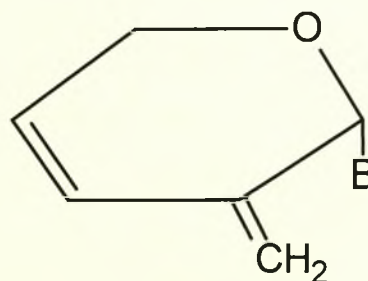
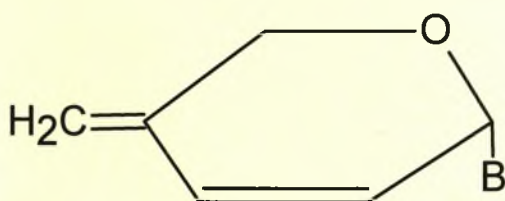


Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μεταπτυχιακός φοιτητής : ΜΑΡΓΑΡΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Διπλωματική Εργασία

Σύνθεση νουκλεοζιτικών αναλόγων της λυξόζης και της αραβινόζης και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης



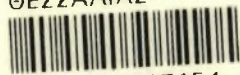
Λάρισα 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7645/1
Ημερ. Εισ.: 18-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
572.854 5
MAP

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087154

Διπλωματική Εργασία

**Σύνθεση νουκλεοζιτικών αναλόγων της λυξόζης και της αραβινόζης
και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης**

Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή

Επιβλέπων καθηγητής

Κομιώτης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής, εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλη

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών, εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω κάποιους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην ομαλή περάτωσή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κομιώτη Δημήτριο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία της ενασχόλησης σε ένα εργαστήριο Οργανικής Χημείας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κουρέτα Δημήτριο, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ενασχόληση μου στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών όπου πραγματοποιήθηκε μέρος της διατριβής.

Θα ήταν σημαντική παράλειψη αν δεν ευχαριστούσα ιδιαίτερα τις υποψήφιες διδάκτορες κ. Τζιουμάκη Νίκη (εργαστήριο Οργανικής Χημείας) και κ. Σπανού Χρύσα (εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών) για την υπομονή και την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια τόσο του πειραματικού μέρους όσο και της συγγραφής της εργασίας.

Επίσης οφείλω ένα ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κ. Βεσκούκη Αρη για την βοήθεια και στήριξη του και τον υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Κουτελιδάκη Αντώνιο για τη σημαντική βοήθεια και στήριξη του. Ευχαριστώ πολύ την κ. Ζώτου Νατάσα για την πολύτιμη βοήθεια, τη στήριξη και την συμπαράσταση της.

Ευχαριστώ επίσης τον απόφοιτο του μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Πορτέση Νίκο για τη βοήθεια του καθώς και όλα τα μέλη των δυο εργαστηρίων όπου πραγματοποιήθηκε η διατριβή για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα και αφιερώνω την πτυχιακή αυτή στην οικογένειά μου για την στήριξη, τη βοήθεια και την αμέριστη συμπαράστασή της σε κάθε προσπάθειά μου.

Οκτώβριος 2009

Μάργαρης Παναγιώτης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
ABSTRACT.....	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Νουκλεοζίτες.....	12
1.1.1 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών.....	14
1.1.2 Πυρανονουκλεοζίτες.....	16
1.1.3 Κετο-πυρανονουκλεοζίτες.....	17
1.1.4 Ακόρεστοι κετο-νουκλεοζίτες.....	17
1.1.5 Δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες.....	19
1.1.6 Νουκλεοζίτες με εξωκυκλικό μεθυλένιο.....	19
1.2 Αντιοξειδωτική δράση	21
1.2.1 Ελεύθερες ρίζες.....	21
1.2.2 Οξειδωτικό στρες και συνέπειες σε κυτταρικό επίπεδο.....	23
1.2.3 Αντιοξειδωτικά.....	23
1.2.4 Συσχέτιση των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού στρες με τον καρκίνο.....	24
1.3 Βιολογική-αντιοξειδωτική δράση νουκλεοζιτικών αναλόγων.....	26
1.4 Σκοπός της μελέτης	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
2.1 Υλικά	29
2.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων.....	29

2.1.2 Χρωματογραφία Χάρτου (TLC).....	30
2.1.3 Χρωματογραφία στήλης.....	31
2.1.4 Ξήρανση διαλυτών.....	31
2.1.5 Ταυτοποίηση ενώσεων.....	31
2.1.6 Πλασμιδιακό DNA.....	32
2.1.7 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νουκλεοσιδικών αναλόγων.....	32
2.1.8 Προϊόντα	32
2.2 Μέθοδοι.....	34
2.2.1 Σύνθεση προϊόντων.....	34
2.2.2 Σύνθεση προϊόντων με βάση τη θυμίνη.....	35
2.2.3 Σύνθεση προϊόντων με βάση την ουρακίλη.....	40
2.2.4 Σύνθεση προϊόντων με βάση τη θυμίνη , την ουρακίλη, τη φθορο-ουρακίλη και τη βενζοϋλοκυτοσίνη.....	45
2.2.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αναστολής τοξικής δράσης ελευθέρων ριζών στο DNA.....	46
2.3 Πειραματική διαδικασία.....	48
2.4 Στατιστική ανάλυση – Υπολογισμοί.....	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
3.1 Σύνθεση των νουκλεοζιτικών αναλόγων.....	50
3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αναστολής τοξικής δράσης των περόξυ ριζών (ROO [•]) στο DNA.....	51
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Αδενοσίνη.....	12
Εικόνα 2: Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες.....	13
Εικόνα 3 : 1-(3-deoxy-3-fluoro-2-ulose-glycopyranose)-N ⁴ -benzoylcytosine (κετονουκλεοσίδιο).....	17
Εικόνα 4 : Ακόρεστοι νουκλεοζίτες.....	18
Εικόνα 5 : Νουκλεοζίτης με εξωκυκλικό μεθυλένιο	20
Εικόνα 6 : Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS).....	22
Εικόνα 7 : Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών.....	24
Εικόνα 8 : Αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks).....	47

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 : Κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου.....	23
Πίνακας 2 : Ενώσεις που συντέθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τη διατριβή.....	33
Πίνακας 3: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-lychoryranosyl)thymine.....	35
Πίνακας 4 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(α -D-lychoryranosyl)thymine.....	36
Πίνακας 5 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-O-isopropylidene- α -D-lychoryranosyl)thymine.....	37
Πίνακας 6 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-O-isopropylidene- α -L-erythro-pentopyranosyl-4-ulose)thymine.....	37
Πίνακας 7 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)thymine.....	38
Πίνακας 8 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4-deoxy-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)thymine.....	39
Πίνακας 9 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene- α -pent-2-enopyranosyl)thymine.....	39
Πίνακας 10 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4-Tri-O-acetyl- α -D-lychoryranosyl)uracil.....	40
Πίνακας 11 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(α -D-lychoryranosyl)uracil.....	41
Πίνακας 12 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-O-Isopropylidene- α -D-lychoryranosyl)uracil.....	42
Πίνακας 13 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-O-isopropylidene- α -L-erythro-pentopyranosyl-4-ulose)uracil.....	42
Πίνακας 14 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)uracil.....	43

Πίνακας 15 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4-deoxy-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)uracil.....	43
Πίνακας 16 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4,-Trideoxy-4-methylene- α -pent-2-enopyranosyl)uracil.....	44
Πίνακας 17 : Συστατικά της αντίδρασης με το AAPH.....	48
Πίνακας 18 : Αντιοξειδωτική δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO [•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	53
Πίνακας 19 : Αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO [•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	54

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 Μεθοδολογία σύνθεσης νουκλεοζιτικών αναλόγων με ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη και την ουρακίλη (προϊόντα 1,2 και 5,6).....	50
--	-----------

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAPH: 2, 2'-Azobis (2-amidinopropanen hydrochloride)

ROS: Δραστικές μορφές οξυγόνου

RNS: Δραστικές μορφές αζώτου

ROO[•]: Ρίζα περοξυλίου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι νουκλεοζίτες με εξαμελή υδρογονανθρακικό δακτύλιο έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντικές και αντιβιοτικές ιδιότητές τους, καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Μεταξύ αυτών οι κετονουκλεοζίτες (ακόρεστοι και μη), οι δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες και οι νουκλεοζίτες που φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο. Εμφανίζουν σημαντικές αντικαρκινικές και αντικές ιδιότητες. Βασιζόμενοι στα παραπάνω, στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση μιας νέας σειράς πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της λυξόζης και της αραβινόζης.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων εξετάστηκε μέσω της ικανότητάς τους να προστατεύουν το DNA από τη δράση των ελευθέρων ριζών (ROS) και πιο συγκεκριμένα αναστέλλοντας την τοξική δράση των περόξυ ριζών (ROO[•]) στο DNA.

Παρατηρήθηκε ότι ορισμένα χαρακτηριστικά των τροποποιημένων δεοξυ-νουκλεοζιτικών αναλόγων όπως η θέση της κετονομάδας ή του εξωκυκλικού μεθυλενίου στο σάκχαρο θεωρήθηκαν πολύ σημαντικά για την αντιοξειδωτική δράση. Η σημασία των αποτελεσμάτων της διατριβής αυτής ίσως αποδειχθεί σημαντική στο μέλλον, καθώς κάποια από αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία ασθενειών, οι οποίες προκαλούνται από την υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών.

ABSTRACT

Nucleoside analogues play a crucial role in medicinal chemistry as a basis for the development of antitumor and antiviral agents. Over the last decades, nucleosides with a six-membered carbohydrate moiety have been assessed for their potential antiviral and antibiotic properties and as building blocks in nucleic acid synthesis. Ketonucleosides (unsaturated and saturated), deoxy-pyranonucleosides and the nucleosides possessing an exocyclic methylene group constitute important series of nucleosides. It appears that these nucleosides exhibit important antiviral and anticancer properties. Based on the above biological activity, a new series of keto-pyranonucleosides of lyxose and arabinose were synthesized and tested for their antioxidant activity.

The antioxidant capacity of the nucleoside analogues was assessed via their ability to protect DNA from reactive oxygen species (ROS). A peroxy radical (ROO•) induced DNA strand scission assay was used.

