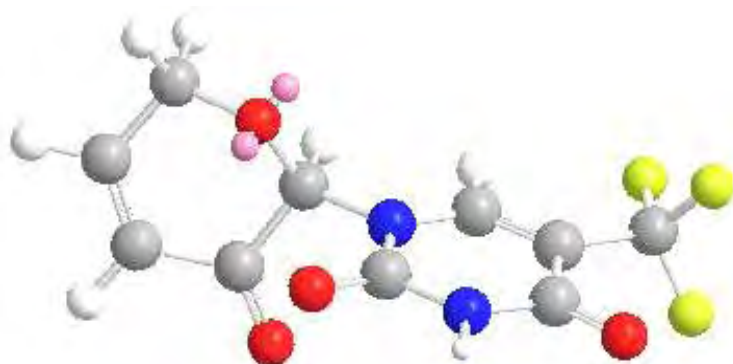




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία Και Περιβαλλοντική Υγιεινή

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ



ΓΑΡΟΥΦΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

Τριμελής Επιτροπή :

ΤΣΙΡΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ , Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΚΟΜΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΣΑΚΑΛΩΦ ΑΝΔΡΕΑΣ, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Τσιρόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα ενδιαφέρον αυτό θέμα, τις εποικοδομητικές και πολύτιμες υποδείξεις του και την αμέριστη συμπαράστασή του.

Ειδικά ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Κο Δημήτριο Κομιώτη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και υπεύθυνου του Εργαστηρίου Οργανικής χημείας, για την πολύτιμη καθοδήγηση και υπομονή του όλο αυτό το διάστημα. Επίσης εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κ. Τσακάλωφ για την ευγενική συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Στην κα. Στυλιανή Μαντά-ΠΔ407 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και στον Κο Χρήστο Κυρίτη, υποψήφιο διδάκτορα, εκφράζω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την ουσιαστική βοήθεια, συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα. Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου για το δημιουργικό, ευχάριστο και φιλικό κλίμα, με το οποίο με περιέβαλε.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Έχει διαπιστωθεί ότι νουκλεοζίτες αποτελούμενοι από ολιγοσακχαρίτες συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση υπάρχουν σε πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντιϊκή αλλά και αντιδιαβητική δράση. Αυτή η διαπίστωση αποτέλεσε το έναυσμα για την σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών οι οποίοι αναμενόταν να συμβάλλουν καθοριστικά στην αντιϊκή, αντικαρκινική και αντιδιαβητική θεραπεία. Οι κλινικές έρευνες που ακολούθησαν πιστοποίησαν την υπόθεση αυτή και έτσι άνοιξαν νέοι δρόμοι προς την χρήση τροποποιημένων νουκλεοζιτών για την καταπολέμηση ιϊκών μολύνσεων και κάποιων μορφών καρκίνου. Μια σχετικά νέα εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων είναι η χρήση τους για τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ένζυμο που μπορεί να αποτελέσει στόχο φαρμακευτικής παρέμβασης διότι εμπλέκεται στην διάσπαση του γλυκογόνου προς παραγωγή γλυκόζης (Somsák L. et al, 2003). Εκλεκτικοί και ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στον έλεγχο της αποδόμησης του γλυκογόνου και κατά συνέπεια στον έλεγχο της παροχής γλυκόζης προς το κύτταρο (Somsák L. et al, 2008). Τέτοια πυρανονουκλεοζιτικά και πυριμινιδικά ανάλογα, παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και έχει μελετηθεί η σχέση δομής-δράσης τους ώστε να δοθούν κατευθύνσεις προς την ανάπτυξη ισχυρότερων αναστολέων (Tsirkone V. et al, 2010). Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η ταυτοποίηση με σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές ορισμένων νουκλεοζιτικών αναλόγων που είχαν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με στόχο να δοκιμαστούν σαν αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance), με χρήση φασμάτων υπερύθρου (IR) καθώς και με χρήση φασμάτων μαζών (Mass Spectrometry) με τη μέθοδο του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό. Έγινε απόδοση των κορυφών στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, GC-MS, IR των ενώσεων προκειμένου να επιτευχθεί η σχετική ταυτοποίησή τους.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που αποτελούν στόχο της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής είναι τα 1-(β-D-Γλυκοπυρανοζυλο)-5-αιθυνυλο-ουρακίλη, 1-(β-D-Γλυκοπυρανοζυλο)-5-φαινυλαιθυνυλο-ουρακίλη, 1-(β-D-Γλυκοπυρανοζυλο)-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυνυλο ουρακίλη, 1-

(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-πεντυλοουρακίλη, 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-επτυνυλοουρακίλη, 6-π-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)]-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονη και τέλος η 6-π-πεντυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)]-φουρανο [2,3-d]πυριμιδινο-2-ονη.

Χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού έγινε προκειμένου για την ορθή ταυτοποίηση των, σε όλες τις περιπτώσεις των προαναφερθέντων μορίων. Πράγματι, με τη χρήση της φασματοσκοπίας ¹H-NMR στάθηκε δυνατή η αποτύπωση της δομής των αναλόγων, λόγω των χαρακτηριστικών ξεκάθαρων απορροφήσεων που λήφθηκαν και αφορούσαν κατά γενικό κανόνα σε όλα τα ανωτέρω νουκλεοζιτικά ανάλογα σε απορροφήσεις εξαιρετικά χαμηλού πεδίου για τα πρωτόνια της βάσης του νουκλεοζιτικού αναλόγου με τα πρωτόνια του σακχάρου και έπειτα του υποκαταστάτη να ακολουθούν (με εξαίρεση τη 1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-φαινυλαιθυνοουρακίλης λόγω της παρουσίας των αρωματικών πρωτονίων στον υποκαταστάτη). Αυτό στάθηκε δυνατό να επιβεβαιωθεί και με τα φάσματα ¹³C-NMR που λήφθηκαν για αιθυνο, πεντυλο και επτυνυλο-υποκατεστημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα, ενώ έγινε χρήση και φασμάτων μάζας προκειμένου για την απεικόνιση των μοριακών ιόντων, που είναι χαρακτηριστικά του μοριακού βάρους των ενώσεων. Σε μία περίπτωση νουκλεοζιτικού αναλόγου έγινε χρήση και φασματοσκοπίας υπέρυθρου από την οποία έγινε φανερή η απορρόφηση που οφειλόταν στην δόνηση τάσης ενός της αιθυλονομαδας στον υποκαταστάτη του αναλόγου καθώς και για την επιβεβαίωση των λειτουργικών κετονομάδων της βάσης.

Τέλος στην παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται μια σύντομη αναφορά στα κινητικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από εργαστήριο δομικής και λειτουργικής βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης των νέων C-5-αλκυνολο πυριμιδινο καθώς και των κυκλοποιημένων αναλόγων τους, έτσι ώστε να καταδειχτεί και η σημασία της ταυτοποίησης των ενώσεων αυτών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδες

Ευχαριστίες	2
Περίληψη.....	3
Περιεχόμενα.....	5
Κατάλογος πινάκων.....	7
Κατάλογος εικόνων.....	7
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ.....	9
1.1 Θεωρία Σακχαρώδους Διαβήτη	
1.1.1 Ορισμός.....	9
1.1.2 Αιτιολογία Σακχαρώδη Διαβήτη.....	9
1.1.3 Σημασία Γλυκόζης.....	9
1.1.4 Σημασία Ινσουλίνης.....	10
1.1.5 Επιπτώσεις του Σακχαρώδους Διαβήτη.....	12
1.1.5.1 Βραχυπρόθεσμες Επιπλοκές.....	13
1.1.5.2 Μακροπρόθεσμες Επιπλοκές.....	14
1.2 Ταξινόμηση Σακχαρώδους Διαβήτη.....	17
1.3 Θεραπευτική Προσέγγιση Στο Σακχαρώδη Διαβήτη.....	19
1.3.1 Εισαγωγή.....	19
1.3.2 Ινσουλινοθεραπεία.....	21
1.3.3 Ρυθμιστής Μεταγευματικής Υπεργλυκαιμίας (Μεγλιτιδίνες).....	22
1.3.4 Θεραπεία με Σουλφονουλουρίες.....	22
1.3.5 Θεραπεία με Διγουανίδια.....	24
1.3.6 Θεραπεία με Θειαζολιδινεδιόνες (Ροσιγλιταζόνη, Πιογλιταζόνη).....	25
2ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ	
2.1 Υδατάνθρακες.....	27
2.1.1 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές :Σχηματισμός ημιακετάλης.....	28
2.2 Νουκλεοζίτες.....	31

2.2.1 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	32
2.2.2 Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες.....	32
2.2.3 Νουκλεοζιτικά παράγωγα ως αντιδιαβητικά.....	33

3ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εισαγωγή στις Φασματοσκοπικές Μεθόδους.....	38
3.2 Υπέρυθρη φασματοσκοπία (IR)	38
3.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).....	42
3.4 Συνδυασμός αεριοχρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών (GC-MS).....	47
3.4.1 Φασματομετρία μαζών.....	47
3.5 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	51
3.5.1 Εισαγωγή στην αρχή λειτουργίας του NMR.....	51
3.5.2 Διέγερση και παραγωγή σήματος στο NMR	52
3.5.3 Αποδιέγερση	53
3.5.4 Μαγνητική διαφοροποίηση- Χημική μετατόπιση.....	54
3.5.5 Μαγνητικές συζεύξεις.....	54
3.5.6 Χρήσεις της Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	55

4ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. Στόχος – σκοπός μελέτης.....	56
4.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	57
4.3. Υπογλυκαιμικοί παράγοντες που ταυτοποιήθηκαν.....	58
i) Ταυτοποίηση της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυλοουρακίλης.....	58
ii) Ταυτοποίηση της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-επτυλοουρακίλης	63
iii) Ταυτοποίηση της 6-n-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)}-φουρανο [2, 3-d]πυριμιδινο-2-ονης	68
iv) Ταυτοποίηση της 6-n-πεντυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)}-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης.....	71
v) Ταυτοποίηση της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυνοουρακίλης	74
vi) Ταυτοποίηση της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθυνοουρακίλης	77
vii) Ταυτοποίηση της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-φαινυλαιθυνοουρακίλης	81

4.4 Αποτελέσματα	83
4.5 Συζήτηση.....	83

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86
--------------------------	-----------

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι : Ικανότητα αναστολής φωσφορυλάσης.....	84
--	-----------

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 2.1: Κυκλοποίηση μονοσαχαρίτη μέσω αντίδρασης ημιακετάλης.....	28
ΕΙΚΟΝΑ 2.2: Αριστερά α-D-γλυκοπυρανόζη, Δεξιά β-D-γλυκοπυρανόζη	29
ΕΙΚΟΝΑ 2.3: Αξονικοί (κόκκινοι) υποκαστάτες και ισημερινοί (μπλε) υποκαταστάτες.....	30
ΕΙΚΟΝΑ 2.4: Η β-στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης.....	31
ΕΙΚΟΝΑ 2.5: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου σύνδεσης της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb.....	35
ΕΙΚΟΝΑ 2.6: Απεικόνιση της δομής της GPb(ως προς τον άξονα συμμετρίας 2ης τάξης)...	37
ΕΙΚΟΝΑ 3.1: Αναπαράσταση των δονητικών διαδικασιών IR και Raman.....	39
ΕΙΚΟΝΑ 3.2: Διαδικασία μετάβασης σε ανώτερη ενεργειακή στάθμη.....	40
ΕΙΚΟΝΑ 3.3: Ταλάντωση διατομικού μορίου.....	41
ΕΙΚΟΝΑ 3.4: Προσπίπτουσα ακτινοβολία σε δείγμα πάχους b.....	42
ΕΙΚΟΝΑ 3.5: Σχηματικό διάγραμμα του συμβολόμετρου Michelson.....	44
ΕΙΚΟΝΑ 3.6: Διάταξη FTIR με διαβαθμισμένο πλέγμα (grating).....	46
ΕΙΚΟΝΑ 3.7: Διαδικασία λειτουργίας φασματοφωτόμετρου.....	46
ΕΙΚΟΝΑ 3.8: Φασματόμετρο Μάζας.....	49
ΕΙΚΟΝΑ 3.9: Διαχωρισμός ιόντων σε τετραπολικό φίλτρο μάζας.....	49
ΕΙΚΟΝΑ 3.10: Αρχή λειτουργίας ενός συστήματος GC-MS.....	51
ΕΙΚΟΝΑ 4.1: Νέοι πυρανοουκλεοζιτικοί και πυριμιδινοουκλεοζιτικοί αναστολείς.....	57
ΕΙΚΟΝΑ 4.2: Η δομή της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυνυλοουρακίλης.....	58
ΕΙΚΟΝΑ 4.3: Φάσμα ¹ H NMR της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυνυλοουρακίλης.....	60
ΕΙΚΟΝΑ 4.4: Φάσμα ¹³ C-NMR της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυνυλοουρακίλης....	61
ΕΙΚΟΝΑ 4.5: Η δομή της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-επτυνυλοουρακίλης.....	63

EIKONA 4.6: Φάσμα ^1H NMR της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-επτυνυλοουρακίλης.....	63
EIKONA 4.7: Φάσμα ^{13}C - NMR της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-επτυνυλοουρακίλης.....	65
EIKONA 4.8: Φάσμα μαζών της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-επτυνυλοουρακίλης.....	67
EIKONA 4.9: Η δομή της 6-n-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)}-φουρανο[2,3- d] πυριμιδινο-2-ονης.....	68
EIKONA4.10: Φάσμα ^1H NMR της 6-n-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)}-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης.....	69
EIKONA4.11: Η δομή της 6-n-πεντυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)}-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης.....	71
EIKONA4.12: Φάσμα ^1H NMR της 6-n-πεντυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)}-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης.....	72
EIKONA 4.13: Φάσμα μαζών της 6-n-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)}-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης	70
EIKONA 4.14: Η δομή της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυνο-ουρακίλης.....	74
EIKONA 4.15: Φάσμα ^1H NMR της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυνο-ουρακίλης.....	74
EIKONA 4.16: Φάσμα υπερύθρου της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυνο-ουρακίλης.....	76
EIKONA 4.17: Η δομή της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθυνο-ουρακίλης.....	77
EIKONA 4.18: Φάσμα ^1H NMR της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθυνο-ουρακίλης.....	77
EIKONA 4.19: Φάσμα ^{13}C -NMR της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθυνο-ουρακίλης.....	79
EIKONA 4.20: Η δομή της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-φαινυλαιθυνο-ουρακίλης.....	81
EIKONA 4.21: Φάσμα ^1H NMR της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-φαινυλαιθυνο-ουρακίλης	81

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ : ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

1ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1.1 ΘΕΩΡΙΑ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ

1.1.1 Ορισμός

Ο *Σακχαρώδης Διαβήτης* ή απλά Διαβήτης, είναι μια ασθένεια του μεταβολισμού των σακχάρων, που προέρχεται από διαταραχή στην παραγωγή και λειτουργία της ορμόνης Ινσουλίνης. Το επιστημονικό όνομα του διαβήτη είναι *Diabetes Mellitus*, όπου το *Diabetes* προέρχεται από το ελληνικό ρήμα διαβαίνω, ενώ το *mellitus* από τα λατινικά όπου γενικά είναι ο γλυκός σα μέλι. Στην προκειμένη περίπτωση αναφέρεται στη διάβαση μεγάλων ποσοτήτων σακχάρων στα ούρα. Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι λοιπόν ένα σύνολο από μεταβολικές ασθένειες που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία από ανεπάρκεια έκκρισης ινσουλίνης, ή της δράσης της, ή και τα δύο (American Diabetes Association, 2008).

1.1.2 Αιτιολογία Σακχαρώδη Διαβήτη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης, όπως αναφέρθηκε, οφείλεται σε διαταραχή του μεταβολισμού των σακχάρων, τα οποία εισάγονται στον οργανισμό μέσω της διατροφής. Ο μεταβολισμός των σακχάρων εξαρτάται από την αλληλεπίδραση τριών διαφορετικών ορμονών: της *ινσουλίνης*, της *γλυκαγόνης* και της *αδρεναλίνης* (Dewit S, 2009).

1.1.3 Σημασία Γλυκόζης

Προκειμένου ο οργανισμός να λειτουργεί ομαλά είναι απαραίτητο να υπάρχει ισότητα μεταξύ της ενέργειας που εισάγεται σε αυτόν και αυτής που καταναλώνεται. Οι πηγές ενέργειας του ανθρώπινου οργανισμού είναι τα σάκχαρα και τα λιπαρά οξέα, τα οποία εισάγονται σε αυτόν με την τροφή, και το οξυγόνο, ενώ σε περιόδους ασιτίας πηγή ενέργειας είναι τα αμινοξέα. Μέσα στο κύτταρο τα συστατικά των τροφών αντιδρούν χημικά με το οξυγόνο, με την

επίδραση διαφόρων ενζύμων, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενέργειας. Κατανάλωση ενέργειας έχουμε με κάθε είδους κίνηση του σώματος.

Η βασικότερη πηγή ενέργειας, τόσο μεταξύ των σακχάρων, όσο και μεταξύ των λιπαρών οξέων είναι η *γλυκόζη*, μιας και η διάσπασή της οδηγεί στην παραγωγή ενώσεων με δεσμούς υψηλής χημικής ενέργειας. Η διάσπαση της γλυκόζης σε CO₂ και H₂O γίνεται σε τρία στάδια, τα οποία είναι: *Γλυκόλυση*, *Κύκλος του κιτρικού οξέος (ή κύκλος του Krebs)*, *Τελική οξειδωση (οξειδωτική φωσφορλίωση)*.

1.1.4 Σημασία Ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι πεπτιδική ορμόνη (αποτελείται δηλαδή από αμινοξέα) που παράγεται στο πάγκρεας από τα β-κύτταρα, τα οποία είναι οργανωμένα μαζί με άλλους κυτταρικούς τύπους σε νησίδες, τις λεγόμενες νησίδες του *Langerhans*. Για να παραχθεί θα πρέπει να υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα ή αυτό να περιέχει πολλά αμινοξέα ή λιπαρά οξέα. Τότε τα β-κύτταρα δεχόμενα το ερέθισμα αντιδρούν, απελευθερώνοντας ινσουλίνη, η οποία στη συνέχεια, ακολουθώντας την κυκλοφορία του αίματος, δρα στα διάφορα όργανα, για την ομαλή λειτουργία των οποίων είναι απαραίτητη.

Η ινσουλίνη εκτελεί μια σειρά από σημαντικές λειτουργίες στο μεταβολισμό τόσο των υδατανθράκων, όσο των λιπών (λιπιδίων) και των πρωτεϊνών (πρωτιδίων). Έχει την ικανότητα να αυξάνει τη διαπερατότητα των κυττάρων του μυϊκού και του λιπώδη ιστού στη γλυκόζη.

Η ινσουλίνη δεν επιδρά με τον ίδιο τρόπο στο ήπαρ, στο οποίο η γλυκόζη διεισδύει και χωρίς την παρουσία της. Πιο συγκεκριμένα, στους ιστούς έχουμε λήψη και καμιά φορά αποθήκευση της γλυκόζης για περαιτέρω επεξεργασία, ενώ στο ήπαρ έχουμε μόνο αποθήκευσή της. Όμως με τη διαδικασία λήψης και αποθήκευσης της γλυκόζης μειώνεται η συγκέντρωσή της στο αίμα, ενώ ταυτόχρονα τα β-κύτταρα μειώνουν την ποσότητα της ινσουλίνης που παράγουν. Πιο συγκεκριμένα, στο ήπαρ με τη βοήθεια της ινσουλίνης έχουμε εναπόθεση γλυκόζης με τη μορφή γλυκογόνου, το οποίο δεν είναι τίποτα άλλο από ένα σύμπλεγμα σακχάρων το οποίο και απελευθερώνει σάκχαρο κάθε φορά που έχουμε υπογλυκαιμία και η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα είναι πολύ μικρή (Stephen L et al, 2004).

Ο μηχανισμός με τον οποίο η ινσουλίνη προκαλεί πρόσληψη και εναπόθεση γλυκόζης στο ήπαρ ακολουθεί τα παρακάτω στάδια, που γίνονται σχεδόν ταυτόχρονα:

- Αρχικά έχουμε την αναστολή της φωσφορυλάσης, δηλαδή εκείνου του ενζύμου που προκαλεί τη διάσπαση του γλυκογόνου σε γλυκόζη.
- Μετά τα ηπατικά κύτταρα αυξάνουν το ρυθμό πρόσληψης γλυκόζης από το αίμα, αυξάνοντας έτσι τη δραστηριότητα της γλυκοκινάσης. Πρόκειται για εκείνο το ένζυμο που προκαλεί την αρχική διάσπαση του γλυκογόνου σε γλυκόζη. Η προκύπτουσα γλυκόζη παγιδεύεται μέσα στα ηπατικά κύτταρα, αφού και η ημιπερατή μεμβράνη απαγορεύει την προς τα έξω κίνηση.
- Τέλος έχουμε αύξηση της λειτουργίας των ενζύμων που προάγουν τη σύνθεση του γλυκογόνου.

Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα αρχίζει να μειώνεται λαμβάνει χώρα μια σειρά από μηχανισμούς που προκαλούν την απελευθέρωσή της από το ήπαρ και την εισαγωγή της στην κυκλοφορία του αίματος. Συγκεκριμένα:

- Η ελάττωση της γλυκόζης προκαλεί μείωση της έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας.
- Αυτή η ελάττωση της ινσουλίνης προκαλεί αντιστροφή των παραπάνω φαινομένων αποθήκευσης γλυκόζης.
- Παράλληλα ενεργοποιείται το ένζυμο *φωσφορυλάση* που προκαλεί τη διάσπαση του γλυκογόνου σε φωσφορική γλυκόζη.
- Τέλος το ένζυμο *φωσφατάση* της γλυκόζης προκαλεί απόσπαση της φωσφορικής ρίζας από τη γλυκόζη, επιτρέποντας τη διάχυσή της προς το αίμα (Stryer Lubert, 1997).

Επομένως, το ήπαρ απομακρύνει με τη βοήθεια της ινσουλίνης τη γλυκόζη όταν αυτή βρίσκεται σε περίσσεια και την επαναφέρει όταν έχουμε μείωσή της κάτω από τα κανονικά επίπεδα.

Στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, έχουμε μεταφορά λιπαρών οξέων, τα οποία παράγονται στο ήπαρ με μετατροπή της γλυκόζης. Πρόκειται για λειτουργία την οποία προάγει η ινσουλίνη. Τα λιπαρά οξέα αποτελούν την πηγή ενέργειας για τα λιπώδη κύτταρα.

Η «καύσιμη ύλη» του μυϊκού ιστού, είναι κυρίως τα λιπαρά οξέα. Αυτό συμβαίνει γιατί η μεμβράνη της μυϊκής ίνας σε ηρεμία είναι σχεδόν αδιαπέραστη στη γλυκόζη, εκτός και αν προηγουμένως διεγερθεί από την ινσουλίνη. Γενικά, δύο είναι οι περιπτώσεις κατά τις οποίες θα χρησιμοποιηθεί για τη παροχή ενέργειας η γλυκόζη. Πρώτον, όταν υπάρχει έντονη σωματική άσκηση και δεύτερον, σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά το φαγητό. Έτσι κατά τη διάρκεια του γεύματος και εφόσον οι μύες δεν ασκούνται έχουμε εναπόθεση γλυκόζης σε αυτούς με τη μορφή γλυκογόνου. Αυτή η ποσότητα γλυκογόνου θα χρησιμοποιηθεί από τους μύες για ενέργεια. Το γλυκογόνο των μυών διαφέρει από εκείνο που απαντάται στο ήπαρ, αφού στους πρώτους η απουσία της φωσφατάσης επιτρέπει την μετατροπή τους σε γλυκόζη και την άμεση απελευθέρωσή της στα υγρά του οργανισμού.

Στον εγκέφαλο τέλος, η επίδραση της ινσουλίνης είναι διαφορετική σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς μιας και εδώ δε παίζει κανένα ρόλο στην πρόσληψη ή στη χρησιμοποίησή της από αυτόν, μιας και τα κύτταρά του είναι πάντα διαπερατά στη γλυκόζη, η οποία και είναι η αποκλειστική πηγή ενέργειας. Όταν η συγκέντρωσή της στο αίμα ελαττωθεί πολύ, δηλαδή στα 20-50mg/100ml, τότε εκδηλώνονται συμπτώματα υπογλυκαιμικής καταπληξίας που εξελίσσονται σε λιποθυμία, σπασμούς ή ακόμη και σε κώμα.

1.1.5 Επιπτώσεις του Σακχαρώδους Διαβήτη

Από τα παραπάνω γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η ομαλή λειτουργία των προαναφερθέντων ορμονών δρα καταλυτικά στο μεταβολισμό των σακχάρων. Ιδιαίτερος είναι ο ρόλος της ινσουλίνης, η μικρή παραγωγή της οποίας ή η μη ικανοποιητική δράση της έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του *Σακχαρώδους Διαβήτη (Diabetes mellitus)*. Πράγματι, σε αυτή την περίπτωση, ακόμη και όταν τα επίπεδα της γλυκόζης είναι σε μεγαλύτερες τιμές από τις επιτρεπτές, δεν ενεργοποιείται ο μηχανισμός, που στη προκειμένη περίπτωση είναι η παραγωγή ινσουλίνης, που θα μειώσει την τιμή της γλυκαιμίας. Αποτέλεσμα αυτού είναι η ραγδαία αύξηση της γλυκόζης στο αίμα. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν τα επίπεδα της ινσουλίνης είναι πολύ χαμηλά σε σχέση με τις μεταβολικές ανάγκες του οργανισμού, τότε αυτός δεν είναι σε θέση να ελέγξει τη συγκέντρωση του σακχάρου στο αίμα, για τους παρακάτω τρεις κυρίως λόγους:

Η απουσία της ινσουλίνης καθιστά τα μυϊκά και λιπώδη κύτταρα μη διαπερατά στη γλυκόζη.

Το ήπαρ δεν μπορεί να αποθηκεύσει την πλεονάζουσα ποσότητα της γλυκόζης με μορφή γλυκογόνου, ενώ παράλληλα συνεχίζεται ο μετασχηματισμός του γλυκογόνου σε γλυκόζη. Ο συνδυασμός αυτός είναι ικανός να ανεβάσει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ακόμη και στα $800\text{mg}/100\text{ml}$ αίματος.

Οι «ανταγωνιστές» της ινσουλίνης, δηλαδή η γλυκαγόνη και η αδρεναλίνη, δεν παρεμποδίζονται με αποτέλεσμα τη ραγδαία αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα.

1.1.5.1 Βραχυπρόθεσμες Επιπλοκές

Αυτή η ραγδαία αύξηση στη συγκέντρωση της γλυκόζης έχει άμεσες συνέπειες στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού, οι οποίες εκδηλώνονται ως εξής:

Όταν η συγκέντρωση του σακχάρου στο αίμα υπερβεί τα $1.8\text{g}/\text{L}$ αίματος, τα νεφρικά σωληνάρια δεν είναι πλέον ικανά να απορροφήσουν τη γλυκόζη, με αποτέλεσμα αυτή να περνάει στα ούρα, προκαλώντας γλυκοζουρία, η οποία συνεπάγεται μεγάλες απώλειες υγρών, έως και 10L ημερησίως, αλάτων και μετάλλων (ηλεκτρολύτες). Ο συνδυασμός αυξημένης συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα και απώλειας υγρών προκαλεί έντονη την αίσθηση της δίψας. Έχουμε απώλεια βάρους και κόπωση. Η απώλεια υγρών είναι δυνατό να οδηγήσει ακόμη και σε αφυδάτωση.

Όταν η παραγωγή της ινσουλίνης είναι μικρή, τότε παρουσιάζεται αύξηση των λιπαρών οξέων, μιας και ο οργανισμός είναι αναγκασμένος να εκμεταλλευτεί τα αποθέματα λίπους στο αίμα, τα οποία, όπως προαναφέρθηκε, είναι «καύσιμη ύλη» για αρκετούς ιστούς. Ταυτόχρονα, τα κύτταρα των ιστών, μη έχοντας επαρκή ποσότητα γλυκόζης, δεν επιτρέπουν στα λιπαρά οξέα να καούν πλήρως, ενώ παράλληλα χρησιμοποιούν μόνο αυτά ως «καύσιμη ύλη», με αποτέλεσμα την παραγωγή κετονικών σωμάτων. Η παρουσία των λιπαρών οξέων και των κετονικών σωμάτων έχει δυσμενή αποτελέσματα στον οργανισμό, μιας και οδηγούν σε υπεροξέωση του αίματος, με αποτέλεσμα να επιβαρύνεται η κυκλοφορία του CO_2 στο αίμα και συνεπώς το άτομο με διαβήτη να παρουσιάζει δυσκολίες στην αναπνοή. Ταυτόχρονα, η παρουσία των κετονικών σωμάτων και κυρίως της ακετόνης οδηγούν σε απώλεια των

αισθήσεων και υπερβολική απώλεια υγρών. Επίσης, έχουμε διαταραχή στη σύνθεση των πρωτεϊνών, μιας και τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται τώρα για την παραγωγή γλυκόζης, αλλά και ως αποκλειστική «καύσιμη ύλη» από τους ιστούς, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να παραχθούν ικανοποιητικά οι πρωτεΐνες και να παρουσιάζονται μυϊκές ατροφίες.

Συνοψίζοντας, άμεση συνέπεια του Σακχαρώδους Διαβήτη είναι τα επεισόδια υπεργλυκαιμίας (hyperglycaemia), δηλαδή η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα πέρα από τα επιθυμητά όρια, η οποία, αν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα, ουσιαστικά με τη χορήγηση ινσουλίνης, μπορεί να οδηγήσει στο λεγόμενο διαβητικό κώμα, που ήταν η βασικότερη αιτία θανάτου των διαβητικών πριν την εισαγωγή της ινσουλίνης στην αντιμετώπιση του διαβήτη.

