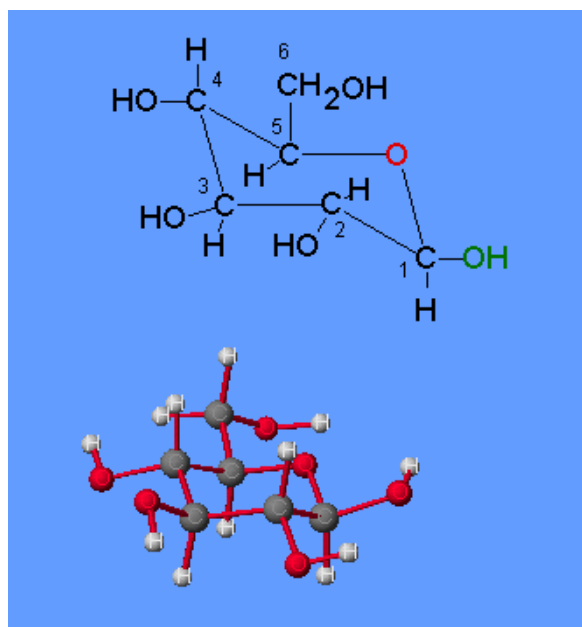


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Μωραΐτης Γεώργιος

Σχεδιασμός, σύνθεση και φασματοσκοπική μελέτη νέων *N*-β-D-
γλυκοπυρανόζυλο-αμινών ως αναστολείς της φωσφορυλάσης
του γλυκογόνου.



Λάρισα, 2016

Σχεδιασμός, σύνθεση και φασματοσκοπική μελέτη νέων *N*-β-D-γλυκοπυρανόζυλο-αμινών ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Κομιώτης Δημήτριος:** Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Μαρκουλάτος Παναγιώτης:** Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Κουρέτας Δημήτριος:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Επιβλέπων καθηγητής της εργασίας είναι ο κ. Κομιώτης Δημήτριος, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας, αλλά και για και τις εποικοδομητικές του υποδείξεις κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τη διδάσκουσα κα. Μαντά Στυλιανή για όλες τις γνώσεις που μου προσέφερε και ήταν απαραίτητες ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διπλωματική εργασία καθώς και για την υποστήριξή της. Ακόμη, ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Παρμενοπούλου Βανέσα για την υποστήριξη της και τις υποδείξεις της κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας.

Τέλος, θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω όλο το προσωπικό και τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ABSTRACT	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1.Υδατάνθρακες- σάκχαρα.....	8
1.2.Γλυκόζη.....	9
1.3.Γλυκογόνο.....	12
1.4.Σακχαρώδης Διαβήτης.....	12
1.5.Φυσιολογική δράση της ινσουλίνης.....	14
1.6.Υποϊνσουλιτισμός.....	15
1.7.Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	16
1.8.Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	18
1.9.Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	23
1.10.Γλυκοζιπικά ανάλογα ως υπογλυκαιμικοί παράγοντες.....	25
2. ΣΚΟΠΟΣ	29
3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR	36
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is a common but complex disease, which is characterized by the inability of the human organism to control the glucose levels in the bloodstream. Glycogen phosphorylase (GP) is one of the best studied enzymes in biochemistry, which plays a critical role in carbohydrate metabolism by regulating the degradation glycogen. Thus, GP has emerged as a promising therapeutic target for the design and synthesis of novel hypoglycemic drugs.

Since glucose derivatives have proven selective and efficient inhibitors of GP, the current study reports the synthesis and biochemical evaluation of three glucopyranosyl amide derivatives as inhibitors of GP. All compounds were fully characterized by spectroscopic techniques and were found to be competitive inhibitors of GP of the enzyme with K_i values ranging from 5.14 to 48.68 μM .

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο διαβήτης τύπου 2 είναι μια κοινή αλλά και αρκετά πολύπλοκη ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από την αδυναμία του ανθρώπινου οργανισμού να ελέγξει τα επίπεδα γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος. Το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) έχει μελετηθεί εκτενώς καθώς διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων εφόσον ρυθμίζει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Ως εκ τούτου η GP έχει αναδειχθεί ως ένας ελπιδοφόρος θεραπευτικός στόχος για το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Με δεδομένο ότι τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι παράγωγα της γλυκόζης είναι εκλεκτικοί και αποτελεσματικοί αναστολείς της GP, η παρούσα εργασία παρουσιάζει τη σύνθεση και τη βιολογική αποτίμηση τριών νέων γλυκοπυρανόζυλο αμιδικών αναλόγων ως εν δυνάμει αναστολείς της GP. Όλες οι ενώσεις χαρακτηρίστηκαν πλήρως με φασματοσκοπικές τεχνικές ενώ βρέθηκε τέλος ότι αποτελούν ανταγωνιστικούς αναστολείς της GP, με τιμές K_i που ποικίλουν από 5.14 μέχρι 48.68 μM .

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες-Σάκχαρα

Οι υδατάνθρακες ή αλλιώς σάκχαρα, είναι αλδεϋδικές ή κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλικές ομάδες που αποτελούν μια ομάδα οργανικών ενώσεων με γενικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$ και μοριακά βάρη που ποικίλουν από μικρότερα του 100 μέχρι εκατοντάδες χιλιάδες. Βρίσκονται σε κάθε ζωντανό οργανισμό, συνιστούν μέρος του περιβλήματος των κυττάρων, είναι δομικές μονάδες στα μόρια του DNA που μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες, ενώ συχνή είναι η χρήση τους και σε φαρμακευτικές ενώσεις στη σύγχρονη επιστήμη. Καθώς αποτελεί μια από τις πλέον πολυάριθμες ομάδες φυσικών προϊόντων, πρόκειται για ένα επιστημονικό αντικείμενο που έχει εκτενώς μελετηθεί αλλά παραμένει ένα από τα πλέον δημοφιλή στην οργανική χημεία. Σε αυτό συμβάλει κυρίως η εύκολη διαθεσιμότητα τους αλλά και η ποικιλία αντιδράσεων τους.

Στην κατηγορία των υδατανθράκων ανήκουν τόσο απλά σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη αλλά και σύνθετα μόρια γνωστά ως πολυσακχαρίτες, όπως το γλυκογόνο και η κυτταρίνη. Βέβαια θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ ενός μεγάλου ολιγοσακχαρίτη και ενός μικρού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτη, αφού οι συγκεκριμένοι όροι στην πράξη χρησιμοποιούνται απλά για να περιγράψουν ενώσεις, των οποίων το μοριακό βάρος παρουσιάζει ένα ευρύ πεδίο τιμών.

Γενικά είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους σε τέσσερις κύριες κατηγορίες :

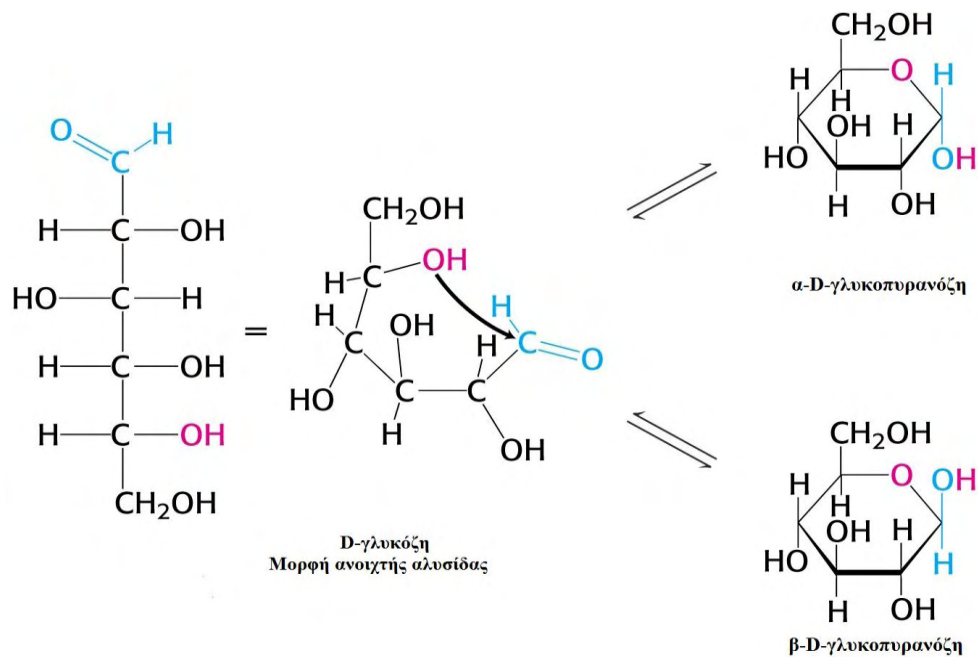
- Μονοσακχαρίτες -όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη- οι οποίοι αποτελούν τις μονομερείς μονάδες για την σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- Δισακχαρίτες που έχουν ως δομικές μονάδες δύο μονοσακχαρίτες. Οι πλέον γνωστοί δισακχαρίτες είναι το καλαμοσάκχαρο (σακχαρόζη), η λακτόζη και η μαλτόζη.
- Ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από 20-30 μονοσακχαρίτες.