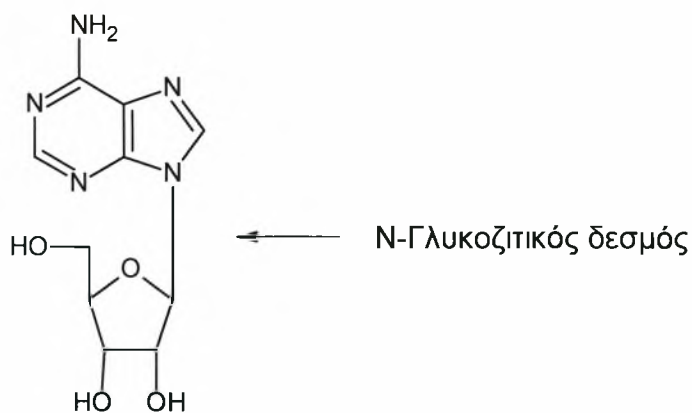
Most of the tested molecules prevented ROO• radical induced DNA damage. The importance of our results may be proved significant in the future, as they could be used to cure diseases which are caused by overproduction of free radicals.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νουκλεοζίτες

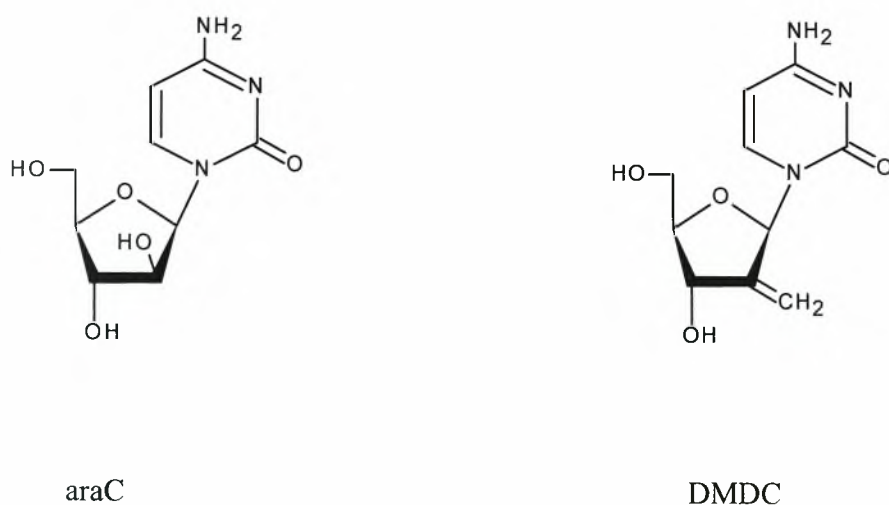
Τα τελευταία χρόνια σημαντικό πλήθος από ερευνητικά προγράμματα εστιάζεται στη μελέτη, σύνθεση και βιολογική αποτίμηση νουκλεοζιτών και νουκλεοζιτικών αναλόγων. Έχει βρεθεί ότι οι νουκλεοζίτες επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντική δράση (Zhou W. et al, 2004; Perigaud C. et al, 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 νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Ιδίως τις τελευταίες δύο δεκαετίες η σύνθεση και η μελέτη των νουκλεοζιτών 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).

Ο νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενωμένη στη θέση 1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg JM. et al, 2001). Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο μιας αμίνης με ένα N-γλυκοζιτικό δεσμό. Ο συγκεκριμένος τρόπος γλυκοζιτικής σύνθεσης είναι συνήθης σε πολλά βασικά μακρομόρια, όπως νουκλεοτίδια, RNA και DNA. Οι N-γλυκοζιτικοί 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 1).



Εικόνα 1 : Αδενοσίνη

Οι νουκλεοζίτες 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 νουκλεοζιτών 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 οι νουκλεοζίτες 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 νουκλεοζίτες ή συγγενικά μόρια, τα οποία επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους. Επιπρόσθετα αξίζει να σημειωθεί ότι το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία το 15% των αντικαρκινικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοζιτικά ανάλογα. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες, όπως οι 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC, Εικόνα 2) (Matsuda A. et al, 2004), 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC, Εικόνα 2), 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; Yamagami K. et al, 1991; Lin TS. et al, 1991; Baker CH. et al, 1991; Cory AH. et al, 1994).



Εικόνα 2 : Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αποτελούν το θεμελιώδη λίθο και για την ανάπτυξη αντικών παραγόντων (Perigaud C. et al, 1992; Zhou W. et al, 2004; Komiotis D. et al, 1991). Το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία, το 55% των αντικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοζιτικά ανάλογα. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός, ότι έξι από τα δεκαπέντε φάρμακα, τα οποία διατίθενται για τη θεραπεία του AIDS (AZT, ddC, ddl, d4T, 3TC και abacavir), είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα (νουκλεοζίτες, αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης, NRTIs), μαζί με τρία μη – NRTIs (nevirapine, delavirdine και efavirenz), καθώς και έξι αναστολείς της πρωτεάσης (saquinavir, indinavir, ritonavir, neflinavir, 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 νουκλεοζίτες (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).

1.1.1 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Είναι γεγονός ότι οι φυσικοί νουκλεοζίτες 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 νουκλεοζιτών. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τους νουκλεοζίτες 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 νουκλεοζιτικών αναλόγων, μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες για τη θεραπεία πληθώρας ασθενειών (Zhou W. et al, 2004).

Τα φάρμακα, που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι δραστικά. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα (Vender M. et al, 2001).

Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά 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 αντικά 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.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ικές πολυμεράσες. Οι ικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντικών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών, τα αντικά φάρμακα νουκλεοζιτών ενσωματώνονται στο ιικό γονιδίωμα από τις ικές 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 νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ιικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα, εξαιρετη δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης.

Τα νουκλεοζιτικά 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 ανάλογων νουκλεοζιτών 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 νουκλεοζιτών ενδεχομένως έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντική θεραπεία (Chong Y. et al, 2003).

1.1.2 Πυρανονουκλεοζίτες

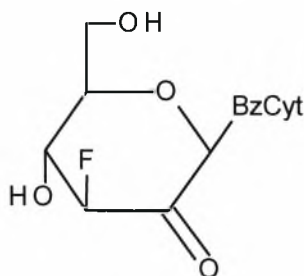
Πληθώρα ερευνητικών προγραμμάτων με σκοπό την παραγωγή φαρμάκων με αντική και αντικαρκινική δράση, επικεντρώθηκαν στη χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων με σάκχαρο μια πεντόζη. Όμως, ορισμένα προβλήματα που προέκυψαν από τη χρήση των πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές 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 χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη (www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html).

Η έρευνα για την ανακάλυψη αντικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικώς ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους. Παρόλα αυτά, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντικές (Verheggen I. et al, 1993, Verheggen I. et al, 1995, Maurinsh Y. et al, 1997, Ostrowski T. et al., 1998), αντικαρκινικές (Antonakis K. et al, 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).

1.1.3 Κετο-πυρανονουκλεοζίτες

Μία ενδιαφέρουσα τάξη πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων αποτελούν οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι περιλαμβάνουν μία κετονομάδα στο τμήμα του σακχάρου, ως αποτέλεσμα της οξειδωσης ενός ασύμμετρου ατόμου άνθρακα. Παρόλο που τα κετο-παράγωγα των πεντονουκλεοζιτών, στις περισσότερες των περιπτώσεων, αποδείχθηκαν ασταθή, τα κετο-παράγωγα των νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έδωσαν το έναυσμα για τη μελέτη μιας νέας και ενδιαφέρουσας χημείας (Antonakis K. et al, 1970, Antonakis K. et al, 1971). 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 οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες αποτελούν απαραίτητα ενδιάμεσα στη βιοσύνθεση πολλών φυσικών νουκλεοζιτικών αντιβιοτικών προϊόντων. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα μόρια εμφανίζουν το πλεονέκτημα ότι οδηγούν σε σύνθετους νουκλεοζίτες μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος. Τέλος, έχει βρεθεί ότι οι κετονουκλεοζίτες επιδεικνύουν αξιόλογη αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων (Antonakis K. et al, 1989). (Εικόνα 3)



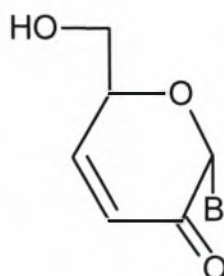
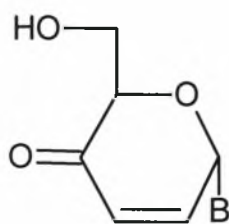
Εικόνα 3 : 1-(3-deoxy-3-fluoro-2-ulose-glycopyranose)-N⁴-benzoylcytosine (κετονουκλεοσίδιο)

1.1.4 Ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες

Μία ασυνήθιστη κατηγορία νουκλεοζιτών με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο αποτελούν οι ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες, οι οποίοι διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών και αντιικών ιδιοτήτων (Antonakis K. et

al, 1974, Chouroulinkov I. et al, 1977, Antonakis K. et al, 1980, Komiotis D. et al, 1991, Ollapaly A. et al, 1999). Στα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα ο δακτύλιος του σακχάρου περιλαμβάνει ένα διπλό δεσμό σε α,β-θέση ως προς την κετονομάδα. Οι ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες έχουν καθιερωθεί για την αντινεοπλασματική δραστηριότητα και τα ανοσοκατασταλτικά τους χαρακτηριστικά (Alaoui M. et al, 1986, Chouroulinkov I. et al, 1977, Paterson J. et al, 1998). Αποδείχθηκε ότι όχι μόνο παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro* (Antonakis K. et al, 1974, Halmos 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 στο πεδίο των νουκλεοζιτών, λόγω της χημικής τους σταθερότητας στα διάφορα μέσα (Antonakis K., 1975).

Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για να προσδιοριστεί η σχέση δομής-δράσης των ακόρεστων κετονουκλεοζιτών, 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 et al. 1986). Επιπλέον, η δράση αυτή εμφανίστηκε να είναι ανεξάρτητη από την ανωμερική απεικόνιση, 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. et al, 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 φουρανονουκλεοζίτη, με αποτέλεσμα να μπορούν να θεωρηθούν ως (βιο)ισοστερή των φυσικών νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων (Herdewijn P. et al. 2001).



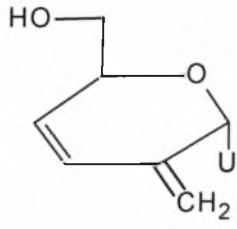
Εικόνα 4 : Ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες

1.1.5 Δεοξυ-πυρανουκλεοζίτες

Άλλη μία σημαντική κατηγορία νουκλεοζιτών με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είναι οι δεοξυ-πυρανουκλεοζίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες (Antonakis K. et al, 1989). Με τον όρο δεοξυνουκλεοζίτες υποδηλώνεται η αντικατάσταση ενός υδροξυλίου από ένα υδρογόνο σε οποιαδήποτε θέση του σακχάρου, το οποίο ενώνεται απευθείας με την αζωτούχο βάση. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε σε αυτήν την τάξη των νουκλεοζιτών από τη στιγμή που αντιβιοτικά, τα οποία περιέχουν 6'-δεοξυπυρανόζες έχουν απομονωθεί από διάφορες φυσικές πηγές και επιπλέον λόγω της εμφάνισης της αντικαρκινικής δράσης των 6'-δεοξυ-κετονουκλεοζιτών (Suhadolnik R et al, 1970, Antonakis K. et al, 1974, Suhadolnik R. et al, 1979). Αξιοσημείωτη, όμως, είναι και η αντική, καθώς και η αντιλευχαιμική δράση που εμφάνισαν ορισμένοι πουρινικοί και πυριμιδινικοί 2'-δεοξυπυρανουκλεοζίτες (Langen P. et al, 1966, Nord D. et al, 1987)..Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί και η αντική δράση των 1,5-ανυδροεξιτολο-νουκλεοζιτών έναντι του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 και τύπου 2, του κυτταρομεγαλοϊού καθώς και του ιού έρπητα ζωστήρα (Verheggen I. et al, 1993, Verheggen I. et al, 1995).

