.42mmol) σε dry THF (0.80mL) στους 0°C υπό άζωτο. Έπειτα το μείγμα αναδεύεται για 30min υπό άζωτο σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση σταματά με προσθήκη κορεσμένου NaHCO₃ και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται με νερό, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Ν (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο, 5/5), δίνοντας την ένωση XII (0.13g, 65%, $R_f=0.4$) σαν κίτρινο σιρόπι.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene-6-O-trityl- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl) uracil (XII).

TLC (Διάλυμα Η)	$R_f=0.4$
Απόδοση	65%

Σύνθεση της 1-(2,3-dideoxy- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) uracil

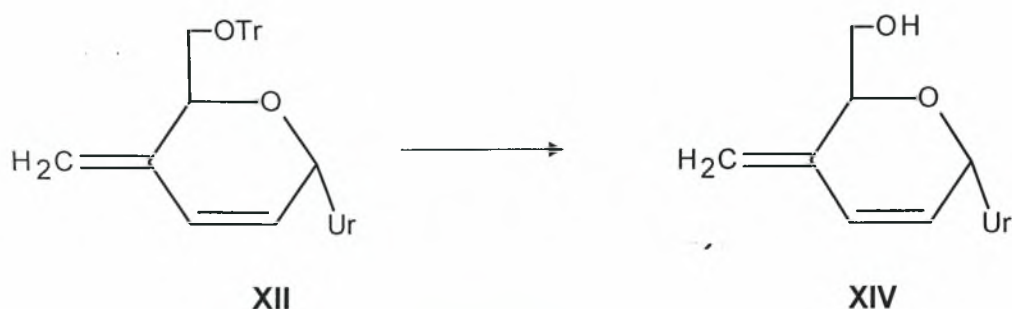


Ποσότητα της ένωσης XI (0.20g, 0.42mmol) διαλύεται σε μείγμα από formic acid/diethylether (11mL, 1:1). Το μείγμα αναδεύεται για 7min σε θερμοκρασία δωματίου, στη συνέχεια αραιώνεται με τολουένιο και αποστάζεται αρκετές φορές με τον ίδιο διαλύτη για την αποφυγή σχηματισμού εστέρα. Το συμπύκνωμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα N (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο, 5/5), δίνοντας καθαρή την ένωση XIII (0.08g, 80%, $R_f=0.25$) σαν ελαιώδες υγρό.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-dideoxy- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) uracil (XIII).

TLC (Διάλυμα H)	$R_f=0.25$
Απόδοση	80%

Σύνθεση της 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl) uracil

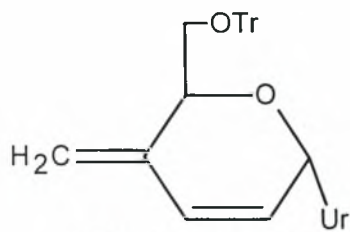


Η ένωση XIV συντίθεται από την ένωση XII (0.30g, 0.63mmol) με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται για την ένωση XIII και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα N (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο, 5/5), δίνοντας καθαρή την ένωση XIV (0.12g, 81%, $R_f=0.25$) σαν άχρωμο ελαιώδες υγρό.

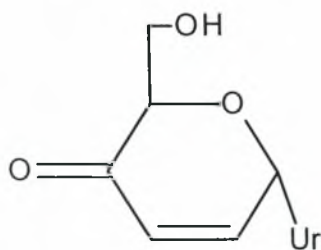
Πίνακας 15: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl) uracil (XIV).

TLC (Διάλυμα H)	$R_f=0.25$
Απόδοση	81%

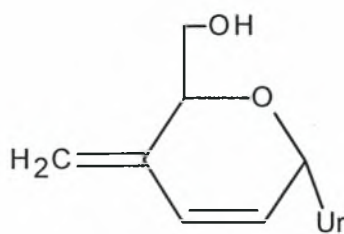
Συμπερασματικά, λοιπόν με βάση τις παραπάνω συνθέσεις νουκλεοσιδικών αναλόγων, γίνεται η αντιστοίχιση με τα προϊόντα ως εξής:



XII – Προϊόν 6



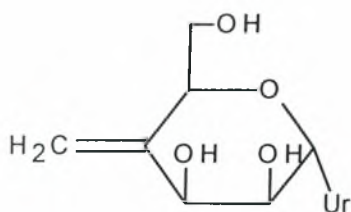
XIII- Προϊόν 7



XIV – Προϊόν 8

2.2.1.3 Σύνθεση προϊόντος με βάση την ουρακίλη (Ur)

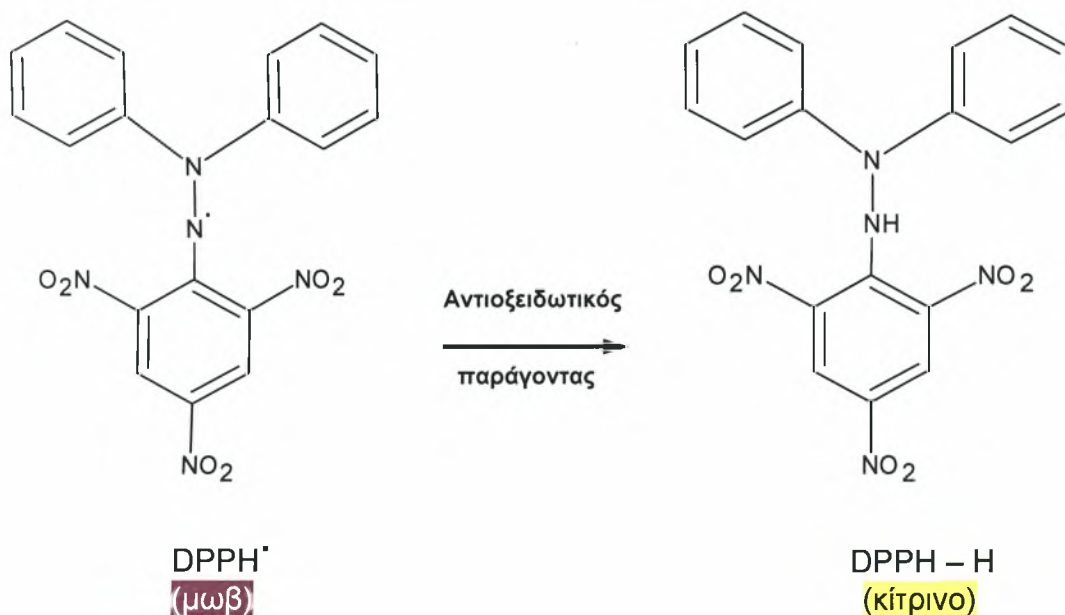
Με παρόμοια διαδικασία στο ίδιο Εργαστήριο παρασκευάστηκε από εμπορικά διαθέσιμη D-μαννόζη και ουρακίλη και το τελευταίο νουκλεοσιδικό ανάλογο.