Ως βραχυπρόθεσμη επιπλοκή του Σακχαρώδους Διαβήτη θα μπορούσαν να θεωρηθούν και τα επεισόδια υπογλυκαιμίας (hypoglycaemia), δηλαδή η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα κάτω από τα επιθυμητά όρια. Τα επεισόδια υπογλυκαιμίας δεν οφείλονται άμεσα στη νόσο του Σακχαρώδους Διαβήτη, αλλά αποτελούν παρενέργεια του τρόπου αντιμετώπισής της, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Η μείωση των επιπέδων της γλυκόζης αίματος επηρεάζει άμεσα τον εγκέφαλο του ασθενούς, με αποτέλεσμα να αισθάνεται ευερέθιστος ή μπερδεμένος. Μπορεί να αισθανθεί αδύναμος ή να υποφέρει από θολή όραση. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, ο ασθενής μπορεί να χάσει τις αισθήσεις του ή να έχει σπασμούς. Ταυτόχρονα, ο οργανισμός αντιδρά με την παραγωγή άλλων ορμονών, όπως η αδρεναλίνη. Αυτό προκαλεί τρέμουλο των άκρων, εφίδρωση, γρήγορους καρδιακούς παλμούς και αίσθημα της πείνας. Η άμεση αντιμετώπιση των επεισοδίων υπογλυκαιμίας συνίσταται στη χορήγηση ζάχαρης, κυρίως σε υγρή μορφή.

1.1.5.2 Μακροπρόθεσμες Επιπλοκές

Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι ο διαβήτης προκαλεί εκτεταμένες διαταραχές στον οργανισμό και με μακροχρόνιες συνέπειες στην ομαλή λειτουργία του. Είναι γνωστό ότι τα αιμοφόρα αγγεία είναι κατεξοχήν υπεύθυνα για την τροφοδοσία όλων των ζωτικών οργάνων με αίμα. Στην εσωτερική πλευρά των αγγείων υπάρχει μεμβράνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την ανταλλαγή υγρών και θρεπτικών ουσιών μεταξύ τριχοειδών και αγγείων. Όταν όμως η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα είναι μεγάλη η λειτουργία της παραπάνω μεμβράνης

αλλοιώνεται, μιας και αλλάζει η σύστασή της, κάτι που προφανώς έχει σοβαρές και μακροχρόνιες επιπλοκές, οι οποίες συνοψίζονται παρακάτω:

A) Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια (Retinopathy): Πρόκειται για τη σταδιακή φθορά του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του ματιού, η οποία μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε τύφλωση. Προκαλείται από την καταστροφή των αγγείων του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του ματιού. Στα πρώτα στάδια (non proliferative retinopathy) τα υπάρχοντα αγγεία γίνονται πορώδη και επιτρέπουν τη διαρροή αίματος στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, με αποτέλεσμα τη θολωμένη όραση. Σε πιο προχωρημένα στάδια (proliferative retinopathy) αναπτύσσονται νέα αγγεία στο μάτι. Τα νέα αγγεία είναι εύθραυστα και αιμορραγούν εύκολα, πράγμα που προκαλεί την απώλεια όρασης και ουλές. Η πιθανότητα εκδήλωσης και η σοβαρότητα της πάθησης αυξάνουν με τη διάρκεια της νόσου του Σακχαρώδους Διαβήτη. Σχεδόν όλοι όσοι πάσχουν από Σακχαρώδη Διαβήτη για περισσότερο από 30 χρόνια θα εμφανίσουν τα συμπτώματα αμφιβληστροειδοπάθειας (<http://health.allrefer.com> R.S. Douglas, 2002). Η κατάσταση επιδεινώνεται σε όσους δεν ακολουθούν την κατάλληλη θεραπεία.

B) Γλαύκωμα (Glaucoma): Πρόκειται για ασθένεια του ματιού, η οποία μειώνει σταδιακά την ικανότητα όρασης και προκαλείται από καταστροφή του οπτικού νεύρου, απαραίτητου για τη μεταφορά των εικόνων στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Επιδεινώνεται λόγω υψηλής πίεσης αίματος.

Γ) Καταρράκτης (Cataract): Πρόκειται για τη θόλωση των φακών των ματιών, γεγονός που οδηγεί σε θολή όραση.

Το γλαύκωμα και ο καταρράκτης δεν αποτελούν άμεσες συνέπειες του Σακχαρώδους Διαβήτη, αλλά οι διαβητικοί έχουν αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν κάποια από αυτές τις ασθένειες.

Δ) Διαβητική Νευροπάθεια (Diabetic Neuropathy): Πρόκειται για μια συνηθισμένη επιπλοκή του Σακχαρώδους Διαβήτη, όπου τα νεύρα καταστρέφονται εξαιτίας της υπεργλυκαιμίας. Όσοι πάσχουν από Σακχαρώδη Διαβήτη συνήθως παρουσιάζουν παροδικές ή μόνιμες ζημιές στο νευρικό ιστό. Οι τραυματισμοί των νεύρων προκαλούνται κυρίως από τη

μειωμένη ροή αίματος και την υψηλή συγκέντρωση της γλυκόζης. Δεν είναι απαραίτητο όλοι οι διαβητικοί να παρουσιάσουν διαβητική νευροπάθεια, αν και σε όσους εμφανιστεί εκδηλώνεται σχετικά νωρίς, περίπου 10 – 20 χρόνια μετά την πρώτη διάγνωση της νόσου (<http://health.allrefer.com> R.S. Douglas, 2002). Η διαβητική νευροπάθεια εξελίσσεται σε στάδια και συνήθως καταλήγει στην ολική απώλεια της αίσθησης του πόνου σε κάποια περιοχή του σώματος, κυρίως των άκρων, λόγω της καταστροφής του νευρικού ιστού. Ο κίνδυνος που εγκυμονεί είναι η λεγόμενη νόσος του «**διαβητικού ποδιού**». Εξαιτίας της διαβητικής νευροπάθειας, το άτομο χάνει την προστατευτική αισθητικότητα των κάτω άκρων, χωρίς να το γνωρίζει και αφήνει ανεξέλεγκτες τις κινήσεις του ποδιού, όπου λόγω των φορτίσεων που αναπτύσσονται κατά τη βάδιση, γίνονται μικρο - τραυματισμοί των πολλαπλών μικρών οστών και αρθρώσεων του ποδιού.

E) Αρτηριοσκλήρωση: Πρόκειται για την κατάσταση, όπου λίπη εναποτίθενται στα τοιχώματα των αρτηριών. Τα λίπη αυτά σκληραίνουν το τοίχωμα των αρτηριών και αυξάνουν το πάχος τους, οπότε μειώνουν και τη διατομή των αρτηριών, με κίνδυνο να τις φράξουν. Η αρτηριοσκλήρωση αποτελεί συνήθη πάθηση και η επιδείνωσή της οφείλεται, πέραν του Σακχαρώδους Διαβήτη και στην παχυσαρκία, την υψηλή περιεκτικότητα του αίματος σε χοληστερόλη, αλλά και άλλες ουσίες, οι οποίες συσσωρεύονται στα τοιχώματα των αρτηριών και σχηματίζουν το λεγόμενο αθήρωμα (atheroma). Η πιο σοβαρή επιπλοκή της αρτηριοσκλήρωσης είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου, που οδηγεί στο θάνατο (<http://health.allrefer.com> R.S. Douglas, 2002).

ΣΤ) Διαβητική Νεφροπάθεια: Πρόκειται για την απώλεια ορθής λειτουργίας των νεφρών. Κάθε νεφρό περιλαμβάνει δέσμες από τριχοειδή αγγεία (glomerulus). Τα τριχοειδή αγγεία των νεφρών φιλτράρουν το αίμα και παράγουν τα ούρα. Στα πρώτα στάδια της διαβητικής νεφροπάθειας, τα τριχοειδή αγγεία των νεφρών παχαίνουν και σκληραίνουν και το νεφρό αρχίζει να επιτρέπει σε ολοένα και περισσότερη αλβουμίνη (albumin), μια πρωτεΐνη, να χάνεται στα ούρα.(American Diabetes Association: Diabetic Nephropathy (Position Statement),2000).

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ

Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ ή World Health Organisation, WHO) διακρίνει, ανάλογα με την παρουσία ή μη της ινσουλίνης, το διαβήτη σε δύο τύπους:

A) Διαβήτης Τύπου 1

Εμφανίζεται σε άτομα νεαρής ηλικίας - λέγεται αλλιώς και *νεανικός ή παιδικός διαβήτης* - μπορεί όμως να εμφανιστεί και σε ενήλικες και σε άτομα μεγάλης ηλικίας. Οφείλεται σε ευαισθησία των β-κυττάρων του παγκρέατος, εξαιτίας γενετικών παραγόντων. Η ευαισθησία αυτή τα καθιστά ευάλωτα στην προσβολή ή ακόμη και την καταστροφή τους από διάφορους ιούς (Coxsackie-B) ή από τα αντισώματα που παράγει ο ίδιος ο οργανισμός, προκειμένου σε φυσιολογικές συνθήκες να προστατευθεί από διάφορες λοιμώξεις. Ο ΣΔ τύπου I είναι μια αυτοάνοση διαταραχή στην οποία τα β-κύτταρα του παγκρέατος καταστρέφονται σε ορισμένα άτομα που εμφανίζουν γενετική προδιάθεση. Το αμυντικό σύστημα δεν καταφέρνει να αναγνωρίσει τα φυσιολογικά κύτταρα του σώματος ως "δικά του" και λαμβάνει "μέτρα καταστολής" εναντίον τους. Στο ΣΔ τύπου I, το αμυντικό σύστημα και κάποιες ουσίες που παράγονται από τα κύτταρα επιτίθενται και καταστρέφουν τα κύτταρα των νησιδίων που παράγουν την ινσουλίνη. Παρόλο που η ακριβής αιτία για την οποία το αμυντικό σύστημα ενός ατόμου δέχεται επίθεση από φυσιολογικά κύτταρα του σώματος δεν είναι γνωστή, άτομα με συγκεκριμένους τύπους ιστών είναι πιο εύκολο να εμφανίσουν αυτοάνοσες διαταραχές, συμπεριλαμβανομένου και του ΣΔ τύπου I. Συγκεκριμένα, άτομα που εμφανίζουν την ιστική ταυτότητα HLA-DR3 ή HLA-DR4 βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ τύπου I. Μερικές λοιμώδεις νόσοι όπως η παρωτίτιδα, η συγγενής ερυθρά και η λοίμωξη από τον ιό Coxsackie φαίνεται ότι επίσης πυροδοτούν την αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος. Δείκτες της ανοσιακής βλάβης που προκαλείται στα κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη αποτελούν η παρουσία στο αίμα αντισωμάτων που κατευθύνονται εναντίων των ίδιων β κυττάρων ή εναντίων παραγόντων που παράγουν τα β κύτταρα. Οι περισσότεροι ασθενείς με ΣΔ τύπου I έχουν αντισώματα κατά των νησιδίων (ANA), αυτοαντισώματα έναντι της ινσουλίνης (IAA), αυτοαντισώματα κατά δεκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος (GAD) ή αυτοαντισώματα εναντίων των φωσφορικών ενώσεων της τυροσίνης.

Κυκλοφορούντα αντισώματα (ANA και IAA) μπορεί να υπάρχουν πριν την εμφάνιση της συμπτωματολογίας του ΣΔ τύπου I (Ignatavicius & Workman, 2008).

B) Διαβήτης Τύπου 2

Αυτός εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 35 χρόνων. Οφείλεται κυρίως στις διατροφικές συνήθειες και στον τρόπο ζωής του ατόμου. Έτσι ο συγκεκριμένος τύπος διαβήτη εμφανίζεται, ως επί το πλείστον, σε άτομα παχύσαρκα, στα οποία η ινσουλίνη απλώς δεν προλαβαίνει να καλύψει τις ανάγκες, καθώς και σε άτομα τα οποία συχνά βρίσκονται σε καταστάσεις πίεσης (stress), με αποτέλεσμα να έχουμε μεγάλη έκκριση αδρεναλίνης. Ο διαβήτης αυτού του τύπου χαρακτηρίζεται από σχετική μείωση -50%- της μάζας των β-κυττάρων του παγκρέατος, από μείωση της ευαισθησίας των παγκρεατικών β-κυττάρων, όσον αφορά την ικανότητά τους να εκκρίνουν ινσουλίνη σε ερέθισμα από τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα και τέλος από μείωση της ευαισθησίας των περιφερικών ιστών - στόχων στην ινσουλίνη, όσον αφορά τη μεταφορά και το μεταβολισμό της γλυκόζης. Ο Διαβήτης Τύπου 2 είναι δυνατό να εμφανιστεί και ως αποτέλεσμα της χρόνιας κακής διατροφής, χωρίς ακόμη να είναι γνωστά τα αίτια και η παθοφυσιολογία του. Αυτό το είδος διαβήτη εμφανίζεται με υψηλή συχνότητα σε μερικές υποανάπτυκτες και τροπικές χώρες (Τούντας Χ., 2005).

Γ) Διαβήτης κατά την κύηση

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης πρόκειται για διαβήτη που εμφανίζεται στη διάρκεια της κύησης και είναι συνέπεια των διαβητογόνων επιδράσεων των ορμονών της κύησης (αντίσταση ιστών στην ινσουλίνη), σε άτομα που μειονεκτούν στην αντιμετώπιση διαβητογόνων επιδράσεων. Οι γυναίκες αυτές ενδεχομένως θα εμφάνιζαν ΣΔ με την αύξηση του βάρους τους ή με την πρόοδο της ηλικίας (Conway DL, 2007). Ο διαβήτης της κύησης άλλοτε εξαφανίζεται μετά τον τοκετό, για να επανεμφανισθεί σε επόμενο τοκετό ή στο απώτερο μέλλον, και άλλοτε παραμένει. Έχει χαρακτηριστικά Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2. Οι γυναίκες αυτές, αν μείνουν χωρίς κατάλληλη ιατρική φροντίδα, γεννούν υπέρβαρα νεογνά τα οποία σε μεγάλο ποσοστό αναπτύσσουν σακχαρώδη διαβήτη στην ενήλικη ζωή τους. Για τη διάγνωση του εν λόγω διαβήτη σημαντική είναι η συμβολή της Δοκιμασίας Ανοχής Γλυκόζης (εφεξής ΔΑΓ), η οποία στις γυναίκες που είναι επιρρεπείς συνιστάται να διενεργείται την 24η εβδομάδα της κύησης (Langer O, Berkus M, Brustman L et al, 1991).

Ο όρος σακχαρώδης διαβήτης στην εγκυμοσύνη περιλαμβάνει δύο βασικές κατηγορίες γυναικών :

- Αυτές με προϋπάρχοντα διαβήτη τύπου 1 ή 2, και
- Αυτές στις οποίες ο διαβήτης διαπιστώνεται για πρώτη φορά στη διάρκεια της εγκυμοσύνης και χαρακτηρίζεται ως Σακχαρώδης Διαβήτης της Κύησης (ΣΔΚ). Το 3-10% των κυήσεων επιπλέκονται με διαταραχές του μεταβολισμού της γλυκόζης. Από αυτές, το 80% οφείλονται σε ΣΔΚ. Στην Αμερική, το ποσοστό των κυήσεων που επιπλέκονται με ΣΔΚ είναι 4%, αναφερόμενο σε όλες τις εθνότητες. Γενικά, η συχνότητα του ΣΔΚ ποικίλλει και αντανακλά στη συχνότητα του διαβήτη τύπου 2 στο συγκεκριμένο πληθυσμό (Pelps RL et al, 1981).

1.3 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΟ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

1.3.1 Εισαγωγή

Δεν υπάρχει θεραπεία για το σακχαρώδη διαβήτη. Ο στόχος είναι να παραμείνουν οι τιμές της γλυκόζης και των λιπιδίων στα φυσιολογικά επίπεδα και οι παράγοντες αυτοί να ελέγχονται όσο το δυνατόν πιο αυστηρά για να προληφθούν οι επιπλοκές. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν πλεονεκτήματα από τον αυστηρό έλεγχο της γλυκόζης στο αίμα για τα άτομα τόσο με διαβήτη τύπου I όσο και με τύπου II. Για κάθε εκατοστιαία πτώση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης οι μικροαγγειακές επιπλοκές (οφθαλμοί, νεφρός και νευρικό σύστημα) του διαβήτη μειώνονται κατά 40%.

Οι ασθενείς που επιθυμούν αυστηρό έλεγχο ακολουθούν εντατικό θεραπευτικό σχήμα με μετρήσεις της γλυκόζης του αίματος τουλάχιστον 4 φορές την ημέρα και χορήγηση ινσουλίνης 3 ή περισσότερες φορές την ημέρα ή χρησιμοποιούν αντλία ινσουλίνης. Σε γενικές γραμμές καλός ή αυστηρός έλεγχος θεωρείται όταν τα επίπεδα της γλυκόζης κατά τη νηστεία παραμένουν σε φυσιολογικά επίπεδα, η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη δείχνει ότι τα επίπεδα γλυκόζης ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια ανάμεσα στις χρονικές περιόδους του ελέγχου, το βάρος του ασθενούς παρέμεινε φυσιολογικό, τα λιπίδια του αίματος παρέμειναν στα φυσιολογικά επίπεδα και ο ασθενής νιώθει ότι είναι σε καλή κατάσταση υγείας. Το

πρωτόκολλο για τον έλεγχο του ΣΔ είναι εξατομικευμένο και εξαρτάται από τον τύπο του διαβήτη που ο ασθενής παρουσιάζει, την ηλικία, την κατάσταση της υγείας του, την ικανότητα να ακολουθήσει την αγωγή που του συστήνεται, την αποδοχή της υπευθυνότητας για τον έλεγχο της νόσου και την ύπαρξη άλλων παραγόντων.

Τόσο οι ασθενείς με τύπου I όσο και εκείνοι με τύπου II διαβήτη, θα πρέπει να ακολουθούν αυστηρά τη δίαιτα που τους υποδεικνύεται και να πραγματοποιούν κάποιο βαθμό σωματικής άσκησης. Αυτά είναι τα κύρια μέτρα αντιμετώπισης ανεξάρτητα από τα ειδικά προβλήματα που αφορούν στη διαταραχή ανοχής της γλυκόζης. Η ινσουλινοθεραπεία μπορεί να χορηγηθεί σε ασθενείς με διαβήτη είτε τύπου I είτε τύπου II. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα άτομα με διαβήτη τύπου II μπορούν να ελέγξουν τη γλυκόζη του αίματος μειώνοντας τις προσλαμβανόμενες θερμίδες και αυξάνοντας τη φυσική δραστηριότητα.

Επιπρόσθετα, μπορούν να χορηγηθούν αντιδιαβητικά δισκία προκειμένου να επιτευχθεί ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος. Αν ο έλεγχος είναι δύσκολο να επιτευχθεί, στο θεραπευτικό σχήμα θα πρέπει να προστίθεται και ινσουλίνη (Dewit S, 2009). Για τους πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, η θεραπεία με ινσουλίνη είναι απαραίτητη. Όχι μόνο για την καλή ρύθμιση του σακχάρου αλλά και για την επιβίωση. Αντίθετα, στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 η χορήγηση ινσουλίνης γίνεται συχνά ως συμπληρωματική αγωγή, όταν τα αντιδιαβητικά φάρμακα σε μορφή δισκίων δεν επαρκούν για την καλή ρύθμιση του σακχάρου. Για την καλή ρύθμιση του σακχάρου υπάρχουν αρκετά φάρμακα. Κανένα από αυτά δεν στερείται ανεπιθύμητων ενεργειών, ενώ συχνά φαίνεται να είναι αποτελεσματική η συνδυασμένη λήψη δύο ή περισσότερων από αυτά.

Τα αντιδιαβητικά δισκία ταξινομούνται σε 5 μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τη δράση τους. Αυτές είναι:

- Οι Ρυθμιστές της Μεταγευματικής Υπεργλυκαιμίας – προάγουν την έκκριση ινσουλίνης όταν λαμβάνονται με τα κύρια γεύματα
- Οι Σουλφονουλουρίες - προάγουν την έκκριση ινσουλίνης
- Οι Διγουανίδες – μειώνουν την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ

- Οι Ευαισθητοποιητές της ινσουλίνης – βελτιώνουν την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη
- Οι Αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης – επιβραδύνουν την απορρόφηση των υδατανθράκων από το έντερο

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, τα αντιδιαβητικά δισκία δρουν είτε προάγοντας την έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος είτε αυξάνοντας την ευαισθησία του σώματος στη δράση της ινσουλίνης. Μία νέα θεραπευτική κατηγορία αποτελούν οι Ρυθμιστές της Μεταγευματικής Υπεργλυκαιμίας, με πρώτο εκπρόσωπό τους τη Ρεπαγλινίδη.

1.3.2 Ινσουλινοθεραπεία

Η ινσουλινοθεραπεία ενδείκνυται στις παρακάτω περιπτώσεις:

- α.** Διαβήτη τύπου I
- β.** Διαβητικό κώμα
- γ.** Υπεροσμωτικό κώμα
- δ.** Διαβήτη κατά την κύηση
- ε.** Διαβήτη κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων μέσης ή μεγάλης βαρύτητας
- στ.** Σημαντική εκτροπή του διαβήτη σε ενήλικες διαβητικούς, που προηγούμενα ρυθμίζονταν μόνο με δίαιτα ή και δισκία, λόγω stress.
- ζ.** Σε συνύπαρξη διαβήτη με νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια

Υπάρχει ποικιλία ινσουλινικών σκευασμάτων, που διαφέρουν ως προς το χρόνο έναρξης της δράσης, το χρόνο μέγιστης δράσης και τη διάρκεια της δράσης. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στη χορήγηση της, διότι υπάρχει πολύ μικρό περιθώριο ανάμεσα στα θεραπευτικά και τα τοξικά (υπογλυκαιμικά) αποτελέσματα της ινσουλίνης. Η άσκηση, η νόσος και το συγκινησιακό stress μπορεί να μεταβάλουν τις ανάγκες για ινσουλίνη (Σαχίνη και συν., 2004). Η ινσουλίνη λαμβάνεται από ζωικές πηγές (πάγκρεας βόειο ή χοίρειο), από συνδυασμό ζωικών πηγών και ημισυνθετικής ανθρώπινης ινσουλίνης και ως συνθετική ανθρώπινη ινσουλίνη (μέσω της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA). Υπάρχουν διαφορές στην ισχύ και στην ταχύτητα έναρξης δράσης της ανθρώπινης και της ζωικής προέλευσης

ινσουλίνης. Επομένως, τόσο η δόση όσο και το ωράριο χορήγησης πρέπει να τροποποιηθούν όταν ο ασθενής περνά από έναν τύπο ινσουλίνης σε έναν άλλο. Η ανθρώπινη ινσουλίνη έχει ταχύτερη έναρξη δράσης, μικρότερη μέγιστη δράση και ελαττωμένη συνολική διάρκεια δράσης σε σχέση με την ινσουλίνη ζωικής προέλευσης. Η ανθρώπινη ινσουλίνη προτιμάται στις εγκύους ή σε γυναίκες που σκοπεύουν να τεκνοποιήσουν, σε ασθενείς με αλλεργίες ή αντίσταση στις ζωικής προέλευσης ινσουλίνες, σε ασθενείς που πρόκειται να ξεκινήσουν ινσουλινοθεραπεία και σε ασθενείς που χρησιμοποιούν την ινσουλίνη περιοδικά (American Diabetes Association, 2003).

Η ινσουλίνη διατίθεται σε συγκεντρώσεις μονάδων units/ml. Ο πιο κοινός τύπος συγκέντρωσης είναι 100 units/ml. Για τη χορήγηση της απαιτούνται ειδικές σύριγγες και βελόνες (Σαχίνη και συν., 2004).

1.3.3 Ρυθμιστής Μεταγευματικής Υπεργλυκαιμίας (Μεγλιτιδίνες)

Ο ρυθμιστής μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας της Novo Nordisk είναι ένας νέος υπογλυκαιμικός παράγοντας με ιδιαίτερα βραχύ χρόνο δράσης. Αν και δρα στα β-παγκρεατικά κύτταρα διαφέρει από τις Σουλφονουλουρίες ως προς τη χημική του δομή, ως προς τις φαρμακοκινητικές του ιδιότητες αλλά και ως προς τη θέση δέσμευσής του επί του υποδοχέα του β-κυττάρου. Ανήκει λοιπόν σε μία νέα θεραπευτική κατηγορία εκκριταγωγών της ινσουλίνης φαρμάκων. Μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα εντόνως διεγείροντας την απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας, δράση που εξαρτάται από τα ενεργά β- κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων.

1.3.4 Θεραπεία με Σουλφονουλουρίες

Οι σουλφονουλουρίες ανακαλύφθηκαν τυχαία. Το 1942 ο Jandon παρατήρησε ότι κάποια σουλφοναμίδια (αντιβιοτικά) είχαν υπογλυκαιμική δράση σε πειραματόζωα. Απορροφούνται ταχέως από το γαστρεντερικό σωλήνα αναλόγως με το είδος της σουλφονουλουρίας. Μεταβολίζονται στο ήπαρ και απεκκρίνονται από τους νεφρούς ή στα κόπρανα.

Οι σουλφονουλουρίες διακρίνονται σε σουλφονουλουρίες «πρώτης γενιάς» (τολβουταμίδη, τολαζαμίδη, ακετοεξαμίδη που δεν κυκλοφορούν πλέον στη χώρα μας και χλωροπροπαμίδη), σε σουλφονουλουρίες «δεύτερης γενιάς» (γλιβενκλαμίδη, γλικλαζίδη, γλιπιζίδη) και «τρίτης γενιάς» (γλιμεπιρίδη). Οι δεύτερες δεν διαφέρουν πολύ από τις σουλφονουλουρίες της "πρώτης γενιάς", είναι όμως αποτελεσματικές σε μικρότερες δόσεις.

Όσον αφορά στον τρόπο ενέργειας των σουλφονουλουριών, υποστηρίζονται τρεις τουλάχιστον μηχανισμοί:

- α)** προαγωγή της έκλυσης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος (ινσουλινοτρόπος ενέργεια),
- β)** αύξηση του αριθμού των υποδοχέων της ινσουλίνης και
- γ)** μείωση των επιπέδων της γλυκαγόνης του αίματος

Η ισχύς των παραγώγων της σουλφονουλουρίας εξαρτάται από τον ρυθμό με τον οποίο μεταβολίζονται, από την δραστικότητα των μεταβολικών προϊόντων που προκύπτουν και από τον ρυθμό απέκκρισης. Ο ρυθμός μεταβολισμού είναι ταχύς για την τολβουταμίδη και την τολαζαμίδη, βραδύς για την χλωροπροπαμίδη και ενδιάμεσος για τις υπόλοιπες σουλφονουλουρίες. Η χλωροπροπαμίδη σε ποσοστό 80% δεν μεταβολίζεται και απεκκρίνεται αναλλοίωτη από τους νεφρούς, γι αυτό και δεν συνιστάται η χορήγησή της σε περιπτώσεις διαβητικών με νεφρική ανεπάρκεια, καθώς και σε άτομα μεγάλης ηλικίας (αυξημένος κίνδυνος υπογλυκαιμίας).

Τα μεταβολικά παράγωγα των σουλφονουλουριών είτε είναι αδρανή, είτε έχουν ασθενή υπογλυκαιμική ενέργεια, εκτός της ακετοεξαμίδης της οποίας το μεταβολικό προϊόν υδροξυεξαμίδη έχει 2½ φορές μεγαλύτερη υπογλυκαιμική δράση σε σύγκριση με την μητρική ουσία. Γι' αυτό το λόγο, η ακετοεξαμίδη δε συνιστάται σε διαβητικούς με νεφρική ανεπάρκεια.

Η χλωροπροπαμίδη διεγείρει την έκκριση της αντιδιουρητικής ορμόνης και ενισχύει την επίδραση της τελευταίας στα ουροφόρα σωληνάκια με αποτέλεσμα την πρόκληση υπονατριάμιας από αραίωση. Η αντιδιουρητική ενέργεια της χλωροπροπαμίδης είναι

αποκλειστική ιδιότητα του υπογλυκαιμικού αυτού παράγοντα, σε αντίθεση με τις άλλες σουλφονουλουρίες που διευκολύνουν την απέκκριση ύδατος. Λόγω της αντιδιουρητικής της ενέργειας, η χλωροπροπαμίδη χρησιμοποιείται σε ήπιες μορφές άποιου διαβήτη. Η γλιμεπιρίδη χαρακτηρίζεται ως 3ης γενιάς σουλφονουλουρία. Η συνιστώμενη ημερήσια δόση είναι 1–8 mg. Το φάρμακο αυτό φαίνεται ότι επιτυγχάνει εξίσου καλό υπογλυκαιμικό αποτέλεσμα με τις σουλφονουλουρίες 2ης γενιάς, με λιγότερη όμως ινσουλινοέκκριση. Αυτό θεωρείται προσόν, με την έννοια ότι η μεγάλη ινσουλινοέκκριση προάγει ενδεχομένως την αθηροσκλήρωση. Παράλληλα, έχει λιγότερη αλληλεπίδραση με τους κυτταρικούς υποδοχείς K⁺ τους ευαίσθητους στο ATP του καρδιαγγειακού συστήματος, ενώ προκαλεί και μικρότερη έκκριση γλυκαγόνης.

Κυριότερη ανεπιθύμητη ενέργεια (χαρακτηριστική της ομάδας) είναι η υπογλυκαιμία, που όμως συνήθως είναι ελαφρότερη και λιγότερο συχνή απ' ό,τι με τη γλιβενκλαμίδη. Το φάρμακο δεν ενδείκνυται σε διαβητικά άτομα με ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια.

Το ενδεχόμενο αυξημένης πιθανότητας ισχαιμικής καρδιοπάθειας μετά από χρήση σουλφονουλουριών δεν έχει επιβεβαιωθεί.

1.3.5 Θεραπεία με Διγουανίδια

Τα διγουανίδια, **φαινορμίνη** και **μετφορμίνη** έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης από εκείνον των σουλφονουλουριών. Τα φάρμακα της ομάδας αυτής αν και στερούνται της ινσουλινοτρόπου δράσης των σουλφονουλουριών έχουν, εντούτοις, ανάγκη της παρουσίας λειτουργικών β-κυττάρων των νησίδων του παγκρέατος για να ασκήσουν τη δράση τους. Από πλευράς υπογλυκαιμικής ικανότητας, τα διγουανίδια πρέπει να θεωρούνται μάλλον "ευγλυκαιμικοί" παράγοντες, παρά υπογλυκαιμικά φάρμακα.