1.1.6 Νουκλεοζίτες με εξωκυκλικό μεθυλένιο

Οι νουκλεοζίτες με εξωκυκλικό μεθυλένιο είναι μια ομάδα νουκλεοζιτικών αναλόγων που προκύπτουν από την μετατροπή μιας καρβονυλικής ομάδας σε ένα εξωκυκλικό μεθυλένιο. Σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχθεί ότι αυτού του είδους οι νουκλεοζίτες επιδεικνύουν ισχυρή τόσο αντική όσο και αντικαρκινική δράση (Jeong LS. et al, 1998; Yoo SJ. et al, 2002; Gunaga P. et al, 2004). Συγκεκριμένα, σε πιο πρόσφατες μελέτες (Aggelis G. et al, 2008) νουκλεοζιτικά ανάλογα της μαννόζης και της γαλακτόζης που έφεραν εξωκυκλικό μεθυλένιο επέδειξαν ισχυρή αντική και αντικαρκινική δράση (Εικόνα 5).



Εικόνα 5 : Νουκλεοζίτης με εξωκυκλικό μεθυλένιο

1.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

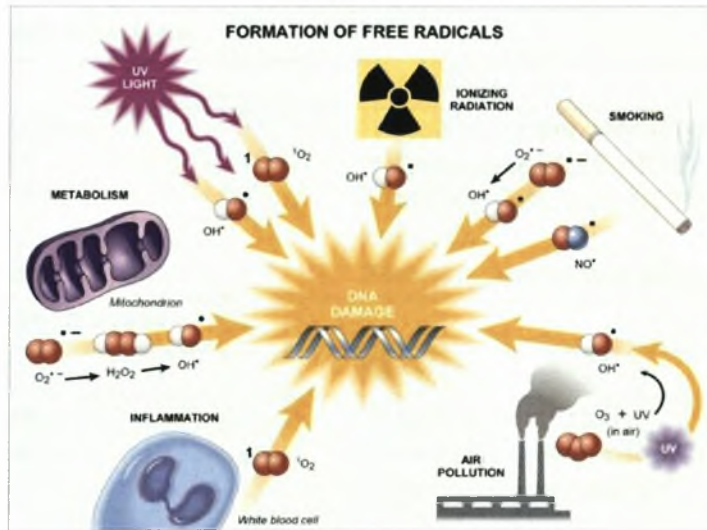
1.2.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα. Τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια δίνουν υψηλή δραστηριότητα στις ελεύθερες ρίζες. Οι ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο αντιπροσωπεύουν τη σημαντικότερη τάξη ελευθέρων ριζών, που παράγονται στους ζωντανούς οργανισμούς.

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στο κύτταρο είτε φυσιολογικά είτε ως αποτέλεσμα επίδρασης εξωτερικών παραγόντων (Halliwell B., 2001). Έχει βρεθεί ότι παράγονται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού του κυττάρου καθώς το οξυγόνο είναι ο αποδέκτης ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Halliwell B, 2001). Ακόμη παράγονται από προοξειδωτικά ένζυμα, κατά την φλεγμονή και την λιπιδική υπεροξειδωση. Ένας ακόμη τρόπος παραγωγής ελευθέρων ριζών σε κυτταρικό επίπεδο είναι, μέσω της καταλυτικής δράσης κάποιων μετάλλων, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός. Ο σίδηρος συνήθως βρίσκεται συμπλοκοποιημένος με αιμοσφαιρίνη, τρανσφερίνη και φερριτίνη. Κατά την αντίδραση Fenton ιόντα σιδήρου (Fe^{+2}) αντιδρούν με το H_2O_2 σχηματίζοντας ρίζες υδροξυλίου (Jacob R., 1995). Εκτός από το Fe και ο χαλκός (Cu) συμβάλλει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών με τον ίδιο μηχανισμό (Halliwell B 2001).



Στους εξωτερικούς παράγοντες παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνονται η υπεριώδης ακτινοβολία, οι ξενοβιοτικές ουσίες και το κάπνισμα (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 : Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS)

Όλες οι δραστικές ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο, είτε είναι ρίζες είτε όχι, κατατάσσονται σε μια κατηγορία ενώσεων που είναι γνωστή με τον όρο δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Οι ROS είναι προϊόντα του αερόβιου κυτταρικού μεταβολισμού και υπολογίζεται ότι περίπου 2-5% του οξυγόνου που καταναλώνεται καθημερινά από τα κύτταρα μετατρέπεται σε ROS. Αντίστοιχα με τις ROS, όλες οι δραστικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο κατατάσσονται στην κατηγορία των δραστικών μορφών αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) (Halliwell B 2001). Οι σημαντικότερες δραστικές μορφές οξυγόνου είναι η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}), το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$) και η ρίζα περοξυλίου ROO^{\cdot} . Επίσης, υπάρχουν και κάποιες ενώσεις που δεν αποτελούν ελεύθερες ρίζες αλλά συμβάλλουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το όζον (O_3) και το υποχλωριώδες οξύ ($HClO$) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 : Κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου

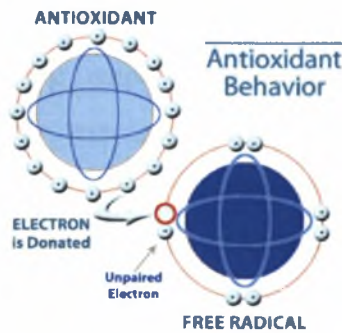
Δραστικές μορφές οξυγόνου	
<i>Ρίζες</i>	<i>(Μη ρίζες)</i>
Ανιόν σουπεροξειδίου, $O_2^{\bullet -}$	Υπεροξειδίο του υδρογόνου, H_2O_2
Υδροξυλίου, OH^{\bullet}	Υποχλωριώδες οξύ, $HOCl$
Περοξυλίου, ROO^{\bullet}	Υποβρωμιώδες οξύ, $HOBr$
Αλκοξυλίου, RO^{\bullet}	Όζον, O_3
Υδροξυπεροξυλίου, HOO^{\bullet}	Μονήρης κατάσταση Οξυγόνου 1O_2
Δραστικές μορφές αζώτου	
<i>Ρίζες</i>	<i>Μη ρίζες</i>
Μονοξειδίο αζώτου, NO^{\bullet}	Νιτρώδες οξύ, HNO_2
Διοξειδίο αζώτου, NO_2^{\bullet}	Μονοξειδίο του αζώτου NO
	Περοξυνιτρίτης, $ONOO^{\bullet -}$

1.2.2 Οξειδωτικό στρες και συνέπειες σε κυτταρικό επίπεδο

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών υπέρ των πρώτων (Sies H., 1991). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μειωμένη λειτουργικότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, είτε από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell B., 2001). Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών ελέγχεται από αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τόσο ενδογενή, όσο και εξωγενή αντιοξειδωτικά (Halliwell B., 2001).

1.2.3 Αντιοξειδωτικά

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 βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας το 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 7).



Εικόνα 7 : Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και στους μη ενζυμικούς. Τα πιο σημαντικά ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η καταλάση, η υπεροξειδική δισμουτάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Halliwell B., 2001). Στους μη ενζυμικούς ανήκουν κάποιες πρωτεΐνες, βιταμίνες, λιπίδια, μέταλλα και ουσίες όπως οι πολυφαινόλες. 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 (Scalbert et al., 2005). Τα αντιοξειδωτικά της τροφής, όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη A, το σελήνιο, οι φαινολικές ενώσεις κτλ., ανήκουν επίσης στους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Masella et al., 2005).

1.2.4 Συσχέτιση των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού στρες με τον καρκίνο

Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν διάφορα βιομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, σάκχαρα, DNA κ.ά.), προκαλώντας οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων, δυσλειτουργία των μεμβρανών, τροποποίηση πρωτεϊνών, απενεργοποίηση ενζύμων και σχάση ή τροποποίηση των βάσεων του DNA. Ακόμη οδηγούν στην καταστροφή των κυτταρικών δομών αδρανοποιώντας ορισμένα συστατικά, όπως ένζυμα και πρωτεΐνες απαραίτητα για την ανάπτυξη και επιβίωση των κυττάρων (Undurti N., 2002). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη συσχέτιση των ελευθέρων ριζών με την πρόωρη γήρανση και διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως καρκίνος, καρδιαγγειακές παθήσεις και νευροεκφυλιστικές νόσοι (Halliwell B., 2001).

Ωστόσο ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στον καρκίνο δεν έχει προσδιοριστεί ακριβώς. Πιο συγκεκριμένα οι ελεύθερες ρίζες σχετίζονται ιδιαίτερα με την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Όταν οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν

φυσιολογικά κύτταρα προκαλείται βλάβη στο DNA, η οποία αποτελεί βασική προϋπόθεση για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Ωστόσο, οι επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν. Όταν οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στα καρκινικά κύτταρα, φαίνεται να έχουν ευεργετική δράση καθώς προκαλούν την καταστροφή αυτών των κυττάρων με διάφορους μηχανισμούς (Undurti N., 2002). Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες παίζουν ρόλο στη μείωση των τελομερών των κυττάρων, τα οποία στα καρκινικά κύτταρα διατηρούνται σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος και συμβάλλουν στη διατήρηση του καρκινικού κυτταρικού φαινότυπου (Ohkawa S. , 1999, Undurti N. 2002).

1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ – ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Οι ανάγκες της σημερινής εποχής για ίαση και θεραπεία σε συνδυασμό με τα αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας έχουν οδηγήσει στην έρευνα και παραγωγή νέων φαρμάκων. Σε αυτή την πληθώρα φαρμάκων εξέχουσα θέση καταλαμβάνουν τα αντιβακτηριακά, αντικαρκινικά και αντιογκογονικά φάρμακα, τα οποία ως δραστική ουσία περιέχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο.

Τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελή δακτύλιο έχουν επιδείξει σημαντική αντικαρκινική και αντιβιοτική δράση (Zhou W. et al, 2004). Μια σημαντική κατηγορία αποτελούν οι ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες, οι οποίοι αναστέλλουν 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 (Antonakis K. et al 1989). Μία σημαντική παράμετρος που συνεισφέρει στη βιολογική σπουδαιότητα των παραπάνω μορίων αποτελεί η ύπαρξη του διπλού δεσμού στο τμήμα του σακχάρου, ο οποίος προκαλεί ακαμψία στο δακτύλιο, όμοια με αυτή ενός φουρανονουκλεοζίτη (Herdewijn P. et al. 2001). Επιπλέον, η ύπαρξη κετονομάδας στο τμήμα του σακχάρου δημιουργεί θέση δεκτική σε πυρηνόφιλη προσβολή.

Από την άλλη, νουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο, επέδειξαν επίσης αντικαρκινική και αντικαρκινική δράση (Aggelis G. et al, 2007). Η αντικατάσταση μίας κετονομάδας από ένα εξωμεθυλένιο δε μεταβάλλει σημαντικά το μέγεθος ή το σχήμα του μορίου, αλλά ενισχύει τη δράση του.

Ειδικότερα από τις βιολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στους νέους κετοακόρεστους και εξωμεθυλενικούς νουκλεοζίτες, οι οποίοι συντέθηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η ύπαρξη ενός πρωτοταγούς ελεύθερου υδροξυλίου στο σάκχαρο του νουκλεοζίτη δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση αντικαρκινικής και αντικαρκινικής δράσης. Αντίθετα, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν μία προστατευτική ομάδα στην 6'-θέση του σακχάρου, εμφανίστηκαν να είναι πιο αποτελεσματικοί αντικαρκινικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.