Προϊόν - 5

2.2.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νουκλεοσιδικών αναλόγων μέσω της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με μια σταθερή ρίζα (DPPH[•])

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με τη σταθερή ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]). Η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) είναι μία ουσία, η οποία φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου και μετατρέπεται σε 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) (Εικόνα 16), η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση στα 517nm να ελαττώνεται.



Εικόνα 16 : Μετατροπή DPPH[•] σε DPPH – H.

2.2.2.1 Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων συγκεντρώσεων ενός εξεταζόμενου νουκλεοσιδικού αναλόγου (προϊόντος), η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1mL, στον οποίο εμπεριέχονται 100μM ρίζας DPPH[•] και το εξεταζόμενο προϊόν σε διάφορες συγκεντρώσεις (5, 10, 20, 50 και 100μM). Το διάλυμα DPPH[•] ετοιμάζεται την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο, γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος (1mL), προστίθεται μεθανόλη. Πρώτα μπαίνουν τα διαλύματα του εξεταζόμενου προϊόντος, μετά η μεθανόλη και τελευταίο προστίθεται το διάλυμα της ρίζας με σταθερό ρυθμό (Πίνακας 16). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm, σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1500. Σε κάθε πείραμα, το διάλυμα μόνο με μεθανόλη χωρίς το εξεταζόμενο προϊόν ονομάζεται τυφλό διάλυμα (blank) και το διάλυμα με το DPPH[•] μόνο του σε μεθανόλη ονομάζεται control. Όλα τα πειράματα έγιναν τρεις φορές για κάθε

συγκέντρωση του εξεταζόμενου προϊόντος και τουλάχιστον δύο φορές για κάθε εξεταζόμενο προϊόν.

Πίνακας 16: Σειρά προσθήκης διαλυμάτων

	Blank	Control	C1	C2	C3
Δ/μα ουσίας	-	-	10μL	20μL	40μL
Μεθανόλη	1000μL	950μL	940μL	930μL	910μL
DPPH 2mM	-	50μL	50μL	50μL	50μL
Υτελ	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

2.2.2.2 Στατιστική ανάλυση - Υπολογισμοί

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

$$\% RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

Όπου RSC (radical scavenging capacity), και απορρόφηση control είναι η απορρόφηση της ρίζας μόνη της διαλυμένη σε μεθανόλη.

Για κάθε συγκέντρωση προϊόντος βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) των απορροφήσεων καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

2.2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αναστολής τοξικής δράσης ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των περόξυ ριζών (ROO[•]) στο DNA

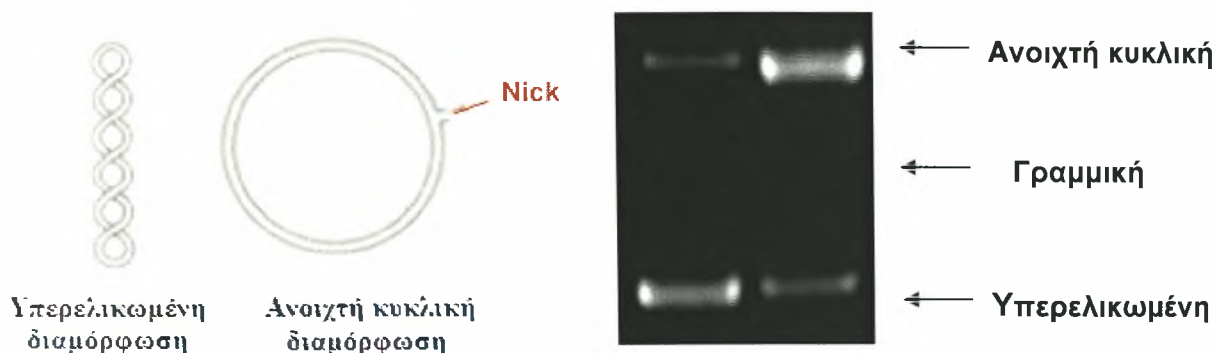
2.2.3.1 Αρχή της Μεθόδου

Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως η μεταλλαξιογένεση και η καρκινογένεση [Stagos D. et al, 2005]. Η παρατήρηση λοιπόν της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της αντιοξειδωτικής συμπεριφοράς των εξεταζόμενων μορίων.

Η εξέταση της τοξικής δράσης των ελευθέρων ριζών, καθώς και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων νουκλεοσιδικών αναλόγων (προϊόντων) πάνω στο DNA, χρησιμοποιεί ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά δίκλωνα κυκλικά μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, φέροντας συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημά του είναι ότι, όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης, εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 17).

- Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation), στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.
- Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει, όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
- Τη γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα.

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα, όσο πιο μικρή είναι αυτή, τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική.

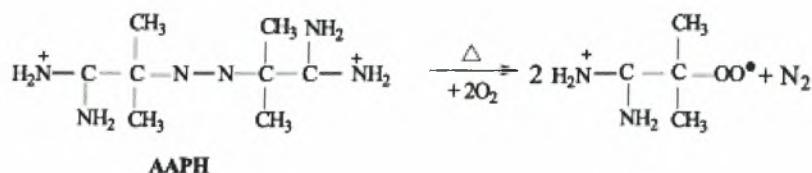
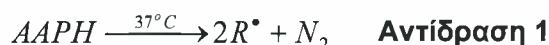


Εικόνα 17: Αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων προϊόντων απέναντι στη δράση ελευθέρων ριζών (ROO^\bullet), βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικομένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

Οι ρίζες ROO^\bullet είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξείδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται.

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO^\bullet χρησιμοποιείται το AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride). Το AAPH σε θερμοκρασία $37^\circ C$ διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO^\bullet (Αντιδράσεις 1,2 και Εικόνα 18).



Εικόνα 18 : Χημική δομή του AAPH και σχηματισμός των περόξυ ριζών (ROO^\bullet).

Εκτός από την ιδιότητα των ριζών ROO^\bullet να ξεκινούν την λιπιδική υπεροξείδωση, έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσής του από υπερελικομένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικομένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο προϊόν αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO[•].