Ως τρόποι ενέργειας των διγουανιδίων θεωρούνται:

- α) Η προαγωγή της αναερόβιας γλυκόλυσης στους περιφερικούς ιστούς (αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης από τους ιστούς, κυρίως τους μυς και το ήπαρ)
- β) Η αναστολή της ηπατικής νεογλυκογένεσης.

- γ) Η ελάττωση της εντερικής απορρόφησης της γλυκόζης.
- δ) Η προαγωγή της δέσμευσης της ινσουλίνης από τους υποδοχείς της στους περιφερικούς ιστούς-στόχους.

Η μετορμίνη που είναι και η πιο διαδεδομένη είναι ένα διγουανίδιο με αντί- υπεργλυκαιμικές ιδιότητες, το οποίο μειώνει και τη βασική και τη μεταγευματική γλυκόζη του πλάσματος. Διεγείρει την ενδοκυτταρική σύνθεση του γλυκογόνου ενεργώντας επί της συνθετάσης του γλυκογόνου. Η μετορμίνη αυξάνει την ικανότητα μεταφοράς όλων των τύπων μεμβρανικών μεταφορέων γλυκόζης (GLUT). Στους ανθρώπους, ανεξάρτητα από τη δράση της επί της γλυκαιμίας, η μετορμίνη έχει ευνοϊκές ενέργειες επί του λιπιδικού μεταβολισμού. Αυτό έχει αποδειχθεί σε θεραπευτικές δόσεις σε ελεγχόμενες μεσοπρόθεσμες ή μακροπρόθεσμες κλινικές μελέτες: η μετορμίνη μειώνει τη συνολική χοληστερίνη, την LDL και τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων.

Η χρήση της φαινορμίνης, αντίθετα, έχει απαγορευθεί σε πολλές χώρες εξαιτίας του κινδύνου της γαλακτικής οξέωσης, ιδιαίτερα σε ασθενείς με νεφρική, ηπατική ή καρδιακή ανεπάρκεια και γενικά σε καταστάσεις που συνοδεύονται από ιστική υποξία.

Η εμφάνιση γαλακτικής οξέωσης ενοείται σε άτομα άνω των 65 ετών, σε αλκοολικούς και σε δόση άνω των 100 mg/24ωρο. Γαλακτική οξέωση έχουμε όταν τα γαλακτικά του ορού ξεπερνούν τα 4-5 mEq/L. Εντούτοις, γαλακτική οξέωση μπορεί να εμφανισθεί και χωρίς την παρουσία προδιαθεσικών παραγόντων. Ο δείκτης θνησιμότητας στις περιπτώσεις αυτές πλησιάζει το 50%. Η μετορμίνη ευθύνεται για γαλακτική οξέωση, διότι προάγει την παραγωγή του γαλακτικού στο αίμα. Όμως η γαλακτική οξέωση από μετορμίνη είναι σπάνια και όποτε διαγνώστηκε αφορούσε σε άτομα στα οποία υπήρχε αντένδειξη για τη χορήγηση της (συνήθως νεφρική ανεπάρκεια). Εντούτοις θα πρέπει να τονιστεί και η μέχρι σήμερα σχετικά περιορισμένη χρήση της σε σχέση με εκείνη της φαινορμίνης.

1.3.6 Θεραπεία με Θειαζολιδινεδιόνες (Ροσιγλιταζόνη, Πιογλιταζόνη).

Οι θειαζολιδινεδιόνες (ή γλιταζόνες) αποτελούν μια νέα κατηγορία αντιδιαβητικών δισκίων, που δρουν αυξάνοντας την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη. Η χορήγησή τους δεν προκαλεί υπογλυκαιμίες, ενώ φαίνεται ότι ασκούν ευεργετικές επιδράσεις και σε άλλες συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου, όπως τη δυσλιπιδαιμία. Η αποτελεσματικότητά τους αυξάνει όταν χορηγηθούν μαζί με το φαγητό, ενώ η ανταπόκριση στη θεραπεία μπορεί να καθυστερήσει έως και 4 εβδομάδες. (Ι. Ιωαννίδης, Αντιδιαβητικά φάρμακα: Διπλός στόχος, ygeia.tanea.gr). Σημειώνεται, επίσης, ότι η χορήγησή τους μπορεί να προκαλεί αύξηση του βάρους, που εν μέρει οφείλεται σε κατακράτηση ύδατος.

Τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας είναι η τρογλιταζόνη, η ροσιγλιταζόνη και η πιογλιταζόνη. Σε αντίθεση με την τρογλιταζόνη και την πιογλιταζόνη, η ροσιγλιταζόνη δεν επάγει το μεταβολισμό μέσω του κυτοχρώματος P4503A4. Αυτό την απαλλάσσει από σημαντικές αλληλεπιδράσεις με άλλα συνήθη φάρμακα, όπως είναι η μετφορμίνη, τα αντισυλληπτικά, η διγοξίνη και η ρανιτιδίνη. Σε ένα μικρό ποσοστό των ατόμων που θεραπεύονται με τρογλιταζόνη μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση των ηπατικών ενζύμων, που θα οδηγήσει τελικά σε διακοπή του φαρμάκου, ενώ έχει παρατηρηθεί και ελάχιστος αριθμός θανάτων που αποδίδεται σε ηπατοτοξική δράση. Αυτό δεν φαίνεται να ισχύει για τα νεότερα παράγωγα ροσιγλιταζόνη και πιογλιταζόνη. Για το λόγο αυτόν, όταν αρχίζει θεραπεία με φάρμακο αυτής της κατηγορίας, χρειάζεται να ελέγχονται περιοδικά τα ηπατικά ένζυμα (οποσδήποτε για την τρογλιταζόνη, δυνητικά για τα άλλα φάρμακα της κατηγορίας).

Το Actos είναι φαρμακευτικό προϊόν που περιέχει τη δραστική ουσία πιογλιταζόνη. (www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Actos/201400e11.pdf) Το Avandia είναι φάρμακο που περιέχει τη δραστική ουσία ροσιγλιταζόνη.

2ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ

2.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στην φύση και έχουν ως γενικό χημικό τύπο την μορφή $C_n(H_2O)_n$. Η βιολογική τους σημασία ως μόρια είναι μεγάλη, διότι μπορούν να αποτελέσουν δομικά στοιχεία των κυττάρων, πηγή ενέργειας, όπως επίσης και μέρος άλλων μακρομορίων, όπως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα.

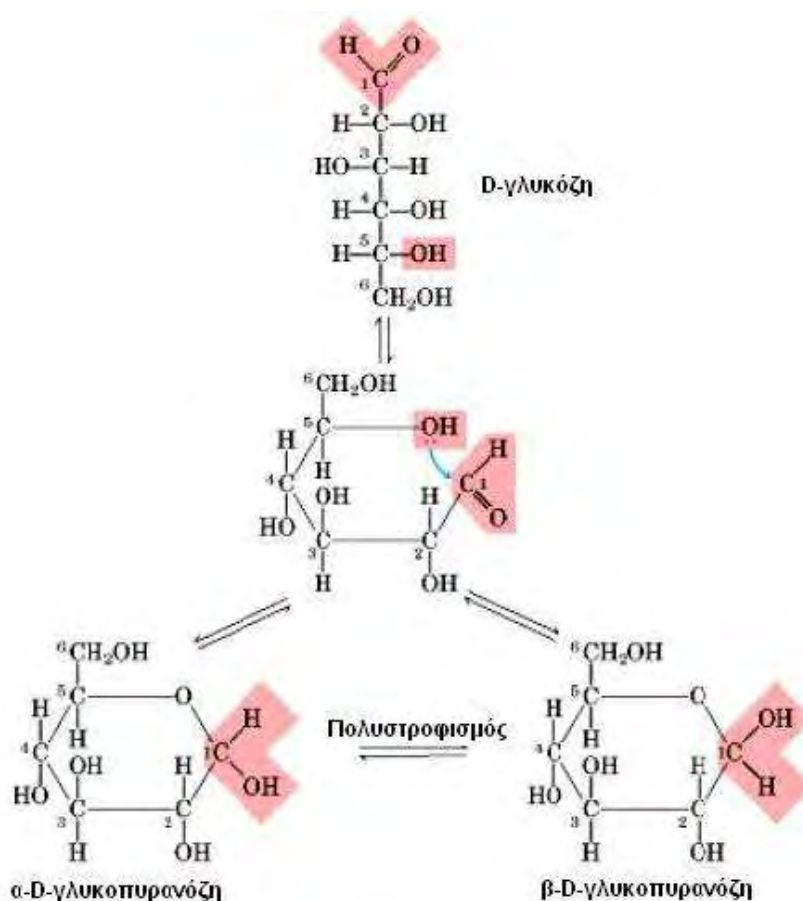
Ο όρος υδατάνθρακες αναφέρεται σε μια ευρεία κατηγορία πολυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών, που ονομάζονται κοινώς σάκχαρα. Τα μικρότερα από άποψη μοριακού βάρους είναι οι μονοσακχαρίτες, ακολουθούν οι δισακχαρίτες, οι ολιγοσακχαρίτες και τέλος οι πολυσακχαρίτες με πολύ υψηλά μοριακά βάρη. Πιο αναλυτικά, οι παραπάνω κατηγορίες υδατανθράκων είναι οι εξής:

- Μονοσακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι η γλυκόζη, η μαννόζη και η φρουκτόζη. Αποτελούν μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών που προκύπτουν από πολυμερισμό τους.
- Δισακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι η λακτόζη, η σουκρόζη και η μαλτόζη που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες.
- Ολιγοσακχαρίτες όπως οι φρουκτολιγοσακχαρίτες. Αυτές οι ενώσεις αποτελούνται από 20-30 μονομερή μονοσακχαριτών.
- Πολυσακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη. Δημιουργούνται με πολυμερισμό μονοσακχαριτών και το κάθε μόριο πολυσακχαρίτη δύναται να αποτελείται από εκατοντάδες χιλιάδες μονομερή.

2.1.1 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές :Σχηματισμός ημιακετάλης

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δύο μορφές. Την μορφή ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλική τους μορφή (κυρίως). Από άποψη χημικής δομής τα σάκχαρα χωρίζονται αναλόγως με το μέγεθος της αλυσίδας του άνθρακα, παραδείγματος χάριν σε πεντόζες, αν έχουν πέντε μόρια άνθρακα, ή εξόζες αν έχουν έξι.

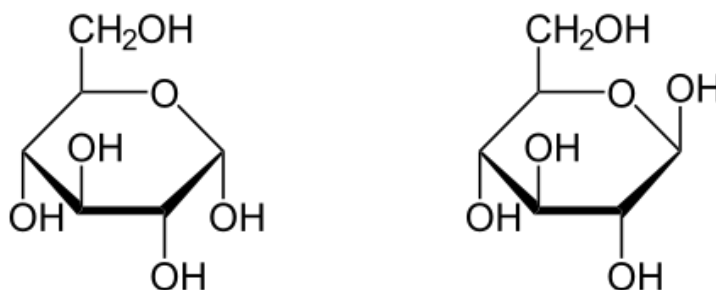
Τα σάκχαρα απαντώνται σε κυκλική μορφή καθώς η καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδρά με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης. Αυτή η αντίδραση είναι μια ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη που οδηγεί στην δημιουργία πυρανοζών ή φουρανοζών (Εικόνα 2.1) Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας.



ΕΙΚΟΝΑ 2.1 : Κυκλοποίηση μονοσακχαρίτη μέσω αντίδρασης ημιακετάλης.

Δυο παραδείγματα αυτής της αντίδρασης είναι η δημιουργία πυρανόζης από την γλυκόζη και η δημιουργία φουρανόζης από την φρουκτόζη. Στην περίπτωση της γλυκόζης, η αλδευδική ομάδα του άνθρακα C-1 αντιδρά με το υδροξύλιο που βρίσκεται στην θέση C-5, σχηματίζοντας μια ενδομοριακή ημιακετάλη και στην συνέχεια παράγοντας τον εξαμελή δακτύλιο της πυρανόζης. Η περίπτωση της φουρανόζης είναι παρόμοια. Η κετονική ομάδα στον άνθρακα C-2 αντιδρά με το υδροξύλιο του άνθρακα C-5 που οδηγεί στον σχηματισμό μιας ενδομοριακής ημιακετάλης, έχοντας ως αποτέλεσμα την δημιουργία δακτυλίου φουρανόζης. (Mc Murry, 2000)

Η κυκλοποίηση των σακχάρων μέσω ημιακετάλης είναι μεγάλης σημασίας διότι με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στο μόριο και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμερείας. Στην περίπτωση της γλυκόζης ο άνθρακας C-1 είναι ανωμερής με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματιστούν δυο στερεοχημικές δομές : της α-D-γλυκοπυρανόζης και της β-D-γλυκοπυρανόζης (εικόνα 2.2). Στην περίπτωση της φρουκτόζης, ο ανωμερής άνθρακας είναι ο C-2. Το α ή το β καταδεικνύει σε ποια θέση στον χώρο βρίσκεται η ύδροξυ ομάδα του ανωμερούς άνθρακα σε σχέση με τον υποκαταστάτη του C-5 άνθρακα. Αν ο υποκαταστάτης (υδροξύλιο σε αυτή την περίπτωση) του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση trans, κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου προς τον υποκαταστάτη στον άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής α. Αν συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση cis, πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου, ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής β.

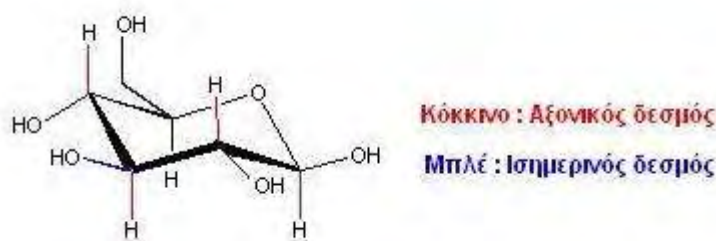


ΕΙΚΟΝΑ 2.2: Αριστερά α-D-γλυκοπυρανόζη, Δεξιά β-D-γλυκοπυρανόζη

Η στερεοδιάταξη του δακτυλίου παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον λόγω της συμπεριφοράς των υποκαταστατών του, όσον αφορά την διάταξή τους σε σχέση με το επίπεδο του δακτυλίου. Συγκεκριμένα διακρίνονται δυο είδη υποκαταστατών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί. Ως αξονικοί υποκαταστάτες ορίζονται οι υποκαταστάτες που βρίσκονται παράλληλα στον άξονα του δακτυλίου, δηλαδή κάθετα στο επίπεδό του. Αντιθέτως, οι ισημερινοί υποκαταστάτες βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τον δακτύλιο (Εικόνα 2.3).

Τα παραπάνω έχουν επίπτωση στην χημική συμπεριφορά του μορίου. Δύναται να εμφανιστούν φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης μεταξύ αξονικών υποκαταστατών, εκτός του υδρογόνου, αν αυτοί βρεθούν στην ίδια πλευρά του δακτυλίου. Το αν θα εμφανιστεί στερεοχημική παρεμπόδιση έχει σχέση με την φύση του υποκαταστάτη όπως την ακτίνα Van der Waals του και την πυκνότητα του νέφους ηλεκτρονίων. Οι ισημερινοί υποκαταστάτες δεν παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο, οπότε η υποκατάσταση στο ισημερινό επίπεδο είναι συνήθως σταθερότερη.

Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται στις κυκλικές δομές των σακχάρων είναι η αλληλεπίδραση αξονικών και ισημερινών υποκαταστατών, που προκαλεί τάση στο μόριο που είναι ικανή να το διαμορφώσει περαιτέρω στερεοχημικά. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται 1,3-διαξονική στερεοχημική τάση και εξαρτάται από το μέγεθος όπως επίσης και την φύση του εκάστοτε υποκαταστάτη. Οι φουρανόζες και οι πυρανόζες δεν είναι επίπεδες στον χώρο αλλά μπορούν να υιοθετήσουν διάφορες στερεοδιαμορφώσεις. Ο δακτύλιος της πυρανόζης μπορεί να λάβει τις μορφές chair, boat, half-chair, skew και envelope, ενώ ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να λάβει λιγότερες μορφές στερεοχημικών διαμορφώσεων, δηλαδή τις μορφές envelope και twist.

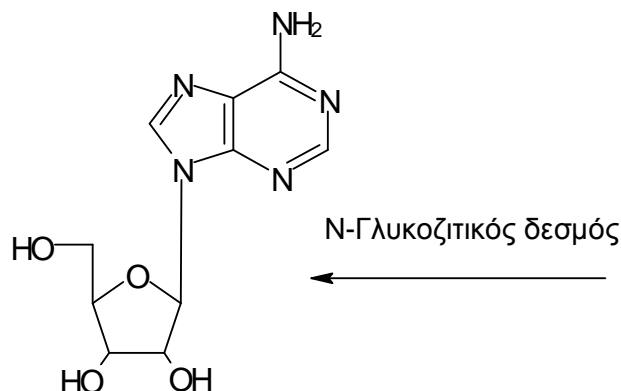


ΕΙΚΟΝΑ 2.3 : Αξονικοί (κόκκινοι) υποκαταστάτες και ισημερινοί (μπλέ) υποκαταστάτες

2.2 Νουκλεοζίδες

Οι νουκλεοζίδες είναι γλυκοσυλαμίνες, οι οποίες προκύπτουν από την ένωση μιας εκ των βάσεων (θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, αδενίνη, ουρακίλη) και ενός σακχάρου που μπορεί να είναι είτε ριβόζη είτε δεοξυριβόζη. Απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στη φύση διότι αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Μερικά παραδείγματα τέτοιων ριβονουκλεοζιδών είναι η γουανοσίνη, η κυτιδίνη, η θυμιδίνη και η αδενοσίνη.

Από άποψη χημικής δομής οι νουκλεοζίδες αποτελούνται από μια βάση, που είναι είτε μια πουρίνη είτε μια πυριμιδίνη, ενωμένη με τον C-1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg J. M. et al, 2001). Στη φύση όπου απαντώνται N-γλυκοζιτικοί δεσμοί πάντα η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου, οπότε χαρακτηρίζονται ως νουκλεοζίδες β στερεοδιάταξης (Εικόνα 2.4).



ΕΙΚΟΝΑ 2.4 : Η β-στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης

Οι νουκλεοζίδες και τα τροποποιημένα ανάλογά τους έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης μελέτης διότι επιδεικνύουν πολύ ενδιαφέρουσες αντικαρκινικές, αντιιικές, αντιοξειδωτικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες (Tsirkone G. et al, 2010; Balatsos N. A. et al, 2009; Tiwari N. et al, 2009). Το ενδιαφέρον για την όσο το δυνατό καλύτερη κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης των νουκλεοζιδών έχει ενταθεί με σκοπό την δημιουργία ισχυρότερων αναλόγων και επέκτασης της του φάσματος των πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών τους.

2.2.1 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Η αναγνώριση των αντικαρκινικών και κυτταροστατικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτών και των αναλόγων τους, αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Balatsos, N. A. et al, 2009; Tzioumaki N. et al, 2009; Agelis G. et al, 2008; Tsoukala E. et al, 2007). Ήδη, οι αντιμεταβολίτες που ορισμένοι από αυτούς ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεοζιτών, χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην ιατρική ως πρώτης γραμμής φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Τέτοιοι αντιμεταβολίτες, όπως οι 1-(2'-deoxy - 2'-methylene-β-D-erythropentofurano) cytosine (DMDC) και 1-β-D-arabinofuranoxycytosine (araC) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών όπως διαφόρους τύπους λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Matsuda A. et al, 2004; Cory A. H. et al, 1994; Yamagami K. et al, 1991; Lin T. S. et al, 1991; Baker C. H. et al, 1991). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui V. et al, 2010; Bhat U. G. et al, 2010).

2.2.2 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβαλλόμενα στην σύνθεση του DNA και του RNA μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Agelis G. et al, 2008; Komiotis D. et al, 2008; Agelis G. et al, 2007; Zhou W. et al, 2004; Perigaund C. et al, 1992; Komiotis D. et al, 1991). Ήδη πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στην ιατρική έναντι ιών όπως το ιού που προκαλεί το AIDS (HIV), του ιού της ηπατίτιδας B (HBV), των ερπητοϊών (HSV 1-2), του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και του ιού του έρπητα ζωστήρα (VZV). Στην περίπτωση του HIV ανάμεσα στα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά είναι τα ddC, AZT, ddl, d4T, abacavir και 3TC που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού. Για τον

ιό HBV έχει ήδη εγκριθεί στην Αμερική και χρησιμοποιείται το 3TC σε συνδυασμό με ιντερφερόνη-α. Για τον CMV, τον HSV 1 και 2 και τον VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως βιδαραβίνη, ακυκλοβίρη, ιδοξουριδίνη τριφλουριδίνη, ασεδουρίδη, γανσικλοβίρη, βαλακυκλοβίρη και άλλα (Gumina G. et al, 2001).

2.2.3 Νουκλεοζίτες ως αντιδιαβητικά

Οι προσπάθειες για την αντιμετώπιση του διαβήτη έχουν επικεντρωθεί σε αγωγές που περιλαμβάνουν διαίτα, άσκηση, υπογλυκαιμικά φάρμακα και αν αυτά αποτύχουν, σε χορήγηση ινσουλίνης. Οι προσεγγίσεις αυτές δεν είναι πάντοτε ικανοποιητικές, επομένως, υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο με σκοπό την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου. Η ανακάλυψη αντιδιαβητικών φαρμάκων αποτελεί ένα από τους κύριους στόχους των ερευνητικών τμημάτων πολλών μεγάλων φαρμακοβιομηχανιών (AstraZeneca, Aventis Pharma, Pfizer, Novo Nordisk A/S, κ.ά.). Οι υπάρχουσες θεραπείες είναι ατελείς ή προκαλούν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η διεθνής ερευνητική προσπάθεια εστιάζεται σε αντιγονοειδικές ή γενικότερα εξειδικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις με ενδεχομένως ριζικά αποτελέσματα. Στην προσπάθεια αυτή η απόλυτη γνώση της σχέσης δομής-δράσης είναι απαραίτητη.

Μια σχετικά νέα πιθανή εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων είναι η χρήση τους για την ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ένζυμο που μπορεί να αποτελέσει στόχο φαρμακευτικής παρέμβασης διότι εμπλέκεται στην διάσπαση του γλυκογόνου προς παραγωγή γλυκόζης (Somsák L. et al, 2003).

Αντικείμενο της συγκεκριμένης διατριβής είναι η ταυτοποίηση τροποποιημένων γλυκοπυρανόζυλο νουκλεοζιτών, οι οποίοι συμβάλλουν στην αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, με προοπτική να χρησιμοποιηθούν ως υπογλυκαιμικά φάρμακα. Ο μακρομοριακός στόχος που μελετήθηκε, με σκοπό την ανάπτυξη υπογλυκαιμικών φαρμάκων, είναι η ηπατική φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP). Η GP αποτελεί σήμερα, έναν ελκυστικό

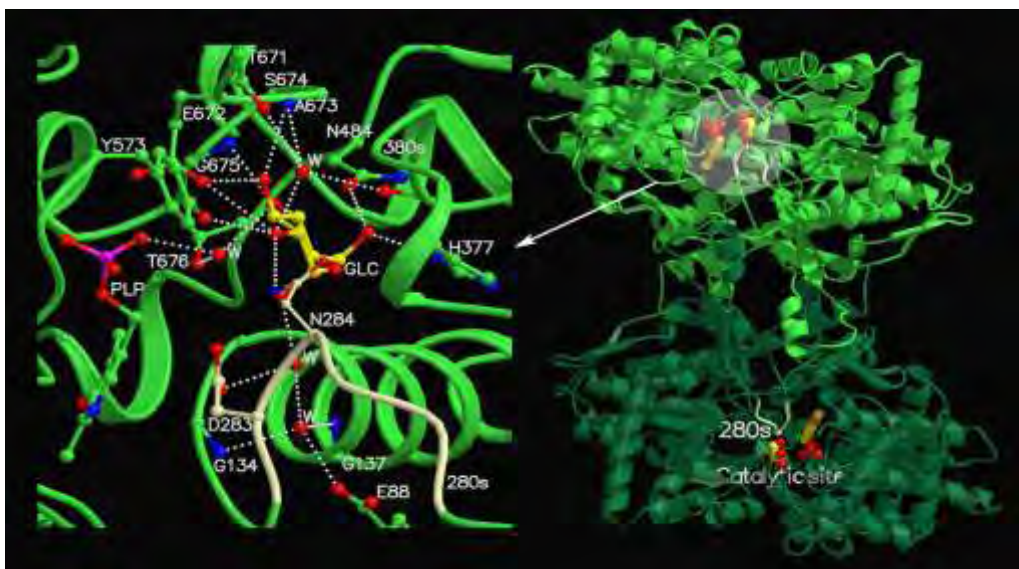
στόχο για την ανακάλυψη νέων αποτελεσματικότερων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, αφού είναι ένα ένζυμο με κεντρικό ρυθμιστικό ρόλο στη μεταβολική πορεία της γλυκογονόλυσης.

Η GP είναι μία αλλοστερική πρωτεΐνη και υφίσταται σε δύο μορφές, GPb (ανεργός, T-διαμόρφωση) και GPa (ενεργός, R-διαμόρφωση). Στον ήρεμο μυ υπάρχει ως GPb, η οποία ενεργοποιείται είτε με AMP είτε με φωσφορυλίωση προς GPa με τη δράση της κινάσης της φωσφορυλάσης (PhK). Η Glc-1-P χρησιμοποιείται μέσω της γλυκόλυσης για την παραγωγή ενέργειας και στο ήπαρ μετατρέπεται προς γλυκόζη (Oikonomakos and Somsak, 2008). Η GP παίζει βασικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, η οποία είναι η κύρια μορφή αποθήκευσης υδατανδράκων στα κύτταρα των θηλαστικών. Επιπλέον, το ένζυμο καταλύει το πρώτο στάδιο της ενδοκυτταρικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P). Η γλυκόζη, που αποτελεί το φυσιολογικό ρυθμιστικό παράγοντα του μεταβολισμού του γλυκογόνου, προκαλεί απενεργοποίηση της GP και δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η αποικοδόμηση και παράλληλα να αυξάνεται η σύνθεση του γλυκογόνου (που οφείλεται στη δράση της γλυκογονικής συνθάσης, GS) (Oikonomakos, 2002). Η αναστολή της δράσης της GP από τη γλυκόζη έχει φυσιολογική σημασία στο ήπαρ. Ως εκ τούτου, ενώσεις με ισχυρότερη ανασταλτική δράση (σε σύγκριση με τη δράση της γλυκόζης) έχουν την ικανότητα να μετατοπίζουν την ισορροπία αποικοδόμησης σύνθεσης γλυκογόνου προς την κατεύθυνση της σύνθεσης, παρουσιάζοντας ενδεχομένως κλινικό ενδιαφέρον για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II.

Για το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων χρησιμοποιούνται ως «στόχοι» τα επί μέρους κέντρα σύνδεσης του ενζύμου, τα οποία παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.5. Η γνώση της τρισδιάστατης δομής της α -D γλυκόζης ως συμπλόκου με την RMGPb βοήθησε στη λεπτομερή καταγραφή των αλληλεπιδράσεων αυτής με τα αμινοξέα στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου και ειδικότερα με την πλευρική αλυσίδα των Asn284 και Asp283 (Εικόνα 2.5). Τα αμινοξέα αυτά προέρχονται από τον εύκαμπτο βρόχο 280, ο οποίος παρεμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο.

Η γλυκόζη αποτέλεσε πρόδρομο ένωση για το σχεδιασμό νέων αναστολέων, αναλόγων αυτής οι οποίοι μελετήθηκαν με βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους. Αξίζει να

σημειωθούν οι πρώτες πρόδρομες ενώσεις της N-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλαμίνης (1-GlcNac) με σταθερά αναστολής $K_i=32 \mu\text{M}$ ~60 φορές καλύτερη

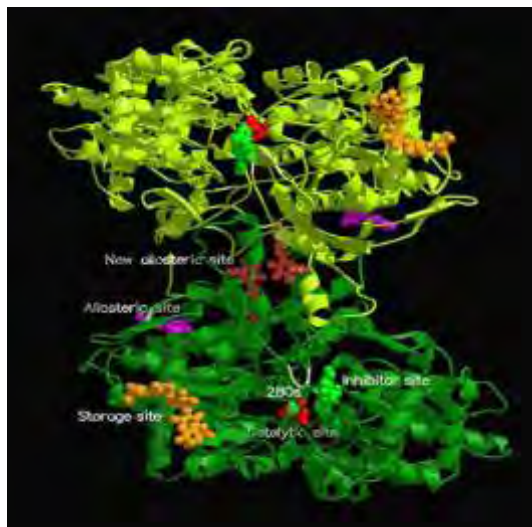


ΕΙΚΟΝΑ 2.5. Σχηματική απεικόνιση του τρόπου σύνδεσης της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές. Υποδεικνύεται η θέση του βρόχου 280s με υποκίτρινο χρώμα.

από αυτή της γλυκόζης. Πλήθος ενώσεων, αναλόγων γλυκόζης, έχει μελετηθεί και νέοι ισχυροί αναστολείς του ενζύμου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί (στο εύρος των nM) με στόχο τόσο το καταλυτικό όσο και άλλα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου (Oikonomakos and Somsak, 2008).