- Πολυσακχαρίτες, όπως είναι το γλυκογόνο, το άμυλο και η κυτταρίνη που αποτελούνται από εκατοντάδες ή και χιλιάδες μόρια μονοσακχαριτών.

Ο γενικός τύπος $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ανταποκρίνεται πλήρως στο μοριακό τύπο των μονοσακχαριτών οι οποίοι έχουν ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα και οξυγόνου, ενώ περιέχουν διπλάσιο αριθμό ατόμων υδρογόνου στο μόριό τους. Οι μικρότεροι μονοσακχαρίτες με $n=3$ είναι η διυδροξυακετόνη και η D- ή L-γλυκεραλδεΐδη και αναφέρονται ως τριόζες. Τέλος, απλοί μονοσακχαρίτες με τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούνται ως τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες, αντίστοιχα.

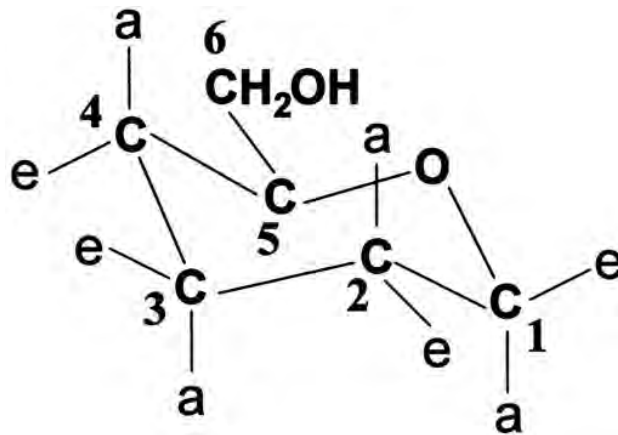
1.2 Γλυκόζη

Η γλυκόζη –όπως προαναφέρθηκε– είναι ένας μονοσακχαρίτης αποτελούμενος από μια αλυσίδα με 6 άτομα άνθρακα (εξόζη) τα οποία συνδέονται με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η συνηθέστερη διαμόρφωση με την οποία συναντάται στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν βρίσκεται σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται ονομάζεται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α -D-γλυκοπυρανόζη και η β -D-γλυκοπυρανόζη (Εικόνα 1). [1]



Εικόνα 1

Οι χαρακτηρισμοί α και β αναφέρονται στη θέση στον χώρο όπου βρίσκεται η υδροξυλομάδα του ανωμερούς άνθρακα (C-1) σε σχέση με τον υποκαταστάτη του C-5. Όταν ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα στη θέση C-5 (θέση trans), τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως ανωμερές α , ενώ στην αντίθετη περίπτωση ως ανωμερές β . Οι απεικονίσεις αυτές (Σχήμα 1) είναι γνωστές ως δομές Haworth και χρησιμοποιούνται ευρέως για διδακτικούς κυρίως σκοπούς, αλλά δεν παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι δακτύλιοι της πυρανόζης υιοθετούν κυρίως στερεοδιατάξεις ανάκλινδρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, αφού όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνίας (Σχήμα 1). [2]



Σχήμα 1: Μορφή ανάκλινδρου μιας πυρανόζης
(e = ισημερινός υποκαταστάτης, a = αξονικός υποκαταστάτης)

Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου της πυρανόζης είναι δύο ειδών: αξονικοί (axial) και ισημερινοί (equatorial) (Σχήμα 2). Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου και - όταν έχουν μέγεθος μεγαλύτερο του υδρογόνου- παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλον εφόσον βρίσκονται στην ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα, οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο του δακτυλίου και δεν παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλον, καθώς υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος. Ως εκ τούτου ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ότι στην αξονική θέση.

Η γλυκόζη -πέρα από βασική δομική μονάδα μεγαλύτερου μοριακού βάρους υδατανθράκων- αποτελεί την κυριότερη πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς και το βασικό ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου. Υπολογίζεται ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έτσι ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασική πηγή ενέργειας ενώ τα ερυθρά αιμοσφαίρια χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας αποκλειστικά τη γλυκόζη. Επειδή η γλυκόζη παίζει τόσο σπουδαίο ρόλο, η συγκέντρωσή της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης. [3] Η συγκέντρωση της στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ -όπως θα αναφερθεί και στην συνέχεια- ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα

και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη. [1] Επίσης, το ήπαρ μπορεί να διοχετεύσει γλυκόζη στο αίμα μέσω της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, όπου το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη.

1.3 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο αποτελείται από μόρια γλυκόζης που σχηματίζουν διακλαδισμένες αλυσίδες. Η κύρια αλυσίδα συνδέεται με $\alpha(1\rightarrow4)$ γλυκοζιτικούς δεσμούς και έχει πολυάριθμους $\alpha(1\rightarrow6)$ γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι συνδέουν πολλές διακλαδώσεις κατά μήκος της αλυσίδας. Το γλυκογόνο είναι αποταμιευτική ουσία των ζώων και των μυκήτων. Στα σπονδυλωτά αποθηκεύεται στο ήπαρ και στους μύες. Διασπώμενο, αποδίδει μόρια γλυκόζης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας. Η αποδόμηση του γλυκογόνου (γλυκογονόλυση) ελέγχεται από δύο ορμόνες, τη γλυκαγόνη και την αδρεναλίνη. Και οι δύο ορμόνες επηρεάζουν τη δραστικότητα δύο ενζύμων, της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, το οποίο συμμετέχει στη αποικοδόμηση του γλυκογόνου και ενεργοποιείται, και της συνθετάσης του γλυκογόνου, που συμμετέχει στη σύνθεση του γλυκογόνου και απενεργοποιείται. Αντίθετα, η σύνθεση του γλυκογόνου (γλυκογονογένεση) διεγείρεται από την ινσουλίνη. [4]

1.4. Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), αποτελεί μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, η οποία εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δεν διατηρούνται σταθερά. Όταν ο οργανισμός είναι υγιής, τα επίπεδα γλυκόζης ρυθμίζονται από τη δράση της ινσουλίνης. Στο ΣΔ, είτε το πάγκρεας παράγει ελάχιστη ή καθόλου ινσουλίνη (διαβήτης τύπου I), είτε η ινσουλίνη η οποία παράγεται δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό (διαβήτης τύπου II) κάτι το οποίο οδηγεί σε υπεργλυκαιμία. Ο διαβήτης τύπου I ή νεανικός διαβήτης συναντάται κυρίως σε άτομα νεαρής ηλικίας και οφείλεται στην καταστροφή των β -κυττάρων του παγκρέατος, που εκκρίνουν ινσουλίνη. Ο διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται και

ως διαβήτη των ενηλίκων και κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Έχει παρατηρηθεί, ότι ο διαβήτης τύπου II εμφανίζεται συνήθως, σε άτομα ηλικίας άνω των 40 χρόνων και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών.

Εκτός από του δύο παραπάνω τύπους ΣΔ παρατηρείται και ο διαβήτης της κύησης. Πρόκειται για την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. (δεν συμπεριλαμβάνονται στον ορισμό γυναίκες με γνωστό διαβήτη πριν την έναρξη της εγκυμοσύνης). Ο τύπος αυτός μοιάζει με το διαβήτη τύπου 2 ως προς το ότι χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης και ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Αυτός ο τύπος ΣΔ συναντάται κυρίως σε παχύσαρκες γυναίκες. Ο Διαβήτης κύησης αφορά στο 3-5% των κυήσεων. Το 30-40% των γυναικών με διαβήτη κύησης θα αναπτύξουν διαβήτη τύπου 2 αργότερα στη ζωή τους. Ο διαβήτης της κύησης είναι αναστρέψιμος και υποχωρεί μετά τον τοκετό, μπορεί όμως να προκαλέσει επιπλοκές και προβλήματα στην υγεία της μητέρας και του νεογνού.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το 2006 οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως ξεπερνούν τα 170 εκατομμύρια, αριθμός που αναμένεται να διπλασιαστεί μέχρι το 2030 καθώς η συχνότητα της νόσου αυξάνει ραγδαία. [4] Στην Ελλάδα το ποσοστό του πληθυσμού που φαίνεται να πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη είναι περίπου 10%. Το 80% των ασθενών με διαβήτη τύπου II είναι παχύσαρκοι και σύμφωνα με την επιδημιολογική μελέτη της Ελληνικής Εταιρίας Παχυσαρκίας, το 41% των ανδρών και το 30% των γυναικών είναι υπέρβαροι γεγονός που κατατάσσει τη χώρα μας στις πρώτες θέσεις στην ΕΕ κατανάλωσης φαρμάκων έναντι του σακχαρώδη διαβήτη. [5]

Η κλασική συμπτωματολογία του σακχαρώδους διαβήτη περιλαμβάνει την πολυουρία, την πολυδιψία, την πολυφαγία και την απώλεια σωματικού βάρους. Στον διαβήτη τύπου I, η εισβολή της νόσου είναι συνήθως απότομη και συχνά η πρώτη εκδήλωσή της μπορεί να είναι η ανάπτυξη διαβητικής κετοξέωσης, με ναυτία, εμέτους, διάχυτο κοιλιακό άλγος και απώλεια συνείδησης. Στον διαβήτη τύπου II, η νόσος εισβάλλει βαθμιαία, πολυφαγία παρατηρείται σπανιότερα, ενώ συχνά συνυπάρχουν αδυναμία, κόπωση, ζάλη