2.2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8%w/v, με διάλυση 0,72 gr αγαρόζης σε 90 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Κάθε φορά δοκιμάζονται τα προϊόντα σε συγκεντρώσεις 5, 10, 20, 50, 100 μΜ.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων σε συγκεντρώσεις 5, 10, 20, 50 και 100μΜ. Τα συστατικά της αντίδρασης (10μL) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 1μg, AAPH 2,5mM και το εξεταζόμενο προϊόν για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

- **PBS** (pH=7,4) : NaCl 137mM (8gr/1000mL), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 mL), Na₂HPO₄ 8,1mM (1,44gr/1000mL), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000mL). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **AAPH 2,5mM**: Αραιώνεται το διάλυμα AAPH 100mM (13,56mg AAPH σε 500μL PBS) 16 φορές. Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17 : Σειρά προσθήκης υλικών για την πραγματοποίηση της αντίδρασης με το AAPH

	PBS	αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control	8μL	-	2μL	-
AAPH 2.5mM	4μL	-	2μL	4μL
Προϊόν (5μM)	1μL	3μL	2μL	4μL
Προϊόν (10μM)	1μL	3μL	2μL	4μL
Προϊόν (20μM)	1μL	3μL	2μL	4μL
Προϊόν (50μM)	1μL	3μL	2μL	4μL
Προϊόν (100μM)	1μL	3μL	2μL	4μL
Προϊόν (100μM)	5μL	3μL	2μL	-

Για κάθε εξεταζόμενο προϊόν χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (1μg πλασμίδιο), ένα θετικό control (1μg πλασμίδιο + 2,5mM AAPH) και ένα control προϊόντος με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (χωρίς το AAPH).

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Στη συνέχεια η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3μL Loading Buffer (Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και η ανάλυση γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης στα 70 V για 1h. Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε 250mL διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και

ξεβαφόταν σε 250mL απιονισμένο νερό για 30 min. Τελικά το gel φωτογραφιζόταν κάτω από UV. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

2.2.3.3 Στατιστική ανάλυση – Υπολογισμοί

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO[•], που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

% αναστολή = $[(S_0 - S)/(S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$, όπου

S_{control} : το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,

S_0 : το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 2,5mM AAPH) και

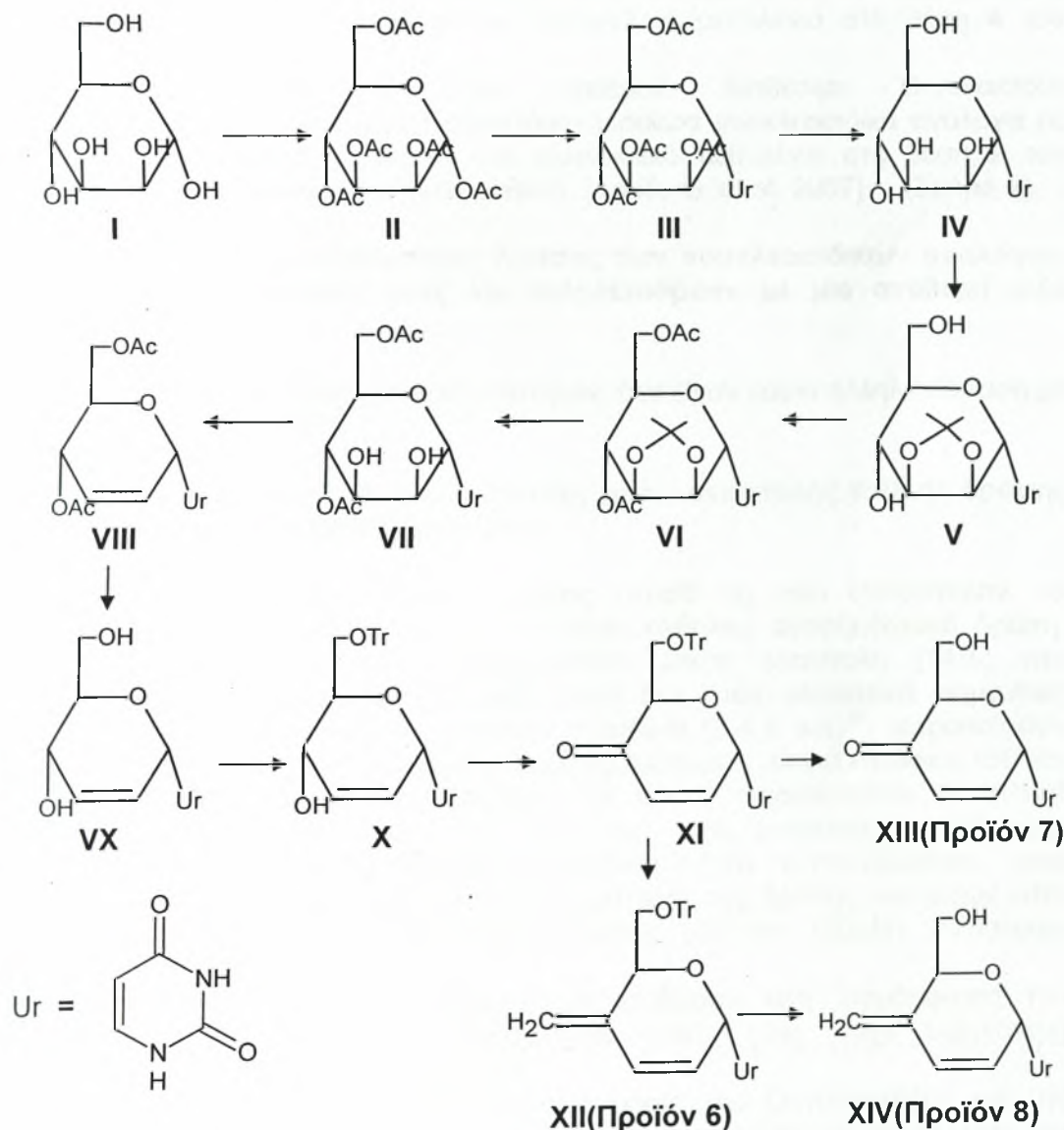
S : το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (προϊόντος) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 2,5mM AAPH.

Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε προϊόν βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnett.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σύνθεση των νουκλεοσιδικών αναλόγων

Στην παρούσα διπλωματική εργασία και στο Εργαστήριο της Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μίας νέας τάξης νουκλεοσιδίων, αυτών με εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 4 του σακχάρου και κετονουκλεοσιδίου με την κετο-ομάδα στη ίδια θέση, που έχουν την ουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση. Παρατηρήθηκε ότι με μία σχετικά εύκολη πειραματική διαδικασία με μικρά και σύντομα βήματα, είναι δυνατή η σύνθεσή τους (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Μεθοδολογία σύνθεσης νουκλεοσιδικών αναλόγων με ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη (προϊόντα 6,7 και 8).