Στα εργαστήρια Οργανικής Χημείας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

πραγματοποιήθηκαν έρευνες, οι οποίες αφορούσαν τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης σειράς πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της φθορογλυκόζης (Spanou C. et al. 2007), της γαλακτόζης και της μαννόζης. Παρατηρήθηκε ότι τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν το α,β -κετοακόρεστο σύστημα στο τμήμα του σακχάρου, εμφανίστηκαν αποτελεσματικά έναντι των ROO[•] ριζών. Αντίθετα αυτά που δεν φέρουν το α,β -κετοακόρεστο σύστημα στη δομή τους, εμφάνισαν μηδενική ή μικρή ανασταλτική δράση και μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις. Φαίνεται ότι η παρουσία του διπλού δεσμού σε α,β -θέση ως προς την κετονομάδα προκαλεί σημαντική σταθεροποίηση και αυξάνει την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση.

Βασιζόμενοι, στα παραπάνω στοιχεία και με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της δομής του σακχάρου στην αντιοξειδωτική δράση των πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, θεωρήθηκε πολύ σημαντική:

α) η σύνθεση πυρανονουκλεοζιτών που φέρουν τη θυμίνη και την ουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση, δέοξυ στη θέση 5' του σακχάρου και κετονομάδα ή εξωμεθυλένιο στις θέσεις 4' (λυξόζης) του σακχάρου και 2' (αραβινόζης) του σακχάρου. Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι η λυξόζη είναι το δεοξυ-ανάλογο της δομής της μαννόζης με δέοξυ στη θέση 5' του σακχάρου και η αραβινόζη είναι το δεοξυ-ανάλογο της δομής της γαλακτόζης με δέοξυ στη θέση 5' του σακχάρου.

β) η μελέτη πυρανονουκλεοζιτών που φέρουν φθοροουρακίλη και βενζοϋλοκυτοσίνη ως ετεροκυκλική βάση και κετονομάδα ή εξωμεθυλένιο στη θέση 2' του σακχάρου (αραβινόζης).

γ) και η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης και των δύο κατηγοριών νουκλεοζιτικών αναλόγων μέσω αναστολής της τοξικής δράσης ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των περόξυ ριζών (ROO[•]) στο DNA.

1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας γίνεται αντιληπτή η ελάχιστη έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί για τη διερεύνηση και τον έλεγχο της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης των πυρανονουκλεοζιτών που έχουν αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Σε πρόσφατη μεταπτυχιακή διατριβή που πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, παρατηρήθηκε ότι τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα της γαλακτόζης και της μαννόζης με σημαντικές αντικαρκινικές και αντικές ιδιότητες παρουσίασαν επιπλέον και αντιοξειδωτική δράση.

Για το σκοπό αυτό, στην παρούσα διατριβή αναζητήθηκαν νέοι νουκλεοζίτες σε συνδυασμό με ετεροκυκλικές βάσεις (θυμίνη, ουρακίλη, φθοροουρακίλη, βενζοϋλοκυτοσίνη) και χαρακτηριστικές ομάδες όπως η κετονομάδα και το εξωκυκλικό μεθυλένιο και εξετάστηκαν σε διαφορετικές θέσεις δύο ακόμη σακχάρων. Πιο συγκεκριμένα, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η σύνθεση νουκλεοζιτικών αναλόγων της λυξόζης και της αραβινόζης (δεοξυ-ανάλογα της μαννόζης και της γαλακτόζης) και η μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Υλικά Σύνθεσης των Νουκλεοζιτικών αναλόγων

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

- D-Lyxose (Alfa Aesar, Γερμανία)
- D-Arabinose (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac-Ισπανία)
- Pyridinium dichromate (PDC)
- Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) (Aldrich, Γερμανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) (Merck, Γερμανία)
- Όξινο θειικό νάτριο (NaHSO_4) (Merck, Γερμανία)
- Πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate (NaHCO_3) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO_4) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) (Merck, Γερμανία)
- Sodium thiosulfate (Merck, Γερμανία)
- Θυμίνη (Sigma, 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 (p-TsOH) (Aldrich, Γερμανία)
- Διάλυμα formic acid (HCOOH) (Panreac-Ισπανία)
- Imidazole (Fluca, Γερμανία)
- Triphenylphosphine (Ph_3P) (Fluca, Γερμανία)
- Iodine (Fluca, Γερμανία)

- Imidazole (Fluca, Γερμανία)
- Iodoform (Aldrich, Γερμανία)
- Triphenylmethyl chloride (Aldrich, Γερμανία)
- Καταλύτης 4-dimethylaminopyridine (Acros Organics, Η.Π.Α.)
- Pyridinium Dichromate (PDC) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Methyl triphenyl-phosphonium bromide (Aldrich, Γερμανία)
- Υδρίδιο του νατρίου (NaH) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN) (Merck, Γερμανία)
- Τολουόλιο (Tol) (Merck, Γερμανία)
- Dimethylformamide (DMF) (Fluca, Γερμανία)
- Βενζοφαινόνη (Fluca, Γερμανία)
- Καυστικό κάλιο (KOH)

2.1.2 Χρωματογραφία Χάρτου (TLC: Thin Layer Chromatography)

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

- 📌 Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 7/3
- 📌 Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 8/2
- 📌 Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8/2
- 📌 Διάλυμα Δ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 5/5
- 📌 Διάλυμα Ε : οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 9/1
- 📌 Διάλυμα ΣΤ : οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 9.5/0.5

2.1.3 Χρωματογραφία στήλης

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 Α : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 7/3
- ❖ Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας /μεθανόλη 8/2
- ❖ Διάλυμα Ζ : οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 9/1
- ❖ Διάλυμα Η : οξικός αιθυλεστέρας

2.1.4 Ξήρανση διαλυτών

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

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

2.1.5 Ταυτοποίηση των ενώσεων

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).

2.1.6 Πλασμιδιακό DNA

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

2.1.7 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νουκλεοσιδικών αναλόγων

Χημικά αντιδραστήρια

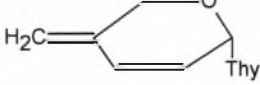
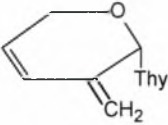
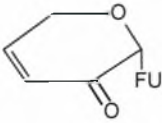
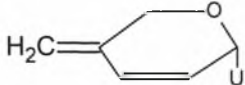
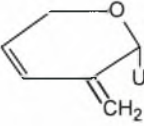
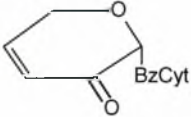
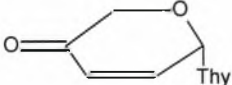
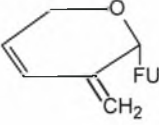
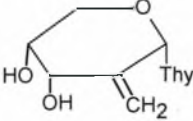
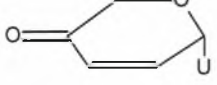
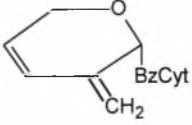
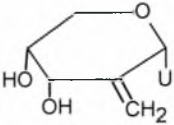
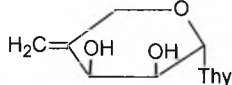
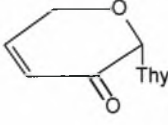
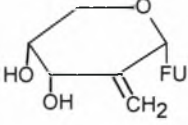
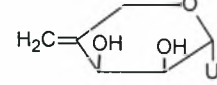
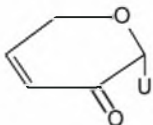
Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)
- Γλυκερόλη (Glycerol) (Panreac-Ισπανία)
- Αγαρόζη (agarose) (Seakem-Η.Π.Α)
- Tris-HCl (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Panreac-Ισπανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)
- Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics- Η.Π.Α)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide) (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl) (Merck-Γερμανία)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) (Merck-Γερμανία)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄) (Merck-Γερμανία)

2.1.8 Προϊόντα (Ενώσεις)

Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, συντέθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος και αποδίδονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2 : Ενώσεις που συντέθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τη διατριβή

Προϊόντα	Προϊόντα	Προϊόντα
<p>Προϊόν 1</p> 	<p>Προϊόν 7</p> 	<p>Προϊόν 13</p> 
<p>Προϊόν 2</p> 	<p>Προϊόν 8</p> 	<p>Προϊόν 14</p> 
<p>Προϊόν 3</p> 	<p>Προϊόν 9</p> 	<p>Προϊόν 15</p> 
<p>Προϊόν 4</p> 	<p>Προϊόν 10</p> 	<p>Προϊόν 16</p> 
<p>Προϊόν 5</p> 	<p>Προϊόν 11</p> 	<p>Προϊόν 17</p> 
<p>Προϊόν 6</p> 	<p>Προϊόν 12</p> 	

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Σύνθεση προϊόντων

Μεθοδολογία σύνθεσης

Ξεκινώντας από την εμπορικά διαθέσιμη D-lyxose πραγματοποιώντας ακετυλίωση προκύπτει η ένωση 1,2,3,4-tetra-O-acetyl- α -D-lyxopyranose (1) Στη συνέχεια ακολουθεί η σύνθεση του νουκλεοζίτη της θυμίνης [1-(2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-lyxopyranosyl)thymine] (2 α) και της ουρακίλης [1-(2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-lyxopyranosyl)uracil] (2 β) αντίστοιχα. Η απομάκρυνση όλων των ακετυλίων (O-acetyl protecting groups) από τα 2 α και 2 β με κορεσμένο μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας έδωσε την ένωση 3 (α,β) σε εξαιρετικές αποδόσεις. Ειδική ακετυλίωση των 3 (α,β) χρησιμοποιώντας το 2,2-dimethoxypropane σε ακετόνη έδωσε τα 2',3'-O-isopropylidene παράγωγα 4 α και 4 β αντίστοιχα.

Στη συνέχεια ακολούθησε η οξείδωση του ελεύθερου υδροξυλίου στη θέση 4' με PDC/ Ac₂O όπου και έδωσε τους επιθυμητούς 4'-κετονουκλεοζίτες 5 α και 5 β . Στη συνέχεια η αντίδραση Wittig οδήγησε στο σχηματισμό των εξωμεθυλενικών παραγώγων 1-(4-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)thymine (6 α) και 1-(4-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)uracil (6 β) αντίστοιχως. Η αποακετυλίωση των 6 α και 6 β με διάλυμα CH₂Cl₂ /HCOOH , 1:1 έδωσε τις ενώσεις 1-(4-deoxy-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)thymine (7 α) και 1-(4-deoxy-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)uracil (7 β). Τέλος είχαμε τη δημιουργία διπλού δεσμού στις θέσεις 2', 3' με iodine-triphenylphosphine (Ph₃P)-imidazole όπου έδωσε τις ενώσεις 1-(2,3,4,-trideoxy-4-methylene- α -pent-2-enopyranosyl)thymine (8 α) και 1-(2,3,4,-trideoxy-4-methylene- α -pent-2-enopyranosyl)uracil (8 β) με αποδόσεις 55 % και 52 % αντίστοιχα.