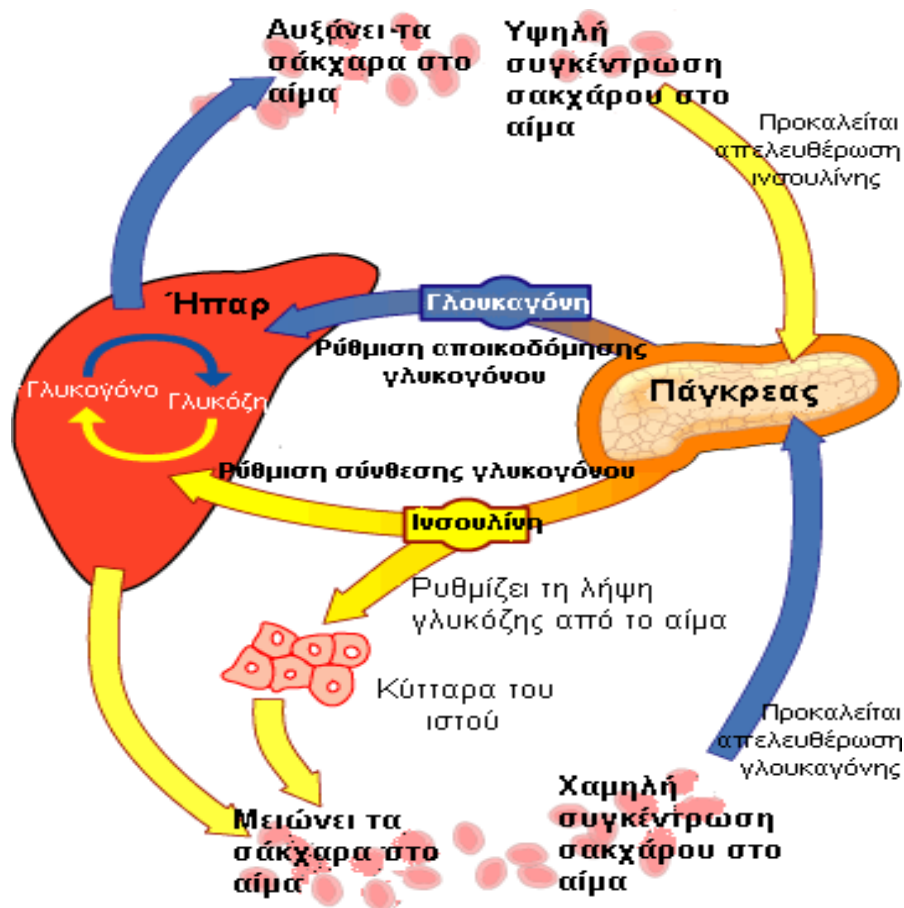
και ευπάθεια σε λοιμώξεις. Συχνά, η συμπτωματολογία στον διαβήτη τύπου II λείπει τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) Οι πρώτες δέκα χώρες σε αριθμό ασθενών με διαβήτη είναι οι εξής: Ινδία, Κίνα, ΗΠΑ, Ινδονησία, Ιαπωνία, Πακιστάν, Ρωσία, Βραζιλία, Ιταλία και Μπαγκλαντές. Στις χώρες αυτές ένας στους τέσσερις θανάτους σε άτομα ηλικίας 35 με 64 χρόνων, οφείλεται στο σακχαρώδη διαβήτη. [6]

1.5. Φυσιολογική δράση της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο, το οποίο παράγεται από τα β-κύτταρα της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος και διαδραματίζει έναν πολύπλευρο ρόλο στον μεταβολισμό. Στο παρακάτω σχήμα παρατηρείται η πορεία ρύθμισης της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα.

Πιο συγκεκριμένα όταν η συγκέντρωση γλυκόζης είναι αυξημένη στο αίμα, απελευθερώνεται από το πάγκρεας ινσουλίνη η οποία κατευθύνεται στο ήπαρ. Η ινσουλίνη προκαλεί σύνθεση γλυκογόνου στο ήπαρ με επακόλουθο, τη μείωση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα (πορεία με κίτρινα βέλη, σχήμα 3). Η χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης που λαμβάνεται από το πάγκρεας και το ήπαρ. Στο ήπαρ η γλυκαγόνη προκαλεί τη διάσπαση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης (πορεία με μπλε βέλη, εικόνα 2). Η γλυκόζη μεταφέρεται στο αίμα και αυξάνει την συγκέντρωση του σακχάρου.



Εικόνα 2 (health.howstuffworks.com/diseases-conditions/diabetes/diabetes1.htm) [7]

1.6. Υποϊνσουλινισμός

Οι λόγοι μείωσης της διαθέσιμης ινσουλίνης στον οργανισμό μπορεί να σχετίζονται με καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, με μειωμένη ανταπόκριση των β-κυττάρων, με αντισώματα κατά της ινσουλίνης, με αυξημένη αποδόμηση της στο ήπαρ αλλά και με δομικές ανωμαλίες στο μόριο της ινσουλίνης.

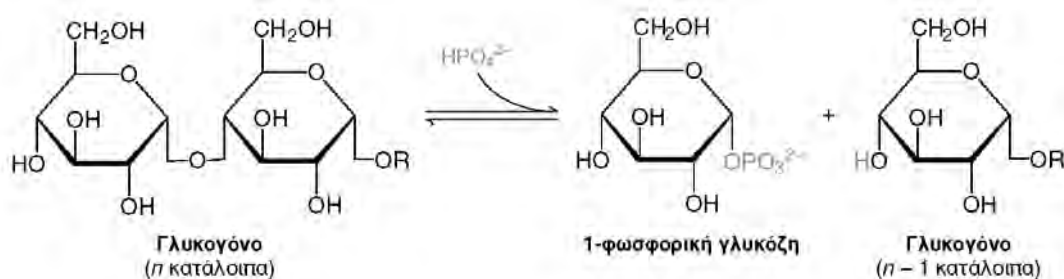
Επίσης μπορεί να είναι μειωμένη η ανταπόκριση στην ινσουλίνη των κυττάρων «στόχου», που μπορεί να οφείλεται σε μείωση του διαθέσιμου αριθμού υποδοχέων ινσουλίνης, σε μειωμένη χημική συγγένεια μεταξύ ινσουλίνης και υποδοχέων ή σε κάποια ενδοκυτταρική ανωμαλία. [8]

1.7. Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Οι Carl & Gerty Cori ήταν αυτοί που μελέτησαν διεξοδικά τη μεταβολική οδό της γλυκογονόλυσης, γύρω στο 1936. Το ζεύγος Cori απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης. [9]

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης (Σχήμα 4). Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού χαρακτηρίζεται ως φωσφορόλυση. Αυτό φαίνεται και στην παρακάτω σχήμα 2.

Γλυκογόνο (n κατάλοιπα) + Pi → 1-φωσφορική-γλυκόζη + γλυκογόνο (n - 1 κατάλοιπα)



Σχήμα 2

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η λεγόμενη γλυκοζιδάση α -1,6, καθώς και μια μεταφοράση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται. [1] Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση χαρακτηρίζεται αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6.

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το σάκχαρο που ελευθερώνεται είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη. [1] Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης. [1]

Δομικά η GP είναι μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ότι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B₆. Με βάση διάφορα πειράματα που έγιναν στο παρελθόν αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστικότητα του ενζύμου. [10] Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γεινίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση. [11]

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση. [1]

Φυσιολογικά η δραστηριότητά της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP). [12]

1.8. Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

Οι ενζυμικοί μηχανισμοί και οι αλληλεπιδράσεις που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες συντονίζονται με την βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η δομή των οποίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν τη δράση τους ανάλογα με τις κυτταρικές ανάγκες. Αλλοστερικές ονομάζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν

τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το αλλοστερικό και το καταλυτικό. [13] Το καταλυτικό κέντρο, είναι υπεύθυνο για τη βιολογική δράση της πρωτεΐνης. Σ' αυτό συνδέεται το *υπόστρωμα*, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται ένας άλλος μεταβολίτης, ο *αλλοστερικός τροποποιητής*. Όταν σχηματίζεται το σύμπλοκο ένζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής προκαλείται μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται αλλοστερική μετάπτωση. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή. [13]

Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή. [13]