Η εμπορικά διαθέσιμη D-μαννόζη μετατρέπεται σε τρία στάδια στο νουκλεοσίδιο 1-(α -D-mannopyranosyl) uracil (IV) με ολική απόδοση 71.3%. Η σύνθεση του 1-(2,3-dideoxy-6-O-trityl- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) uracil (XI) είχε απόδοση 83%. Από αυτή την ένωση προέκυψαν τα νουκλεοσίδια 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene-6-O-trityl- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl) uracil (προϊόν 6) και 1-(2,3-dideoxy- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) uracil (προϊόν 7) με αποδόσεις 65% και 80% αντίστοιχα. Τέλος, από το προϊόν 6 προέκυψε η ένωση 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene- α -D-glycero-hex-2-enopyranosyl) uracil (προϊόν 8) με απόδοση 81%. Η ταυτοποίηση των παραπάνω ενώσεων έγινε μέσω του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού $^1\text{H-NMR}$ καθώς επίσης και μέσω του Mass spectra.

Με παρόμοια διαδικασία στο ίδιο Εργαστήριο παρασκευάστηκε από την εμπορικά διαθέσιμη D-μαννόζη και ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη ένα ακόμη νουκλεοσιδικό ανάλογο με εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 4 του σακχάρου (προϊόν 5).

Με πρώτη ύλη την εμπορικά διαθέσιμη D-γαλακτόζη παρασκευάστηκαν στο ίδιο Εργαστήριο τέσσερα νουκλεοσιδικά ανάλογα με ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη και εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 2 του σακχάρου ή κετο-ομάδα στην ίδια θέση [Agelis G. et al, 2007] (Σχήμα 1).

Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νουκλεοσιδικών αναλόγων μέσω της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με μια σταθερή ρίζα (DPPH')

Όλα τα προϊόντα, που εξετάστηκαν, δεν είχαν καμία αλληλεπίδραση με τη σταθερή ρίζα DPPH.

Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αναστολής τοξικής δράσης των περόξυ ριζών (ROO') στο DNA

Από τις οκτώ καθαρές ενώσεις (προϊόντα) που εξετάστηκαν, τα τέσσερα προϊόντα (1,2,6 και 8) δεν είχαν καθόλου αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα το προϊόν 1 παρουσίασε μικρή αναστολή (14%) στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (100 μM), αλλά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 18). Τα υπόλοιπα τέσσερα προϊόντα (3,4,5 και 7) παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση στις μεγαλύτερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (50 και 100 μM). Συγκεκριμένα τα προϊόντα 3,4 και 5 παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αναστολή κατά 17%, 19% και 15% αντίστοιχα, μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση (100 μM). Το προϊόν 7 ήταν το πιο δραστικό, αφού έδωσε στατιστικά σημαντικά ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών κατά 13% και 20% στις μεγάλες συγκεντρώσεις (50 και 100 μM), αντίστοιχα (Πίνακες 18 και 19).

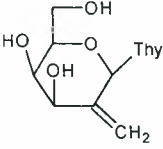
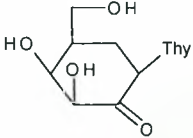
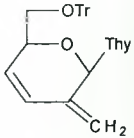
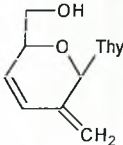
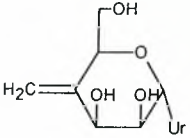
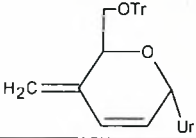
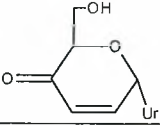
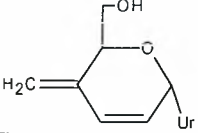
Όλα τα μόρια δεν είχαν καμία επίδραση στη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (100 μM).

Εξετάστηκαν, επίσης, τα καθαρά μόρια της D-γαλακτόζης και της D-μαννόζης, καθώς και τα μόρια των ετεροκυκλικών βάσεων, της θυμίνης και της ουρακίλης. Κανένα από τα παραπάνω μόρια δεν είχε αντιοξειδωτική δράση.

Από τα νουκλεοσιδικά ανάλογα με ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη (προϊόντα 1,2,3 και 4), αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν τα προϊόντα 3 και 4, τα οποία φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 2 του σακχάρου. Αυτά τα δύο προϊόντα φέρουν και διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα στις θέσεις 3 και 4. Τα προϊόντα 1 και 2 δεν παρουσίασαν καμία αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα το προϊόν 1, το οποίο φέρει μόνο εξωκυκλικό μεθυλένιο στην ίδια θέση (χωρίς την ύπαρξη διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα), παρουσίασε μικρή αναστολή (14%) στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (100μM), αλλά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το προϊόν 2, το οποίο φέρει κετο-ομάδα στην ίδια θέση (χωρίς την ύπαρξη διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα), δεν παρουσίασε καμία αντιοξειδωτική δράση.