Τα τελευταία 6 έτη, μελέτες κατευθυνόμενου (από την 3D) σχεδιασμού, κινητικές και κρυσταλλογραφικές αναλύσεις έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη πληθώρας (>100 ενώσεων) παραγώγων του α- και β-ανυδρο-γλυκο-επτονικού οξέος, της 1-δεσοξυ-1-θειο-β-D-γλυκόζης, της β-D-γλυκοκυρανοζυλαμίνης και της σπιροϋδαντοΐνης. με αυξημένη χημική συγγένεια (συγκριτικά με την α-D-γλυκόζη) προς τη GPb (Kontou et al. 2000, Tiraidis et al. 2007, Zographos et al. 2007, Zographos et al. 1997). Σε νεώτερη μελέτη, η ένωση (-)(S)-3-isopropyl 4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate (W1807), η σύνθεση της οποίας έγινε στα εργαστήρια της Bayer AG βρέθηκε ως ο πλέον ισχυρός (μέχρι σήμερα) αναστολέας της GPb (με σταθερά αναστολής, $K_i=1.6 \text{ nM}$, δηλαδή 106 φορές μικρότερη της αντίστοιχης K_i για την α-D-γλυκόζη). Η κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου GPb-W1807, σε ευκρίνεια 2.3 \AA (Zographos et al, 1997) και του συμπλόκου GPa-

α -D-γλυκόζη-W1807, σε ευκρίνεια 2.1 Å (Oikonomakos et al, 1999) αποκάλυψε ότι η W1807 συνδέεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου (κέντρο σύνδεσης του AMP). Πρόσφατες μελέτες, στην κατεύθυνση ταυτοποίησης ενώσεων με ενδεχόμενο κλινικό ενδιαφέρον στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο διαβήτη τύπου II, οδήγησαν στην ανακάλυψη μιας νέας τάξης αναστολέων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης (Hoover et al. 1998; Martin et al. 1998). Η ένωση 5-chloro-1H-indole-2-carboxylic acid [1-(4-fluorobenzyl)-2-(4-hydroxypiperidin-1-yl)-2-oxoethyl]amide (CP320626) είναι ισχυρός αναστολέας της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης α ($IC_{50}=1 \mu M$), δρα συνεργιστικά με τη γλυκόζη ($IC_{50}=0.13 \mu M$) και προκαλεί ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης σε διαβητικά ob/ob ποντίκια (χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος) (Oikonomakos and Somsak, 2008). Προφανώς, η κατανόηση του μηχανισμού δράσης αυτής και χημικά συγγενών ενώσεων καθώς επίσης και ο σχεδιασμός δομικών αναλόγων, αυξημένης συγγένειας και εξειδίκευσης προς τη φωσφορυλάση, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμάκων για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II. Η κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου GPb-CP320626 (Oikonomakos et al, 2000) αποκάλυψε ένα νέο αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης, που βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς (Εικόνα 2.6), στη μεσεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Το νέο κέντρο σύνδεσης απέχει $> 30 \text{ \AA}$ από το καταλυτικό κέντρο, όμως, η σύνδεση της ένωσης CP320626 προκαλεί σταθεροποίηση της ανενεργούς T-διαμόρφωσης (ή επάγει την ανενεργό T διαμόρφωση).



ΕΙΚΟΝΑ 2.6 Απεικόνιση της δομής της GPb (ως προς τον άξονα συμμετρίας 2ης τάξης), με τα κέντρα σύνδεσης που αποτελούν «στόχους» για το σχεδιασμό υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η μία υπομονάδα αποδίδεται με σκούρο πράσινο και η άλλη με ανοιχτό πράσινο. Το καταλυτικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης του υποστρώματος-Glc-1-P και του αναστολέα-γλυκόζης) βρίσκεται στο κέντρο του μορίου. Στην T-διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση γίνεται μέσω ενός καναλιού πλάτους ~5 Å και μήκους περίπου ~15 Å, αλλά περιορίζεται (κυρίως) από το βρόχο 280s (αμινοξικής αλληλουχίας 282-286) (κίτρινο). Η φλαβοπιριδόλη συνδέεται στο κέντρο αναστολής που απαρτίζεται από ομάδες με υδροφοβικά χαρακτηριστικά (Phe285 από το βρόχο 282-286 και Tyr613) και βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου (~12 Å). Η κατάληψη του κέντρου αναστολής αναστέλλει τη δράση του ενζύμου συνεργιστικά με τη γλυκόζη. Το αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης του ενεργοποιητή AMP και αναστολέα W1807), εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων και απέχει από το καταλυτικό κέντρο περίπου 30 Å. Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς και απέχει 15 Å από το αλλοστερικό, 33 Å από το καταλυτικό και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου (μέσω του οποίου η φωσφορυλάση συνδέεται στα σωμάτια γλυκογόνου *in vivo*), βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, σε απόσταση 30 Å από το καταλυτικό και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο.

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εισαγωγή στις Φασματοσκοπικές Μεθόδους

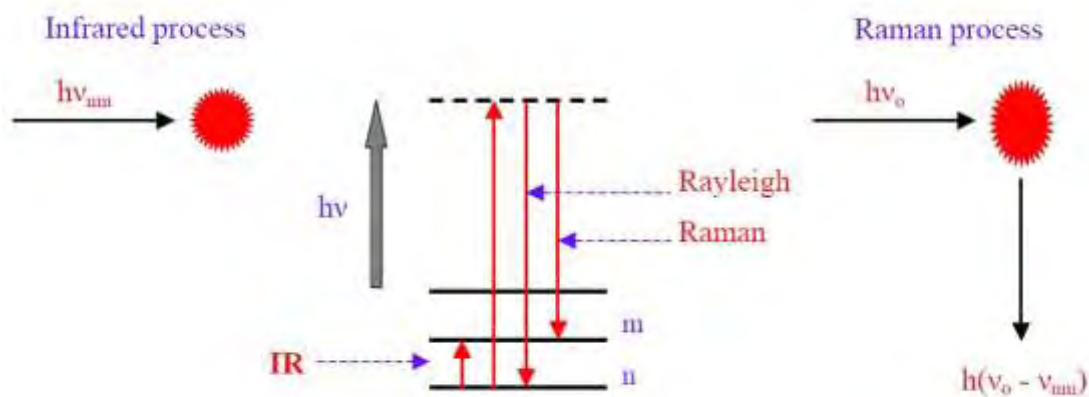
Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι το βασικό εργαλείο της σύγχρονης χημείας για την αναγνώριση της μοριακής δομής. Στην οργανική χημεία οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των μοριακών δομών, την παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων και τον έλεγχο της καθαρότητας των ενώσεων. Οι πλέον βασικές μέθοδοι για τα οργανικά μόρια είναι η φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR) η φασματομετρία μαζών, η φασματοσκοπία υπέρυθρου και η φασματοσκοπία UV/Vis.

3.2 Υπέρυθρη φασματοσκοπία (*InfraRed spectroscopy, IR*)

Φασματοσκοπία είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (φως, ραδιοκύματα, ακτίνες x, κλπ.) με την ύλη. Τα άτομα, που αποτελούνται από ηλεκτρικά φορτισμένους πυρήνες και ηλεκτρόνια, μπορούν και αλληλεπιδρούν με το ταλαντευόμενο ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο του φωτός και απορροφούν την ενέργεια που μεταφέρει. Ένα άτομο/μόριο διεγείρεται μόνο από φωτόνια ενέργειας ίσης με την διαφορά ενέργειας μεταξύ του διεγερμένης και του ουδέτερης κατάστασης. Με ακτινοβολία (φως) υπέρυθρων συχνοτήτων ($10 - 12800 \text{ cm}^{-1}$), λόγω της χαμηλής ενέργειας του φωτονίου, μπορούν να διεγερθούν μόρια από ένα δονητικό ενεργειακό επίπεδο σε άλλο. Η ενέργεια μιας τέτοιας ακτινοβολίας ($1 - 800 \text{ meV}$) είναι αρκετή, ώστε να προκαλέσει δονήσεις στα μόρια που την απορροφούν. Ωστόσο, οι περιστροφικές ενέργειες των μορίων είναι ακόμα μικρότερες από τις δονητικές, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη ακτινοβολία να είναι ικανή να προκαλέσει παράλληλα και περιστροφικές μεταπτώσεις. Στην περίπτωση αυτή, η φασματοσκοπία ονομάζεται δονητική (vibrational spectroscopy).

Οι δονητικές φασματοσκοπικές τεχνικές αποτελούν τα πιο χρήσιμα εργαλεία για την κατανόηση της φύσης των χημικών δεσμών ενός συστήματος και την μελέτη χημικών αντιδράσεων. Τέτοιες τεχνικές είναι η φασματοσκοπία FTIR και η φασματοσκοπία Raman οι οποίες είναι μη καταστροφικές ως προς το δείγμα και σχετίζονται κυρίως με μελέτες

μεταβάσεων μεταξύ δονητικών και περιστροφικών επιπέδων της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης, ιόντων και μορίων.



ΕΙΚΟΝΑ 3.1. Αναπαράσταση των δονητικών διαδικασιών IR και Raman

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) προκύπτει από απορρόφηση της ακτινοβολίας και μετάβαση σε ανώτερο ενεργειακό επίπεδο. Ενώ η Raman φασματοσκοπία διαφέρει από την υπέρυθη IR στο ότι η πληροφορία αποκτάται από σκέδαση φωτός. Κατά τη διαδικασία της Raman έχουμε διέγερση φωτονίων σε μία διεγερμένη κατάσταση και μη ελαστική σκέδαση των φωτονίων κατά την αποδιέγερση (Εικόνα 3.1). Ένα ποσοστό των φωτονίων παραμένουν ενεργειακά αμετάβλητα και επιστρέφουν στην κατώτερη ενεργειακά στάθμη (τότε έχουμε την λεγόμενη σκέδαση Rayleigh), ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό σκεδάζονται με μεταβολή της ενέργειάς τους (σκέδαση Raman).

Βασικές αρχές της φασματοσκοπίας.

Όταν ένα μόριο αλληλεπιδρά με ηλεκτρομαγνητικό πεδίο γίνεται μεταφορά ενέργειας από το πεδίο στο μόριο όταν ικανοποιείται η συνθήκη του Bohr, $\Delta E = h\nu$, όπου ΔE η διαφορά ενέργειας μεταξύ δύο κβαντισμένων ενεργειακών καταστάσεων του μορίου, h η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα της ακτινοβολίας. Στην εικόνα 3.2 δίδονται σχηματικά οι ενεργειακές στάθμες ενός διατομικού μορίου. Κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη υποδιαιρείται σε στάθμες ταλαντώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον κβαντικό αριθμό ταλαντώσεως ν , ενώ κάθε στάθμη ταλαντώσεως υποδιαιρείται σε στάθμες περιστροφής των οποίων η ενέργεια χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό J .



ΕΙΚΟΝΑ 3.2. Διαδικασία μετάβασης σε ανώτερη ενεργειακή στάθμη.

Οι ενεργειακές στάθμες λόγω περιστροφής ευρίσκονται η μία πλησίον της άλλης και επομένως μεταπτώσεις μεταξύ γειτονικών σταθμών λαμβάνουν χώρα σε χαμηλές συχνότητες (ή μεγάλα μήκη κύματος). Τέτοιες μεταπτώσεις δίδουν τα φάσματα περιστροφής (rotational spectra) τα οποία μετρώνται στην περιοχή των μικροκυμάτων και άπω υπερέυθρου, δηλαδή 1cm^{-1} (10000 μm) έως περίπου 102 cm^{-1} (100 μm). Υπενθυμίζεται ότι η συχνότητα, ν , μετατρέπεται σε κυματάριθμους, u , ή σε μήκος κύματος, λ , μέσω της σχέσης: $\lambda = c / \nu = 1 / u$, όπου c η ταχύτητα του φωτός.

Η απόσταση μεταξύ δονητικών ενεργειακών σταθμών είναι μεγαλύτερη, με αποτέλεσμα οι σχετικές ενεργειακές μεταπτώσεις να λαμβάνουν χώρα σε μεγαλύτερες συχνότητες (μικρότερα μήκη κύματος) απ' ότι οι μεταπτώσεις λόγω περιστροφής. Τα δονητικά φάσματα (vibrational spectra) μετρώνται συνήθως στην περιοχή 102 cm^{-1} (102 μm) έως 104 cm^{-1} (1 μm) (περιοχή υπερέυθρου). Τέλος, η μεγάλη ενεργειακή απόσταση μεταξύ των ηλεκτρονιακών ενεργειακών σταθμών έχει ως αποτέλεσμα τα αντίστοιχα ηλεκτρονιακά φάσματα (electronic spectra) να μετρώνται στην περιοχή 104 cm^{-1} (1 μm) έως 105 cm^{-1} (0.1 μm) (περιοχή ορατού και υπεριώδους). (R.Kellner et al,1997)

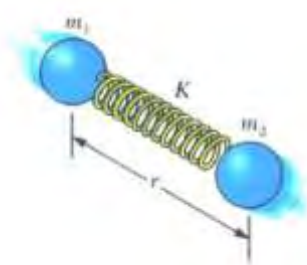
Δονητική Φασματοσκοπία

Ένα μόριο απορροφά IR ακτινοβολία όταν η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας συμπίπτει με την ενέργεια μια μετάβασης του μορίου μεταξύ δύο δονητικών επιπέδων της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης. Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο

καθίσταται δυνατή όταν υπάρχει αλλαγή στη διπολική ροπή που χαρακτηρίζει ένα συγκεκριμένο τρόπο δόνησης. Δηλαδή το μόριο πρέπει να περιέχει ένα δίπολο το οποίο να δονείται με συχνότητα ίση με τη συχνότητα του παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η μόνιμη διπολική ροπή δίνεται από τη σχέση: $\mu = e * r$ όπου μ η διπολική ροπή, e το φορτίο και r η απόσταση που χωρίζει τα θετικά από τα αρνητικά φορτία. Η θεωρία είναι ότι, αν ένα ετεροπυρηνικό διατομικό μόριο δονείται σε μία συγκεκριμένη συχνότητα, η μοριακή διπολική ροπή επίσης ταλαντώνεται γύρω από την τιμή ισορροπίας της. Το ταλαντούμενο δίπολο απορροφά ενέργεια από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μόνο αν το τελευταίο ταλαντώνεται με την ίδια συχνότητα του διπόλου. Το ποσό της ακτινοβολίας IR που απορροφάται κατά τη διάρκεια μίας δόνησης, καθώς και η ένταση της στο λαμβανόμενο φάσμα εξαρτάται από την πιθανότητα της δονητικής μετάβασης, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την αλλαγή της διπολικής ροπής που συνοδεύει αυτή τη μετάβαση. Έχει αποδειχθεί ότι η ένταση της απορρόφησης στο IR είναι ανάλογη του τετραγώνου της μεταβολής της διπολικής ροπής P ως προς τη μετατόπιση q του πυρήνα, στη διάρκεια της δόνησης: $IIR \sim (\partial P / \partial q)^2$ Αυτό σημαίνει ότι μία δόνηση είναι ενεργή στο IR όταν μεταβάλλει τη διπολική ροπή.

Δονήσεις Τάσης

Η θεωρία των μοριακών διεγέρσεων περιγράφεται απλά με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή. Το σύστημα θεωρείται ότι αποτελείται από δυο σφαίρες μάζας m , συνδεδεμένες μέσω ενός αβαρούς ελατηρίου, του οποίου η τάση δίνεται από μια σταθερά k .

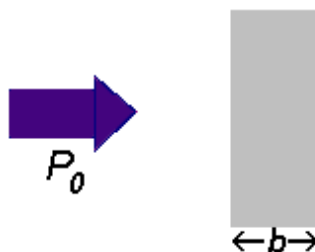


EIKONA 3.3 Ταλάντωση διατομικού μορίου

Η ενέργεια του συστήματος, σύμφωνα με την θεωρία του κλασικού αρμονικού ταλαντωτή δίνεται από την σχέση $E = kx$, όπου x είναι η μετατόπιση του ελατηρίου. Επειδή το x μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή, κάθε τιμή ενέργειας κατά την κλασική άποψη είναι επιτρεπτή, συμπεράσμα, όμως, που κβαντομηχανικά δεν ευσταθεί. Έτσι, σύμφωνα με την κβαντομηχανική, η ενέργεια του συστήματος δίνεται από την σχέση: $E=(n+1/2)h\nu$, όπου ν είναι η συχνότητα δόνησης και n είναι ο κβαντικός αριθμός που παίρνει τιμές (0,1, 2, ...). Συνεπώς, η ενέργεια του κβαντομηχανικού ταλαντωτή μπορεί να είναι μόνο ακέραιο πολλαπλάσιο του $\frac{1}{2} h\nu$. Η ενέργεια με $n=0$, $E_0=1/2 h\nu$, ονομάζεται ενέργεια μηδενικού σημείου και υπάρχει ακόμα και στη θερμοκρασία του απόλυτου μηδέν, γιατί είναι ανεξάρτητη από τις θερμικές κινήσεις των μορίων. (R.Kellner et al ,1997)

3.3 Φασματοσκοπία υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform – InfraRed spectroscopy, FT-IR)

Στη φασματοσκοπία υπερόθρου μελετάμε την απορρόφηση υπέρυθρου φωτός από το δείγμα συναρτήσει της συχνότητας. Το μόριο απορροφά ενέργεια $\Delta E = h\nu$ από την IR πηγή (που εκπέμπει ακτινοβολία έντασης I) σε κάθε δονητική μετάβαση.



ΕΙΚΟΝΑ 3.4 Προσπίπτουσα ακτινοβολία σε δείγμα πάχους b .

Η διαπερατότητα T ορίζεται: $T=I_t/I_o$

Η διέλευση μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή μεταξύ του 0 και του 1 και συχνά εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό (οπότε οι τιμές που μπορεί να πάρει βρίσκονται μεταξύ του 0 και του 100%). Η απορρόφηση και η διέλευση σχετίζονται επομένως ως εξής:

$$P=P_o \text{Exp}[-a b]$$

Όπου: P : Ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας μετά τη διέλευση δείγματος

P_0 : Ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας

a : σταθερά απορρόφησης

b : πάχος δείγματος

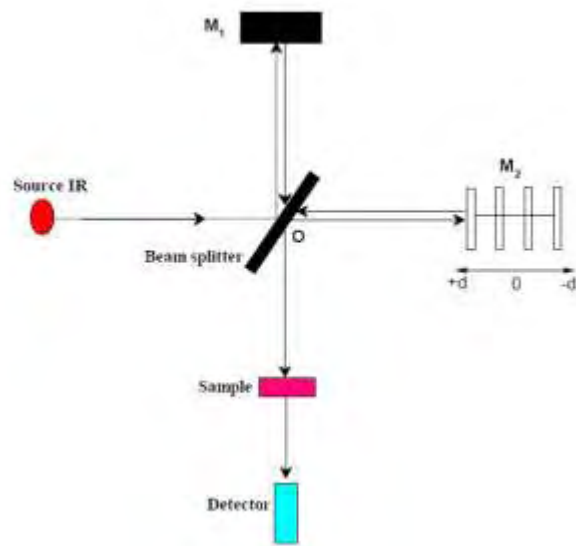
Ενώ η σχέση Απορρόφησης $A(\%)$ –Σκέδασης $S(\%)$ – Διαπερατότητας $T(\%)$ – Ανάκλασης $R(\%)$ είναι:

$$A(\%) + S(\%) + T(\%) + R(\%) = 100 (\%) \quad (3.12)$$

Η πλέον χρήσιμη σχέση στην φασματοφωτομετρία απορρόφησης προκύπτει από τον συνδυασμό του νόμου του Lambert (κάθε στρώμα, ίσης επιφάνειας, ενός απορροφητικού μέσου απορροφά ίσο ποσοστό της ακτινοβολίας που το διασχίζει) και του νόμου του Beer (η απορρόφηση ενός διαλύματος είναι ανάλογη προς την συγκέντρωση της απορροφητικής ουσίας). Το φάσμα απορρόφησης και ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης σε μήκος κύματος λ είναι παράμετροι που χαρακτηρίζουν μοναδικά συγκεκριμένα μόρια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ποσοτικοποίηση, όσο και για χαρακτηρισμό δειγμάτων.

Η αρχή λειτουργίας φασματοφωτόμετρου FTIR

Τα δονητικά φάσματα λαμβάνονται με ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR. Αυτό έχει ως βάση λειτουργίας το συμβολόμετρο Michelson, το οποίο χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί ένα συμβολογράφημα. Μαθηματική επεξεργασία του συμβολογραφήματος (μετασχηματισμός Fourier) δίνει το φάσμα απορρόφησης IR. Το συμβολόμετρο (interferometer) δύο δεσμών, αρχικά σχεδίασε ο Michelson το 1891. Πολλά άλλα συμβολόμετρα δύο δεσμών έχουν σχεδιαστεί μετά απ' αυτό, τα οποία μπορεί να είναι χρήσιμα για μερικές ιδιαίτερες εφαρμογές. Ωστόσο, η αρχή λειτουργίας των συμβολόμετρων δύο δεσμών είναι παρόμοια.



ΕΙΚΟΝΑ 3.5 Σχηματικό διάγραμμα του συμβολόμετρου Michelson.

Το συμβολόμετρο Michelson είναι μια διάταξη οπτικών που χωρίζει μια δέσμη ακτινοβολίας σε δύο δέσμες και τις επανασυνθέτει, αφού πρώτα ακολουθήσουν ξεχωριστές διαδρομές που διαφέρουν στο μήκος. Οι μεταβολές της έντασης της επαλληλίας των δύο δεσμών ακτινοβολίας, ως συνάρτηση της διαφοράς των οπτικών διαδρομών καταγράφονται από έναν ανιχνευτή.

Όλα τα φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιούν ένα συμβολόμετρο τύπου Michelson (Εικόνα 3.5). Η πολυχρωματική IR ακτινοβολία, που εκπέμπεται από την πηγή, φθάνει στο διαχωριστή δέσμης όπου είναι φτιαγμένος από ημιδιαφανές υλικό, συνήθως KBr και το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται και το υπόλοιπο 50% περνά από το διαχωριστή. Ο διαχωριστής είναι τοποθετημένος σε γωνία 45° , ως προς την προσπίπτουσα δέσμη, ώστε να είναι μέγιστες οι εντάσεις τόσο του μέρους της δέσμης που ανακλάται, όσο και εκείνου που διαπερνά (R.Kellner et al, 1997).

Η ακτινοβολία που παράγεται από την IR πηγή προσπίπτει στο διαχωριστή δέσμης, ο οποίος διαιρεί την ακτινοβολία σε δύο ίσα μέρη αποστέλλοντας το ένα τμήμα στο κάτοπτρο M_1 και το άλλο μισό στο M_2 . Η ανακλώμενη ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στο σταθερό καθρέπτη, ο οποίος βρίσκεται σε απόσταση L από το διαχωριστή. Η δέσμη ανακλάται και επιστρέφει στο διαχωριστή. Το δεύτερο κλάσμα της IR ακτινοβολίας που διαπερνά τον διαχωριστή, αφού διανύσει απόσταση $(L+d)$, ανακλάται από τον κινούμενο καθρέπτη και επανέρχεται στον

διαχωριστή. Έτσι, η διαφορά των δύο οπτικών διαδρομών είναι $\delta=2d$. Οι δύο ανακλώμενες δέσμες, όταν επιστρέψουν στο διαχωριστή, συμβάλουν έχοντας διανύσει διαφορετικό οπτικό δρόμο. Με την διαδικασία αυτή, δημιουργούνται οι κροσσοί συμβολής μέσω των οποίων γίνεται η κατάλληλη επιλογή των μηκών κύματος.

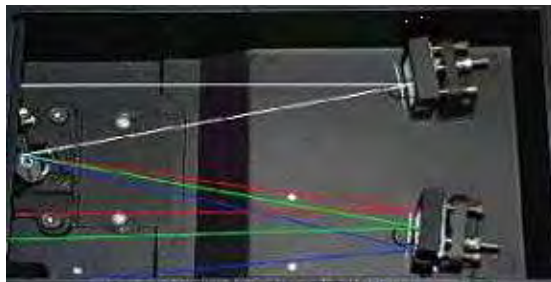
Στην περίπτωση μονοχρωματικής δέσμης φωτός μήκους κύματος λ (αν και στην περίπτωση της φασματοφωτομετρίας FT-IR δεν χρησιμοποιείται μονοχρωματική ακτινοβολία) που εκπέμπεται από την πηγή και συνενώνεται στην πλάκα B, υπόκειται σε ενισχυτική ή καταστροφική συμβολή ανάλογα με τις αποστάσεις της πλάκας B από τα κάτοπτρα M1 και M2. Εάν οι αποστάσεις αυτές είναι ίσες ή διαφέρουν κατά ένα ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της μονοχρωματικής δέσμης, τότε δημιουργείται ενισχυτική συμβολή με αποτέλεσμα να τετραπλασιάζεται η ένταση. Εάν, όμως οι αποστάσεις της B από τα M1 και M2 δεν είναι ακέραια πολλαπλάσια του μήκους κύματος, τότε οι δέσμες φωτός ανακλώνται στα κάτοπτρα και επανέρχονται στην B, όπου και αλληλοεξουδετερώνονται.

Σε ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR η πηγή εκπέμπει ένα συνεχές φάσμα. Κατά την έξοδο από το συμβολόμετρο έχουμε επαλληλία των διαφόρων φασματικών συνιστωσών των επιμέρους δεσμών. Το τελικό αποτέλεσμα προκύπτει από το άθροισμα των επιμέρους εντάσεων ακτινοβολίας που αντιστοιχούν σε κάθε φασματική περιοχή. Έτσι για μηδενική διαφορά οπτικού δρόμου όλες οι φασματικές συνιστώσες είναι σε φάση και η συνολική ένταση ακτινοβολίας είναι μέγιστη. Καθώς αυξάνεται η διαφορά οπτικού δρόμου ΔL η επαλληλία για κάθε φασματική συνιστώσα οδηγεί σε μέγιστο η ελάχιστο ανάλογα με τον λόγο $\Delta L/\lambda$. Έτσι η συνολική ένταση μειώνεται ή αυξάνεται με όλο και μικρότερο πλάτος διαμόρφωσης. Μετά από μια μέγιστη διαφορά οπτικού δρόμου δεν υπάρχει πια κανένας συσχετισμός φάσης μεταξύ των διαφόρων φασματικών συνιστωσών και η συνολική ένταση είναι πια σταθερή και ανεξάρτητη από την διαφορά οπτικού δρόμου.

Δυνατότητες και Πλεονεκτήματα Φασματοφωτόμετρου FT-IR

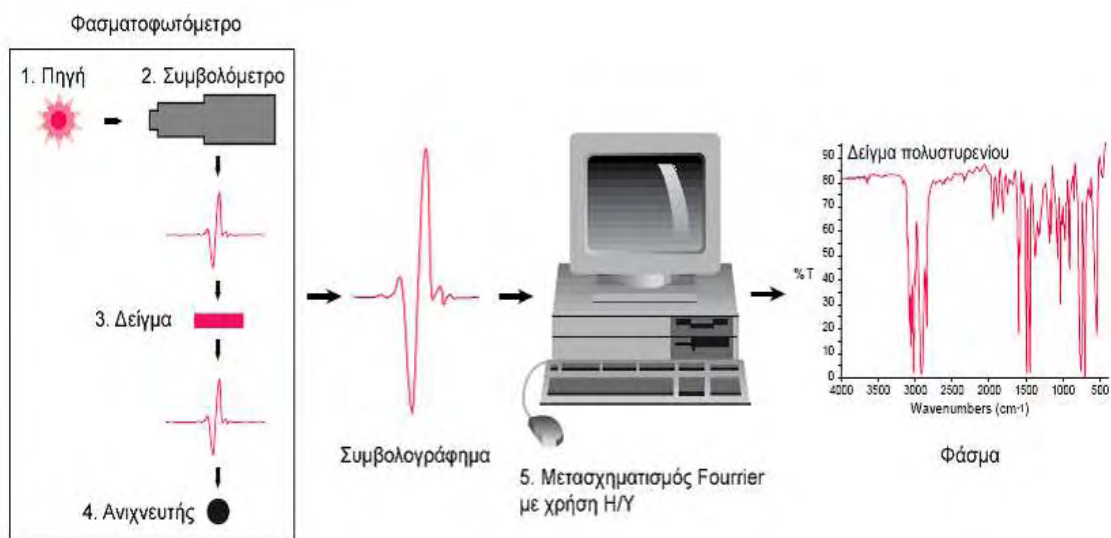
Η τεχνική αυτή του FT-IR έχει σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τις άλλες τεχνικές φασματοσκοπίας. Χρησιμοποιεί το συμβολόμετρο Michelson για επιλογή μήκους κύματος

και το μετασχηματισμό Fourier για τη δημιουργία του φάσματος. Κατά συνέπεια παίρνουμε φάσματα υψηλής ποιότητας.



ΕΙΚΟΝΑ 3.6 Διάταξη FTIR με διαβαθμισμένο πλέγμα (grating).

Τα φασματοφωτόμετρα FT-IR παρουσιάζουν σαφή πλεονεκτήματα. Καταρχήν, η χρήση υπολογιστή στη φασματοσκοπία FT-IR προσφέρει τη δυνατότητα ταχείας λήψης πολλαπλών φασμάτων, υπολογισμού του μέσου όρου τους, επεξεργασίας και αποθήκευσης των δεδομένων. Τούτο συνεπώς οδηγεί στην καταγραφή φασμάτων υψηλής ποιότητας. Είναι δυνατή επίσης η αφαίρεση φασμάτων και επομένως η ακριβής ανίχνευση πολύ μικρών μεταβολών που οφείλονται τόσο σε μεταβαλλόμενη σύσταση, όσο και στη φυσική κατάσταση του δείγματος.



ΕΙΚΟΝΑ 3.7 Διαδικασία λειτουργίας φασματοφωτόμετρου.

Η ύπαρξη «βιβλιοθήκης» φασμάτων υπερύθρου παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης του φάσματος ενός μείγματος συστατικών στα επί μέρους συστατικά του και επομένως τη δυνατότητα ποιοτικής/ποσοτικής ανάλυσης του μείγματος. Η μεγάλη ευαισθησία που χαρακτηρίζει τη φασματοσκοπία FT-IR μετατρέπεται σε μειονέκτημα στην περίπτωση που η ατμόσφαιρα του φωτομέτρου δεν έχει πλήρως εκκενωθεί ή αντικατασταθεί με άζωτο. Τότε, το φάσμα υπερύθρου παρουσιάζει έντονες απορροφήσεις που οφείλονται στο H₂O και το CO₂ του χώρου του φωτομέτρου. Το σοβαρότερο όμως μειονέκτημα της φασματοσκοπίας FT-IR είναι η απαιτούμενη ακριβής ρύθμιση των οπτικών του οργάνου, κυρίως του συμβολομέτρου Michelson. Σε σύγκριση με τα συμβατικά IR φασματοφωτόμετρα με διαβαθμισμένο πλέγμα, τα FTIR φασματοφωτόμετρα υπερέχουν σημαντικά, καθώς ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο (S/N) είναι πολύ μεγαλύτερος. Η υπεροχή των FTIR φασματοφωτόμετρων οφείλεται στα βασικά χαρακτηριστικά κατασκευής και λειτουργίας τους, που έχουν ως αποτέλεσμα: 1) όλες οι συχνότητες που εκπέμπονται από την πηγή να φθάνουν ταυτόχρονα στον ανιχνευτή 2) ένα μεγάλο εμβαδόν της δέσμης να περνά μέσα από το δείγμα και 3) η θέση του κινούμενου καθρέπτη να προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια.