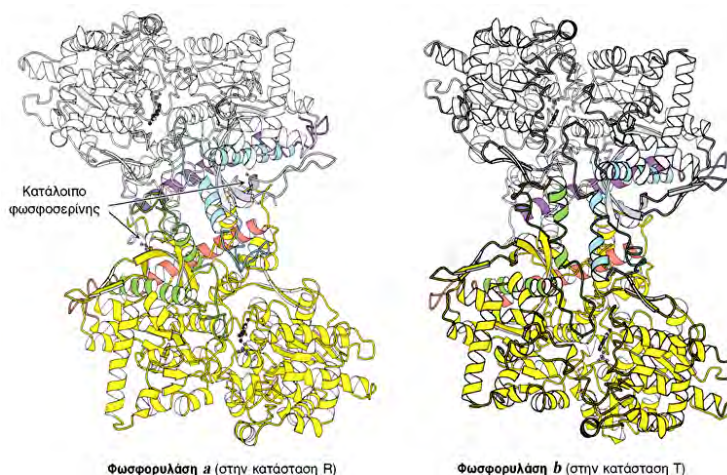
Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις με τη σειρά τους χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Έτσι, έχουμε τις ομοτροπικές, μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και τις ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την κατάσταση T και R, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια κατάσταση στην άλλη, ενώ η συγγενειά τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε μονομερές δεν επηρεάζει κατά κανένα τρόπο την σύνδεσή του στα υπόλοιπα μονομερή (δηλαδή οι μικροσκοπικές σταθερές διάστασης στα σύμπλοκα μεταξύ μονομερών κατάστασης T ή R και υποστρώματος είναι αντίστοιχα ίδιες. [13]

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με

βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα. [13]

Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται ανάλογα με το αν η αλλοστερική μετάπτωση προκαλείται από αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου. Σημειώνεται ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών. [13]

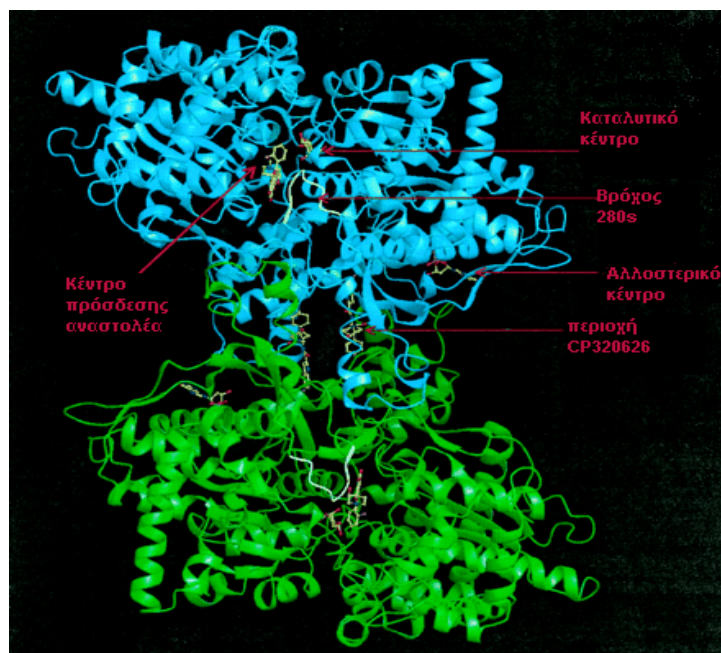
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T (εικόνα 3). Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α -έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη. [1]



Εικόνα 3. Οι δομές της φωσφορυλάσης a και b. Η φωσφορυλάση a είναι φωσφορυλιωμένη και στις δύο υπομονάδες στη Ser14. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή κατάσταση R. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα ενώ η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα. Επίσης απεικονίζονται οι ρυθμιστικές περιοχές με πορτοκαλί και πράσινο χρώμα. Η φωσφορυλάση b δεν είναι φωσφορυλιωμένη και συναντάται κυρίως στην T κατάσταση.

Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο όταν παρουσιάζονται υψηλές συγκεντρώσεις AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Η ATP λειτουργεί ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. [1] Όταν οι συνθήκες είναι φυσιολογικές, η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Από την άλλη μεριά, η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης η οποία παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια.

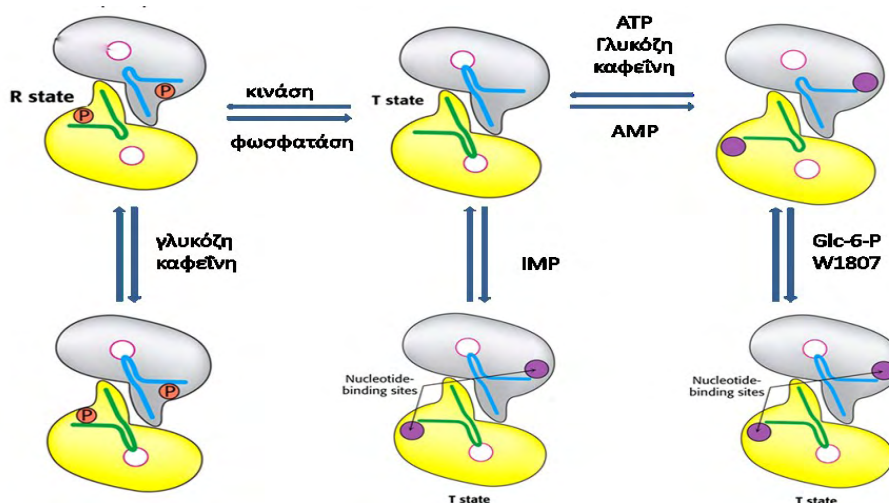
Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο (εικόνα 4). Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική κατάσταση T. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) κάτι το οποίο προκαλεί μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την κατάσταση T. Τέλος, στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την κατάσταση T, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την κατάσταση R και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP. [14]



Εικόνα 4. Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Οι αναστολείς είναι προσδεδμένοι στα κέντρα του ενζύμου, ενώ υποδεικνύεται και η θέση του βρόχου 280s.

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης b είναι δυνατόν να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως η IMP) και να ανασταλεί από η ATP, η ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν in vitro να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Με παρόμοιο τρόπο λειτουργούν: η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} . [10]

Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό όταν απουσιάζει το AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P (Εικόνα 5). [15]



Εικόνα 5. Ρύθμιση της φωσφορυλάσης του μυός (Stryer 1997)

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει κατά ένα μεγάλο βαθμό από εκείνη των μυών, κι αυτό εξαιτίας του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α, αλλά όχι η β εμφανίζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετατοπίζει την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. [1]

1.9. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Σύμφωνα με βιολογικές μελέτες η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. [14] Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην

αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται ως στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας. [16]

Ας αναφερθεί ότι η ύπαρξη των τριών ισομορφών (ηπατικής, μυϊκής, του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Πιο συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές. [17] Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ. [18]

Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου ίσως να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της κατάστασης T της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιορισθεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Κατ' αυτό τον τρόπο, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν

κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων.
[19]

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, που θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu\text{M}$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης [20] στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με $K_i \approx 0.1 \mu\text{M}$.

1.10 Γλυκοζιτικά ανάλογα ως υπογλυκαιμικοί παράγοντες

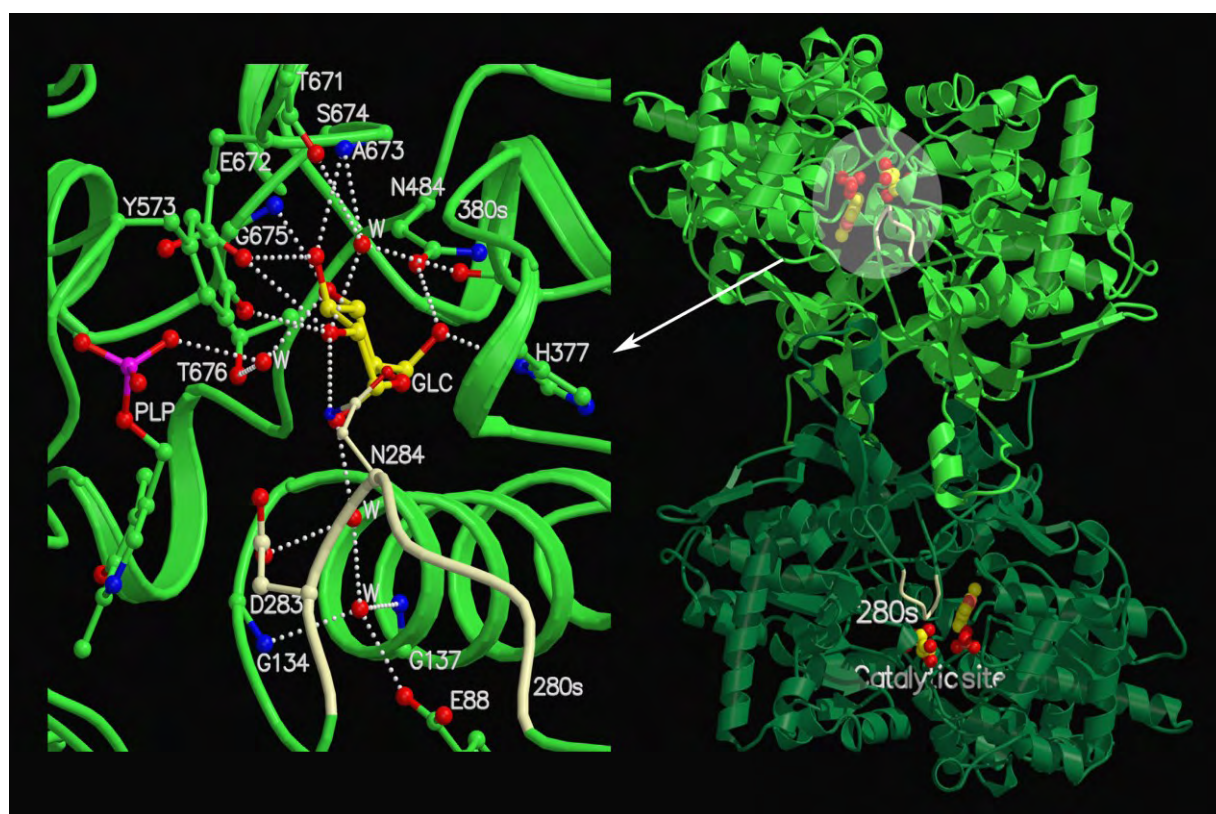
Ο σακχαρώδης διαβήτης –όπως προαναφέρθηκε– αποτελεί μια από τις βασικές διαταραχές μεταβολισμού των υδατανθράκων. Η συγκεκριμένη διαταραχή περιλαμβάνει δύο κυρίως τύπους (τύπου I και τύπου II) και μπορεί να οδηγήσει σε τύφλωση, νεφρική ανεπάρκεια, ενώ είναι γνωστό ότι αυξάνει σε μεγάλο βαθμό τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, οδηγώντας σε καρδιακή προσβολή, έμφραγμα και ακρωτηριασμό των κάτω άκρων. Περίπου το 90% των διαβητικών είναι τύπου II. Όσον αφορά την αντιμετώπιση του, αυτή αφορά κυρίως διαίτα, άσκηση, υπογλυκαιμικά φάρμακα και αν αυτά αποτύχουν χορήγηση ινσουλίνης. Αξίζει, ωστόσο να σημειωθεί ότι είναι αρκετές οι περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα από τις παραπάνω προσπάθειες δεν είναι πάντα ικανοποιητικά. Κατά συνέπεια, η επιστήμη έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Φυσικά, σκοπός αυτών των φαρμάκων θα είναι ο καλύτερος γλυκαιμικός έλεγχος κάτι το οποίο θα φέρει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου.