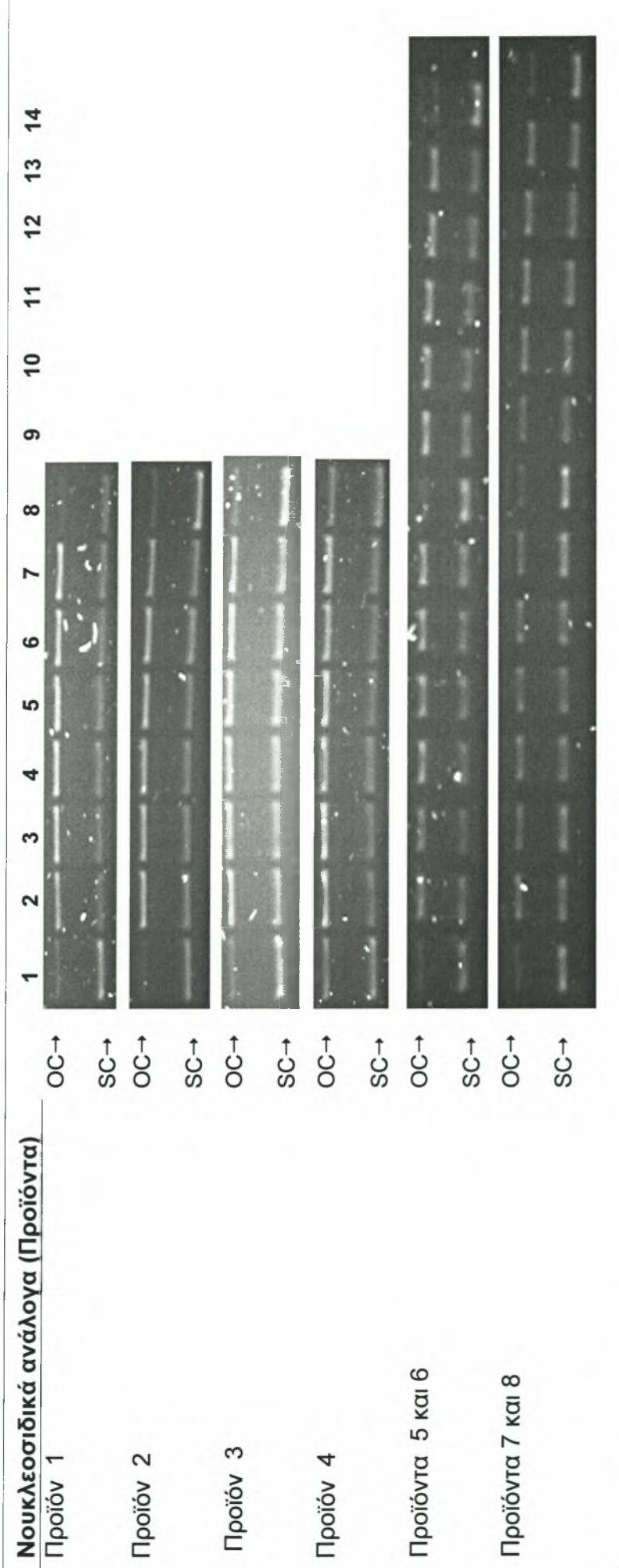
Από τα νουκλεοσιδικά ανάλογα με ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη (προϊόντα 5,6,7 και 8), αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν τα προϊόντα 5 και 7. Το προϊόν 5 φέρει εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 4 του σακχάρου (χωρίς την ύπαρξη διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα) και παρουσίασε ποσοστό αναστολής 15% στην υψηλότερη μόνο συγκέντρωση (100μM). Το προϊόν 7 που παρουσίασε τα μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής φέρει κετο-ομάδα στη θέση 4 του σακχάρου και διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα στις θέσεις 2 και 3.

Πίνακας 18: Αντιοξειδωτική δράση των νουκλεοσιδικών αναλόγων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Προϊόντα	% Αναστολή				
Συγκεντρώσεις (μM)	5	10	20	50	100
Προϊόν 1 	NI	NI	NI	10±3	14±4
Προϊόν 2 	NI	NI	NI	NI	NI
Προϊόν 3 	NI	NI	8±2	11±3	17±2 [*]
Προϊόν 4 	NI	NI	NI	9±2	19±2 [*]
Προϊόν 5 	NI	NI	NI	7±2	15±1 [*]
Προϊόν 6 	NI	NI	NI	NI	NI
Προϊόν 7 	NI	NI	NI	13±1 [*]	20±2 [*]
Προϊόν 8 	NI	NI	NI	NI	NI

Όπου οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± SE του ποσοστού αναστολής από τρεις ανεξάρτητες μετρήσεις
 NI: no significant inhibition (λιγότερο από 7%).
^{*}p<0.05 όταν συγκρίνεται με το control (πλασμίδιο DNA μαζί με AAPH).

Πίνακας 19: Αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA



1: 1µg plasmid, 2: 1µg plasmid + 2.5mM AAPH, 3-8: 1µg plasmid, 2.5mM AAPH και 5µM, 10µM, 20µM, 50µM και 100µM αντίστοιχη συγκέντρωση προϊόντος, 9-14 1µg plasmid, 2.5mM AAPH και 5µM, 10µM, 20µM, 50µM και 100µM αντίστοιχη συγκέντρωση προϊόντος
OC: Ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση DNA (Open circular Conformation), SC: Υπερελικωμένη διαμόρφωση DNA (Supercoiled Conformation).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ραγδαία ανάπτυξη της φαρμακολογίας και της φαρμακευτικής χημείας σε συνδυασμό με τις ανακαλύψεις που έγιναν σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία του γενετικού υλικού των οργανισμών, επέτρεψαν τη σύνθεση, μελέτη, εφαρμογή και προώθηση στην αγορά πληθώρας φαρμάκων που ως δραστική ουσία περιέχουν κάποιο νουκλεοσιδικό ανάλογο. Τα αντιβακτηριδιακά, αντιικά και αντιογκογονικά φάρμακα περιλαμβάνονται μεταξύ των πιο σημαντικών θεραπευτικών ανακαλύψεων του εικοστού αιώνα και έχουν αλλάξει τη θεραπευτική αγωγή πολλών ασθενειών, μειώνοντας τη θνησιμότητα.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας φαίνεται ότι ελάχιστες έρευνες έχουν γίνει για τα ίδια νουκλεοσιδικά ανάλογα και την αντιοξειδωτική τους δράση. Συγκεκριμένα, η μόνη έρευνα στο ίδιο θέμα, έχει γίνει πάλι από το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και αφορά την αντιοξειδωτική δράση μιας σειράς φθοριωμένων πυρανο-νουκλεοσιδικών αναλόγων της N⁴-benzoyl cytosine και N⁶-benzoyl adenine [Spanou C. et al, 2007].

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοσιδίων και συγκεκριμένα κετονουκλεοσιδίων καθώς επίσης και νουκλεοσιδίων με εξωκυκλικό μεθυλένιο της γαλακτόζης και της μαννόζης, και η μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε η σύνθεση νουκλεοσιδικών αναλόγων με ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη και εξωκυκλικό μεθυλένιο ή κετο-ομάδα στη θέση 4 του σακχάρου και διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα στις θέσεις 2 και 3. Αυτές οι ενώσεις βρέθηκε να έχουν αντικαρκινικές και αντιικές ιδιότητες [Agelis G. et al, 2008].

Στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είχαν συντεθεί και νουκλεοσιδικά ανάλογα με ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη και εξωκυκλικό μεθυλένιο ή κετο-ομάδα στη θέση 2 του σακχάρου και διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα στις θέσεις 3 και 4. Αυτές οι ενώσεις βρέθηκε επίσης ότι είναι ισχυροί αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες [Agelis G. et al, 2007].