3.4 Συνδυασμός αεριοχρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών (GC-MS)

3.4.1 Φασματομετρία μαζών

Είναι η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων και ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που οδηγούν στο σχηματισμό ιόντων σε αέρια κατάσταση (με ή χωρίς διάσπαση των μορίων). Καθένα από τα ιόντα που σχηματίζονται χαρακτηρίζεται από το λόγο της μάζας προς το φορτίο του (m/z) και από τη σχετική αφθονία του.

Η φασματομετρία μαζών βασίζεται σε χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην αέρια φάση κατά τις οποίες σχηματίζονται ιοντικά και ουδέτερα θραύσματα εξαιτίας της διάσπασης των μορίων ενός συστατικού λόγω ιονισμού του. Τα ιόντα που προκύπτουν διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z) και καταγράφονται με τη μορφή ενός φάσματος μαζών. Αν οι εντάσεις του φορτίου κάθε ιόντος εκφρασθούν ως ποσοστό της έντασης του ιόντος το οποίο αποτελεί τη βασική κορυφή, οι τιμές m/z συναρτήσει της

εκατοστιαίας σχετικής έντασης (% RI) αποτελούν το γραμμικό φάσμα μαζών. Η φασματομετρία μαζών είναι τεχνική που μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη δομή μιας χημικής ένωσης και υπό προϋποθέσεις να επιτρέψει τον ποσοτικό προσδιορισμό της. Στην περίπτωση μιγμάτων χημικών ενώσεων, παρέχει ελάχιστες χρήσιμες πληροφορίες ακόμη και όταν χρησιμοποιηθούν φασματόμετρα μαζών μεγάλης διακριτικής ικανότητας. Ο συνδυασμός της φασματομετρίας μαζών με την αεριοχρωματογραφία επιτρέπει την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των επιμέρους συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων ακόμη και όταν αυτά περιέχονται σε εξαιρετικώς χαμηλές συγκεντρώσεις.

Τα φασματόμετρα μαζών διακρίνονται σε:

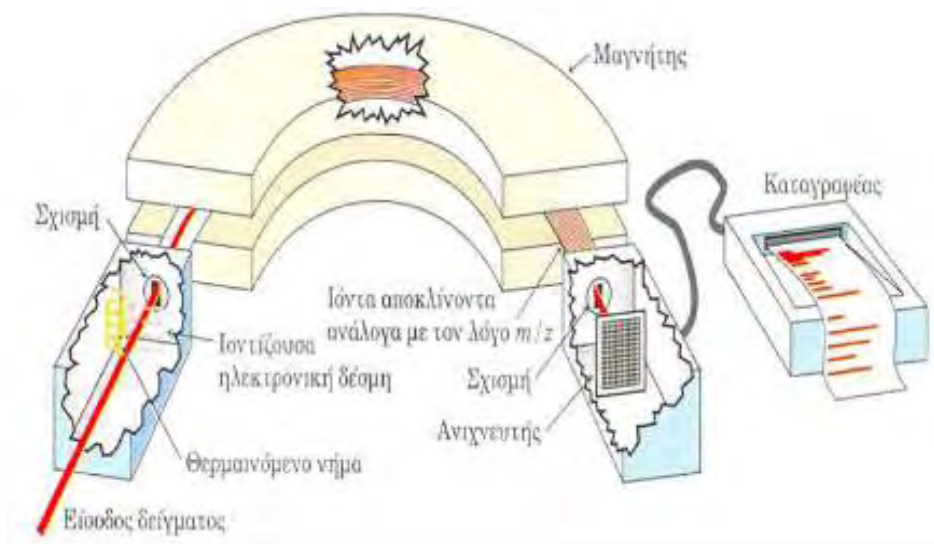
- φασματόμετρα συνεχούς λειτουργίας ή φασματόμετρα εκπομπής ιόντων, όπως τα φασματόμετρα μαζών μαγνητικού τομέα και τα φασματόμετρα μαζών τετραπολικού φίλτρου, και
- φασματόμετρα αποθήκευσης ιόντων, όπως τα φασματόμετρα παγίδευσης ιόντων (ή IT-MS) και τα φασματόμετρα κυκλοτρονικού συντονισμού (ή ICR-MS).

Κάθε φασματόμετρο μαζών αποτελείται από διάφορες επιμέρους διατάξεις στις οποίες λαμβάνουν χώρα η ατμοποίηση του δείγματος, ο ιονισμός του δείγματος, ο διαχωρισμός των ιόντων τα οποία σχηματίζονται κατά τον ιονισμό του δείγματος, η προώθηση των επιμέρους ιόντων στον ανιχνευτή, και η αποτύπωση του συνόλου των ιόντων (φάσμα μαζών).

Ο ιονισμός στα φασματόμετρα μαζών επιτυγχάνεται με **α)** πρόσπτωση ηλεκτρονίων, ανιόντων ή κατιόντων και **β)** έκθεση στην επίδραση ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου.

Ο διαχωρισμός των ιόντων επιτυγχάνεται:

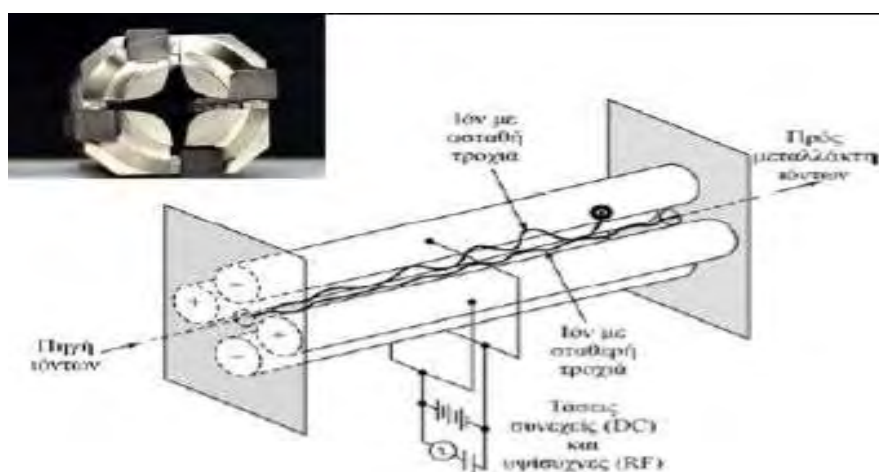
- σε μαγνητικό ή ηλεκτρομαγνητικό αναλυτή μάζας,
- σε αναλυτή μάζας στον οποίο μετράται ο «χρόνος πτήσης»,
- σε αναλυτή μάζας τύπου τετραπολικού φίλτρου, ή
- σε αναλυτή μάζας τύπου τετραπολικής παγίδας ιόντων.



ΕΙΚΟΝΑ 3.8 Φασματόμετρο Μάζας

Διαχωρισμός σε τετραπολικό φίλτρο μάζας

Τα τετραπολικά φίλτρα μάζας αποτελούνται από τέσσερις παράλληλες ράβδους τοποθετημένες με τρόπο που οι άξονές τους να διέρχονται από τις κορυφές ενός τετραγώνου. Στο ένα ζεύγος από τις διαγωνίως ευρισκόμενες ράβδους, εφαρμόζεται τάση +Vdc Volts, ενώ στο άλλο ανάλογο ζεύγος τάση -Vdc Volts.



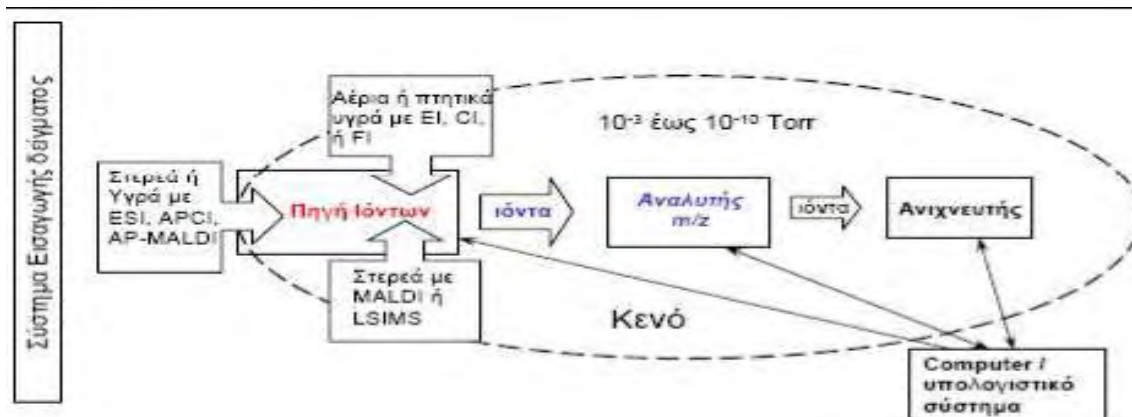
ΕΙΚΟΝΑ 3.9 Διαχωρισμός ιόντων σε τετραπολικό φίλτρο μάζας

Τα ιόντα επιταχύνονται στο κέντρο του τετραπολικού φίλτρου (κατά μήκος του άξονα z που διέρχεται από το σημείο τομής των διαγωνίων του νοητού τετραγώνου το οποίο σχηματίζουν οι άξονες των ράβδων). Στα δύο ζεύγη των ράβδων εφαρμόζεται εναλλασσόμενη τάση, καθορισμένης συχνότητας ραδιοκυμάτων με διαφορά φάσης 180°, οπότε τα ιόντα που πάλλονται με ένα ολοένα αυξανόμενο πλάτος προσκρούουν σε μια ράβδο, ενώ μόνο τα ιόντα με ορισμένο λόγο m/z (καθορίζεται από τη διαφορά δυναμικού V και από τη συχνότητα των ραδιοκυμάτων) διέρχονται μέσα από το τετραπολικό φίλτρο και ανιχνεύονται. Με σάρωση της συχνότητας των ραδιοκυμάτων ή του δυναμικού είναι δυνατή η καταγραφή του φάσματος μαζών. Ο λόγος της μάζας προς το φορτίο ενός ιόντος υπολογίζεται από τη σχέση $m/z = 0,136 \cdot V/r_0^2 \cdot f^2$, όπου r_0 η συχνότητα των ράβδων (σε cm), και f η συχνότητα των ραδιοκυμάτων σε (MHz).

Τα φασματομέτρα μαζών με τετραπολικό φίλτρο είναι φθηνότερα και πολύ μικρότερα σε διαστάσεις σε σχέση με τα φασματομέτρα μαζών μαγνητικού τομέα, αλλά είναι χαμηλής διακριτικής ικανότητας. Ωστόσο με τα φασματομέτρα αυτά λαμβάνονται γραμμικά φάσματα μαζών. (R.Kellner et al, 1997)

Αρχή λειτουργίας ενός συστήματος GC-MS

Η γραμμή μεταφοράς, η οποία είναι θερμαινόμενη, διατηρεί τα διαχωρισθέντα συστατικά στην αέρια φάση κατά τη μεταφορά τους από τη χρωματογραφική στήλη του αεριοχρωματογράφου στο φασματομέτρο μάζας. Στο θάλαμο ιονισμού του τελευταίου ιονίζεται κάθε συστατικό χωριστά, κυρίως με πρόσπτωση δέσμης ηλεκτρονίων ορισμένης ενέργειας. Τα θετικώς φορτισμένα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μάζας, όπου και διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z), (McMurry, 2002). Ο ανιχνευτής ταξινομεί τα ιοντικά θραύσματα σύμφωνα με το λόγο m/z και τα καταγράφει ως κορυφές. Το σήμα του ανιχνευτή ενισχύεται και μετατρέπεται σε αξιοποιήσιμη πληροφορία με τη μορφή του φάσματος μάζας. Το υψηλό κενό στο θάλαμο ιονισμού του φασματομέτρου μάζας εγγυάται ότι η πιθανότητα σύγκρουσης των ιόντων με μη ιονισθέντα μόρια είναι εξαιρετικά μικρή.



EIKONA 3.10 Αρχή λειτουργίας ενός συστήματος GC-MS.

Καταγραφή όλων των ιόντων (Full Scan)

Η τεχνική επιτρέπει τη λήψη του φάσματος μαζών όλων των συστατικών που διαχωρίζονται αεριοχρωματογραφικά με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η ταυτοποίησή τους με τη βοήθεια ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών. Η παράμετρος που παίζει καθοριστικό ρόλο στη λήψη του φάσματος μαζών όταν χρησιμοποιούνται φασματόμετρα μαζών συνεχούς λειτουργίας, είναι ο διαθέσιμος χρόνος για την καταγραφή της μάζας του κάθε ιόντος. Ο χρόνος αυτός καθορίζει και την τυπική ευαισθησία του φασματόμετρου μαζών. Η ανίχνευση και η καταγραφή όλων των ιόντων που σχηματίζονται κατά τον ιονισμό κάθε επιμέρους συστατικού του εξεταζόμενου δείγματος γίνεται ταυτόχρονα στα φασματόμετρα μαζών αποθήκευσης ιόντων. Σε μια πρώτη φάση αποθηκεύονται όλα τα ιόντα στον αναλυτή μάζας και στη συνέχεια, αφού ταξινομηθούν σύμφωνα με τη μάζα τους, οδηγούνται με πολύ μεγάλη ταχύτητα στον πολλαπλασιαστή όπου ανιχνεύονται και καταγράφονται. Στα φασματόμετρα αυτά μπορούν να καταγραφούν μέχρι 11.000 μονάδες μάζας ανά δευτερόλεπτο (στα φασματόμετρα μαζών συνεχούς λειτουργίας είναι δυνατό να καταγραφούν μόνο 1.000 μονάδες μάζας ανά δευτερόλεπτο).

3.5 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

3.5.1 Εισαγωγή στην αρχή λειτουργίας του NMR

Η τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) εκμεταλλεύεται τη μαγνητική ιδιότητα της **ιδιοστροφορμής I (spin)** συγκεκριμένων πυρήνων. Κάθε ένα από τα πυρηνικά σωματίδια έχει την ιδιότητα αυτή, ενώ το συνολικό spin ενός πυρήνα εξαρτάται από τις συζεύξεις τους. Οι πυρήνες με $I \neq 0$ είναι **μαγνητικά ενεργοί**. Η μελέτη πολυπεπτιδίων, βασίζεται, κατά κύριο λόγο, στις μαγνητικές πυρηνικές ιδιότητες των ισοτόπων ^1H , ^{15}N , ^{13}C , ^2H . Με την εφαρμογή **εξωτερικού μαγνητικού πεδίου** έντασης \mathbf{B}_0 , η πυρηνική **μαγνητική ροπή** ευθυγραμμίζεται με τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου και αποκτά φορά **παράλληλη** ή **αντιπαράλληλη** με αυτό. Η διαφορά ενέργειας των δύο σταθμών είναι μικρή και εξαρτάται από την ένταση του εξωτερικού πεδίου B_0 και τη φυσική σταθερά που καλείται **γυρομαγνητικός λόγος γ** του πυρήνα $\Delta E = \gamma h B_0 / 2\pi$. (R.Kellner et al, 1997). Μικρότερης ενέργειας, και άρα πιο πιθανή, είναι η κατάσταση στην οποία η πυρηνική μαγνητική ροπή είναι **παράλληλη** προς το άνυσμα της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Ο λόγος του αριθμού των μορίων με αντιπαράλληλη προς το εξωτερικό πεδίο μαγνητική ροπή (N-) προς αυτόν με παράλληλη (N+) προβλέπεται από τη στατιστική Boltzman $N-/N+ = e^{-\Delta H/KT}$.

3.5.2 Διέγερση και παραγωγή σήματος στο NMR

Η **διέγερση** ενός πυρήνα ώστε αυτός να μεταπέσει από τη βασική κατάσταση (μικρότερη ενέργεια- παράλληλη προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο διάταξη της μαγνητικής του ροπής) στη διηγεμένη, είναι εφικτή με την πρόσληψη ποσού ενέργειας ΔE . Η ενέργεια αυτή προσδίδεται με τη μορφή **ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας** στην περιοχή των **ραδιοσυχνοτήτων (RF)**, χρησιμοποιώντας ένα **πηνίο εκπομπής (transmitter coil)**. Η πρόσληψη ποσού ενέργειας με αποτέλεσμα τη μετάπτωση από μια βασική ενεργειακή στάθμη σε διηγεμένη ονομάζεται **συντονισμός (resonance)**. Η συνισταμένη όλων των μαγνητικών ροπών των επιμέρους πυρήνων ενός μορίου ονομάζεται **μαγνήτιση (magnetization)**. Προκύπτει από τη συμβολή όλων των περιστρεφόμενων υπό γωνία θ σε σχέση με τη διεύθυνση του εξωτερικού B_0 πεδίου ανυσμάτων μαγνητικών ροπών. Από τη διαχείριση αυτού του ανύσματος προέρχεται το σήμα στο NMR. Με τη χρήση του εξωτερικού πεδίου η μαγνητική αυτή συνισταμένη αποκτά μέγιστη ένταση κατά την **κατεύθυνση** (διεύθυνση και φορά) του εξωτερικού πεδίου. Αν καρτεσιανό σύστημα αναφοράς οριστεί ώστε ο άξονας των

z να ταυτίζεται με τη διεύθυνση του B_0 , τότε η εκπομπή ραδιοσυχνοτήτων γίνεται κατά τον άξονα των x και ισοδυναμεί με δημιουργία ενός νέου μαγνητικού πεδίου έντασης B_1 , μικρότερης της B_0 , κατά τον άξονα αυτό. Το μαγνητικό πεδίο B_1 εκτρέπει τη συνισταμένη των μαγνητικών ροπών (μαγνήτιση) από τον άξονα των z συντονίζοντας τους πυρήνες και καθιστώντας τους **συμφασικούς**. Εξισώνει δηλαδή τη φάση περιστροφής όλων των πυρήνων που περιστρέφονται με τη συχνότητα Larmor $\nu_0 = \Delta E/h = \gamma B_0/2\pi$. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται συνιστώσα μαγνήτισης στο επίπεδο xy που καλείται M_{xy} . Η περιστροφή της γύρω από τον άξονα των z εγείρει ηλεκτρικό ρεύμα (επαγωγή Faraday) στο **πηνίο- δέκτη (receiver coil)**, το οποίο αποτελεί ουσιαστικά τη μετρούμενη ποσότητα στο NMR. (R.Kellner et al, 1997).

3.5.3 Αποδιέγερση

Η ανταλλαγή ενέργειας κατά την καταγραφή του σήματος οδηγεί στην **αποδιέγερση (relaxation)** των πυρήνων και την επιστροφή της μαγνήτισης στη θέση ισορροπίας με διεύθυνση παράλληλη προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (άξονας z). Το φαινόμενο της αποδιέγερσης λαμβάνει χώρα ως αποτέλεσμα δύο μηχανισμών ανταλλαγής ενέργειας: του **διαμήκη (longitudinal)** και του **εγκάρσιου (transverse)**. Ο πρώτος χαρακτηρίζεται από τη χρονική σταθερά T_1 και περιγράφει την επιστροφή των πυρήνων στην κατάσταση που προβλέπεται από τη στατιστική Boltzman και ο δεύτερος από τη χρονική σταθερά T_2 και αναφέρεται στην απώλεια της συμφωνίας φάσεων περιστροφής στο επίπεδο xy, λόγω αλληλεπίδρασης ζευγών πυρηνικών spin.

$$M_t = M_0[1 - e^{-t/T_1}] \text{ και } M_t = M_0 e^{-t/T_2}$$

Με M_0 συμβολίζεται η μαγνήτιση σε άπειρο χρόνο μετά τη διέγερση, όταν θεωρητικά έχει επιστρέψει στη θέση ισορροπίας και M_0 η μαγνήτιση αμέσως μετά τη διέγερση, όταν και έχει τη μέγιστη τιμή της. Γρήγορη αποδιέγερση (μικρές τιμές των χρονικών σταθερών) οδηγεί σε γρήγορη απώλεια σήματος, κάτι που δυσχεραίνει τη μελέτη συστημάτων με NMR. Σε μακρομόρια, η χρονική σταθερά T_2 είναι σημαντικά μικρότερη από την T_1 καθιστώντας την εγκάρσια αποδιέγερση τον κύριο μηχανισμό απώλειας σήματος με την πάροδο του χρόνου. Καθοριστικός παράμετρος για το χρόνο αποδιέγερσης είναι ο **χρόνος ιδιοσυσχετισμού (correlation time) τ_c** που αντανακλά το μοριακό μέγεθος. Όσο μεγαλύτερο είναι ένα

μακρομόριο, τόσο πιο αργά κινείται στο διάλυμα με συνέπεια να εμφανίζει μεγάλο χρόνο ιδιοσυσχετισμού. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ιδιοσυσχετισμού, τόσο μικρότερη η χρονική σταθερά αποδιέγερσης T2 και άρα γρηγορότερη η απώλεια του σήματος.

3.5.4 Μαγνητική διαφοροποίηση- Χημική μετατόπιση

Το **ηλεκτρονιακό νέφος** γύρω από κάθε πυρήνα δημιουργεί ένα τοπικό μαγνητικό πεδίο αντίθετης έντασης προς το εξωτερικό. Έτσι, όσο πυκνότερο είναι το ηλεκτρονιακό νέφος γύρω από έναν πυρήνα, τόσο μικρότερη η ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου ν_{960} που αυτός “αισθάνεται”. Το φαινόμενο αυτό καλείται **προάσπιση** (*shielding*). Συνάγεται λοιπόν ότι η ενέργεια (και άρα η ραδιοσυχνότητα) που απαιτείται για το συντονισμό δεν είναι ίδια για όλους τους πυρήνες ίδιου τύπου ατόμου ενός μορίου. Η συχνότητα στην οποία συντονίζεται κάθε πυρήνας ενός δείγματος στο NMR συνήθως εκφράζεται σε κλασματικές μονάδες (ppm) δ σε σχέση με τη συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα αναφοράς και καλείται **χημική μετατόπιση** (*chemical shift*) του πυρήνα αυτού.

$$\delta = \nu - \nu_{\text{ref}} / \nu_0 \cdot 1000000 \text{ ppm.}$$

Με ν_{ref} συμβολίζεται η συχνότητα συντονισμού πυρήνα ένωσης αναφοράς, όπως το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS).

Διαφοροποίηση στη χημική μετατόπιση όμως επάγει και η τριτοταγής δομή, μιας και επηρεάζει την ηλεκτρονιακή κατανομή γύρω από κάθε πυρήνα. Σε αυτό το γεγονός τελικά βασίζεται και ο δομικός χαρακτηρισμός ενός βιομορίου με NMR.

3.5.5 Μαγνητικές συζεύξεις

Πυρηνικά spin είναι δυνατό να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Τέτοιες **συζεύξεις** (*couplings*) παρατηρούνται όταν οι αντίστοιχοι πυρήνες είναι **μαγνητικά μη ισοδύναμοι** και αποτελούν πηγή πολύτιμης πληροφορίας. **Μαγνητικά ισοδύναμοι** ονομάζονται οι χημικά ισοδύναμοι πυρήνες που μπορούν να ανταλλάσσουν θέσεις λόγω συμμετρίας. Οι πυρήνες αυτοί επιδεικνύουν την ίδια χημική μετατόπιση.

3.5.6 Χρήσεις της Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Αντίθετα με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές η φασματοσκοπία NMR δύναται να χρησιμοποιηθεί για καταγραφή φασμάτων ανόμοιων μεταξύ τους ως προς τη μορφή αλλά και το είδος της πληροφορίας που περιέχουν. Η “απάντηση” που εμπεριέχεται σε κάθε τύπο φάσματος εξαρτάται από την “ερώτηση” που θα τεθεί, κάτι που γίνεται χρησιμοποιώντας τη “γλώσσα” του NMR. Έτσι μια διαδοχή παλμών ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μήκη κύματος ραδιοσυχνοτήτων και παύσεων, γνωστή ως **παλμική ακολουθία** (*pulse sequence*), καθορίζει τα πυρηνικά spin των οποίων οι **μαγνητικές συζεύξεις** (*magnetic couplings*) θα χρησιμοποιηθούν στην καταγραφή του φάσματος. Η σύνταξη παλμικών ακολουθιών κατάλληλων για την καταγραφή δεδομένης πληροφορίας είναι πολύπλοκο έργο και στις μέρες μας το κύριο επίπεδο εισαγωγής καινοτομιών και τεχνολογικών βελτιώσεων στο πεδίο. Με την καταγραφή κατάλληλων φασμάτων NMR, είναι δυνατό να εξαχθεί ποικίλου τύπου πληροφορία. (D. A. Skoog, et al, 1998), (R.Kellner, et al ,1997)

4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΣΤΟΧΟΣ – ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

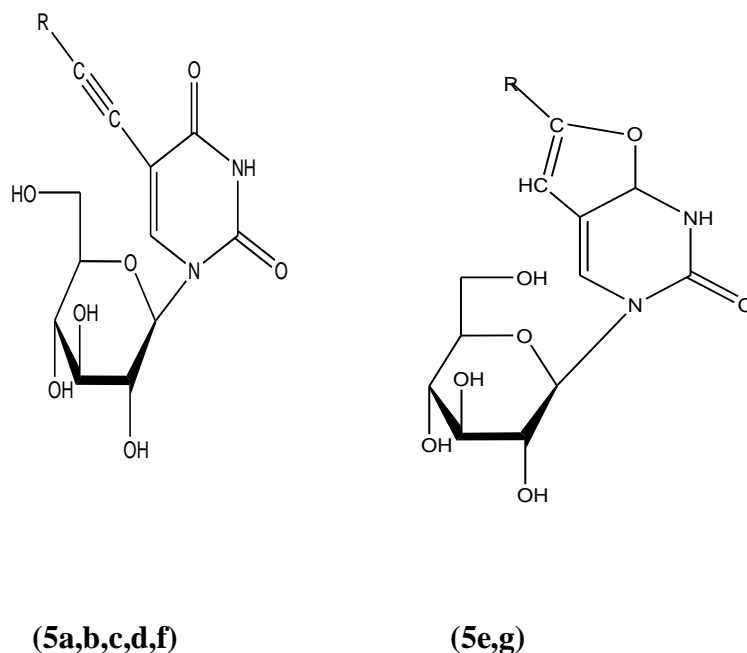
Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η ταυτοποίηση με φασματοσκοπικές τεχνικές νέων τροποποιημένων γλυκοπυρανόζυλο νουκλεοζιτών, αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Οι νουκλεοζίτες μαζί με τα ανάλογά τους αποτελούν το θεμελιώδη λίθο για την ανάπτυξη ενώσεων με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με αυτές που χρησιμοποιούσαμε ,κλινικά, μέχρι τώρα. Η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο.

Η ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου είναι μια .σημαντική στρατηγική για τον έλεγχο του σακχάρου στον διαβήτη τύπου II. Η GP είναι ένα ένζυμο που κατέχει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και αποτελεί σημαντικό μοριακό στόχο για την σχεδίαση νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Λαμβάνοντας υπόψη μελέτες που υποδεικνύουν υποκατεστημένους στο σάκχαρο πυριμιδινικούς πυρανονουκλεοζίτες ως εν δυνάμει αναστολείς της GP, συντέθηκε μια νέα τάξη τροποποιημένων στη βάση πυρανονουκλεοζιτικών και πυριμιδινονουκλεοζιτικών αναλόγων ,η ταυτοποίηση των οποίων αποτελεί αντικείμενο της παρούσης μεταπτυχιακής διατριβής.

Η γενική δομή των μορίων που ταυτοποιήθηκαν φαίνονται στην ΕΙΚΟΝΑ 4.1.



ΕΙΚΟΝΑ 4.1 : Νέοι πυρανονουκλεοζιτικοί και πυριμιδινονουκλεοζιτικοί αναστολείς

Όπου: **5a** R= Me₃Si , **5b** R= H, **5c** R= Ph , **5d** R = C₃H₇, **5f** = C₅H₁₁, **5g** = C₃H₇, **5e**=C₅H₁₁

4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance), με χρήση φασμάτων υπερύθρου (IR Spectrophotometry) καθώς και με χρήση φασμάτων μαζών (Mass Spectrometry).

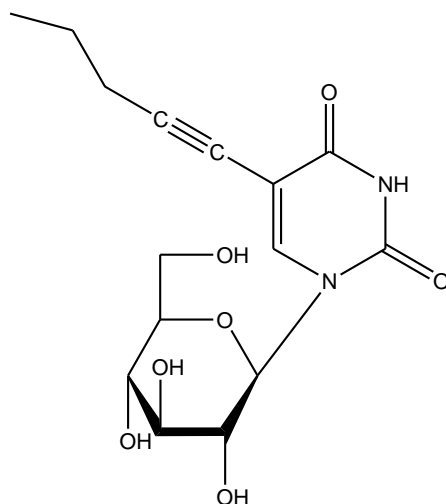
Τα φάσματα ¹H NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 400 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ¹H.). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

Τα φάσματα IR πάρθηκαν με χρήση του σπεκτοφωτόμετρου Thermo Scientific Nicolet IR100 FT-IR.

Τα φάσματα μαζών πάρθηκαν με τη χρήση ενός φασματογράφου μάζας ThermoQuest Finnigan AQA με τη μέθοδο του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό.