Η ανακάλυψη αντιδιαβητικών φαρμάκων αποτελεί ένα από τους κύριους στόχους των ερευνητικών τμημάτων πολλών μεγάλων φαρμακοβιομηχανιών (AstraZeneca, Aventis Pharma, Pfizer, Novo Nordisk A/S, κ.ά.). Οι θεραπείες που υπάρχουν αυτή τη στιγμή είναι συχνά ατελείς ή προκαλούν σημαντικές

ανεπιθύμητες ενέργειες. Η διεθνής ερευνητική προσπάθεια εστιάζεται σε αντιγονοειδικές ή γενικότερα εξειδικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις με ενδεχομένως ριζικά αποτελέσματα.

Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου, εξαιτίας του κεντρικού ρόλου που κατέχει, μεταξύ άλλων ενζύμων στο μεταβολισμό του γλυκογόνου χρησιμοποιείται ως μοριακός στόχος για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

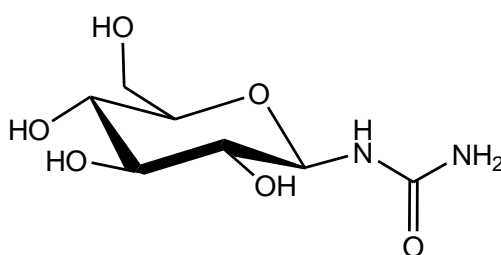
Η γνώση της τρισδιάστατης δομής της α -D-γλυκόζης ως συμπλόκου με τη φωσφορυλάση του μυός βοήθησε στη λεπτομερή καταγραφή των αλληλεπιδράσεων αυτής με τα αμινοξέα στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου και ειδικότερα με την πλευρική αλυσίδα των αμινοξέων Asn284 και Asp283. Τα αμινοξέα αυτά προέρχονται από τον εύκαμπτο βρόχο 280s, ο οποίος παρεμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Απεικόνιση του τρόπου σύνδεσης της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο της μυϊκής φωσφορυλάσης από κουνέλι. Οι δεσμοί υδρογόνου εμφανίζονται με διακεκομμένες γραμμές ενώ η θέση του βρόχου 280s υποδεικνύεται με υποκίτρινο χρώμα.

Τα τελευταία έτη, μελέτες κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού, έχουν καθοδηγήσει τη σύνθεση ποικίλων αναλόγων του α - και β -άνυδρο-γλυκοεπτονικού οξέος, της 1-δεσοξυ-1-θειο- β -D-γλυκόζης, της β -D-γλυκοπυρανοζυλαμίνης καθώς και της σπιροϋδαντοΐνης με αυξημένη χημική συγγένεια προς τη GPb [21-24] ενώ πιο συγκεκριμένα η ένωση με κωδική ονομασία W1807 (Bayer AG) βρέθηκε ως ο πλέον ισχυρός αναστολέας της GPb ($K_i = 1.6 \mu\text{M}$, 106 φορές μικρότερη της αντίστοιχης K_i για την α -D-γλυκόζη). *In silico* μελέτες σε αξονικές και ισημερινές υποκαταστάσεις στην 3'-θέση της α -D-γλυκόζης, προέβλεψαν ότι καμία από τις ισημερινές υποκαταστάσεις που μελετήθηκαν δε θα είχε καλύτερη συγγένεια για τη GPb από ότι η υδροξυλική ομάδα της (-OH) ενώ η υποκατάσταση σε αξονική θέση προβλέπεται να δημιουργηθεί ανάλογα με πιο αυξημένη βιοδραστικότητα.. [25] Ενώ τέλος γλυκοπυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα, που φέρουν αλκύνυλο υποκαταστάτες στην περιοχή της ετεροκυκλική βάσης, παρουσίασαν επίσης αυξημένη ανασταλτική δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Παράγωγα της γλυκόζης τέλος, είναι γνωστά ως εκλεκτικοί και αποτελεσματικοί αναστολείς της GP. Η ένωση της *N*-ακετυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλο αμίνης (Σχήμα 3) αποτέλεσε έναν αποτελεσματικό αναστολέα της GP που προσδένεται στο καταλυτικό της κέντρο ($K_i = 32 \mu\text{M}$) που οδήγησε σε μια νέα τάξη ενώσεων στο συγκεκριμένο επιστημονικό αντικείμενο. [26]



Σχήμα 3

Η γνώση συνεπώς, του μηχανισμού δράσης των ενώσεων που δρουν ανασταλτικά έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι απαραίτητη για τον περαιτέρω σχεδιασμό και σύνθεση ενώσεων με αυξημένη συγγένεια για το

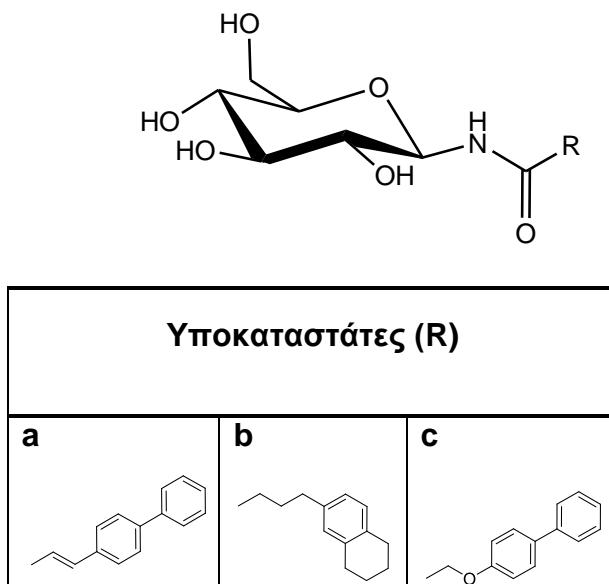
ένζυμο και τη μετέπειτα δημιουργία φαρμάκων έναντι του διαβήτη τύπου II.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως αναφέρθηκε, το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου κατέχει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και ως εκ τούτου αποτελεί μοριακό στόχο για τη σχεδίαση νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση τριών νέων τροποποιημένων γλυκοπυρανόζυλο αμιδικών αναλόγων, οι οποίοι διαφέρουν στο τμήμα του υποκαταστάτη τους, ως εν δυνάμει αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Τα μόρια που προέκυψαν είχαν τη γενική δομή που απεικονίζεται κάτωθι (Σχήμα 4).



Σχήμα 4

Στα μόρια αυτά πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια κινητική μελέτη ώστε να διαπιστωθεί η αρχική υπόθεση.