Όλα, λοιπόν, τα παραπάνω νουκλεοσιδικά ανάλογα με ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη και την ουρακίλη εξετάστηκαν, ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, με δύο μεθόδους.

Αρχικά έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νουκλεοσιδικών αναλόγων μέσω της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με μια σταθερή ρίζα (DPPH[•]). Όλα τα προϊόντα, που εξετάστηκαν, δεν παρουσίασαν καμία αλληλεπίδραση με τη ρίζα του DPPH. Αυτή η έλλειψη δράσης μπορεί να οφείλεται στο γεγονός, ότι τα νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι μεγάλα μόρια και δεν μπορούν να προσεγγίσουν τη ρίζα ή οφείλεται στη στερεοχημική τους δομή [Prior RL. et al, 2005].

Στη συνέχεια έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νουκλεοσιδικών αναλόγων μέσω αναστολής τοξικής δράσης των περόξυ ριζών (ROO[•]) στο DNA. Από τα αποτελέσματα (πίνακας 18), φαίνεται ότι τα προϊόντα 1, 2, 6 και 8, δεν παρουσίασαν καμία αντιοξειδωτική δράση. Τα υπόλοιπα τέσσερα προϊόντα (3, 4, 5 και 7) παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση στις υψηλές εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (50 και 100 μM), με το προϊόν 7 να είναι το πιο δραστικό (Πίνακες 18 και 19).

Από τα νουκλεοσιδικά ανάλογα που έχουν ως ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη (προϊόντα 1, 2, 3 και 4), αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν τα προϊόντα 3 και 4, τα οποία φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 2, σε αντίθεση με το προϊόν 2, το οποίο φέρει κετο-ομάδα στην ίδια θέση και δεν παρουσίασε καμία ανασταλτική δράση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ενώσεις 3 και 4, οι οποίες φέρουν επιπλέον και διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα στις θέσεις 3 και 4 του σακχάρου παρουσίασαν αυξημένη αντιοξειδωτική δράση. Φαίνεται ότι η παρουσία του διπλού δεσμού στις θέσεις 3 και 4 προκαλεί ριζική σταθεροποίηση λόγω συντονισμού και αυξάνει την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση.

Από τα νουκλεοσιδικά ανάλογα που έχουν ως ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη (προϊόντα 5, 6, 7 και 8), αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν τα προϊόντα 5 και 7. Τα προϊόντα 6 και 8, τα οποία φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 4 του σακχάρου και διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα στις θέσεις 2 και 3 δεν παρουσίασαν καμία αντιοξειδωτική δράση. Αντίθετα, το προϊόν 5, το οποίο φέρει μόνο εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 4, παρουσίασε μικρό ποσοστό αναστολής. Από την άλλη πλευρά, το προϊόν 7, το οποίο φέρει το α,β -κετοακόρεστο σύστημα στο τμήμα του σακχάρου, εμφανίστηκε να είναι το πιο ισχυρό. Φαίνεται ότι η παρουσία του διπλού δεσμού σε θέση α,β ως προς την κετο-ομάδα προκαλεί ριζική σταθεροποίηση και αυξάνει την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση. Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και από προηγούμενες μελέτες ακόρεστων κετονουκλεοσιδικών αναλόγων [Spanou C. et al, 2007]. Για το προϊόν 6 η μηδενική αντιοξειδωτική δράση είναι πιθανόν να οφείλεται στο μεγάλο μέγεθος και την ύπαρξη της τριφαινυλομεθυλο-ομάδας (Tr), η οποία από τη φύση της είναι υδρόφοβη.

Ενδιαφέρον παρουσίασε και η επίδραση της θέσης της χαρακτηριστικής ομάδας στην αντιοξειδωτική δράση των εξεταζόμενων ενώσεων. Όταν το εξωκυκλικό μεθυλένιο βρίσκεται στη θέση 2 του σακχάρου, τότε εμφανίζεται μικρή αντιοξειδωτική δράση (προϊόντα 3,4). Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι η παρατηρούμενη ανασταλτική δράση αυξάνεται με την παρουσία του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα στις θέσεις 3 και 4 του σακχάρου (προϊόντα 3,4). Σε αντίθεση με το εξωκυκλικό μεθυλένιο, όταν η κετο-ομάδα βρίσκεται στη θέση 2 του σακχάρου, δεν παρατηρείται καμία αντιοξειδωτική δράση (προϊόν 2).

Όσον αφορά την ένωση 7, η οποία φέρει κετο-ομάδα στη θέση 4 του σακχάρου, παρουσίασε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και πρέπει να σημειωθεί ότι στην ίδια ένωση υπάρχει και διπλός δεσμός άνθρακα-άνθρακα στις θέσεις 2 και 3. Στα υπόλοιπα προϊόντα τα οποία φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο στην θέση 4 του σακχάρου παρατηρήθηκε μικρό ή και μηδενικό ποσοστό αναστολής.

Συγκεκριμένα, τα προϊόντα 6 και 8 με εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 4 του σακχάρου και διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα στις θέσεις 2 και 3 δεν παρουσίασαν καμία αναστολή. Αντίθετα, μικρή αναστολή παρουσίασε το προϊόν 5 με εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 4, χωρίς την ύπαρξη του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα.