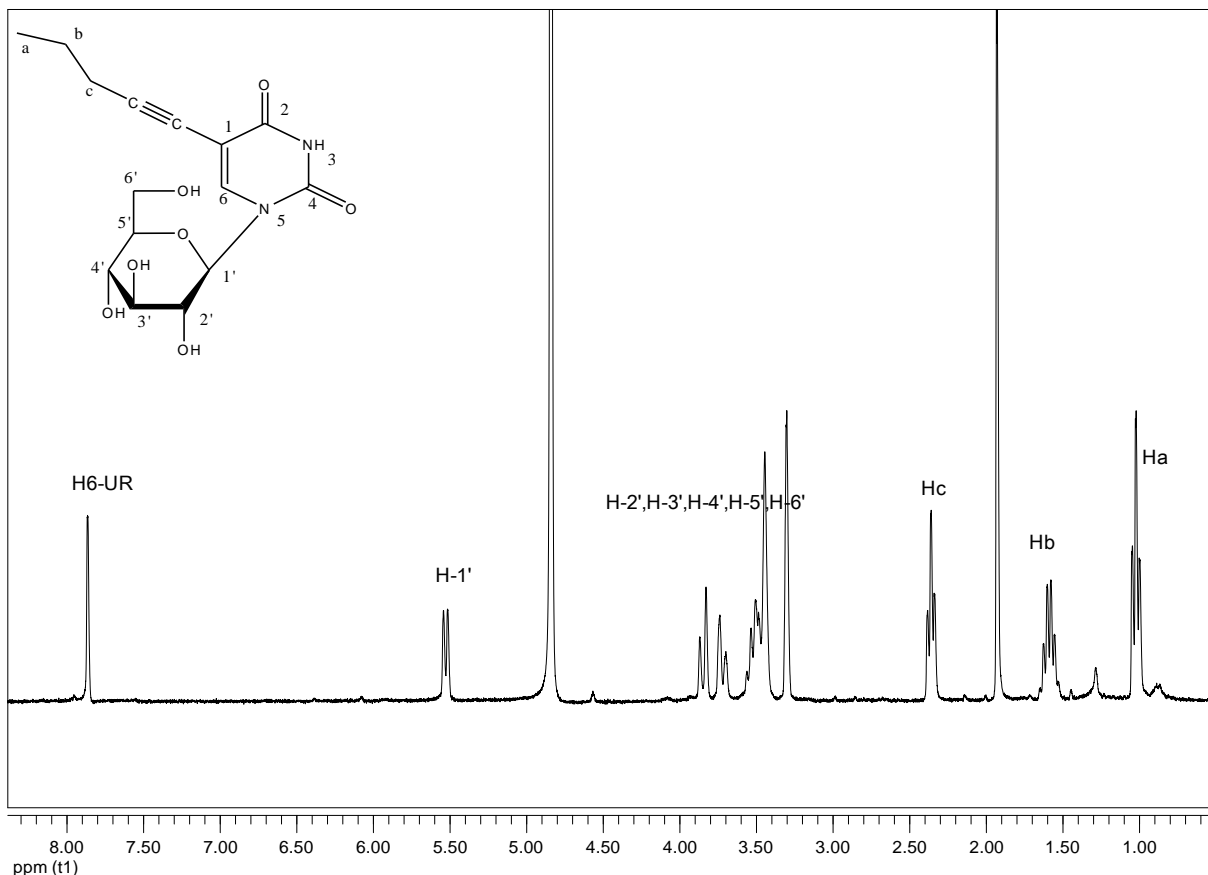
4.3. ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

i) Ταυτοποίηση της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυνυλοουρακίλης



ΕΙΚΟΝΑ 4.2 : Η δομή της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυνυλοουρακίλης

Ταυτοποίηση με $^1\text{H-NMR}$

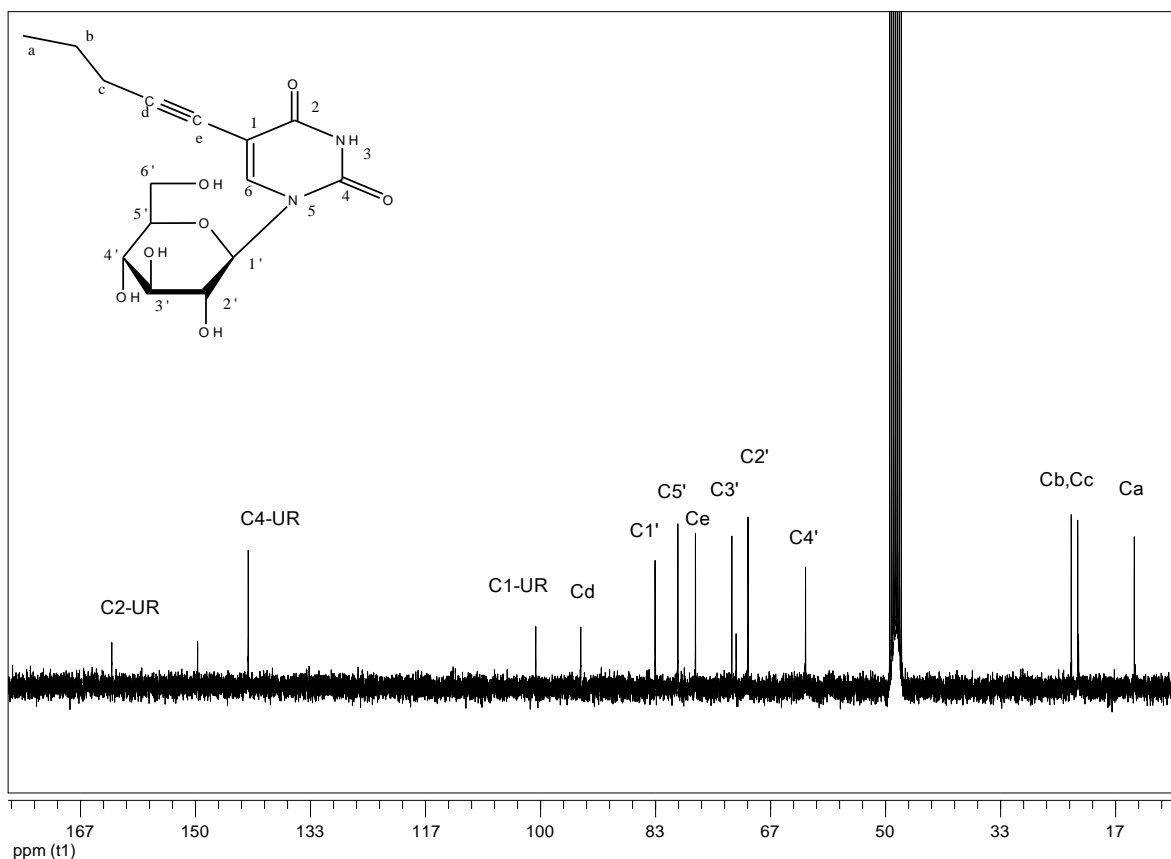


ΕΙΚΟΝΑ 4.3 : Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυνυλοουρακίλης

Στο φάσμα $^1\text{H NMR}$ της ένωσης 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυνυλοουρακίλης το σήμα πρωτονίου της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια απλή κορυφή στην περιοχή των 7.9 ppm. Το H-6 της ετεροκυκλικής βάσης είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο του μορίου λόγω της ύπαρξης του π-συστήματος της βάσης που απογυμνώνει το πρωτόνιο από το ηλεκτρονικό του φορτίο με αποτέλεσμα την απορρόφηση σε αυτή την περιοχή εξαιρετικά χαμηλού πεδίου. Ακολουθεί το αιθερικό πρωτόνιο H-1' του σακχάρου σαν μία διπλή κορυφή, ελαφρώς μετατοπισμένη σε περιοχή χαμηλοτερου πεδίου (5,6δ) καθώς αποπροστατεύεται από το απεντοπισμένο ηλεκτρονικό νέφος του π-συστήματος της ετεροκυκλικής βάσης. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,2 έως 3,9 δ αποπροστατευμένα από την παρουσία του ηλεκτραρνητικού ατόμου O στον αυτό άνθρακα. Τέλος ακολουθούν οι

απορροφήσεις των δυο ισοδύναμων πρωτονίων Hc, των ισοδύναμων πρωτονίων Hb και των τριών ισοδύναμων πρωτονίων Ha του υδρογονανθρακικού υποκαταστάτη. Τα πρωτόνια Hc απορροφούν σε χαμηλότερο πεδίο από τα άλλα δύο ισοδύναμα είδη καθώς αποπροστατεύονται μερικώς από τη γειτνίαση με το γειτονικό π-δεσμό της υδρογονανθρακικής αλυσίδας, δίνοντας μία τριπλή κορυφή (σχάζονται μόνο από τα Hb). Τα πρωτόνια Hb απορροφούν σε υψηλότερο πεδίο στα 1,6δ και εμφανίζονται σαν μία πολλαπλή κορυφή καθώς σχάζονται τόσο από τα Ha όσο και από τα Hc. (σχάζονται σε μία τριπλή κορυφή από τα δυο ισοδύναμα πρωτόνια Hc οι οποίες με τη σειρά τους σχάζονται σε τετραπλή από τα τρία ισοδύναμα πρωτόνια Ha. Επομένως τριπλή τετραπλών-Hb(tq)). Τέλος τα πλέον προστατευμένα είναι τα τρία μεθυλικά πρωτόνια που δίνουν μία τριπλή κορυφή σε χημική μετατόπιση 1,1δ. Σημειώνεται ότι το πρωτόνιο H-3 της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που λαμβάνει χώρα μεταξύ αυτού και του διαλύτη (μεθανόλη).

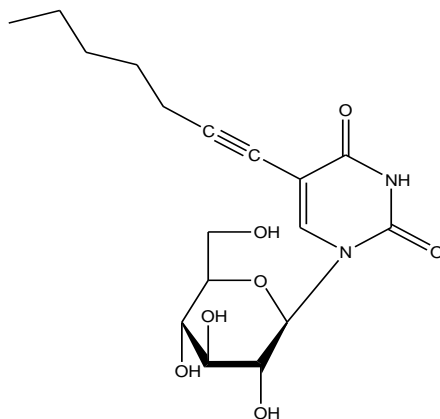
Ταυτοποίηση Με ^{13}C -NMR



ΕΙΚΟΝΑ 4.4 : Φάσμα ^{13}C -NMR της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυνυλουρακίλης

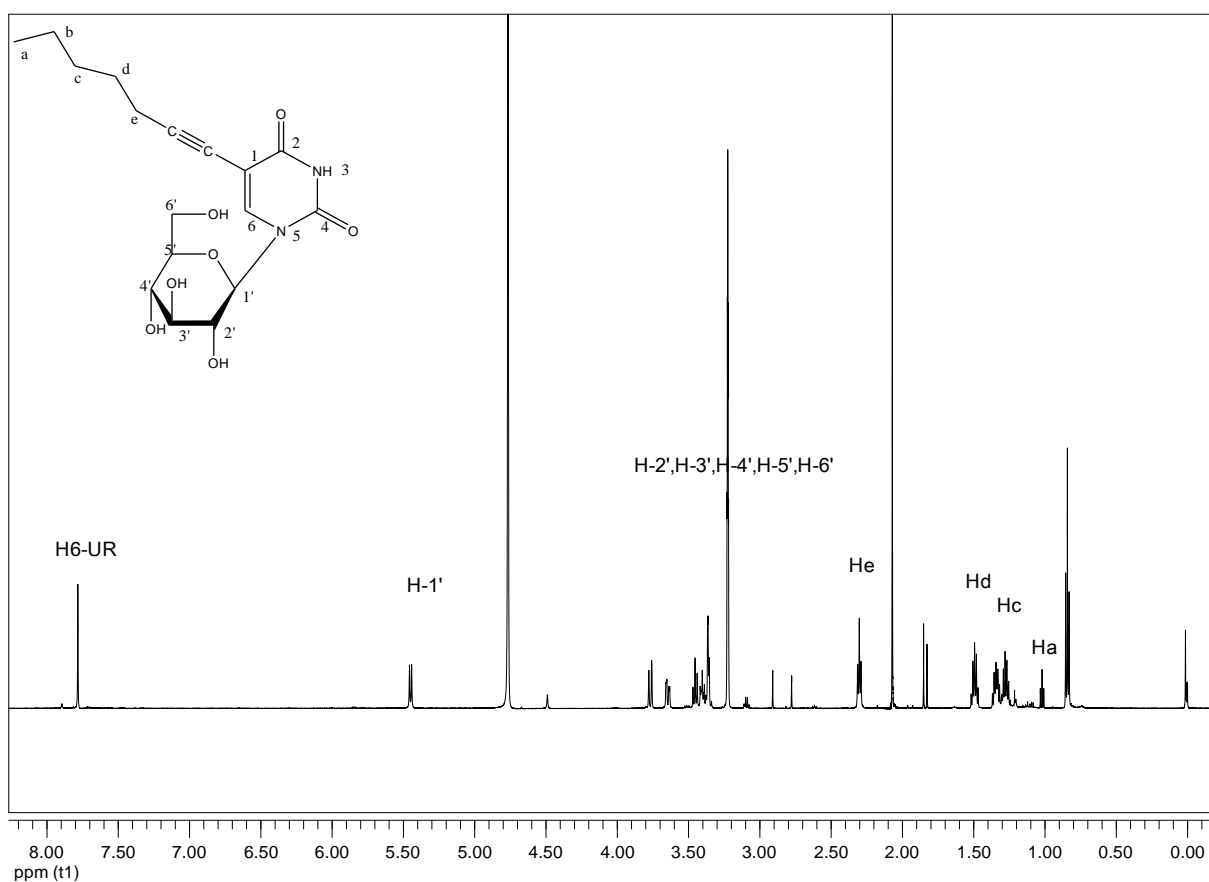
Στο φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυλοουρακίλης εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις χαμηλού πεδίου των καρβονυλικών ανθράκων της βάσης, στην περιοχή χαμηλού πεδίου του φάσματος και συγκεκριμένα πρώτα εμφανίζεται η κορυφή που αποδίδεται στον άνθρακα του αλλυλικού καρβονυλίου, ο οποίος και συντονίζεται σε χαμηλότερο πεδίο από τον έτερο καρβονυλικό άνθρακα λόγω του π συστήματος που δημιουργείται με τη συμμετοχή των p-τροχιακών του καρβονυλίου και αυτών του γειτονικού βινυλικού δεσμού και έχει ως αποτέλεσμα τον απεντοπισμό του ηλεκτρονιακού του νέφους στο σύστημα και την αναμενόμενη αποπροστασία του καρβονυλοάνθρακα σε χημική μετατόπιση 165δ. Έπεται η απορρόφηση του έτερου καρβονυλικού άνθρακα που συντονίζεται σε περιοχή χαμηλού πεδίου 145δ, όντας σε ασθενές ηλεκτρονικό περιβάλλον λόγω του ηλεκτραρνητικού καρβονυλικού οξυγόνου. Ακολουθεί η απορρόφηση του sp^2 υβριδισμένου βινυλικού άνθρακα και έπειτα αυτή του αλκυλικού σε 100 και 90δ αντίστοιχα. Κάτω από τα 90δ ακολουθούν οι απορροφήσεις όλων των sp^3 υβριδισμένων αλειφατικών ανθράκων του μορίου οι οποίοι και συντονίζονται σε περιοχές υψηλότερου πεδίου όντας περισσότερο ηλεκτρονικά προστατευμένοι. Χαρακτηριστικά στην περιοχή 55-85δ συντονίζονται οι άνθρακες του σακχάρου και στην περιοχή πολύ υψηλού πεδίου 10-25δ οι αλειφατικοί άνθρακες του υδρογοναθρακικού υποκαταστάτη της βάσης. Ο λόγος που οι άνθρακες του σακχάρου συντονίζονται σε περιοχή χαμηλότερου πεδίου είναι η γειτνίαση με τα ηλεκτραρνητικά άτομα άνθρακα των υδροξυλομάδων του σακχάρου δεδομένου ότι οι δεσμοί C-OH είναι πολωμένοι προς την κατεύθυνση του O, με τον C να εμφανίζει μερικό θετικό φορτίο δ^+ με μετατόπιση του ηλεκτρονικού φορτίου προς το O με συνέπεια την αποπροστασία του C και την απορρόφηση σε χαμηλότερο πεδίο από τους αλειφατικούς του υποκαταστάτη της βάσης. Χαρακτηριστικά δε από τους άνθρακες του σακχάρου σε χαμηλότερο πεδίο απορροφά ο αιθερικός C1'.

ii) Ταυτοποίηση της 1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)- 5-επτυνυλοουρακίλης



ΕΙΚΟΝΑ 4.5 : Η δομή της 1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)- 5-επτυνυλοουρακίλης

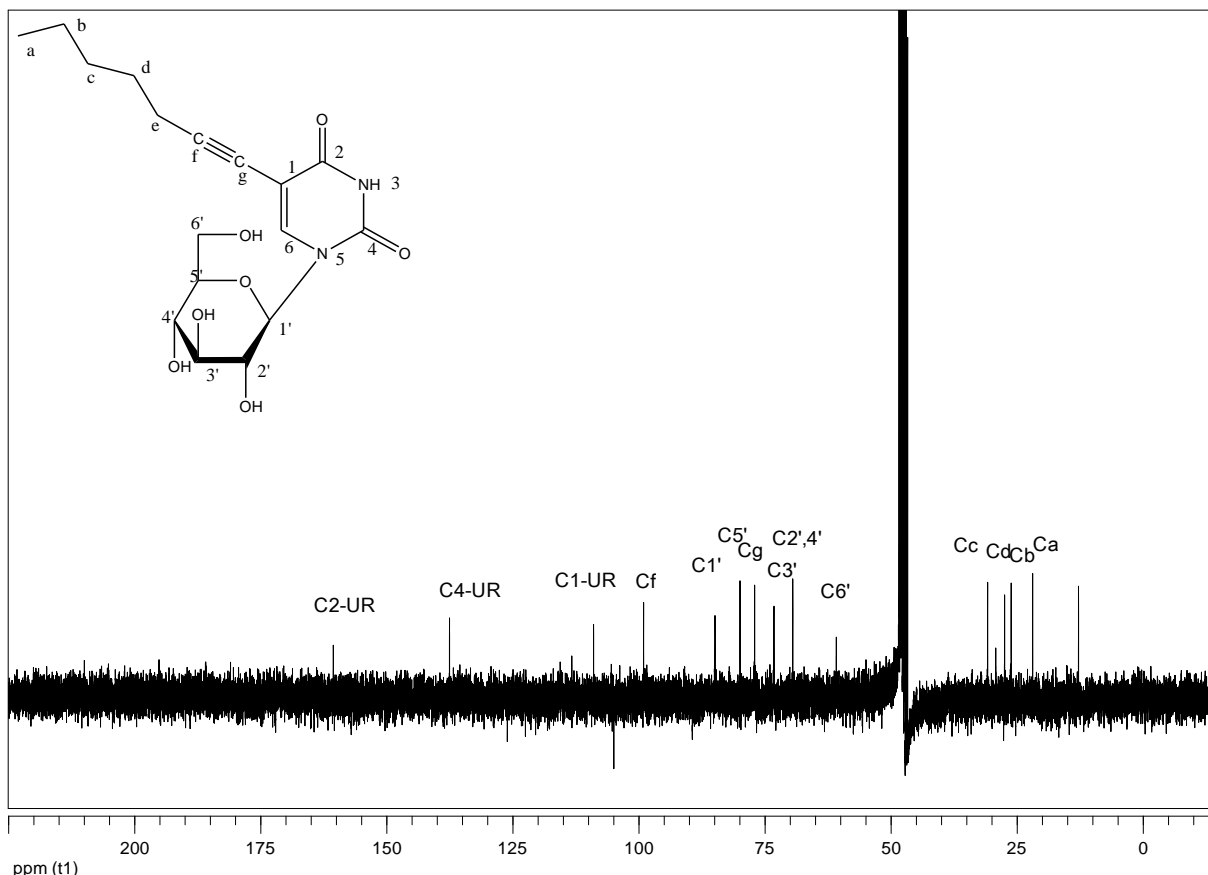
Ταυτοποίηση με $^1\text{H-NMR}$



ΕΙΚΟΝΑ 4.6 : Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της 1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)- 5-επτυνυλοουρακίλης

Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης 1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)- 5-επτυνυλοουρακίλης το σήμα πρωτονίου της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια απλή κορυφή στην περιοχή των 7.9 ppm. Το H-6UR της ετεροκυκλικής βάσης είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο του μορίου λόγω της ύπαρξης του π-συστήματος της βάσης που απογυμνώνει το πρωτόνιο από το ηλεκτρονικό του φορτίο με αποτέλεσμα την απορρόφηση σε αυτή την περιοχή εξαιρετικά χαμηλού πεδίου. Ακολουθεί το αιθερικό πρωτόνιο H-1' του σακχάρου σαν μία διπλή κορυφή, ελαφρώς μετατοπισμένη σε περιοχή χαμηλότερου πεδίου (5,5δ) καθώς αποπροστατεύεται από το απεντοπισμένο ηλεκτρονικό νέφος του π-συστήματος της ετεροκυκλικής βάσης. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,2 έως 3,9 δ αποπροστατευμένα από την παρουσία του ηλεκτραρνητικού ατόμου O στον αυτό άνθρακα. Τέλος ακολουθούν οι απορροφήσεις των πρωτονίων He, Hd, Hc, Hb, Ha σε σαφώς υψηλότερες τιμές πεδίου. Περισσότερο αποπροστατευμένα τα He με απορρόφηση σε χημική μετατόπιση 2,45δ λόγω της αποπροστασίας που προκαλεί ο γειτονικός τριπλός δεσμός, σχάζεται σε μία τριπλή κορυφή από τα δύο γειτονικά πρωτόνια Hd. Ακολουθεί η απορρόφηση των Hd σαν μία πολλαπλή κορυφή και τέλος τα Hb και Hc απορροφούν σε περιοχές πεδίου 1,2 με 1,45δ ως αλληλεπικαλυπτόμενες πολλαπλές κορυφές. Τέλος τα περισσότερο προστατευμένα Ha απορροφούν στη περιοχή πολύ υψηλού πεδίου 1,0 δ και εμφανίζονται σαν μία τριπλή κορυφή. Σημειώνεται ότι το πρωτόνιο H-3 της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που λαμβάνει χώρα μεταξύ αυτού και του διαλύτη (μεθανόλη).

Ταυτοποίηση Με ^{13}C -NMR

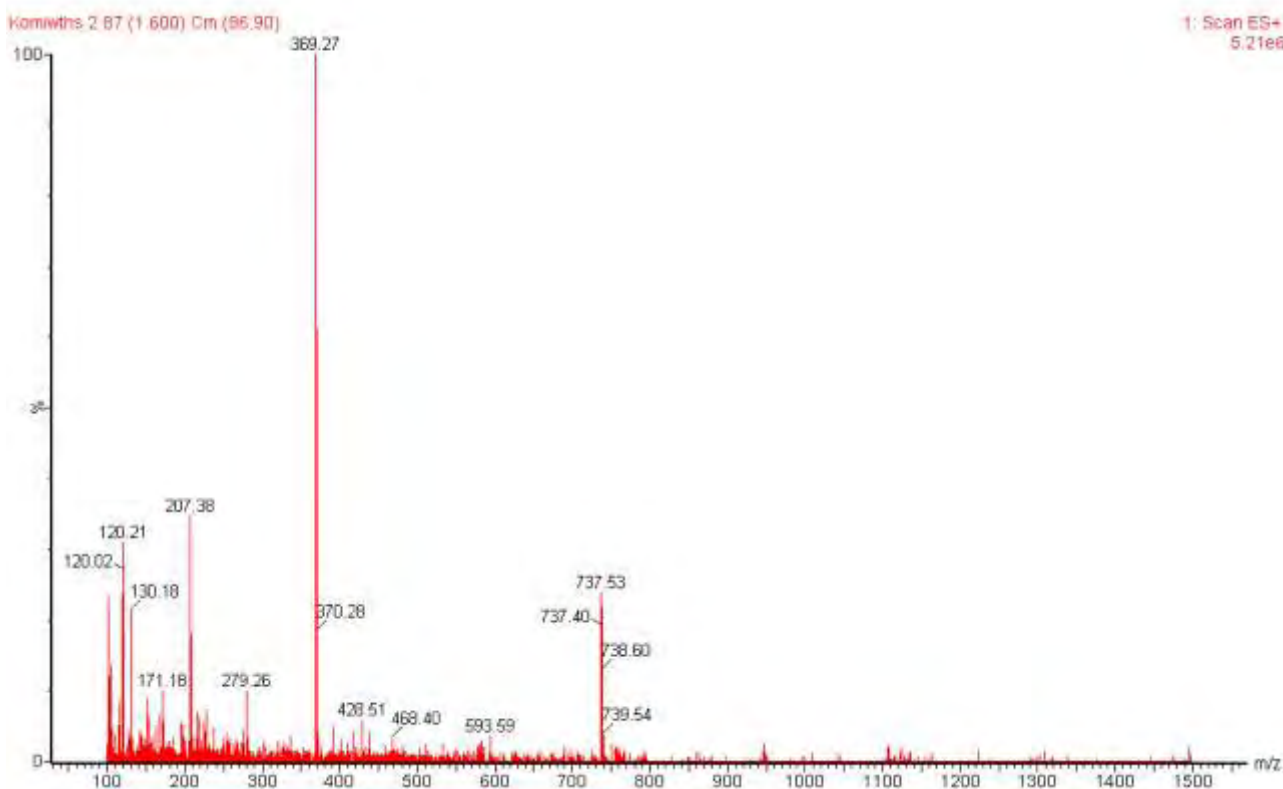


ΕΙΚΟΝΑ 4.7 : Φάσμα ^{13}C - NMR της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-επτυνυλοουρακίλης

Στο φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-επτυνυλοουρακίλης εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις χαμηλού πεδίου των καρβονυλικών ανθράκων της βάσης, στην περιοχή χαμηλού πεδίου του φάσματος και συγκεκριμένα πρώτα εμφανίζεται η κορυφή που αποδίδεται στον άνθρακα του αλλυλικού καρβονυλίου, ο οποίος και συντονίζεται σε χαμηλότερο πεδίο από τον έτερο καρβονυλικό άνθρακα λόγω του π συστήματος που δημιουργείται με τη συμμετοχή των p-τροχιακών του καρβονυλίου και αυτών του γειτονικού βινυλικού δεσμού και έχει ως αποτέλεσμα τον απεντοπισμό του ηλεκτρονιακού του νέφους στο σύστημα και την αναμενόμενη αποπροστασία του καρβονυλοάνθρακα σε χημική μετατόπιση 160δ. Έπεται η απορρόφηση του έτερου καρβονυλικού άνθρακα που συντονίζεται σε περιοχή χαμηλού πεδίου 140δ, όντας σε ασθενές ηλεκτρονικό περιβάλλον λόγω του ηλεκτραρνητικού καρβονυλικού οξυγόνου. Ακολουθεί η απορρόφηση του sp^2 υβριδισμένου βινυλικού άνθρακα και έπειτα αυτή του αλκυλικού σε 110

και 80δ αντίστοιχα. Κάτω από τα 90δ ακολουθούν οι απορροφήσεις όλων των sp^3 υβριδισμένων αλειφατικών ανθράκων του μορίου οι οποίοι και συντονίζονται σε περιοχές υψηλότερου πεδίου όντας περισσότερο ηλεκτρονικά προστατευμένοι. Χαρακτηριστικά στην περιοχή 55-85δ συντονίζονται οι άνθρακες του σακχάρου και στην περιοχή πολύ υψηλού πεδίου 10-30δ οι αλειφατικοί άνθρακες του υδρογοναθρακικού υποκαταστάτη της βάσης. Ο λόγος που οι άνθρακες του σακχάρου συντονίζονται σε περιοχή χαμηλότερου πεδίου είναι η γεινίαση με τα ηλεκτραρνητικά άτομα άνθρακα των υδροξυλομάδων του σακχάρου δεδομένου ότι οι δεσμοί C-OH είναι πολωμένοι προς την κατεύθυνση του O, με τον C να εμφανίζει μερικό θετικό φορτίο δ^+ με μετατόπιση του ηλεκτρονικού φορτίου προς το O με συνέπεια την αποπροστασία του C και την απορρόφηση σε χαμηλότερο πεδίο από τους αλειφατικούς του υποκαταστάτη της βάσης. Χαρακτηριστικά δε από τους άνθρακες του σακχάρου σε χαμηλότερο πεδίο απορροφά ο αιθερικός C1'.