2.2.2 Σύνθεση προϊόντων με βάση την θυμίνη (Thy)

2.2.2.1 Σύνθεση της 1-(2,3,4,-trideoxy-4-methylene- α -pent-2-enopyranosyl)thymine (8 α)

Σύνθεση της 1-(2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-lyxopyranosyl)thymine (2 α)



Μίγμα θυμίνης (2.87 g, 22.72 mmol) , HMDS (5.94 mL, 28.17 mmol) και σακχαρίνης (191.45 mg, 1.05 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (85mL) θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά υπό άζωτο. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC (πίνακας 3). Αφότου έγινε διαυγές, προστιθηκαν η 1,2,3,4- tetra-O-acetyl- α -D-lyxopyranose (1) (5.16 g, 16.23 mmol) και SnCl₄ (2.7 mL, 22.72 mmol) Το αντιδρών μίγμα θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 1 ώρα, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ αραιώθηκε με CH₂Cl₂ και εκχυλίστηκε με νερό. Η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και μετά από διήθηση συμπυκνώθηκε. Πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (διάλυμα A) η οποία έδωσε το επιθυμητό προϊόν 2 α (4.49 g, 72%) σαν καθαρό παχύρευστο λάδι.

Πίνακας 3 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-lyxopyranosyl)thymine

TLC (Διάλυμα A)	R _f =0.38
Απόδοση	72%

Σύνθεση της 1-(α -D-lyxopyranosyl)thymine (3 α)

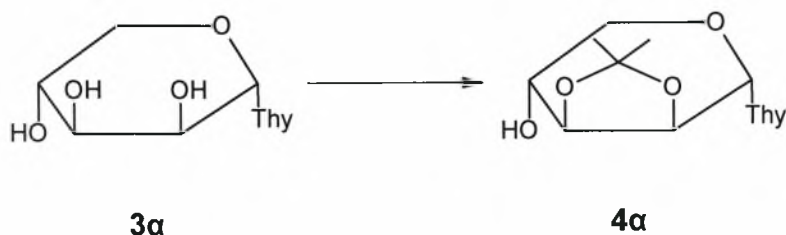


Το προϊόν 2 α (4.49 g, 11.68 mmol) αναμίχθηκε με αμμωνία/MeOH (κορεσμένο στους 0° C, 0.48 L). Το διάλυμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό μειωμένη πίεση. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με το διάλυμα Γ, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν 3 α (2.95 g) (Πίνακας 4)

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(α -D-lyxopyranosyl)thymine

TLC (Διάλυμα Β)	R _f =0.40
Απόδοση	98%

Σύνθεση της 1-(2,3-O-isopropylidene- α -D-lyxopyranosyl)thymine (4 α)



Σε ένα υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης 3 α (2.95 g, 11.45mmol) με άνυδρη ακετόνη (215 mL) και 2,2 dimethoxypropane (11mL) προστέθηκε p-TsOH (0.44g, 2.29 mmol). Μετά από 3 ώρες το μίγμα της αντίδρασης εξουδετερώθηκε με τριαιθυλαμίνη. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Η, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν 4 α (2.77 g,) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού. (Πίνακας 5)

Πίνακας 5 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-O-isopropylidene- α -D-lyxopyranosyl)thymine

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f=0.34$
Απόδοση	81%

Σύνθεση της 1-(2,3-O-isopropylidene- α -L-erythro-pentopyranosyl-4-ulose)thymine (5a)

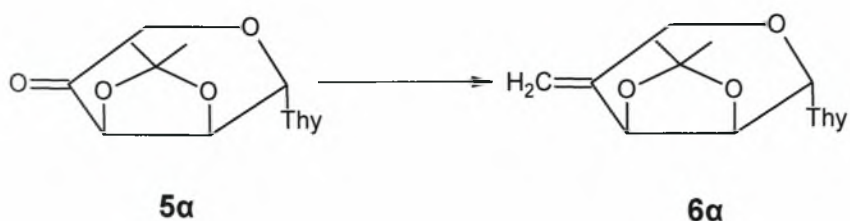


Ένα μείγμα της ένωσης 4a (1.97 g, 6.60 mmol), PDC (2.98 g, 7.93 mmol) και Ac_2O (1.87 ml, 19.80 mmol) αναδεύτηκε σε άνυδρο $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (5:3) για 1h, υπό άζωτο σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Β, δίνοντας καθαρό το επιθυμητό προϊόν 5a (1.64 g) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (Πίνακας 6).

Πίνακας 6 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-O-isopropylidene- α -L-erythro-pentopyranosyl-4-ulose)thymine

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f=0.54$
Απόδοση	95%

Σύνθεση της 1-(4-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)thymine (6a)

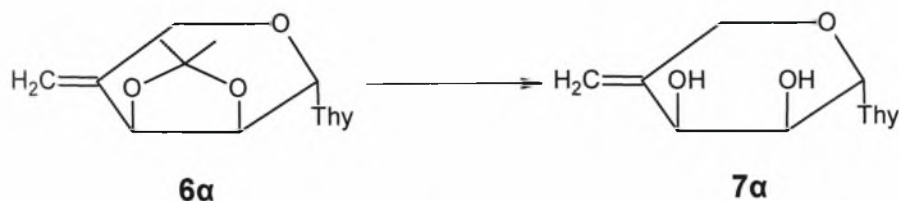


Σε ένα υπό ανάδευση μείγμα αποτελούμενο από methyl triphenylphosphonium bromide (6.53 g, 18.28 mmol) και t-amyl alcohol (2.18 mL, 19.94 mmol) σε THF (56 mL) προστέθηκε NaH (0.76 g, 60% in oil, 31.90 mmol) στους 0°C υπό άζωτο και το μείγμα αναδεύτηκε για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Σ' αυτό το κίτρινο υλίδιο του φωσφόρου προστέθηκε στάγδην διάλυμα της ένωσης 5a (1.64 g, 5.54 mmol) σε THF (9 mL) στους 0°C υπό άζωτο. Έπειτα το μείγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντιδρών μίγμα θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 1 ώρα, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ αραιώθηκε με CH₂Cl₂ και εκχυλίστηκε με νερό. Η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και μετά από διήθηση συμπυκνώθηκε. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Δ, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν 6a (0.99 g) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (Πίνακας 7).

Πίνακας 7 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)thymine

TLC (Διάλυμα E)	R _f =0.3
Απόδοση	61%

Σύνθεση της 1-(4-deoxy-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)thymine (7a)



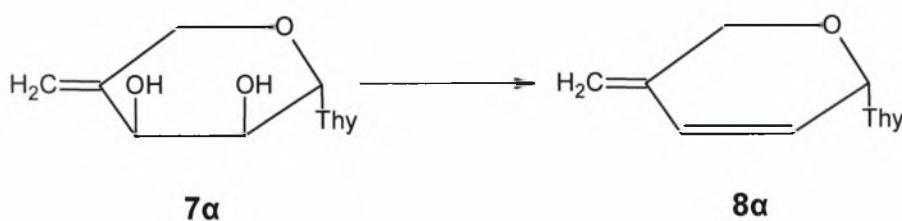
7a : Προϊόν 5

Σε ποσότητα της ένωσης 6a (0.99 g, 3.38 mmol) διαλύθηκε ένα μείγμα από CH₂Cl₂ (12 mL) και HCOOH (12 mL, 90%). Το διάλυμα αναδεύτηκε για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με το διάλυμα Z, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν 7a (0.72 g) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (Πίνακας 8).

Πίνακας 8 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4-deoxy-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)thymine

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	$R_f=0.14$
Απόδοση	84%

Σύνθεση της 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene- α -pent-2-enopyranosyl)thymine (8a)



8a : Προϊόν 1

Σε ποσότητα της ένωσης 7a (0.72 g, 2.83 mmol) προστέθηκαν Ph_3P (2.22 g, 8.49 mmol), iodine (1.08g, 4.25 mmol) και imidazole (0.29 g, 4.25 mmol) σε 78 mL άνυδρου μίγματος Tol/DMF (4:1). Η αντίδραση θερμάνθηκε (80°C) υπό άζωτο για 15 λεπτά. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με το διάλυμα Z, δίνοντας την ένωση 8a (0.34 g) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (Πίνακας 9).

Πίνακας 9 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4-trideoxy-4-methylene- α -pent-2-enopyranosyl)thymine

TLC	$R_f=0.34$
Απόδοση	55%

2.2.3 Σύνθεση προϊόντων με βάση την ουρακίλη (U)

2.2.3.1 Σύνθεση της 1-(2,3,4,-Trideoxy-4-methylene- α -pent-2-enopyranosyl)uracil (8 β)

Σύνθεση της 1-(2,3,4-Tri-O-acetyl- α -D-lyxopyranosyl)uracil (2 β)



Μίγμα ουρακίλης (2.46 g, 21.99 mmol) , HMDS (5.75 mL, 27.26 mmol) και σακχαρίνης (185.29 mg, 1.01 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (68 mL) θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά στους 120° C υπό άζωτο. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC (πίνακας 10). Αφότου έγινε διαυγές, προστέθηκαν η 1,2,3,4- tetra-O-acetyl- α -D-lyxopyranose (1) (5.0 g, 15.71 mmol) και SnCl₄ (2.6 mL, 21.99 mmol) Το αντιδρών μίγμα θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 2 ώρες στους 80° C, εξουδετερώθηκε με NaHCO₃ και εκχυλίστηκε με CH₂Cl₂. Η οργανική φάση πλύθηκε με νερό και πραγματοποιήθηκε ξήρανσή της με άνυδρο Na₂SO₄ και στη συνέχεια έλαβε χώρα διήθηση και συμπύκνωσή της. Πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (διάλυμα A) η οποία έδωσε την ένωση 2 β (3.79 g, 72%) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού.

Πίνακας 10 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4-Tri-O-acetyl- α -D-lyxopyranosyl)uracil

TLC	R _f =0.3
Απόδοση	65%

Σύνθεση της 1-(α -D-lyxopyranosyl)uracil (3 β)

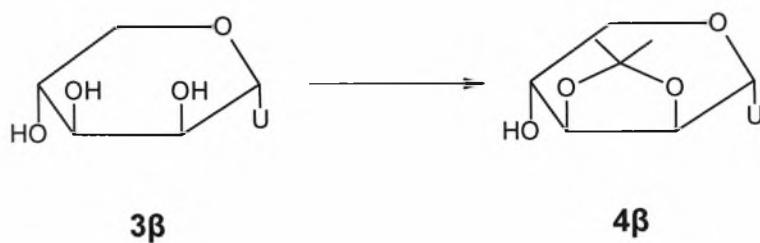


Η ένωση 3 β συντέθηκε από την ένωση 2 β ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για την ένωση 3 α . Τελικά σχηματίστηκε η ένωση 3 β (2.47 g) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (διάλυμα Γ) και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμούς (Πίνακας 11).