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

i. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin layer chromatography)

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F254) ώστε να ελεγχθεί η αντίδραση. Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 30% είτε υπό λυχνία υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας (254 nm).

ii. Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με υπό πίεση αέρα (flash chromatography), σε silica gel (240-400, Merck grade).

iii. Ξήρανση διαλυτών

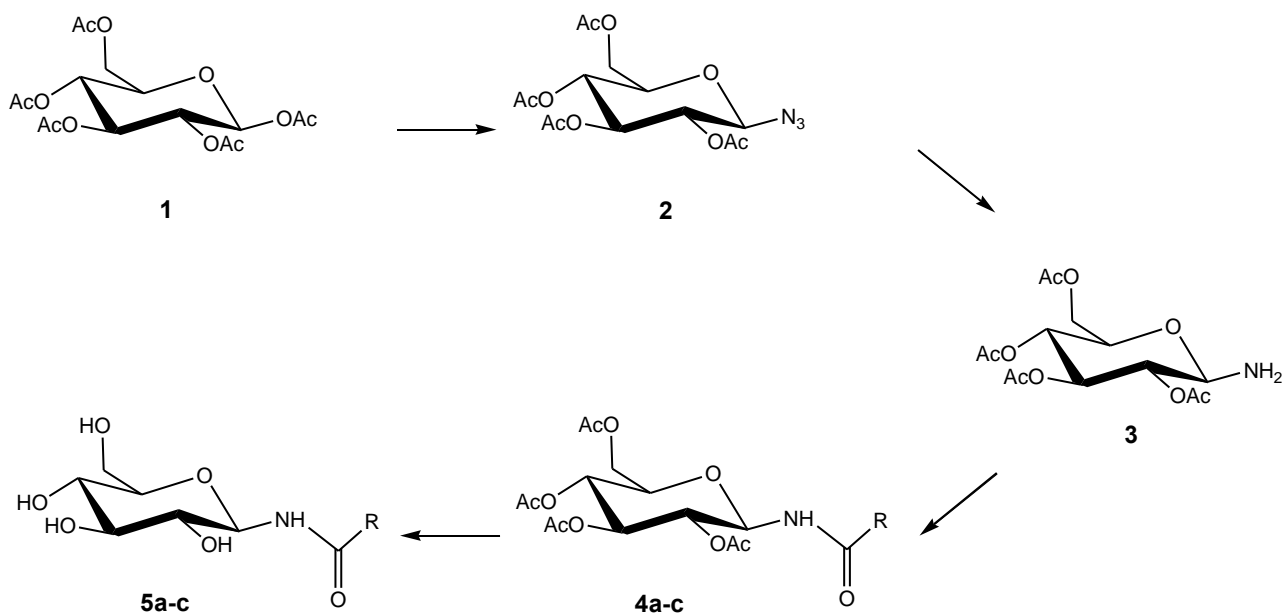
Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων που απαιτούν άνυδρους οργανικούς διαλύτες πραγματοποιείται προηγούμενα ξήρανσή τους. Το διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Το δε *N,N*-διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF) αποστάχθηκε υπεράνω υδριδίου του ασβεστίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4 Å, όπου και αποθηκεύτηκε.

iv. Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση ενός φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ¹H NMR μετρήθηκαν με Bruker 500 MHz, χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃) ή σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ¹H.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ι. Επισκόπηση συνθετικής οδού



Υποκαταστάτες (R)		
a	b	c

ii. Μεθοδολογία της σύνθεσης

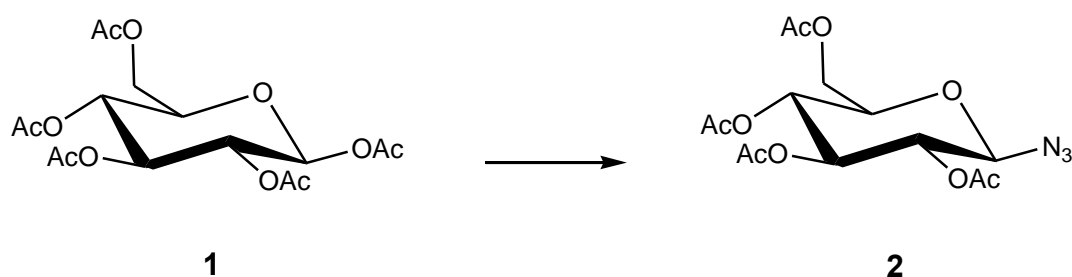
Αφετηρία για τη σύνθεση των νέων γλυκοπυρανοζυλοαμιδικών αναλόγων στόχους αποτέλεσε το 2,3,4,6-τετράκις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζυλο-αζίδιο (**2**) το οποίο λαμβάνεται ύστερα από αντίδραση της εμπορικά διαθέσιμης 1,2,3,4,6-πεντάκις-Ο-ακέτυλο-γλυκοπυρανόζης (**1**) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) με καταλύτη τετραχλωριούχο κασσίτερο (SnCl₄).

Στη συνέχεια, το γλυκοπυρανόζυλο αζίδιο **2** υδρογονώθηκε προς την αντίστοιχη αμίνη **3** με τη βοήθεια παλλαδίου σε άνθρακα 10% (Pd/C 10%) και διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) για 24 h.

Αφού επιβεβαιώθηκε η διαθεσιμότητα της γλυκοπυρανόζυλο-αμίνης **3** πραγματοποιήθηκε σύζευξή της με τα κατάλληλα εμπορικά χλωρίδια **a-c** προς σχηματισμό των ακετυλιωμένων γλυκοπυρανόζυλο αμινών **4a-c** σε ικανοποιητικές αποδόσεις 63-83% ύστερα από χρωματογραφία στήλης υπό πίεση.

Για τη λήψη τέλος των επιθυμητών τελικών προϊόντων **5a-c**, ακολουθήθηκε αποπροστασία των ενώσεων **4a-c** σε διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας (κορεσμένη στους 0 °C) για 24 h, οπότε και λήφθησαν τα επιθυμητά προϊόντα **5a-c** σε ικανοποιητικές αποδόσεις 68-80% ύστερα από χρωματογραφία στήλης.

iii. Σύνθεση του 2,3,4,6-τετράκις-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζυλο-αζιδίου (**2**)

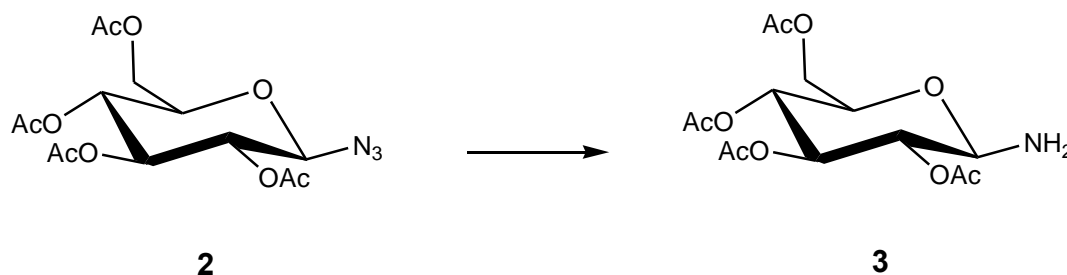


Σε υπό ανάδευση διάλυμα της 1,2,3,4,6-πεντάκις-Ο-ακέτυλο-γλυκοπυρανόζης (**16**) (0.026 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) (126 mL) προστίθενται 0.031 mmol τριμέθυλο σίλιλο αζίδιο (Me₃SiN₃) και 0.013 mmol SnCl₄, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC), το διάλυμα αραιώνεται με CH₂Cl₂ και εκχυλίζεται με νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται

υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου (Na₂SO₄), ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως.

TLC (<i>n</i> -εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:4)	R _f = 0.28
Απόδοση	86%
[α] _D	+ 2 (c = 0.20)

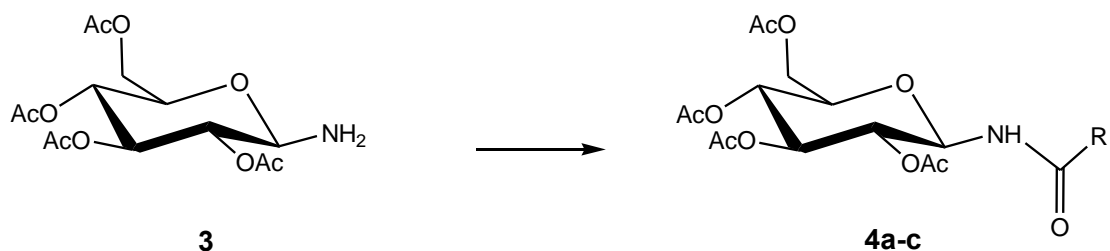
iv. Σύνθεση της 2,3,4,6-τετράκις-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζυλο-αμίνης (3)



Για τη λήψη του προϊόντος **3** πραγματοποιήθηκε υδρογόνωση της ένωσης **2** (13.4 mmol) με τη βοήθεια παλλαδίου σε άνθρακα 10% (0.95 g), σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) (184.6 mL), στους 20 °C για 24 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC), το διάλυμα φιλτράρεται, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως

TLC (<i>n</i> -εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 2:3)	R _f = 0.18
Απόδοση	77%
[α] _D	+ 4 (c = 0.20)

v. **Σύνθεση των ακετυλιωμένων γλυκοπυρανόζυλο αμινών 4a-c**



Υποκαταστάτες (R)		
a	b	c

a. **Σύνθεση της N-(E)-3-(Διφαίνυλο-4-υλο)ακρυλόυλο-(2,3,4,6-τέτρακις-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-αμίνης (4a)**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της ακετυλιωμένης β-D-γλυκοπυρανόζυλο αμίνης **3** (1.44 mmol) σε άνυδρο DMF (3 mL) προστίθενται, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, 0.96 mmol τριεθυλαμίνης (Et₃N) και 0.96 mmol από το ακυλοχλωρίδιο **a**. Μετά από ανάδευση 1 h, η αντίδραση ολοκληρώνεται (TLC), ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως .

TLC (<i>n</i> -εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1)	R _f = 0.30
Απόδοση	68%
[α] _D	+6 (c = 0.20)

b. **Σύνθεση της N-4-(5,6,7,8-Τετραϋδρονάφθαλενο-2-υλο)βουτανόυλο-(2,3,4,6-τετράκις-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-αμίνης (4b)**

Η γλυκοπυρανόζυλο αμίνη **4b** συντίθεται μετά από ακυλίωση της αμίνης **3** από το ακυλοχλωρίδιο **b**. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια

που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **4a**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση.

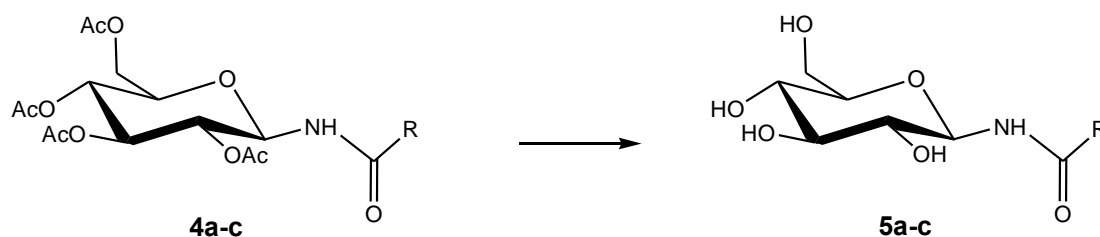
TLC (<i>n</i> -εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1)	R _f = 0.6
Απόδοση	63%
[α] _D	-8 (c = 0.20)

ε. Σύνθεση της *N*-2-(Διφαίνυλο-4-υλοξυ)ακέτυλ-(2,3,4,6-τετράκισ-*O*-ακέτυλο-β-*D*-γλυκοπυρανόζυλο)-αμίνης (**4c**)

Το επιθυμητό προϊόν **4c** συντίθεται μετά από ακυλίωση της αμίνης **3** από το ακυλοχλωρίδιο **c** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **4a**. Με τον ίδιο τρόπο, το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση.

TLC (<i>n</i> -εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1)	R _f = 0.33
Απόδοση	83%
[α] _D	-6 (c = 0.20)

vi. Σύνθεση των αποπροστατευμένων γλυκοπυρανόζυλο αμινών **5a-c**



Υποκαταστάτες (R)		
a	b	c

a. Σύνθεση της *N*-(*E*)-3-(Διφαινυλο-4-υλ)ακρυλόυλο-(β-*D*-γλυκοπυρανόζυλο)-αμίνης (**5a**)

Διάλυμα της ένωσης **4a** (0.18 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (κορεσμένη στους 0 °C, 10 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης.

TLC (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1)	Rf = 0.27
Απόδοση	80%
[α] _D	-26 (c = 0.20)

b. Σύνθεση της *N*-4-(5,6,7,8-Τετραϋδρόναφθαλενο-2-υλο)βουτανόυλο-(β-*D*-γλυκοπυρανόζυλο)-αμίνης (**5b**)

Το αποπροστατευμένο ανάλογο **5b** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο πρόδρομο του **4b** με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για την ένωση **5a**. Το επιθυμητό προϊόν λήφθηκε ως κίτρινο παχύρευστο έλαιο, ύστερα από χρωματογραφία στήλης.

TLC (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1)	Rf = 0.28
Απόδοση	76%.
[α] _D	-36 (c = 0.20)

c. Σύνθεση της *N*-2-(Διφαινυλο-4-υλοξυ)ακέτυλ-(β-*D*-γλυκοπυρανόζυλο)-αμίνης (**5c**)

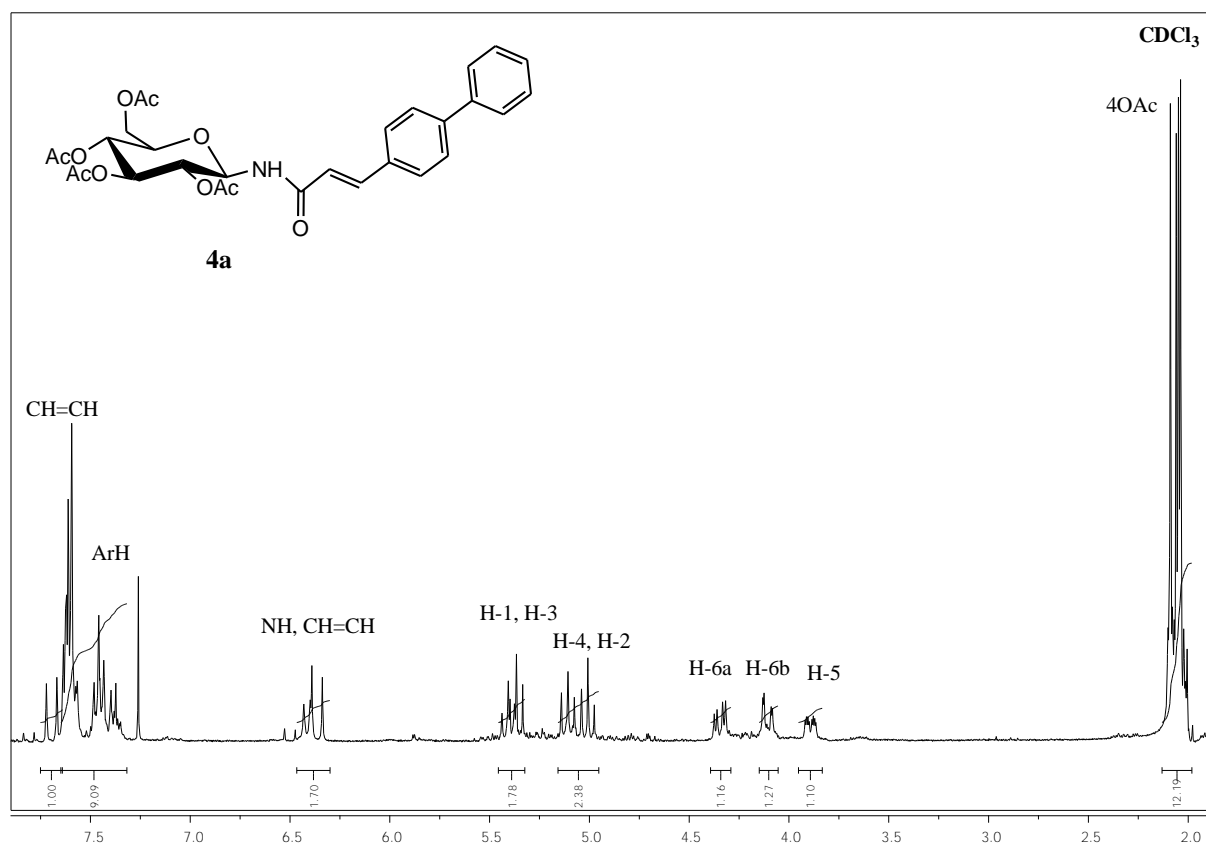
Το αποπροστατευμένο ανάλογο **5c** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο πρόδρομο του **4c** με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για την ένωση **5a**. Με τον ίδιο τρόπο, η ένωση **5c** λήφθηκε ως κίτρινο παχύρευστο έλαιο, ύστερα από χρωματογραφία στήλης.

TLC (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1)	Rf = 0.25
Απόδοση	68%
[α] _D	+2 (c = 0.20)