Ταυτοποίηση με GC-MS

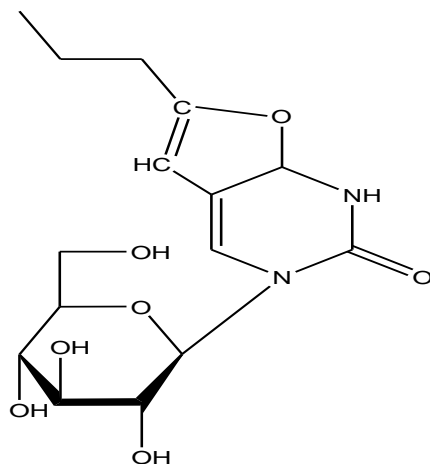


ΕΙΚΟΝΑ 4.8 : Φάσμα μαζών της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-επτυλοουρακίλης

Το θραύσμα που είναι χαρακτηριστικό του μοριακού ιόντος της ένωσης φαίνεται σε:

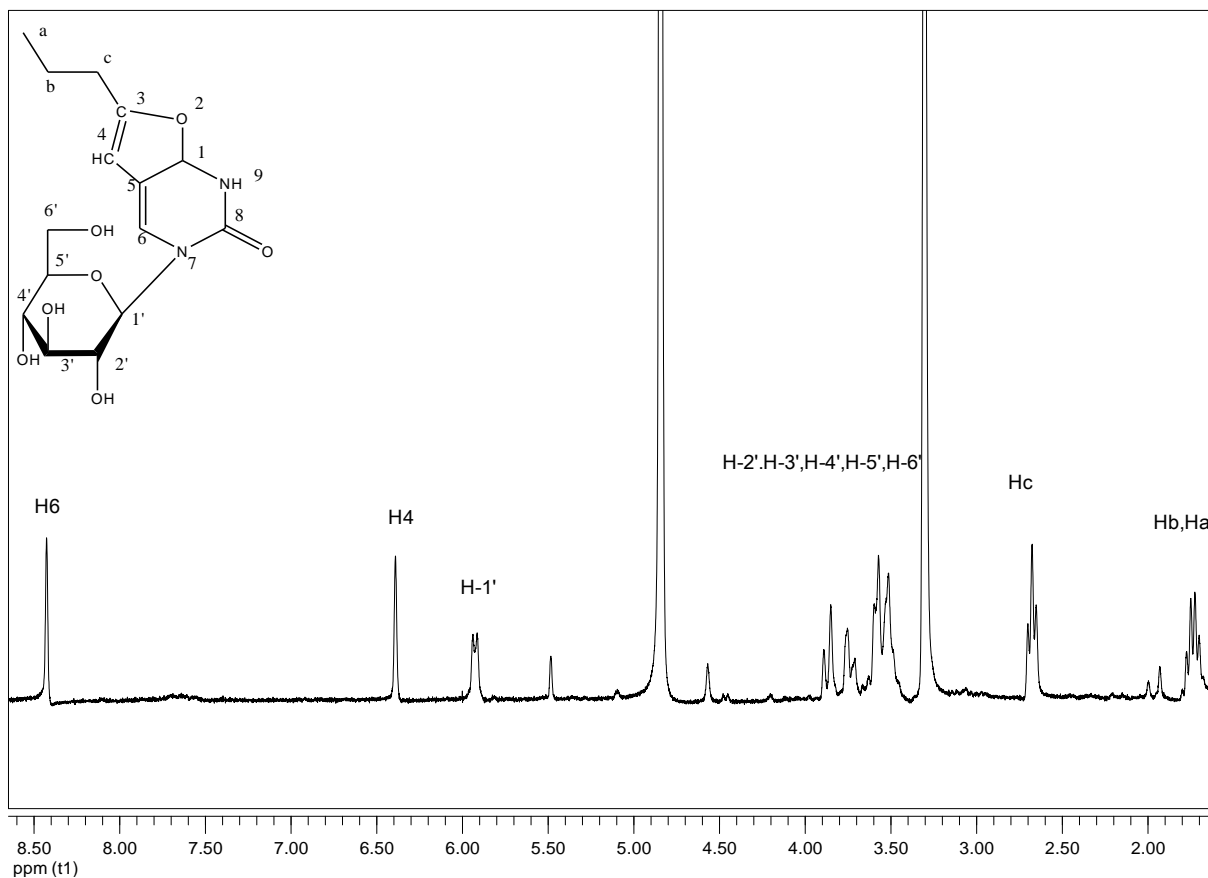
$$(M+H)^{+1}(m/z) = 369.27$$

iii) Ταυτοποίηση της 6-n-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης



ΕΙΚΟΝΑ 4.9 : Η δομή της 6-n-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης

Γαυτοποίηση με $^1\text{H-NMR}$

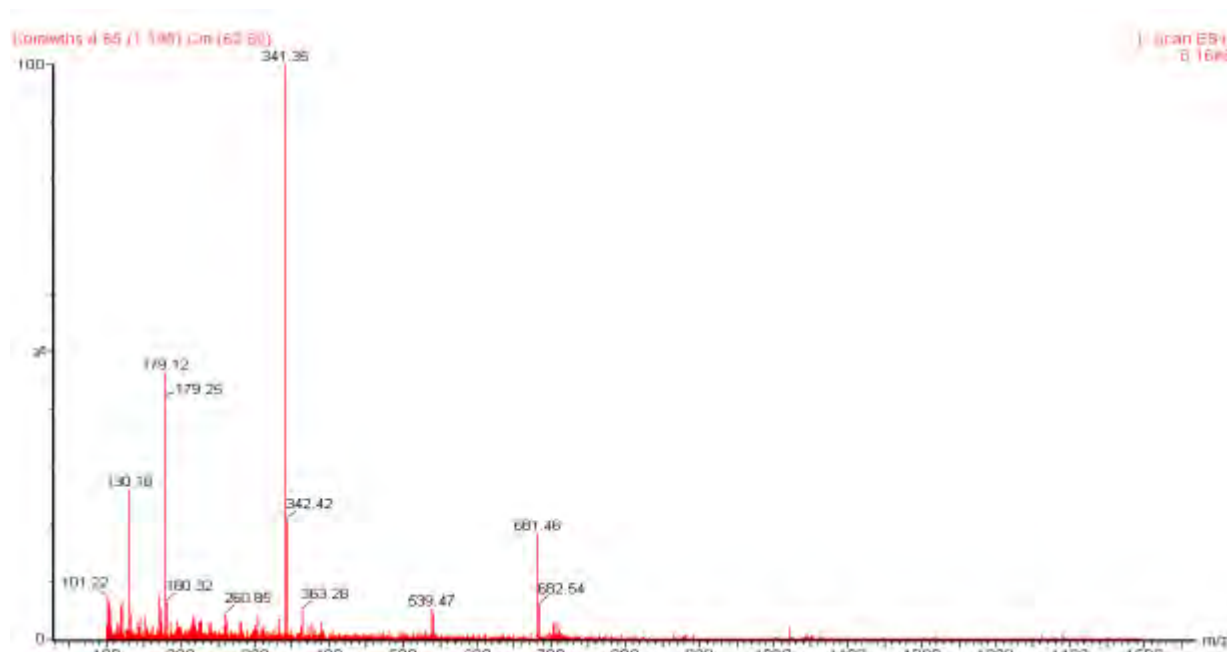


ΕΙΚΟΝΑ 4.10 : Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της 6-n-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης

Στο φάσμα $^1\text{H NMR}$ της ένωσης 6-n-προπυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης το σήμα πρωτονίου της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια απλή κορυφή στην περιοχή των 8.4 ppm. Το H-6 της ετεροκυκλικής βάσης είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο του μορίου λόγω της ύπαρξης του π-συστήματος της βάσης που απογυμνώνει το πρωτόνιο από το ηλεκτρονικό του φορτίο με αποτέλεσμα την απορρόφηση σε αυτή την περιοχή εξαιρετικά χαμηλού πεδίου. Ακολουθεί το H-4 που δίνει μία χαρακτηριστική απλή κορυφή στα 6,48 χαρακτηριστική βινυλικού πρωτονίου με απεντοπισμένο το ηλεκτρονικό του νέφος στο π-δεσμό. Ακολουθεί το αιθερικό πρωτόνιο H-1' του σακχάρου σαν μία διπλή κορυφή, ελαφρώς μετατοπισμένη σε περιοχή χαμηλοτερου πεδίου (5,9δ) καθώς

αποπροστατεύεται από το απεντοπισμένο ηλεκτρονικό νέφος του π-συστήματος της ετεροκυκλικής βάσης. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,2 έως 3,9 δ αποπροστατευμένα από την παρουσία του ηλεκτραρνητικού ατόμου Ο στον αυτό άνθρακα. Τέλος ακολουθούν οι απορροφήσεις των δυο ισοδύναμων πρωτονίων Hc, των ισοδύναμων πρωτονίων Hb και των τριών ισοδυνάμων πρωτονίων Ha του υδρογονανθρακικού υποκαταστάτη. Τα πρωτόνια Hc απορροφούν σε χαμηλότερο πεδίο από τα άλλα δύο ισοδύναμα είδη καθώς αποπροστατεύονται μερικώς από τη γειτνίαση με το γειτονικό βινυλικό δεσμό, είναι δηλαδή αλληλικά και απαντούν στο φάσμα σαν μία τριπλή κορυφή στα 2,7δ. Τέλος η πολλαπλή κορυφή στα 1,7δ των Hb και στα 1,3δ περίπου η τριπλή κορυφή των τριών ισοδυνάμων αλειφατικών Ha σε αυτή την περιοχή υψηλού πεδίου. Σημειώνεται ότι το πρωτόνιο H-3 της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που λαμβάνει χώρα μεταξύ αυτού και του διαλύτη(μεθανόλη).

Ταυτοποίηση με GC-MS

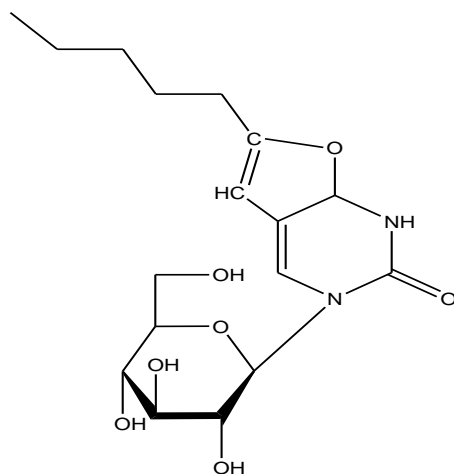


ΕΙΚΟΝΑ 4.13 : Φάσμα μαζών της 6-n-προπυλο-3-[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιдино-2-ονης

Το θραύσμα που είναι χαρακτηριστικό του μοριακού ιόντος της ένωσης φαίνεται σε:

$$(M+H)^+(m/z) = 342.42$$

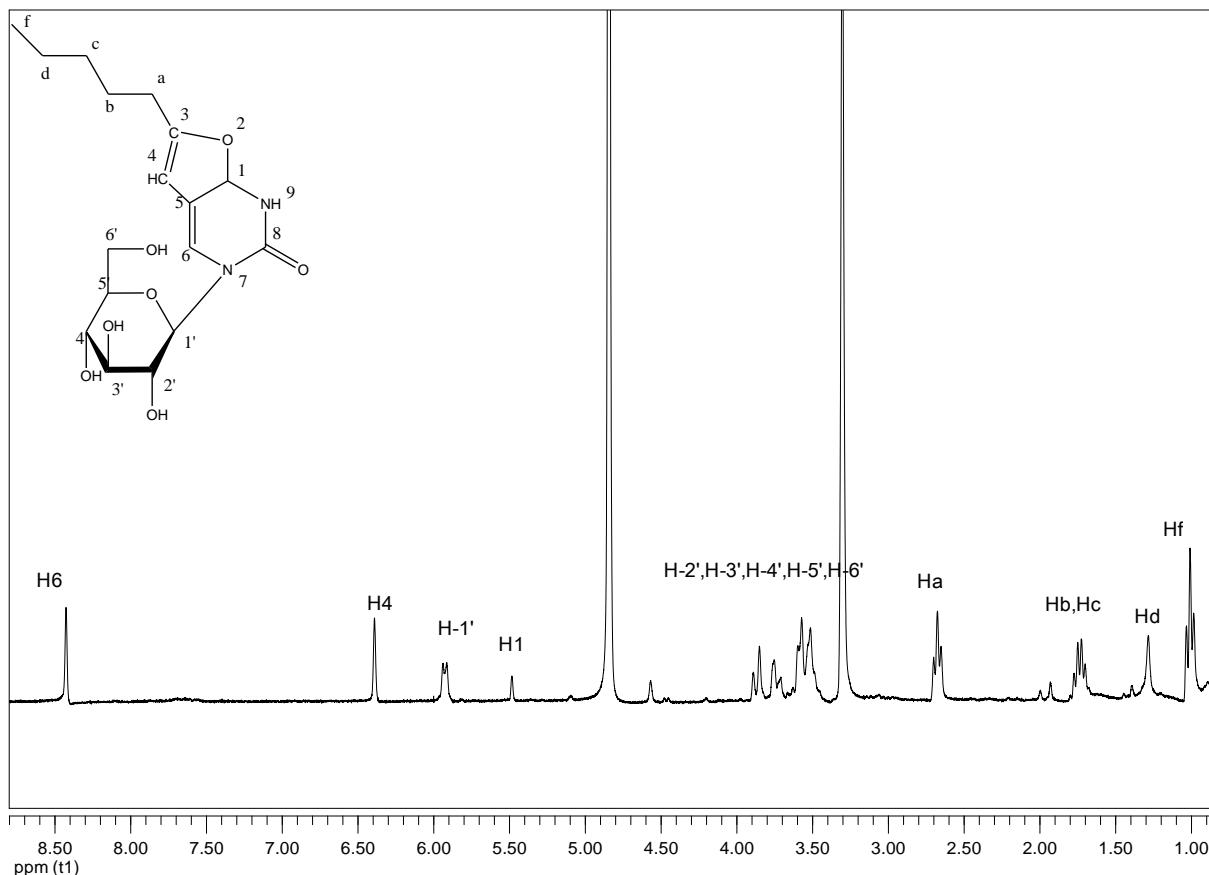
iv) Ταυτοποίηση της 6-n-πεντυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης



ΕΙΚΟΝΑ 4.11 : Η δομή της 6-n-πεντυλο-3[1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης

Μοριακό Βάρος = 370.4

Ταυτοποίηση με $^1\text{H-NMR}$

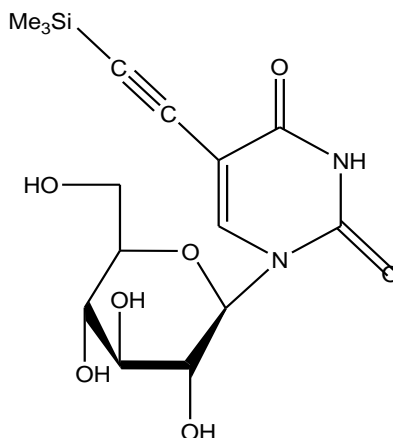


ΕΙΚΟΝΑ 4.12 : Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της 6-n-πεντυλο-3[1-(β -D-γλυκοπυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης

Στο φάσμα $^1\text{H NMR}$ της ένωσης 6-n-πεντυλο-3[1-(β -D-γλυκοπυρανοζυλο)-φουρανο[2,3-d]πυριμιδινο-2-ονης το σήμα πρωτονίου H-6 της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια απλή κορυφή στην περιοχή των 8.4 ppm. Το H-6 της ετεροκυκλικής βάσης είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο του μορίου λόγω της ύπαρξης του π -συστήματος της βάσης που απογυμνώνει το πρωτόνιο από το ηλεκτρονικό του φορτίο με αποτέλεσμα την απορρόφηση σε αυτή την περιοχή εξαιρετικά χαμηλού πεδίου. Ακολουθεί το H-4 που δίνει μία χαρακτηριστική απλή κορυφή στα 6,4 δ χαρακτηριστική βινυλικού πρωτονίου με απεντοπισμένο το ηλεκτρονικό του νέφος στο π -δεσμό. Έπειτα το H-1', το αιθερικό πρωτόνιο του σακχάρου, ακολουθούμενο από το επίσης αιθερικό πρωτόνιο H-1' της βάσης σαν μία

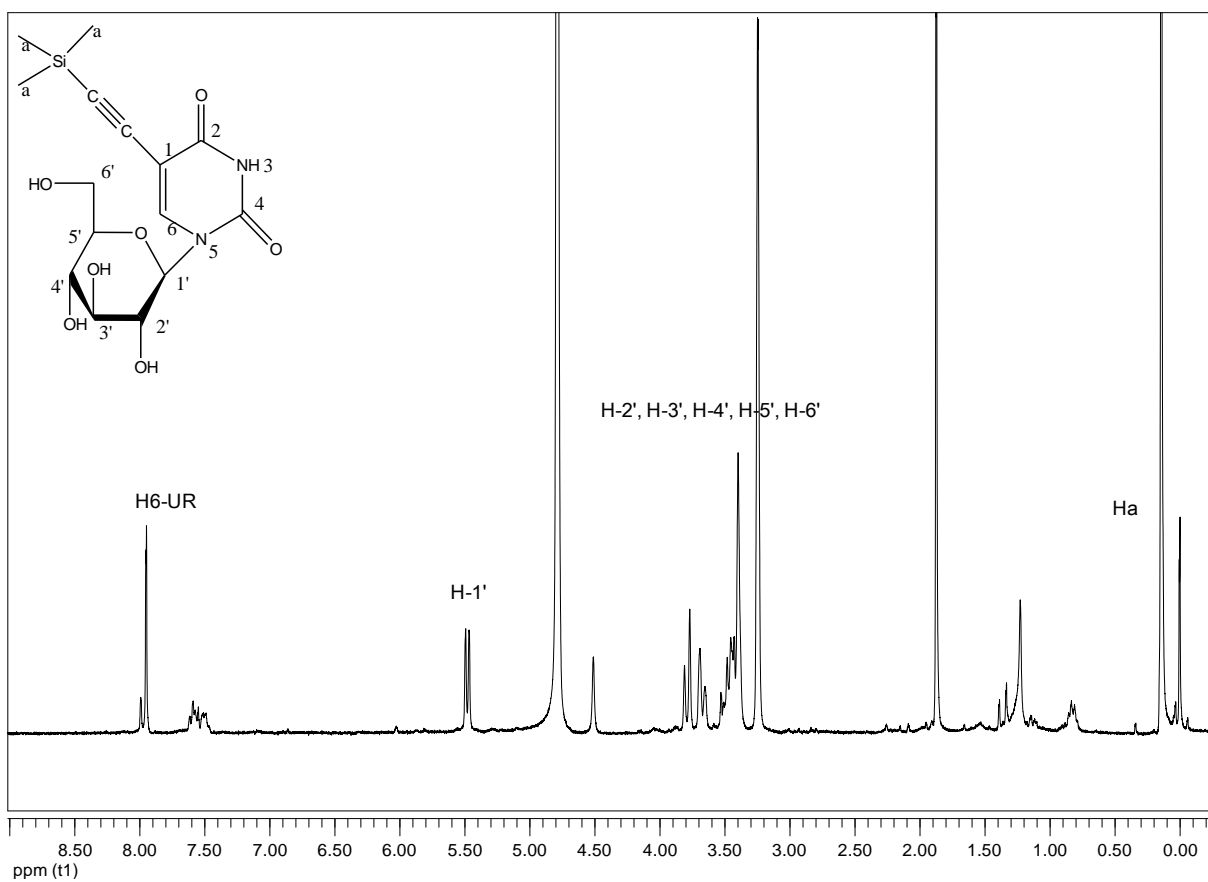
απλή κορυφή ,ελαφρώς μετατοπισμένη σε περιοχή χαμηλοτερου πεδίου (5,5δ) καθώς αποπροστατεύεται από το απεντοπισμένο ηλεκτρονικό νέφος του π-συστήματος της ετεροκυκλικής βάσης. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,2 έως 3,9 δ αποπροστατευμένα από την παρουσία του ηλεκτραρνητικού ατόμου Ο στον αυτό άνθρακα. Ακολουθεί η απορρόφηση του ισοδύναμου είδους των αλληλικών πρωτονίων Ha , αποπροστατευμένων από τον γειτονικό βινυλικό δεσμό σαν μία τριπλή κορυφή στα 2,7δ,έπειτα πολλαπλές αλληπικαλυπτόμενες από τα Hb ,Hc ισοδύναμα είδη πρωτονίων στην περιοχή 1,6 – 1,8 δ ,το ισοδύναμο είδος πρωτονίων Hd σε τιμή πεδίου 1,3δ και τέλος τα πρωτόνια Ha σαν μία τριπλή κορυφή σε πολύ υψηλή τιμή πεδίου χαρακτηριστική μεθυλικών πρωτονίων σε χημική μετατόπιση 1,0δ. Σημειώνεται ότι το πρωτόνιο H-3 της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που λαμβάνει χώρα μεταξύ αυτού και του διαλύτη(μεθανόλη).

ν) Ταυτοποίηση της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυλοουρακίλης



ΕΙΚΟΝΑ 4.14 : Η δομή της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυλοουρακίλης

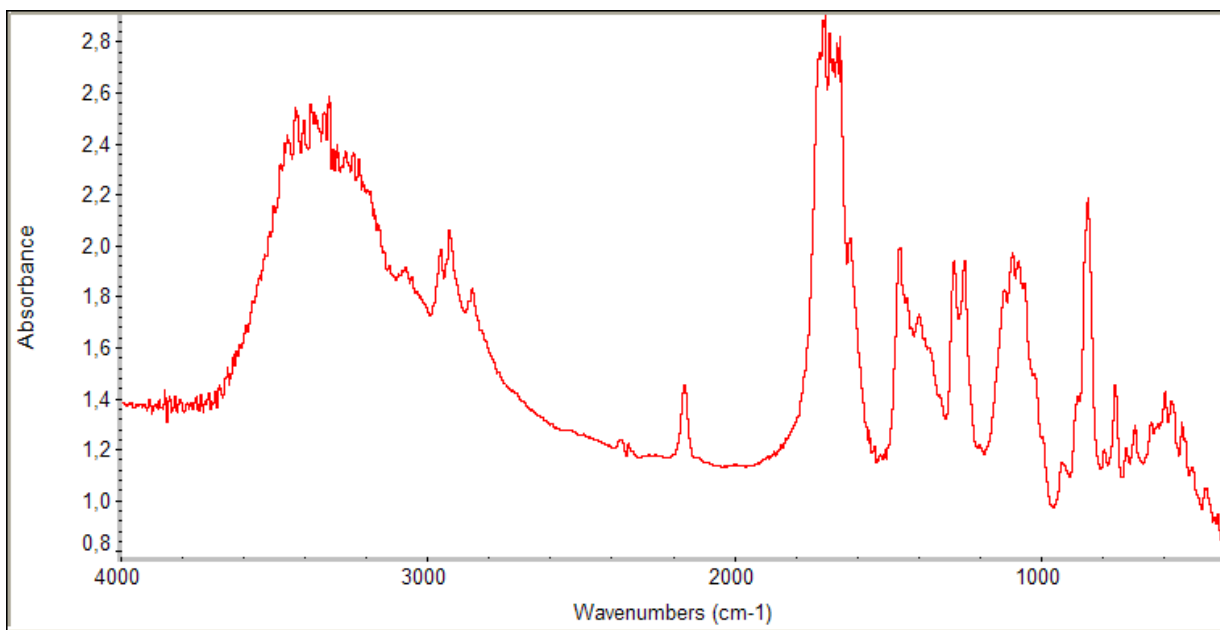
Ταυτοποίηση με $^1\text{H-NMR}$



ΕΙΚΟΝΑ 4.15 : Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυλοουρακίλης

Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυνο-ουρακίλης το σήμα πρωτονίου της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια απλή κορυφή στην περιοχή των 8,0δ. Το H-6 της ετεροκυκλικής βάσης είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο του μορίου λόγω της ύπαρξης του π-συστήματος της βάσης που απογυμνώνει το πρωτόνιο από το ηλεκτρονικό του φορτίο με αποτέλεσμα την απορρόφηση σε αυτή την περιοχή εξαιρετικά χαμηλού πεδίου. Ακολουθεί το αιθερικό πρωτόνιο H-1' του σακχάρου σαν μία διπλή κορυφή, ελαφρώς μετατοπισμένη σε περιοχή χαμηλότερου πεδίου (5,5δ) καθώς αποπροστατεύεται από το απεντοπισμένο ηλεκτρονικό νέφος του π-συστήματος της ετεροκυκλικής βάσης. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,2 έως 3,9 δ αποπροστατευμένα από την παρουσία του ηλεκτραρνητικού ατόμου O στον αυτό άνθρακα. Τέλος ακολουθεί η απορρόφηση των 9 ισοδύναμων πρωτονίων που ανήκουν στους 3 μεθυλοποκαταστάτες του Si σαν μία απλή κορυφή σε πολύ υψηλό πεδίο(0,5δ), ελάχιστα χαμηλότερα από το TMS(τετραμεθυλοσιλάνιο), που χρησιμοποιείται άλλωστε σαν σημείο αναφοράς μηδενικής απορρόφησης. Σημειώνεται ότι το πρωτόνιο H-3 της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που λαμβάνει χώρα μεταξύ αυτού και του διαλύτη(μεθανόλη).

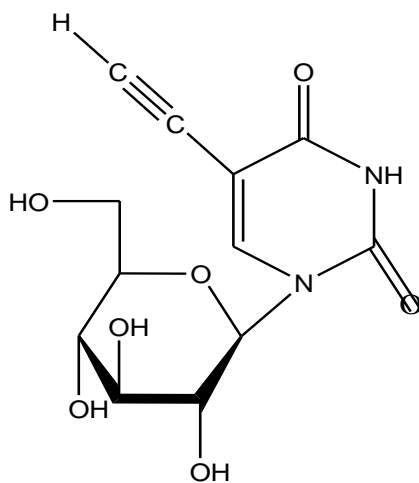
Ταυτοποίηση με IR



ΕΙΚΟΝΑ 4.16 : Φάσμα υπερόθρου της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθινυλο-ουρακίλης

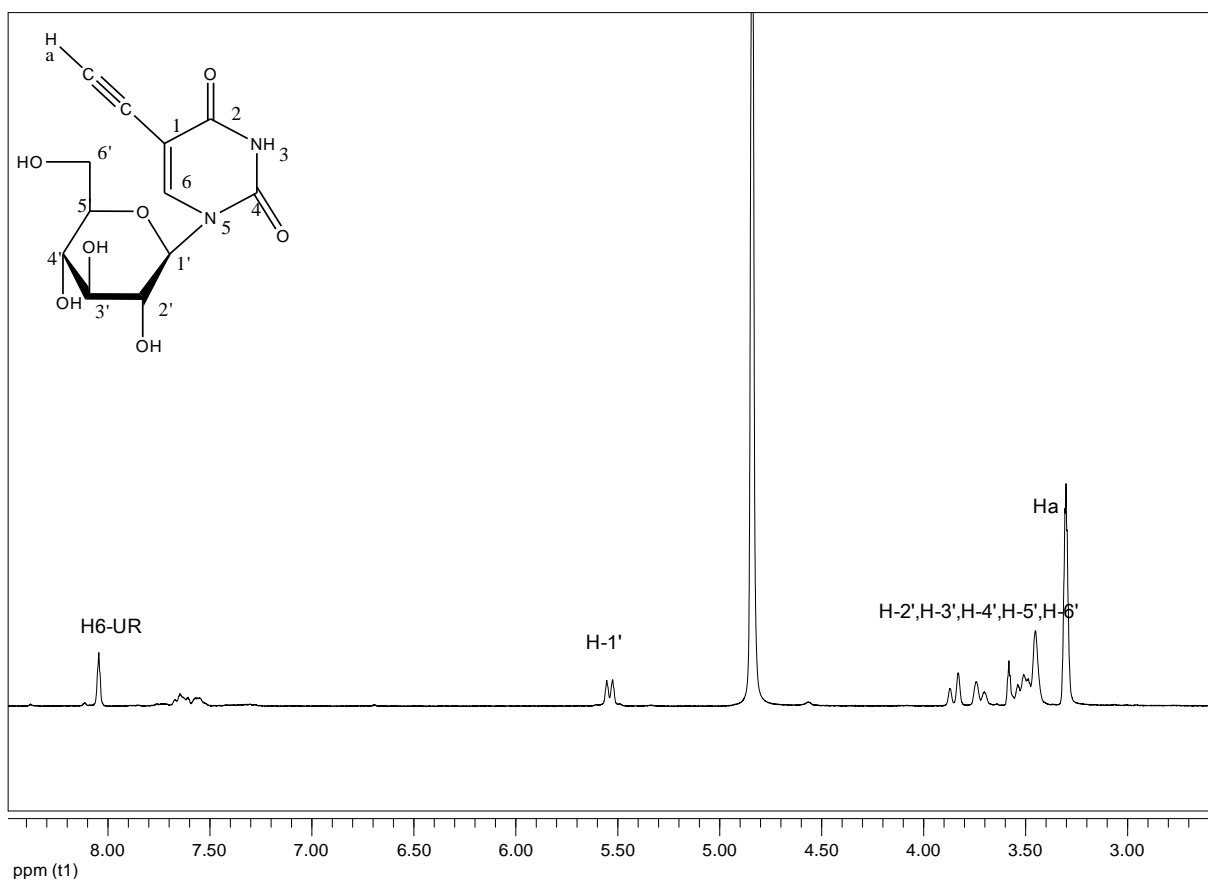
Από το παραπάνω φάσμα IR φαίνεται η χαρακτηριστική απορρόφηση τάσης του δεσμού $C\equiv C$ στα 2180 cm^{-1} η οποία και είναι η σχετική χαρακτηριστική απορρόφηση εσωτερικών αλκυνίων ,υψηλής διαγνωστικής αξίας όσον αφορά την εξακρίβωση της δομής της υπο διερεύνηση ένωσης. Επίσης άλλες δύο απορροφήσεις υψηλής διαγνωστικής αξίας είναι η δόνηση τάσης του δεσμού $C=O$ που εμφανίζει δύο χαρακτηριστικές απορροφήσεις ,μία περι τα 1715 cm^{-1} η οποία και είναι χαρακτηριστική απορρόφηση κυκλικών εξαμελών κετονών και μία δεύτερη περί τα 1690 cm^{-1} που αφορά το αλλυλικό ως προς τον βινυλικό άνθρακα της βάσης καρβονύλιο.

vi) Ταυτοποίηση της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθινυλο-ουρακίλης



ΕΙΚΟΝΑ 4.17 : Η δομή της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθινυλο-ουρακίλης

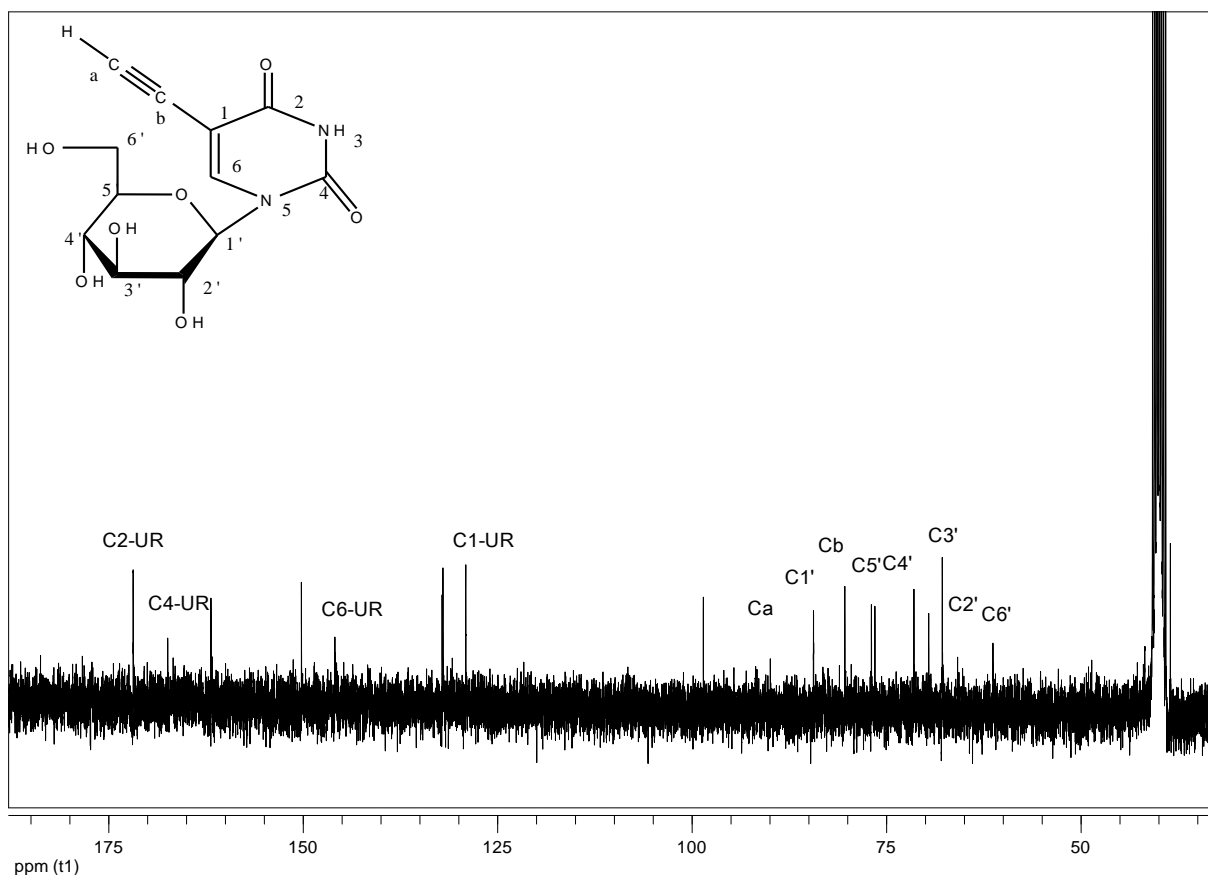
Ταυτοποίηση με $^1\text{H-NMR}$



ΕΙΚΟΝΑ 4.18 : Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθινυλο-ουρακίλης

Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-πεντυνυλοουρακίλης το σήμα πρωτονίου της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια απλή κορυφή στην περιοχή των 7.9 ppm. Το H-6 της ετεροκυκλικής βάσης είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο του μορίου λόγω της ύπαρξης του π-συστήματος της βάσης που απογυμνώνει το πρωτόνιο από το ηλεκτρονικό του φορτίο με αποτέλεσμα την απορρόφηση σε αυτή την περιοχή εξαιρετικά χαμηλού πεδίου. Ακολουθεί το αιθερικό πρωτόνιο H-1' του σακχάρου σαν μία διπλή κορυφή, ελαφρώς μετατοπισμένη σε περιοχή χαμηλότερου πεδίου (5,6δ) καθώς αποπροστατεύεται από το απεντοπισμένο ηλεκτρονικό νέφος του π-συστήματος της ετεροκυκλικής βάσης. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,2 έως 3,9 δ αποπροστατευμένα από την παρουσία του ηλεκτραρνητικού ατόμου O στον αυτό άνθρακα. Τέλος ακολουθεί η απορρόφηση του αλκυλικού πρωτονίου Hα που εμφανίζεται σαν μια απλή κορυφή σε χημική μετατόπιση 3,25δ, μερικώς αποπροστατευμένο λόγω του π-δεσμού. Σημειώνεται ότι το πρωτόνιο H-3 της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που λαμβάνει χώρα μεταξύ αυτού και του διαλύτη (μεθανόλη).