Πίνακας 11 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(α -D-lyxopyranosyl)uracil

TLC	$R_f=0.34$
Απόδοση	99%

Σύνθεση της 1-(2,3-O-Isopropylidene- α -D-lyxopyranosyl)uracil (4 β)

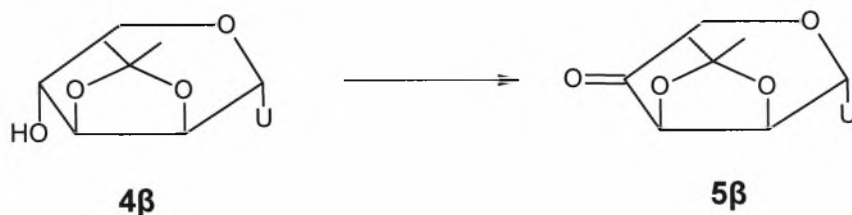


Η ένωση 4 β συντέθηκε από την ένωση 3 β ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για την ένωση 4 α . Έπειτα από καθαρισμό σε χρωματογραφία στήλης (διαλυμα Η) σχηματίστηκε η ένωση 4 β (2.24 g) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (Πίνακας 12)

Πίνακας 12 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-O-Isopropylidene- α -D-lyxopyranosyl)uracil

TLC	$R_f=0.34$
Απόδοση	52%

Σύνθεση της 1-(2,3-O-isopropylidene- α -L-erythro-pentopyranosyl-4-ulose)uracil (5 β)

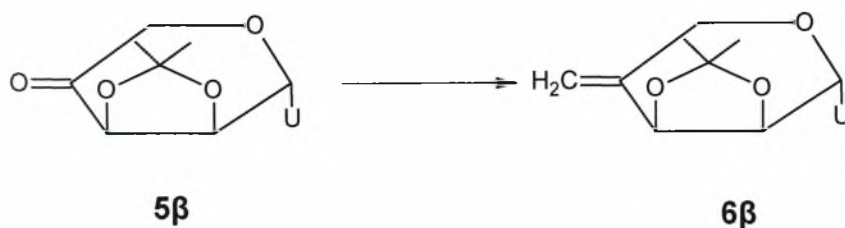


Η ένωση 5 β συντέθηκε από την ένωση 4 β ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για την ένωση 5 α . Έπειτα από καθαρισμό σε χρωματογραφία στήλης (διάλυμα Β) σχηματίστηκε η ένωση 5 β (0.85 g) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού) (Πίνακας 13).

Πίνακας 13 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3-O-isopropylidene- α -L-erythro-pentopyranosyl-4-ulose)uracil

TLC	$R_f=0.45$
Απόδοση	69%

Σύνθεση της 1-(4-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)uracil (6 β)

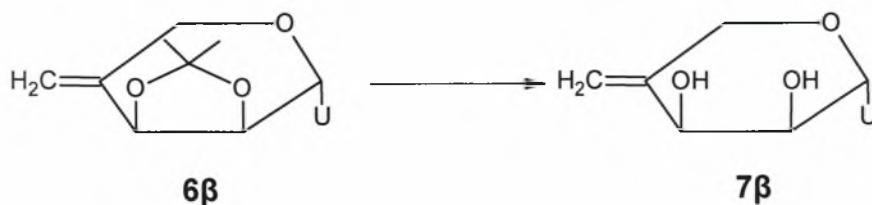


Η ένωση 6 β συντέθηκε από την ένωση 5 β ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για την ένωση 6 α . Έπειτα από καθαρισμό

σε χρωματογραφία στήλης (διάλυμα A) σχηματίστηκε η ένωση 6β (0.46 g) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (Πίνακας 14).

Πίνακας 14 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4-deoxy-2,3-O-isopropylidene-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)uracil

TLC	$R_f=0.54$
Απόδοση	54%



Σύνθεση της 1-(4-deoxy-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)uracil (7β)

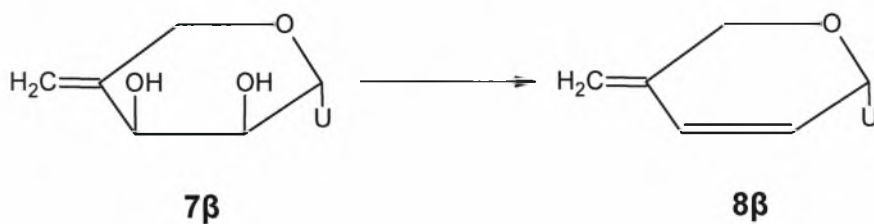
7β : Προϊόν 6

Η ένωση 7β συντέθηκε από την ένωση 6β ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για την ένωση 7α. Έπειτα από καθαρισμό σε χρωματογραφία στήλης (διάλυμα Z) σχηματίστηκε η ένωση 7β (0.46 g) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (Πίνακας 15).

Πίνακας 15 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(4-deoxy-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)uracil

TLC	$R_f=0.57$
Απόδοση	78%

Σύνθεση της 1-(2,3,4,-trideoxy-4-methylene- α -pent-2-enopyranosyl)uracil (8 β)



8 β : Προϊόν 2

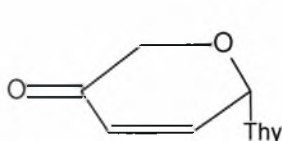
Η ένωση 8 β συντέθηκε από την ένωση 7 β ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για την ένωση 8 α . Έπειτα από καθαρισμό σε χρωματογραφία στήλης (διάλυμα Β) σχηματίστηκε η ένωση 8 β (0.14 g) υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (Πίνακας 16).

Πίνακας 16 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2,3,4,-trideoxy-4-methylene- α -pent-2-enopyranosyl)uracil

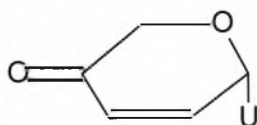
TLC	R _f =0.54
Απόδοση	54%

2.2.4 Σύνθεση προϊόντων με βάση τη θυμίνη, την ουρακίλη, τη φθοροουρακίλη και τη βενζοϋλοκυτοσίνη

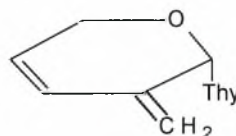
Με πρώτη ύλη τις εμπορικά διαθέσιμες D-Γλυκόζη και D-Αραβινόζη παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τα παρακάτω δεκατρία νουκλεοσιδικά ανάλογα :



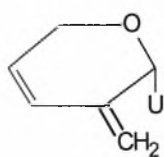
Προϊόν 3



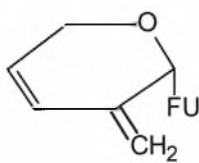
Προϊόν 4



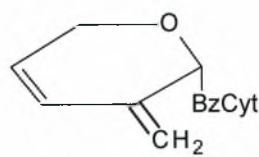
Προϊόν 7



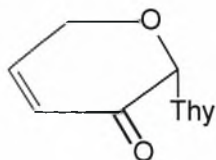
Προϊόν 8



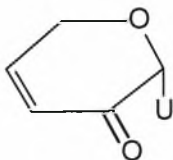
Προϊόν 9



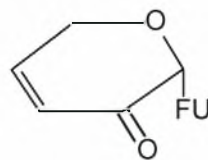
Προϊόν 10



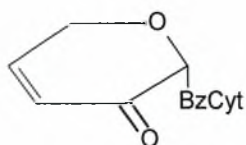
Προϊόν 11



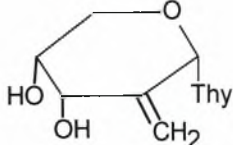
Προϊόν 12



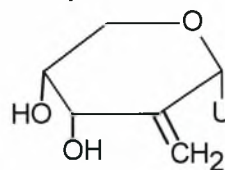
Προϊόν 13



Προϊόν 14

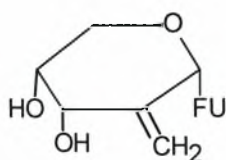


Προϊόν 15



Προϊόν 16

και



Προϊόν 17

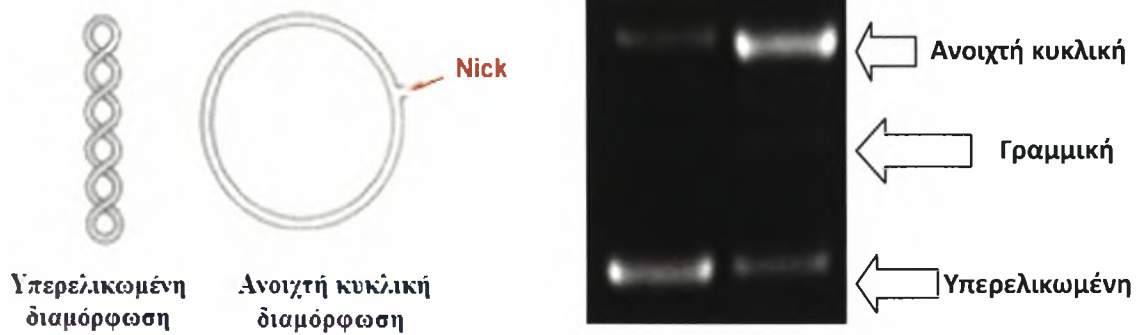
2.2.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αναστολής τοξικής δράσης ελευθέρων ριζών στο DNA

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των μορίων να παρεμποδίζουν την τοξική δράση ελευθέρων ριζών πάνω στο DNA χρησιμοποιώντας ως μοντέλο το πλασμιδιακό DNA. Το πλασμιδιακό DNA έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Μια από τις σημαντικότερες ιδιότητές του αποτελεί το ότι όταν τρέχει σε ένα πήκτωμα αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 8) :

1. Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα). Η διαμόρφωση αυτή αποτελεί την πιο συμπακνωμένη του μορφή.
2. Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλινα 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.
3. Τη γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλινα σπασίματα.

Οι διαμορφώσεις αυτές τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση. Όσο πιο μικρή σε μέγεθος είναι η διαμόρφωση τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αγαρόζης. Κατά συνέπεια το πλασμιδιακό DNA με την υπερελικωμένη διαμόρφωση είναι αυτό που τρέχει πρώτο, αυτό με τη γραμμική διαμόρφωση δεύτερο ενώ αυτό με την ανοιχτή κυκλική είναι αυτό που θα τρέξει τρίτο.

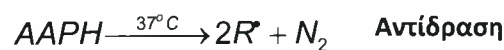


Εικόνα 8 : Αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

2.2.5.1 Επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Οι ρίζες ROO[•] 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[•] χρησιμοποιείται το AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride). Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO[•] (Αντιδράσεις).



Εκτός από την ιδιότητα των ριζών ROO[•] να ξεκινούν την λιπιδική υπεροξειδωση έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η

εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική. Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο αντιοξειδωτικό μόριο αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO^{\cdot} .

2.3 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- ❖ Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας σε αγαρόζη 0,8 % TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA)
- ❖ Ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων της αντίδρασης:
 - ✓ **PBS** (pH=7,4) : NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 8,1mM, KH_2PO_4 1,5mM. Το διάλυμα αφού αποστειρώνεται διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
 - ✓ **AAPH 2,5mM**: Προετοιμάζεται διάλυμα AAPH 100mM το οποίο αραιώνεται κατάλληλα. Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.
- ❖ Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων σε συγκεντρώσεις 5, 10, 20, 50, 100 μ M. Τα συστατικά της αντίδρασης (10 μ l) ήταν τα εξής: PBS, πλασμιδιακό DNA Bluescript SK-(+) 1 μ g, AAPH 2,5mM και η εξεταζόμενη ένωση στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις.