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε, ότι τροποποιημένα νουκλεοσιδικά ανάλογα της γαλακτόζης και της μαννόζης με σημαντικές αντικαρκινικές και αντιικές ιδιότητες παρουσίασαν επιπλέον και αντιοξειδωτική δράση. Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον και θα άξιζε περαιτέρω διερεύνηση η αποτελεσματική ικανότητα αυτού του τύπου των μορίων στην παρεμπόδιση και πιθανόν τη θεραπεία ασθενειών, οι οποίες προκαλούνται από την υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agelis G, Tzioumaki N, Botić T, Cencič A, Komiotis D. (2007). Exomethylene pyranonucleosides: Efficient synthesis and biological evaluation of 1-(2,3,4-trideoxy-2-methylene-β-D-glycero-hex-3-enopyranosyl)thymine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **15**:5448-5456
- Agelis G, Tzioumaki N, Tselios T, Botić T, Cencič A, Komiotis D. (2008). Synthesis and Molecular Modelling of Unsaturated Exomethylene Pyranonucleoside Analogues with Antitumor and Antiviral Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **43**(7);1366-1375
- Alaoui-Jamali MA, Lasne C, Antonakis K, Chouroulinkov I. (1986). Absence of Genotoxic Effects in Cells exposed to Four Ketonucleoside Derivatives. *Mutagenesis*. **1**(6);411-417
- Andrew R. Collins, (2005), Antioxidant intervention as a route to cancer prevention, *European Journal of Cancer*, **41**:1923-1930.
- Antonakis K, Bessodes M. (1973). 9-(Ketohehexosyl)purines: Synthesis, Reactivity, and Biological Activity of 6-chloro-9-(6-deoxy-beta-L-lyxohexopyranosylulose)purine. *Carbohydr Res*. **30**(1):192-5.
- Antonakis K, Chouroulinkov I. (1974). Studies on the Inhibition of the growth of KB cells by 9- and 7-(ketonucleosides). *Biochem Pharmacol*. **23**(15):2095-2100.
- Antonakis K, Egron MJ. (1973). Unsaturated Ketonucleosides- the Synthesis and properties of 7-(3-O-Acetyl-4,6-Dideoxy-β-L-Glycero-Hex-3 Enopyranosylulose)Theophylline. *Carbohydr. Res*. **27**:468-470
- Antonakis K, Halmos T, Bach J, Chouroulinkov I. (1980). Antitumor Activity of Ketonucleosides-Unsaturated Ketohehexosyl Pyrimidines. *Eur.J.Med.Chem*. **15**:237-240
- Antonakis K. (1975). Synthesis of Nucleoside Analogues. *Chimia*. **29**;59
- Antonakis K. (1989). Hexopyranose nucleosides. In studies in Natural Products Chemistry. Stereoselective Synthesis (Part C), Elsevier. Amsterdam. **vol4**, p 221, 241, 249.
- Arner ESJ, Eriksson S. (1995). Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther*. **67**(2):155-86.
- Baker CH, Banzon J, Bollinger JM, Stubbe J, Samano V, Robins MJ, Lippert B, Jarvi E, Resvick R. (1991). 2'-Deoxy-2'-methylenecytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based Inhibitors of Ribonucleotide Reductase. *J Med Chem*. **34**(6):1879-84.

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. **(2001)**. Βιοχημεία (Τόμος Ι). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. (p)329-351
- Blackburn GM, Gait MJ. **(1996)**. Nucleic Acids in Chemistry and Biology. Oxford University Press. New York.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. **(2003)**. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany*. **91**:179-194
- Bloomfield VA, Crothers DM, Tinoco I. **(1999)**. Nucleic Acids: Structure, Properties and Functions. University Science Books. Sausalito. California.
- Brady RC, Bernstein DI. **(2004)**. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.* **61(2)**:73-81.
- Chong Y, Gumina G, Mathew JS, Schinazi RF, Chu CK. **(2003)**. 1-2'.3'-Didehydro-2'.3'-dideoxy-3'-fluoronucleosides: synthesis, anti-HIV activity, chemical and enzymatic stability, and mechanism of resistance. *J Med Chem.* **46(15)**:3245-3256
- Chouroulinkov I, Antonakis K. **(1977)**. Antitumor effects of keto-nucleosides. Study of the antitumor activity of γ (3'-O-acetyl-4', 6'-dideoxy-beta-L-glycero-hex-3'-eno-pyranosyl) theophylline and 1(4'-keto-2'-3'-O-isopropylidene-alpha-L-"rhamnosyl"O thymine against L 1210 leukemia in mice. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* **285(9)**:1021-1024.
- Cory AH, Samano V, Robins MJ, Cory JG. **(1994)**. 2'-Deoxy-2'-methylene Derivatives of Adenosine, Guanosine, Tubercidin, Cytidine and Uridine as Inhibitors of L1210 cell growth in culture. *Biochem Pharmacol.* **47(2)**:365-71.
- De Clercq E. **(2002)**. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochim Biophys Acta.* **1587**:258-275
- Elion GB. **(1989)**. The purine path to chemotherapy. *Science.* **244**: 41-47.
- Gunaga P, Baba M, Jeong LS. **(2004)**. Assymmetric Synthesis of novel thioiso dideoxynucleosides with exocyclic methylene as potential Antiviral Agents. *J Org Chem.* **69(9)**:3208-3211
- Halliwell B. **(2001)**. Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences*

- Halmos T, Antonakis K. **(1975)**. The action of alkali on Keto-Nucleosides: the formation of saccharinic acid nucleosides during the alkaline degradation of 7-(6-deoxy-3,4-O-isopropylidene-beta-L-lyxohexopyranosylulose)theophylline. *Carbohydr Res.* **43(1)**:208-12.
- Halmos T, Cardon A, Antonakis K. **(1983)**. Interactions of Cytostatic Unsaturated Ketonucleosides with Sulfhydryl Containing Cell constituents. *Chem. Biol. Interact.* **46**:11-29
- Haouz A, Vanheusden V, Munier-Lehmann H, Froeyen M, Herdewijn P, Van Calenbergh S, Delarue M. **(2003)**. Enzymatic and Structural analysis of inhibitors designed against Mycobacterium tuberculosis thymidylate kinase. New insights into the phosphoryl transfer mechanism. *J Biol Chem.* **278(7)**:4963-71.
- Herdewijn P, De Clercq E. **(2001)**. The Cyclohexene Ring as Bioisostere of a Furanose Ring: Synthesis and Antiviral Activity of Cyclohexenyl Nucleosides. *Bioorg Med Chem Lett.* **11(12)**:1591-1597
- Jeong LS, Yoo SJ. **(1998)**. Synthesis and Antiviral Activity of Novel Isodideoxy Nucleosides with exocyclic methylene. *Bioorg Med Chem Lett.* **8(7)**:847-852
- Khan AR, Mulligan KX, Ollapally AP. **(2001)**. Synthesis of 5-chloro-1-(2,3-dideoxy-3-fluoro-beta-D-glycero-hex-2-enopyranose-4-ulosyl)uracil as potential Anticancer/Antiviral Agent. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **20(4-7)**:759-762
- Komiotis D, Delatre S, Holt L, Ollapally A, Balzariei J, De Clercq E, Ligo M. **(1991)**. Biologically Important Nucleosides: A General Method for the Synthesis of Unsaturated Ketonucleosides of Uracil and its Analogues. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **10(1)**:431 – 455.
- Komiotis D, Lim CT, Dieter JP, Le Breton GC, Venton DL. **(1992)**. PgH₂ Analogs as potential antiplatelet derivatives. *J Med Chem.* **35(16)**:3033-9.
- Lee J, Koo N, Min DB. **(2003)**. Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Society.* **3**:21-33.
- Lin TS, Luo MZ, Liu MC, Clarke-Katzenburg RH, Cheng YC, Prusoff WH, Mancini WR, Birnbaum GI, Gabe EJ, Giziewicz J. **(1991)**. Synthesis and Anticancer and Antiviral Activities of various 2'- and 3'-methylidene-substituted Nucleoside Analogues and Crystal Structure of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine hydrochloride. *J Med Chem.* **34(8)**:2607-15.