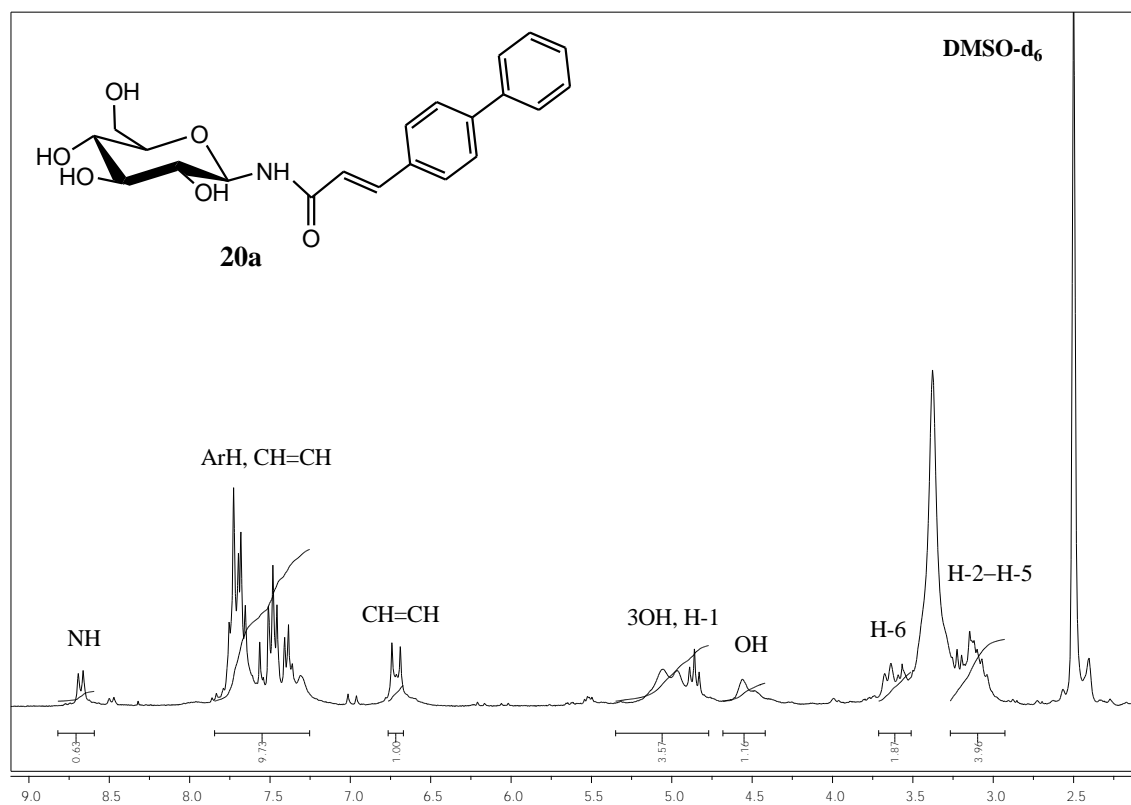
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR

Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (¹H NMR). Ενδεικτικά, αναφέρεται το φάσμα της προστατευμένου γλυκοπυρανόζυλοαμιδικού αναλόγου **4a** και του αποπροστατευμένου τελικού προϊόντος **5a**. Όπως παρατηρείται στα φάσματα πρωτονίου των ενώσεων, διαφαίνονται τόσο τα πρωτόνια των υποκαταστατών όσο και του σακχάρου. Τα πρωτόνια του σακχάρου ακολουθούν ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο, με σειρά εμφάνισης τα σήματα πρωτονίου των H-1, H-3 ως ψευδοτριπλές κορυφές, έπειτα τα σήματα πρωτονίου των H-4, H-2 ως τριπλές κορυφές καθώς και τα σήματα των πρωτονίων H-6a και H-6b όπως και του H-5 ως κορυφή διπλή διπλής διπλών.

Φάσμα ^1H NMR ένωσης **4a**



Φάσμα ^1H NMR ένωσης **5a**

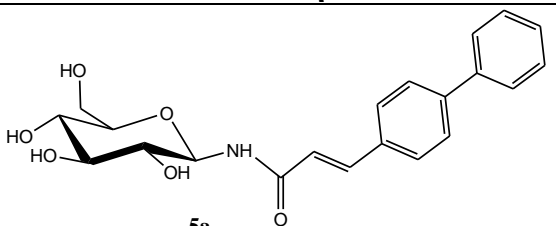
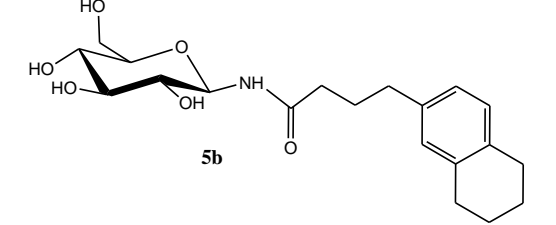
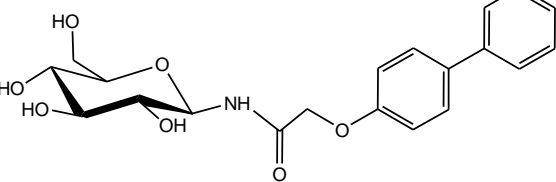


6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης γλυκοπυρανόζυλο αναλόγων και η κατόπιν αποτίμηση της δράσης τους στη βιοδραστικότητα της GP. Η συνθετική μας στρατηγική για τα μόρια-στόχους επικεντρώθηκε αρχικά στη σύνθεση της κατάλληλης γλυκοπυρανόζυλο αμίνης, η οποία στη συνέχεια συζεύχθηκε με το κατάλληλο ακυλοχλωρίδιο. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, με σύντομα βήματα, ενώ οι αποδόσεις των επιθυμητών ενώσεων είναι αρκετά καλές. Τα μόρια που συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές.

Για τη βιολογική αποτίμηση των νέων αναστολέων πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες με τη GPb που είχε προηγουμένως απομονωθεί από το μυϊκό ιστό κουνελιού. Με δεδομένο ότι η ανθρώπινη GPb του ήπατος και η μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού έχουν πανομοιότυπη αλληλουχία αμινοξέων και αρχιτεκτονική δομή, αναμένεται ότι οι αναστολείς στο ένα ένζυμο θα αναστέλλουν όμοια και το άλλο.

Όλοι οι αναστολείς επέδειξαν συναγωνιστική αναστολή όσων αφορά το υπόστρωμα (1-φωσφορική γλυκόζη) ενώ οι καλύτεροι αναστολείς εμφανίστηκαν οι **5a** ($K_i = 5.14 \mu\text{M}$) και **5c** ($K_i = 8.25 \mu\text{M}$) και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ένωση	K_i (μM)
 5a	5.14 ± 0.77
 5b	48.68 ± 4.49
 5c	8.25 ± 0.77

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, οι νέες ενώσεις θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγοί για τη σύνθεση ανάλογων ενώσεων με αυξημένη συγγένεια για το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stryer L., 1997, Βιοχημεία, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
2. McMurry J., 2000, Οργανική Χημεία, Τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
3. McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., 2000, Essentials of Exercise Physiology, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.
4. <https://el.wikipedia.org>
5. <http://www.ifet.gr/diabetes2005IFET.pdf>.
6. http://www.who.int/diabetes/BOOKLET_HTML/en/print.html
7. health.howstuffworks.com/diseases-conditions/diabetes/diabetes1.htm
8. Σμοκοβίτης Α., 2004, Φυσιολογία, Έκδοση 4^η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
9. Cori C. F. & Cori G. T., 1936, Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new ester, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 34, 702-705.
10. Oikonomakos N. G., Acharya K. R. & Johnson L. N., 1992, Post-Translational Modifications of Proteins, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-127.
11. McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., and Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. Biochemistry 23, 5862-5873.
12. Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J., 2000, Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. Chemistry and Biology, 7, 677-682.
13. Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., 1965, On the nature of allosteric transitions: a plausible model, J. Mol. Biol., 12, 88-118.
14. Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*, 63, 258-261
15. Johnson L. N. & Hajdu J., 1989, Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals, Biophysics & Synchrotron Radiation, Hasnain S. ed, 142-155, Ellis Horwood, Chichester.

16. Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P., 2002, The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696.
17. Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. 2008, New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983.
18. Oikonomakos, N. G.; Somsak, L. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2008, 9, 379.
19. Blundell T. L., Jhoti H. & Abell C., 2002, High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, *Nature Reviews, Drug Discovery*, Volume 1.
20. Witters L. A. & Avruch J., 1978, Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase, *Biochemistry*, 17, 406-410.
21. Kontou, M., Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Tsantili, P., Mamalaki, A., Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., and Tzartos, S.J., 2000 The crystal structure of the Fab fragment of a rat monoclonal antibody against the main immunogenic region of the human muscle acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* 267, 2389-2397.
22. Tiraidis, C., Alexacou, K.M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Gimisis, T., and Oikonomakos, N.G., 2007 FR258900, a potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase. *Protein Sci* 16, 1773-82.
23. Zographos, S.E. Leonidas, D.D., Lazoura, E., Dossi, K., Konarev, P.V., Kikhney, A.G., Svergun, D.I., Schmoll, D., Defossa, E., and Oikonomakos, N.G. 2007 Experimental evidence for the existence of an intermediate form of glucokinase, which accounts for the sigmoidal kinetic behaviour of the enzyme. *EMBL, Hamburg Outstation, Annual Report, Part II*, pp. 371-372
24. Zographos, S.E., Oikonomakos, N.G., Tsitsanou, K.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Skamnaki, V.T., Bischoff, H., Goldmann, S., Watson, K.A., and Johnson, L.N. 1997. The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyldihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor. *Structure* 5, 1413-25.

25. Manta S., Xipnitou A., Kiritsis C., Kantsadi A.L., Hayes J.M., Skamnaki V.T., Lamprakis C., Kontou M., Zoumpoulakis P., Zographos S.E., Leonidas D.D., Komiotis 3'-Axial CH₂OH Substitution on Glucopyranose does not Increase Glycogen Phosphorylase Inhibitory Potency. QM/MM-PBSA Calculations Suggest Why. *D. Chem. Biol. Drug Design*, 79, 2012, 663-673.
26. Györgydeák, Z., Hadady, Z., Felföldi, N., Krakomperger, A., Nagy, V., Tóth, M., Brunyánszki, A., Docsa, T., Gergely, P., Somsák L., Synthesis of N-(β-D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, 12, 4861-4870.