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

Πίνακας 17 : Συστατικά της αντίδρασης

	Προϊόν			
	PBS	(νουκλεοζιτικό ανάλογο)	Πλασμιδιακό DNA	AAPH
- Control	8 μ l	-	2 μ l	-
+ Control (AAPH 2,5mM)	4 μ l	-	2 μ l	4 μ l
Προϊόν 5 μ M	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Προϊόν 10 μ M	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Προϊόν 20 μ M	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Προϊόν 50 μ M	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Προϊόν 100 μ M	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Προϊόν 100 μ M (μόνο του)	5 μ l	3 μ l	2 μ l	-

- ❖ Για κάθε εξεταζόμενο μόριο χρησιμοποιήθηκε ένα αρνητικό control (1μg πλασμιδιακό DNA) και ένα θετικό control (1μg πλασμιδιακό DNA + 2,5mM AAPH).
- ❖ Η προσθήκη των διαλυμάτων γίνεται με τη σειρά που φαίνεται στον πίνακα
- ❖ Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται στους 37°C για 45 min.
- ❖ Στη συνέχεια η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 3 μl Loading Buffer (Χρωστική Bromophenol Blue 0,25% + 30% Glycerol).
- ❖ Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης στα 70 V για 1h.
- ❖ Στη συνέχεια ακολουθεί χρώση του πηκτώματος σε 0,5μg/ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και πλύση για 30 min σε απιονισμένο νερό.
- ❖ Το πήκτωμα φωτογραφίζεται μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και οι φωτογραφίες αναλύονται με το πρόγραμμα Gelpro-3.
- ❖ Κάθε πείραμα γίνεται εις τριπλούν.

2.4 Στατιστική ανάλυση – Υπολογισμοί

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO[•] από τα εξεταζόμενα μόρια, υπολογίστηκε ως εξής:

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

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 (μόριο) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 2,5mM AAPH.

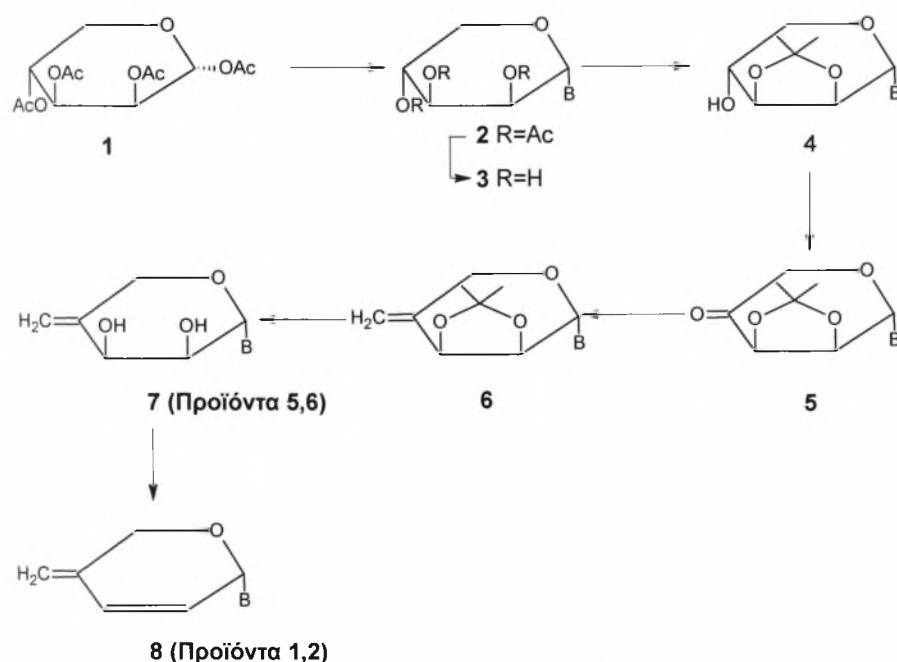
Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). (Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

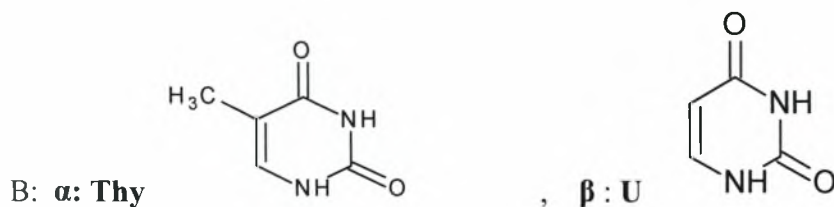
3.1 Σύνθεση των νουκλεοζιτικών αναλόγων

Κατά τη διάρκεια της διατριβής αυτής και στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των νουκλεοζιτών με εξωκυκλικό μεθυλένιο στις θέσεις 4' του σακχάρου της λυξόζης και 2' του σακχάρου της αραβινόζης αλλά και κετονουκλεοζιτών με την κετονομάδα στις ίδιες θέσεις χρησιμοποιώντας τη θυμίνη και την ουρακίλη ως ετεροκυκλικές βάσεις για τη λυξόζη και τη θυμίνη, την ουρακίλη, τη φθοροουρακίλη και την βενζοϋλοκυτοσίνη για την αραβινόζη. Έξι (6) νουκλεοζίτες είχαν ως σάκχαρο τη λυξόζη ενώ έντεκα (11) την αραβινόζη.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τη σύνθεση των πυρανονουκλεοζιτών της λυξόζης ήταν η εξής :



Σχήμα 1: Μεθοδολογία σύνθεσης νουκλεοζιτικών αναλόγων με ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη και την ουρακίλη (προϊόντα 1,2 και 5,6)



3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αναστολής τοξικής δράσης των περόξυ ριζών (ROO[•]) στο DNA

Από τις δεκαεπτά καθαρές ενώσεις (προϊόντα) που συντέθηκαν και δοκιμάστηκαν, οι έντεκα έδωσαν στατιστικά σημαντική αναστολή στην δράση των ριζών ROO[•] ενώ οι υπόλοιπες έξι (**1, 2, 3, 5, 16** και **17**) δεν έδωσαν δράση σε καμία εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Τα προϊόντα **1-6** αποτελούν νουκλεοζιτικά ανάλογα του σακχάρου της λυξόζης (Πίνακας 18). Δύο από τα προϊόντα αυτά, τα **4** και **6**, παρουσίασαν προστατευτική δράση απέναντι στις ρίζες σε ποσοστά 22 και 23% αντίστοιχα στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (100 μM). Τα προϊόντα **4** και **6** φέρουν ως βάση την ουρακίλη. Τα αντίστοιχα προϊόντα **3** και **5** φέρουν ως βάση την θυμίνη. Αφού τα προϊόντα **3**, και **5** δεν είχαν καμία δράση, φαίνεται ότι η παρουσία της ουρακίλης είναι σημαντικότερη για την ανασταλτική δράση από αυτή της θυμίνης.

Συνολικά από την δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων της λυξόζης παρατηρείται ότι η βάση (συγκεκριμένα η ουρακίλη), σε συνδυασμό με κετοακόρεστο σύστημα (προϊόν **4**) ή σε συνδυασμό με εξωμεθυλένιο στη θέση 4' απουσία ακόρεστου συστήματος (προϊόν **6**) είναι σημαντική για την προστατευτική δράση των μορίων.

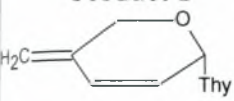
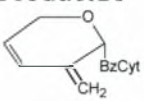
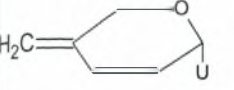
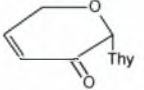
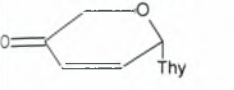
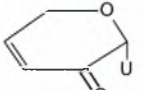
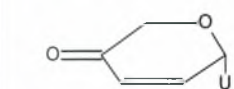
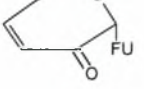
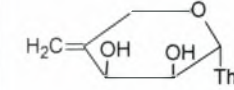
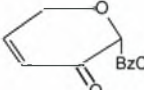
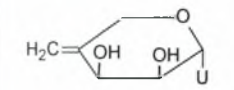
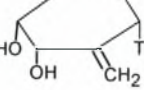
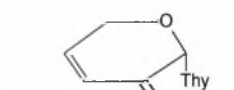
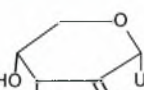
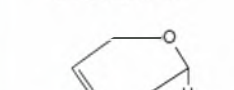
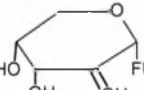
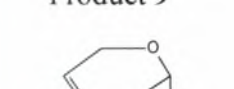
Τα προϊόντα **7-17** αποτελούν νουκλεοζιτικά ανάλογα του σακχάρου της αραβινόζης (Πίνακας 18). Εννέα από αυτά παρουσίασαν ανασταλτική δράση ενώ τα προϊόντα **16** και **17** δεν είχαν καμία δράση. Τα πιο δραστικά προϊόντα ήταν τα **7, 8, 9, 10, 13** και **14** τα οποία παρουσίασαν σημαντική προστατευτική δράση από τις συγκεντρώσεις 20 και 50 μM. Το προϊόν **8** ήταν το πιο δραστικό από όλα καθώς ήταν το μόνο που παρουσίασε ανασταλτική δράση στα 20 μM (22 %). Το προϊόν **8** φέρει την ουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση, εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 2' και διπλό δεσμό στις θέσεις 3', 4' του σακχάρου.

Τα προϊόντα **7, 8, 9, 10** διαφέρουν μόνο στην ετεροκυκλική βάση ενώ φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 2' και διπλό δεσμό στις θέσεις 3', 4' (Πίνακας 18). Όλα αυτά τα προϊόντα παρουσίασαν ανασταλτική δράση ανεξάρτητα της βάσης στις μεγαλύτερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (50 και 100 μM).

Επίσης ανάμεσα στα προϊόντα **11, 12, 13** και **14** που διαφέρουν μόνο στην βάση, μεγαλύτερη ανασταλτική δράση είχαν τα προϊόντα 13 και 14, τα οποία φέρουν τη φθοροουρακίλη και τη βενζοϋλοκυτοσίνη ως ετεροκυκλικές βάσεις αντίστοιχα.

Τα προϊόντα **15, 16** και **17** τα οποία έχουν μόνο εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 2' και διαφέρουν ως προς την ετεροκυκλική βάση παρουσίασαν τη μικρότερη δράση από τα προϊόντα της αραβινόζης.

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

Προϊόντα	% Αναστολή					Προϊόντα	% Αναστολή				
	5	10	20	50	100		5	10	20	50	100
Συγκεντρώσεις (μM) Product 1 	NI	NI	NI	NI	NI	Συγκεντρώσεις (μM) Product 10 	NI	NI	NI	17±1*	19±1*
Product 2 	NI	NI	NI	NI	NI	Product 11 	NI	NI	NI	NI	9±1*
Product 3 	NI	NI	NI	NI	NI	Product 12 	NI	NI	NI	13±4	19±2*
Product 4 	NI	NI	NI	16±4	22±3*	Product 13 	NI	13±2	11±4	19±4*	36±3*
Product 5 	NI	NI	NI	NI	NI	Product 14 	NI	12±2	10±1	17±2*	32±2*
Product 6 	NI	NI	15±3	14±4	23±5*	Product 15 	NI	NI	NI	9±2	13±1*
Product 7 	NI	NI	NI	16±1*	36±3*	Product 16 	NI	NI	NI	12±2	12±1
Product 8 	NI	10±2	22±1*	21±3*	25±2*	Product 17 	NI	NI	NI	NI	9±2
Product 9 	NI	NI	13±2	19±1*	30±1*						

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 (πλασμιδίο DNA μαζί με AAPH).