- MacCoss M, Robins MJ, **(1990)**. Anticancer Pyrimidines, Pyrimidine Nucleosides and Prodrugs. In the Chemistry of Antitumor Agents, Wilman D.E.V. Ed.; Chapman and Hall: New York. (p) 261-298.
- Matsuda A, Sasaki T. **(2004)**. Antitumor Activity of Sugar-modified Cytosine Nucleosides. *Cancer Sci.* **95(2)**;105-111.
- Matsuda A, Takenuki K, Sasaki T, Ueda T. **(1991)**. Nucleosides and Nucleotides, 97, Synthesis of new broad spectrum Antineoplastic Nucleosides, 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine (DMDC) and its derivatives. *J Med Chem.* **34(2)**:812-9.
- Maurinsh Y, Schraml J, De Winter H, Blaton N, Peeters O, Lescrinier E, Rozenski J, Van Aerschot A, De Clercq E, Busson R, Herdewijn P. **(1997)**. Synthesis and Conformational Study of 3-Hydroxy-4-(Hydroxymethyl)-1-Cyclohexanyl Purines and Pyrimidines. *J Org Chem.* **62(9)**:2861-2871.
- McMurry J. **(1999)**. Οργανική Χημεία (Τόμος II). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. (p)1235-1283
- Mylonas C, Kouretas D. **(1999)**. Lipid Peroxidation and Tissue Damage. *In Vivo.* **13(3)**:295-309
- Ostrowski T, Wroblowski B, Busson R, Rozenski J, De Clercq E, Bennett MS, Champness JN, Summers WC, Sanderson MR, Herdewijn P. **(1998)**. 5-Substituted Pyrimidines with a 1,5-anhydro-2, 3-dideoxy-D-arabino-hexitol moiety at N-1: Synthesis, Antiviral activity, Conformational analysis, and Interaction with viral thymidine kinase. *J Med Chem.* **41(22)**:4343-53.
- Pastor-Anglada M, Felipe A, Casado FJ. **(1998)**. Transport and Mode of Action of Nucleoside Derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends Pharmacol Sci.* **19(10)**:424-30.
- Perigaud C, Gosselin G, Imbach JL. **(1992)**. Nucleosides Analogues as Chemotherapeutic Agents: A Review. *Nucleosides and Nucleotides.* **11**:903-945.
- Prior R.L, Wu X, Schaich K. **(2005)**. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**:4290-4302.
- Robins RK, Kini GD. **(1990)**. Purines and Purine Nucleoside Analogues as Antitumor Agents. In the Chemistry of Antitumor Agents, Wilman D.E.V. Ed.; Chapman and Hall: New York. (p) 299-321.
- Saenger W. **(1984)**. Principles of Nucleic Acid Chemistry. Springer-Verlag. New York.

- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. **(2005)**. Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**:287-306.
- Spanou C, Manta S, Komiotis D, Dervishi A, Kouretas D. **(2007)**. Antioxidant Activity of a Series of Fluorinated Pyrano-nucleoside Analogues of N⁴-benzoyl Cytosine and N⁶-benzoyl Adenine. *International Journal of Molecular Sciences*. **8**:695-704.
- Stagos D, Karaberis E, Kouretas D. **(2005)**. Assessment of antioxidant/anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods. *In Vivo*. **19**:741-748
- Takenuki K, Matsuda A, Ueda T, Sasaki T, Fujii A, Yamagami K. **(1988)**. Design, Synthesis and Antineoplastic Activity of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine. *Med Chem*. **31(6)**:1063-4.
- Undurti N. Das, **(2002)**, A radical approach to cancer. *Med Sci Monit*, **8(4)**:RA79-92
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. **(2004)**. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **266**:37-56.
- Vastmans K, Froeyen M, Kerremans L, Pochet S, Herdewijn P. **(2001)**. Reverse Transcriptase Incorporation of 1,5-anhydrohexitol nucleotides. *Nucleic Acids Res*. **29(15)**:3154-3163.
- Vastmans K, Pochet S, Peys A, Kerremans L, Van Aerschot A, Hendrix C, Marlière P, Herdewijn P. **(2000)**. Enzymatic Incorporation in DNA of 1,5-anhydrohexitol nucleotides. *Biochemistry*. **39(42)**:12757-65.
- Vender MD, Sherman PD, Luciano PD, Tsakoulos DM. **(2001)**. Φυσιολογία του ανθρώπου: μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού. Εκδόσεις Πασχαλίδης (8^η έκδοση).
- Verheggen I, Van Aerschot A, Toppet S, Snoeck R, Janssen G, Balzarini J, De Clercq E, Herdewijn P. **(1993)**. Synthesis and Antiherpes Virus Activity of 1,5-anhydrohexitol nucleosides. *J Med Chem*. **36(14)**:2033-40.
- Verheggen I, Van Aerschot A, Van Meervelt L, Rozenski J, Wiebe L, Snoeck R, Andrei G, Balzarini J, Claes P, De Clercq E, Herdewijn PJ. **(1995)**. Synthesis, Biological Evaluation, and Structure Analysis of a series of new 1,5-anhydrohexitol nucleosides. *J Med Chem*. **38(5)**:826-35.
- Yamagami K, Fujii A, Arita M, Okumoto T, Sakata S, Matsuda A, Ueda T, Sasaki T. **(1991)**. Antitumor activity of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine, a new 2'-deoxycytidine derivative. *Cancer Res*. **51(9)**:2319-23.

- Yoo SJ, Kim HO, Lim Y, Kim J, Jeong LS. **(2002)**. Synthesis of Novel (2R,4R)-and (2S,4S)-iso dideoxynucleosides with exocyclic methylene as potential Antiviral Agents. *Bioorg Med Chem Lett*. **10(1)**;215-226
- Zhou W, Gumina G, Chong Y, Wang J, Schinazi RF, Chu CK. **(2004)**. Synthesis, structure-activity relationships, and drug resistance of beta-d-3'-fluoro-2',3'-unsaturated nucleosides as anti-HIV Agents. *J Med Chem*. **47(13)**:3399-408