Νουκλεοξίτικα ανάλογα (Προϊόντα)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Προϊόν 1	OC→														
	SC→														
Προϊόν 2	OC→														
	SC→														
Προϊόν 3	OC→														
	SC→														
Προϊόν 4	OC→														
	SC→														
Προϊόν 5	OC→														
	SC→														
Προϊόν 6	OC→														
	SC→														

Προϊόν 7	OC→ SC→	
Προϊόν 8	OC→ SC→	
Προϊόν 9	OC→ SC→	
Προϊόντα 10 και 11	OC→ SC→	
Προϊόντα 12 και 13	OC→ SC→	
Προϊόντα 14 και 15	OC→ SC→	
Προϊόντα 16 και 17	OC→ SC→	

Πίνακας 19: Αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων απέναντι στην επαγόμενη από ρίζες ROO^{*} πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

OC: Ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση DNA (Open circular Conformation), SC: Υπερελικωμένη διαμόρφωση DNA (Supercoiled Conformation).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ανάγκες της σημερινής εποχής για θεραπεία σε συνδυασμό με τα αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας έχουν οδηγήσει στην έρευνα και παραγωγή νέων φαρμάκων. Σε αυτή την πληθώρα φαρμάκων εξέχουσα θέση καταλαμβάνουν τα αντιβακτηριακά, αντικαρκινικά και αντιογκογονικά φάρμακα τα οποία ως δραστική ουσία περιέχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας γίνεται αντιληπτή η ελάχιστη έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί για τη διερεύνηση και τον έλεγχο της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης των πυρανονουκλεοζιτών που έχουν αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα στα εργαστήρια Οργανικής Χημείας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας πραγματοποιήθηκαν έρευνες, οι οποίες αφορούσαν τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης σειράς πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της γαλακτόζης, της μαννόζης και της φθορογλυκόζης (Spanou C. et al, 2007). Παρατηρήθηκε ότι τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν το α,β -κετοακόρεστο σύστημα στο τμήμα του σακχάρου, εμφανίστηκαν αποτελεσματικά έναντι των ROO[•] ριζών. Αντίθετα αυτά που δεν φέρουν το α,β -κετοακόρεστο σύστημα στη δομή τους, εμφάνισαν μηδενική ή μικρή ανασταλτική δράση και μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις. Φαίνεται ότι η παρουσία του διπλού δεσμού σε α,β -θέση ως προς την κετονομάδα προκαλεί σημαντική σταθεροποίηση και αυξάνει την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση.

Σε συνέχεια των παραπάνω μελετών, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση νουκλεοζιτικών αναλόγων της λυξόζης και της αραβινόζης. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε η σύνθεση νουκλεοζιτικών αναλόγων της λυξόζης που φέρουν ως ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη και την ουρακίλη, εξωκυκλικό μεθυλένιο ή κετονομάδα στη θέση 4' και διπλό δεσμό στις θέσεις 2', 3' του σακχάρου. Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είχαν συντεθεί τα νουκλεοζιτικά ανάλογα του σακχάρου της αραβινόζης (προϊόντα 7-17), τα οποία φέρουν ως ετεροκυκλικές βάσεις τη θυμίνη, την ουρακίλη, τη φθορο-ουρακίλη και τη βενζοϋλοκυτοσίνη, εξωκυκλικό μεθυλένιο ή κετονομάδα στη θέση 2' και διπλό δεσμό στις θέσεις 3', 4' του σακχάρου. Τα προϊόντα αυτά μελετήθηκαν στην

συνέχεια για την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω αναστολής της επαγόμενης από ρίζες ROO[•] πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

Από τα δεκαεπτά προϊόντα που συντέθηκαν και δοκιμάστηκαν, τα έντεκα έδωσαν στατιστικά σημαντική αναστολή στην δράση των ριζών ROO[•] ενώ τα υπόλοιπα έξι (1, 2, 3, 5, 16 και 17) δεν είχαν δράση σε καμία εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Τα προϊόντα 1-6 αποτελούν νουκλεοζιτικά ανάλογα της λυξόζης (Πίνακας 18). Δύο από τα προϊόντα αυτά, τα 4 και 6 που φέρουν ως ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη, παρουσίασαν προστατευτική δράση απέναντι στις ρίζες. Τα αντίστοιχα προϊόντα 3 και 5 που φέρουν ως ετεροκυκλική βάση την θυμίνη δεν είχαν καμία δράση. Συνολικά από την δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων της λυξόζης παρατηρείται ότι η ετεροκυκλική βάση (ουρακίλη), σε συνδυασμό με κετοακόρεστο σύστημα (προϊόν 4) ή σε συνδυασμό με εξωμεθυλένιο στη θέση 4' απουσία ακόρεστου συστήματος (προϊόν 6) είναι σημαντική για την προστατευτική δράση των μορίων. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι οι αντίστοιχοι νουκλεοζίτες της μαννόζης που φέρουν επίσης την ουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση. Παρολ'αυτά οι δεοξυ-νουκλεοζίτες παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Τα προϊόντα 7-17 αποτελούν νουκλεοζιτικά ανάλογα της αραβινόζης (Πίνακας 18). Εννέα από αυτά παρουσίασαν ανασταλτική δράση ενώ τα προϊόντα 16 και 17 δεν είχαν καμία δράση. Τα πιο δραστικά προϊόντα ήταν τα 7, 8, 9, 10, 13 και 14. Τα προϊόντα 7, 8, 9, 10, τα οποία διαφέρουν μόνο ως προς την βάση και φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 2' και διπλό δεσμό στις θέσεις 3', 4' παρουσίασαν ανασταλτική δράση στις μεγαλύτερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Πίνακας 18). Μεταξύ αυτών το προϊόν 8, το οποίο φέρει την ουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση ήταν το πιο δραστικό (Πίνακας 19).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι όταν οι εξεταζόμενοι δεοξυ-νουκλεοζίτες φέρουν ουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση και εξωμεθυλένιο στη θέση 4' του σακχάρου εμφανίζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Αντίθετα, το εξωμεθυλένιο στη θέση 2' σε συνδυασμό με το διπλό δεσμό στους άνθρακες 3', 4'

του σακχάρου είναι σημαντικό για την αντιοξειδωτική δράση ανεξάρτητα, ωστόσο, από την βάση. Αυτό επιβεβαιώνεται από το ότι τα προϊόντα **15**, **16** και **17**, τα οποία έχουν μόνο εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 2' και δεν έχουν το διπλό δεσμό στις θέσεις 3', 4' είχαν πολύ μικρή ή καθόλου αντιοξειδωτική δράση.

Ανάμεσα στα προϊόντα **11**, **12**, **13** και **14** που φέρουν κετονομάδα στην θέση 2', διπλό δεσμό στις θέσεις 3', 4' του σακχάρου, αλλά διαφορετικές βάσεις, μεγαλύτερη ανασταλτική δράση παρουσίασαν τα προϊόντα **13** και **14**, αντίστοιχα. Στην περίπτωση αυτή η αντιοξειδωτική δράση των μορίων που φέρουν το παραπάνω α,β κετοακόρεστο σύστημα εξαρτάται και από την βάση καθώς τα προϊόντα **13** και **14**, που φέρουν φθοροουρακίλη και βενζοϋλοκυτοσίνη ήταν τα πιο ισχυρά.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αντιοξειδωτική δράση των 2' κετοακόρεστων νουκλεοζιτών εξαρτάται από την παρουσία της βάσης, γεγονός που δεν παρατηρείται στους 4' κετοακόρεστους νουκλεοζίτες.

Συνεπώς, παρατηρήθηκε ότι ορισμένα τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα έδωσαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Η σημασία των αποτελεσμάτων της διατριβής αυτής ίσως αποδειχθεί σημαντική στο μέλλον, καθώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν κάποια από αυτά στη θεραπεία ασθενειών, οι οποίες προκαλούνται από την υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών.

Βιβλιογραφία

- 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, M.; Lasnes, C.; Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Mutagenesis* **1986**, *1*, 411
- Antonakis K. (1989). Hexopyranose nucleosides. In studies in Natural Products Chemistry. Stereoselective Synthesis (Part C), Elsevier. Amsterdam. **vol4**, p 221, 241, 249.
- Antonakis, K. *Chimia* **1975**, *29*, 59.
- Antonakis, K.; Arvor, M. J. *C.R. Acad. Sci.* **1971**, 272-c, 1982.
- Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 2095.
- Antonakis, K.; Leclercq, F. *C. R. Acad. Sci., Ser. C* **1970**, *271*, 1197.
- Antonakis, K.; Leclercq, F. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1971**, 2142.
- Antonakis, K.; Halmos, T.; Bach, J.; Chouroulinkov, I. *Eur. J. Med. Chem.* **1980**,
- 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
- Brady RC, Bernstein DI. (2004). Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.* **61**(2):73-81.

- Chouroulinkov, I.; Antonakis, K. *C. R. Acad. Sci. Hebd Seances Acad. Sci. D.* **1977**, 285, 1021.
- Chong Y, Gumina G, Mathew JS, Schinazi RF, Chu CK. (2003). I-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
- 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). Assymetric 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.; Cardon, A.; Antonakis, K. *Chem. -Biol. Interactions* **1983**, 46, 11.
- Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 4963.
- Herdewijn, P.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1591.
- Jacob, R, (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, **15(5)**, 755-766.
- Jeong LS, Yoo SJ. (1998). Synthesis and Antiviral Activity of Novel Isodideoxy Nucleosides with exocyclic methylene. *Bioorg Med Chem Lett.* **8(7)**;847-852
- 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
- Langen, P.; Etzold, G. *Mol. Pharmacol.* **1966**, 2, 89.

- 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
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 577-586.
- 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. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 2861.
- McMurry J. (1999). Οργανική Χημεία (Τόμος ΙΙ). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. (p)1235-1283
- Nord, D. L.; Dalley, N. K.; Mc Kernan, P. A.; Robins, R. K. *J. Med. Chem.* 1987, 30, 1044.
- Ohkawa H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1978). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Ollapally, A. P.; Dorange, I. B.; Whitaker, T. L. *Nucleosides & Nucleotides* 1999, 18, 703.

- Osawa T. (1999). Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development*, 111, 133-139.
- Ostrowski, T.; Wroblowski, B.; Busson, R.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Bennet, M. S.; Champness, J. N.; Summers, W. C.; Sanderson, M. R.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4343.
- 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.
- Paterson, J.; Uriel, C.; Egron, M. J.; Herscovici, J.; Antonakis, K.; Alaoui, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 779.
- Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 903.
- 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.
- Suhadolnik, R. J. Nucleoside Antibiotics, Wiley-Interscience, New York, **1970**.
- Suhadolnik, R. J. Nucleosides as biological Probes, Wiley and Sons, New York, **1979**.
- 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.
- Takenuki K, Matsuda A, Ueda T, Sasaki T, Fujii A, Yamagami K. (1988). Design, Synthesis and Antineoplastic Activity of 2'-deoxy-2'-methylidencytidine. *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. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3154.
- Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12757.
- 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, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 826.
- 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
- www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html
- www.medscape.com
- www.pubmed.com
- www.sciencedirect.com