Ταυτοποίηση Με ^{13}C -NMR

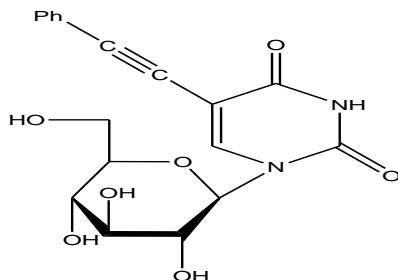


ΕΙΚΟΝΑ 4.19 : Φάσμα ^{13}C -NMR της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθυλο-ουρακίλης

Στο φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθυλο-ουρακίλης εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις χαμηλού πεδίου των καρβονυλικών ανθράκων της βάσης, στην περιοχή χαμηλού πεδίου του φάσματος και συγκεκριμένα πρώτα εμφανίζεται η κορυφή που αποδίδεται στον άνθρακα του αλλυλικού καρβονυλίου, ο οποίος και συντονίζεται σε χαμηλότερο πεδίο από τον έτερο καρβονυλικό άνθρακα λόγω του π συστήματος που δημιουργείται με τη συμμετοχή των p-τροχιακών του καρβονυλίου και αυτών του γειτονικού βινυλικού δεσμού και έχει ως αποτέλεσμα τον απεντοπισμό του ηλεκτρονιακού του νέφους στο σύστημα και την αναμενόμενη αποπροστασία του καρβονυλοάνθρακα σε χημική μετατόπιση 172.5δ. Έπεται η απορρόφηση του έτερου καρβονυλικού άνθρακα που συντονίζεται σε περιοχή χαμηλού πεδίου 162.5δ, όντας σε ασθενές ηλεκτρονικό περιβάλλον λόγω του ηλεκτραρνητικού καρβονυλικού οξυγόνου. Ακολουθεί η απορρόφηση των sp^2 υβριδισμένου βινυλικών ανθράκων σε 146 και 130δ

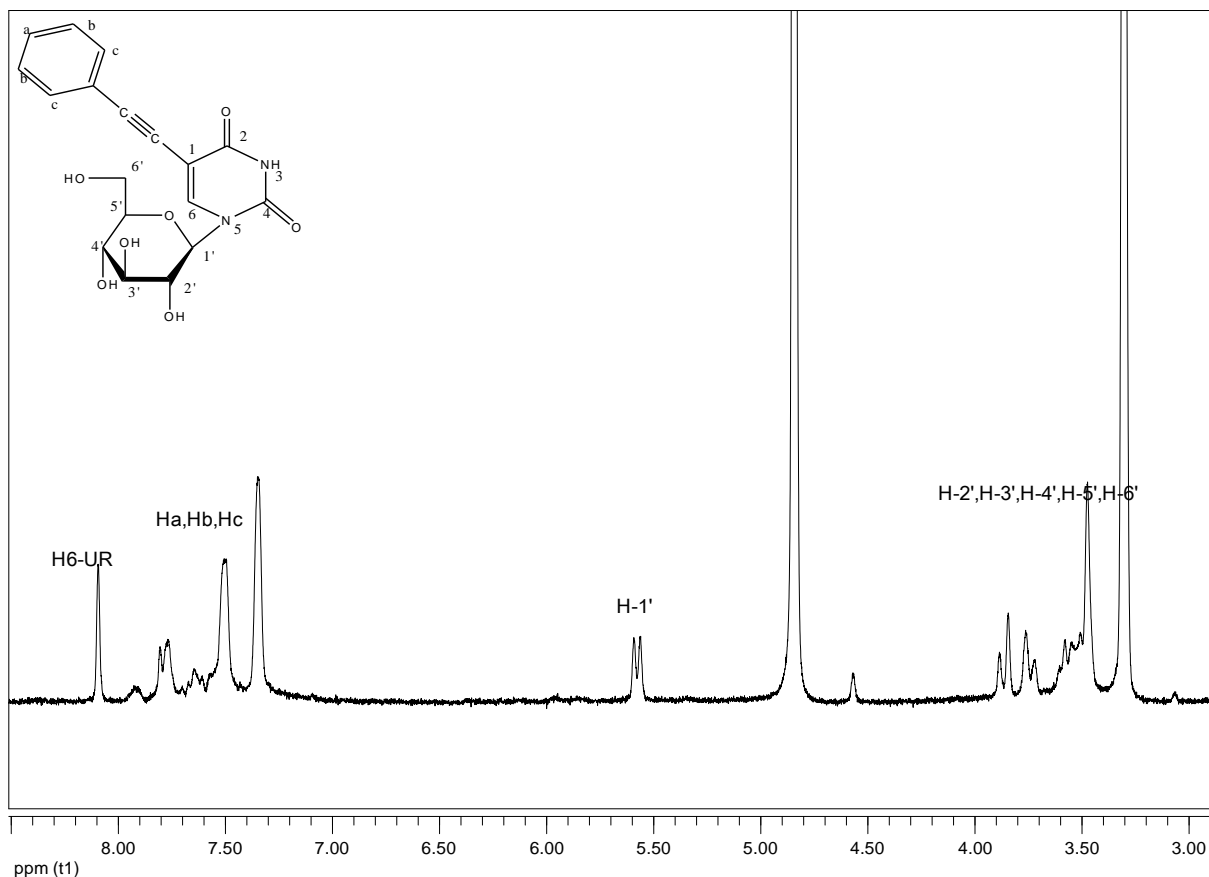
αντίστοιχα. Έπειτα οι απορροφήσεις των ανθράκων ακραίου αλκυνίου του αιθυνολουποκαταστάτη σε 90 και 80 δ αντίστοιχα. Κάτω από τα 85δ ακολουθούν οι απορροφήσεις όλων των sp^3 υβριδισμένων αλειφατικών ανθράκων του μορίου. Χαρακτηριστικά στην περιοχή 55-85δ συντονίζονται οι άνθρακες του σακχάρου και ο λόγος που οι άνθρακες του σακχάρου συντονίζονται σε αυτή την περιοχή σχετικά χαμηλού για αλειφατικούς άνθρακες πεδίου είναι η γειτνίαση με τα ηλεκτραρνητικά άτομα άνθρακα των υδροξυλομάδων του σακχάρου δεδομένου ότι οι δεσμοί C-OH είναι πολωμένοι προς την κατεύθυνση του O, με τον C να εμφανίζει μερικό θετικό φορτίο δ^+ με μετατόπιση του ηλεκτρονικού φορτίου προς το O με συνέπεια την αποπροστασία του C και την απορρόφηση σε χαμηλότερο πεδίο από τους αλειφατικούς του υποκαταστάτη της βάσης. Χαρακτηριστικά δε από τους άνθρακες του σακχάρου σε χαμηλότερο πεδίο απορροφά ο αιθερικός C1'(85δ).

vii) Ταυτοποίηση της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-φαινλαιθουυλο-ουρακίλης



ΕΙΚΟΝΑ 4.20 : Η δομή της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-φαινλαιθουυλο-ουρακίλης

Ταυτοποίηση με ¹H-NMR



ΕΙΚΟΝΑ 4.21 : Φάσμα ¹H NMR της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-φαινλαιθουυλο-ουρακίλης

Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-φαινυλαιθινυλο-ουρακίλης το σήμα πρωτονίου της ετεροκυκλικής βάσης παρουσιάζεται πρώτα σαν μια απλή κορυφή στην περιοχή των 8.15 ppm. Το H-6 της ετεροκυκλικής βάσης είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο του μορίου λόγω της ύπαρξης του π-συστήματος της βάσης που απογυμνώνει το πρωτόνιο από το ηλεκτρονικό του φορτίο με αποτέλεσμα την απορρόφηση σε αυτή την περιοχή εξαιρετικά χαμηλού πεδίου. Συντονίζεται σε χαμηλότερη περιοχή πεδίου σε σχέση με τα αντίστοιχα βινυλικά πρωτόνια της βάσης των υπολοίπων αναλόγων λόγω της συνύπαρξης σε αυτή την περίπτωση του αρωματικού υποκαταστάτη του οποίου τα π-τροχιακά μαζί με αυτά της αιθινυλομάδας και των βινυλικών και καρβονυλικών της βάσης δημιουργούν ένα εξαιρετικά εκτεταμένο π-σύστημα που έλκει το ηλεκτρονικό νέφος του βινυλικού πρωτονίου H-6 σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό, αφήνοντας το ισχυρά αποπροστατευμένο να απορροφά σε αυτή την περιοχή χαμηλού πεδίου. Έπονται τα τρία ισοδύναμα είδη πρωτονίων του αρωματικού υποκαταστάτη τα οποία δίνουν τρεις πολλαπλές κορυφές στην περιοχή 7.25δ έως 7.75δ. Ακολουθεί το αιθερικό πρωτόνιο H-1' του σακχάρου σαν μία διπλή κορυφή, ελαφρώς μετατοπισμένη σε περιοχή χαμηλοτερου πεδίου (5,6δ) καθώς αποπροστατεύεται από το απεντοπισμένο ηλεκτρονικό νέφος του π-συστήματος της ετεροκυκλικής βάσης. Ακολουθούν τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου που απορροφούν επίσης στην περιοχή χαμηλού πεδίου 3,2 έως 3,9 δ αποπροστατευμένα από την παρουσία του ηλεκτραρνητικού ατόμου O στον αυτό άνθρακα.. Σημειώνεται ότι το πρωτόνιο H-3 της ετεροκυκλικής βάσης δεν εμφανίζεται στο φάσμα λόγω της ταχείας ανταλλαγής που λαμβάνει χώρα μεταξύ αυτού και του διαλύτη(μεθανόλη).

4.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ερευνητικές προσπάθειες για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως ιικές μολύνσεις, κακοήθεις νεοπλασίες, και υπεργλυκαιμικές νόσοι έχουν στραφεί στην ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα. Κύριος στόχος των ερευνητικών προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους και να έχουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα, όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

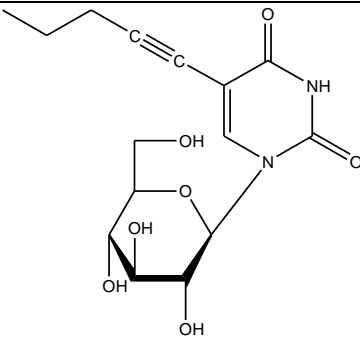
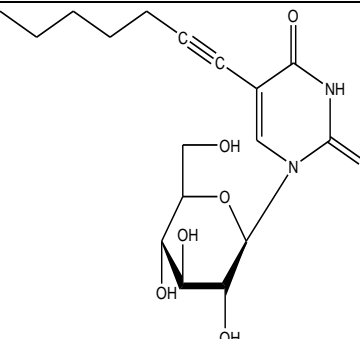
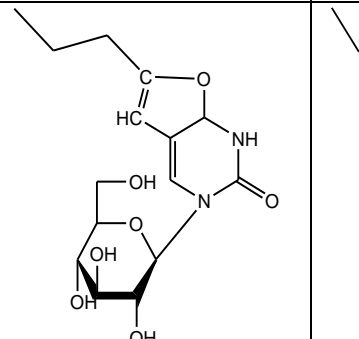
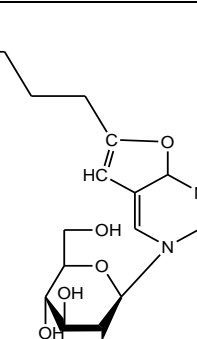
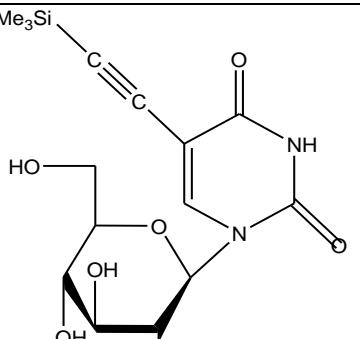
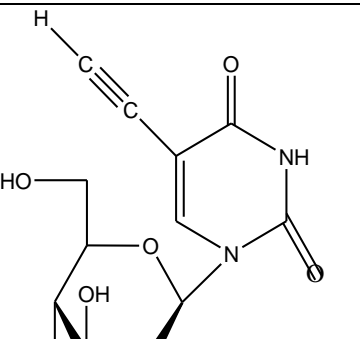
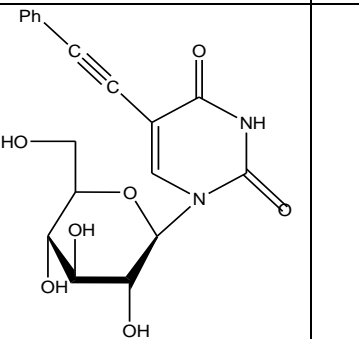
Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση μιας νέας τάξης γλυκοκυρανονουκλεοζιτών με πιθανή αντιδιαβητική δράση, η σύνθεση των οποίων έλαβε χώρα στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πραγματοποιήθηκε αναλυτική παρουσίαση των φασματοσκοπικών δεδομένων και έγινε επιτυχής αντιστοίχιση των δεδομένων αυτών στις υπό διερεύνηση ενώσεις.

4.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όσον αφορά την ικανότητα αναστολής του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που παρουσίασαν οι ενώσεις αυτές, θα ήταν φρόνιμο να γίνει μία σύντομη αναφορά στα κινητικά πειράματα που πραγματοποίησε ανεξάρτητα σχετικό εργαστήριο μελετώντας τη συγκεκριμένη δράση.

Πραγματοποιήθηκαν λοιπόν παράλληλα κινητικά πειράματα για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης των νέων C-5-αλκυνολο πυριμιδινό καθώς και των κυκλοποιημένων αναλόγων τους στο εργαστήριο είναι της δομικής και λειτουργικής βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου. Τα κινητικά πειράματα έδειξαν ότι αυτές οι ενώσεις είναι αναστολείς του ενζύμου με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονται μεταξύ 121 μM και 6145 μM. (ΠΙΝΑΚΑΣ I)

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι : Ικανότητα αναστολής φωσφορυλάσης

1	2	3	4
			
$IC_{50} = 765.8 \pm 9.6 \mu M$	$IC_{50} = 6145.8 \pm 237.6 \mu M$	$IC_{50} = 154.2 \pm 4.1 \mu M$	$IC_{50} = 121.8 \pm 0.1 \mu M$
5	6	7	
			
$IC_{50} = 839.3 \pm 28.5 \mu M$	$IC_{50} = 15.4 \pm 0.3 \mu M$	No inhibition at 1.0 mM	

Έγινε μέτρηση της ενεργότητας της GP ύστερα από την αλληλεπίδρασή της με τους παραπάνω αναστολείς και παρατηρώντας την τιμή IC_{50} μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την ανασταλτική δράση των ενώσεων. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή IC_{50} , τόσο μεγαλύτερη είναι η ενζυμική δραστηριότητα, δηλαδή τόσο λιγότερη ανασταλτική δράση έχουν οι ενώσεις μας.

Οι νουκλεοζίτες **3** και **4** είναι αρκετά ογκώδεις με αποτέλεσμα να δυσκολεύεται η διόδος τους στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και κατά συνέπεια η τιμή της IC_{50} σε αυτούς τους αναστολείς να είναι στα 121.8 μ M για την **4** και 154.2 μ M για την **3**. Στην ένωση **1** έγινε προσθήκη ενός πεντύνυλο υποκαταστάτη σχηματίζοντας έτσι μια «ουρά» στο τέλος του αναστολέα. Το μεγάλο μέγεθος δυσκολεύει ακόμα περισσότερο την διόδο του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο με αποτέλεσμα η τιμή της IC_{50} να αυξάνεται στα 765.8 μ M. Τέλος, η ένωση **2** είναι ο χειρότερος αναστολέας. Διαθέτει έναν επτύνυλο υποκαταστάτη στη θέση 5 της ουρακίλης. Η ουρά του τελικού αλκινίου που δημιουργείται, όπως και στην περίπτωση της ένωσης **1** αυξάνει το μέγεθος του αναστολέα. Η προσθήκη ακόμα 2 ατόμων άνθρακα στο τελικό αλκίνιο δυσκολεύει την πρόσβαση του αναστολέα και την ισχυρή πρόσδεση του στο καταλυτικό κέντρο για μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου. Το μεγάλο μέγεθος του αναστολέα έχει σαν αποτέλεσμα η τιμή της IC_{50} να είναι 6145.8 μ M, μεγαλύτερη δηλαδή από κάθε άλλη ένωση που μελετήθηκε. Τα αυτά ισχύουν και για τις ενώσεις 5,6,7 όπου και επιβεβαιώνεται η προηγούμενη θεώρηση της σχέσης της αναστολής της δράσης με το ογκώδες μέγεθος των νουκλεοζιτικών αναλόγων.

Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως η δραστηριότητα των αναστολέων που μελετήθηκαν, εξαρτάται από τον υποκαταστάτη που προστίθεται στην αζωτούχο βάση. Υποκαταστάτες με ιδιαίτερα μεγάλο μήκος ή μέγεθος παρεμποδίζουν την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται και η αναστολή της βιολογικής δραστηριότητας του ενζύμου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agelis G.; Tzioumaki N.; Tselios T.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis D. Eur. J. Med. Chem. 2008, 43, 1366.
2. Alfassi ZB. General Aspects of the Chemistry of Radicals. Viley-VCH, Weinheim, 1999.
3. American Diabetes Association: Diabetic Nephropathy (Position Statement).Diabetes Care 23(Suppl.1):S69-S72,2000
4. Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlasi, M.; Komiotis D.; Stathopoulos, C. Biochemistry 2009, 48, 6044–6051.
5. Bell, G. I., Pilkis, S. J., Weber, I. T., and Polonsky, K. S., 1996. Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. *Annu. Rev. Physiol.* 58:171-186.
6. Bender C, Berliner LJ, eds. EPR: Instrumental Methods. Klumer Academic/Plenum, Dordrecht, 2004.
7. Berg, J. M., Tymockzko J. L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001 (p) 329-351
8. Berg, J. M., Tymockzko J. L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2006 p.649, 651
9. Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. Molecular cancer therapeutics 2010.
10. Bradley D. Modern Drug Discovery 11, 28-30, 32, 34, 2001.

11. Chang CT, Chen YC, Fang JT, Huang CC. Metformin-associated lactic acidosis: case reports and literature review. *J Nephrol* 15(4): 398-402, 2002.
12. Conway DL. Obstetric management in Gestational diabetes. *Diabetes Care* 2007;30,suppl 2, s175-179.
13. Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47,365.
14. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 5η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, 1998, p. 519-571.
15. Daniel De Noon: Actos Effective in Late-Stage Type 2, *Diabetes WebMD Health News*, 2005.
16. Dewit S, 2009. *Παθολογική Χειρουργική Νοσηλευτική. Έννοιες και Πρακτική*. 2ος τόμος. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας. Αθήνα.
17. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association. *Diabetes Care*, Volume 31, Supplement 1, 2008.
18. D. R. Lide, ed., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 75th ed. (Boca Raton, FL: CRC Press, 1994), 9–79.
19. Goldberg RB, Einhorn D, Lucas CP.: A randomised placebo- controlled trial of repaglinide in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 21:1897-1903, 1998.
20. Gumina, G.; Song, G. Y.; Chu, C. K. *FEMS Microbiology Letters* 2001, 202, 9.
21. Halliwell, B., (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopaedia of life sciences*

22. Heiner Laube, Department of Internal Medicine, Universität Giessen And Giessen: Acarbose An Update of Its Therapeutic Use in Diabetes Treatment, 2002.
23. Hermann LS, Wiernsperger N. Impaired glucose tolerance and metformin: Clinical and mechanistic aspects. *Br J Diabetes asc Dis* 2002, 2:177–183.
24. Ian N. Scobie, MD, Diabetes Retinopathy, Chronic complications of diabetes mellitus. An Atlas Of Diabetes Mellitus, second edition, 2002.
25. Ignatavicius & Workman, 2008. Παθολογική - Χειρουργική Νοσηλευτική. Κριτική σκέψη για συνεργατική φροντίδα. 2ος τόμος. Ιατρικές Εκδόσεις Βήτα Αθήνα.
26. Komiotis D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic acids 1991, 10, 431.
27. Kontou, M., Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Tsantili, P., Mamalaki, A., Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., and Tzartos, S.J., The crystal structure of the Fab fragment of a rat monoclonal antibody against the main immunogenic region of the human muscle acetylcholine receptor. 2000. *Eur. J. Biochem.* 267: p. 2389-2397.
28. Langer O, Berkus M, Brustman L, Anyaegbunam A, Mazze R. Rationale for insulin management in gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 1991;40 (Suppl2):186-190.
29. Lin, T. S.; Luo, M. Z.; Liu, M. C.; Clarkatzenburg, R. H.; Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. J. *Med. Chem.* 1991, 34, 2607.
30. Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* 2010, 79, 1772–1780.

31. Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. J. *Med. Chem.* 1991, *34*, 2607.
32. Marshall W., *Clinical biochemistry*, 2000, p.217-220.
33. Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, *95*, 105.
34. Mavromoustakos T., Zervou M., Zoumpoulakis P., Kyrikou I. Et al, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2004.
35. McMurry John, *Οργανική Χημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2000, p.1245-1247
36. Mc Murry J. *Οργανική Χημεία*, Τόμος 1, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2002, σελ.54.
37. Misbin RI, Green L, Stadel BV, Gueriguian JL, Gubbi A, Fleming GA: Lacticacidosis in patients with diabetes treated with metformin. *N Engl J Med* 338: 265– 266, 1998.
38. Misbin RI: The phantom of lactic acidosis due to metformin in patients with diabetes. *Diabetes Care* 27: 1791–1793, 2004.
39. Mona M. Chitre, PharmD, CGP, and Susan Burke: Treatment Algorithms and the Pharmacological Management of Type 2Diabetes, *Diabetes Spectrum* 4: 249-255, 2006.
40. Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., and Tzartos, S.J., The crystal structure of the Fab fragment of a rat monoclonal antibody against the main immunogenic region of the human muscle acetylcholine receptor. 2000. *Eur. J. Biochem.* 267: p. 2389-2397

41. Oikonomakos, N.G., Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr Protein Pept Sci* 2002 3: p.561-586.
42. Oikonomakos, N. G.; Somsak, L., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2008, 9 (4), p.379-395.
43. Oikonomakos, N. G., *Curr. Med. Chem.* 2008, 15 (28), p.2933-2983
44. Parsons AF. *An Introduction to Free Radical Chemistry*. Blackwell Science, Oxford, 2000.
45. Pelps RL, Metzger BE, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:730-736.
46. Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* 1992, 11, 903.
47. R.Kellner,J.-M.Mermet,M.Otto,H.M.Widmer.,*Analytical Chemistry*,1997.
48. Saltiel, AR. You are what you secrete. *Nature Medicine* 2001;7(8): 887-888.
49. Somsák, L.; Nagya, V.; Hadady, Z.; Docsa, T.; Gergely, P. *Current pharmaceutical design* 2003, 9, 1177–1189.
50. Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G., *Curr. Med. Chem.* 2008, 15 (28), p.2933-2983.
51. Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *International Journal of Molecular Sciences* 2007.
52. Stryer Lubert, *Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 1997, p.347-354.

53. Tiraidis, C., Alexacou, K.M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Gimisis, T., and Oikonomakos, N.G., FR258900, a potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase. 2007. *Protein Sci* 16(8): p. 1773-82
54. Tiwari, K. N.; Shortnacy-Fowler, A. T.; Parker, W. B.; Waud, W. R.; Secrist, J. A. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 2009, 28, 657–677.
55. Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2010, 18, 3413–3425.
56. Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Manta, S.; Agelis, G.; Balzarini, J.; Komiotis D. *Archiv der Pharmazie* 2009, 342, 353.
57. Walker M, Turnbull DM. Mitochondrial related diabetes: a clinical perspective. *Diabetic Med* 1997;14:1007-1009.
58. William H. Brown, *Organic Chemistry*, 1995, *Mass Spectrometry*, p.453-459.
59. William H. Brown, *Organic Chemistry*, 1995, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, p.475-478, 498-501.
60. William H. Brown, *Organic Chemistry*, 1995, *Infrared and Ultraviolet – Visible Spectroscopy*, p.521-530.
61. William H. Brown, *Organic Chemistry*, 1995, *Nucleosides and Nucleotides*, p.1088.
62. Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* 1991, 51, 2319.

63. Yong S. K. Moon, Pharm. D.; Moti L. Kashyap, M. D., Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetic Dyslipidemia, *Pharmacotherapy Publications* 24 (12):1692-1713, 2004.107.
64. Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 3399.
65. Zographos, S.E., Oikonomakos, N.G., Tsitsanou, K.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Skamnaki, V.T., Bischoff, H., Goldmann, S., Watson, K.A., and Johnson, L.N., The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyldihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor. 1997. *Structure* 5(11): p. 1413-25.
66. Zographos, S.E. Leonidas, D.D., Lazoura, E., Dossi, K., Konarev, P.V., Kikhney, A.G., Svergun, D.I., Schmoll, D., Defossa, E., and Oikonomakos, N.G. Experimental evidence for the existence of an intermediate form of glucokinase, which accounts for the sigmoidal kinetic behaviour of the enzyme. EMBL, Hamburg Outstation, Annual Report 2007, Part II, pp. 371-372
67. Δημήτριος Θ. Καραμήτσος, *Διαβητολογία*, Εκδόσεις Σιώκης, 2000.
68. Θ. Μαυρομούστακος, Μ. Ζερβού, Ε. Μαντζουράνη, Σχεδιασμός Φαρμακευτικών Ενώσεων με χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού *ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ* 17,1, 8-15, 2004.
69. Ι. Ιωαννίδης, *Αντιδιαβητικά φάρμακα: Διπλός στόχος*, ygeia.tanea.gr
70. Ν. Κατσίλαμπρος, Ι. Ιωαννίδης: Νεότερα Αντιδιαβητικά Φάρμακα. Α Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΠΓΝΑ «ΛΑΪΚΟ» , *Αρχ. Ελλ. Ιατρ.*, 16(6), 1999, Νοέμβριος-Δεκέμβριος, 552-556.

71. Παπαδογιάννης Ι. & Σαμανίδου Β. Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη, 2001, σελ. 331.
72. Ράπτης Σ, Φαρμακευτική αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη, Εσωτερική Παθολογία, Αθήνα, 1998.
73. Σαχίνη Καρδάση Α & Πάνου Μ, 2004. Παθολογική & χειρουργική νοσηλευτική. Νοσηλευτικές διαδικασίες. 3ος Τόμος Εκδόσεις ΒΗΤΑ, Β' έκδοση, Αθήνα.
74. Τούντας Χ: Σακχαρώδης Διαβήτης Θεωρία και Πράξη. Αθήνα 2005,σελ 140.
75. www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Actos/201400e11.pdf
76. www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Avandia/H-268-e11.pdf
77. <http://health.allrefer.com>, reviewed by R.S. Douglas, Department of Ophthalmology, UCLA Medical Center, Review provided by VeriMed Healthcare Network (12/22/2002).
78. <http://www.ifet.gr/ES2003/6.1.2.2.HTM>
79. www.medscape.com
80. www.medicenet.com
81. <http://medlib.med.utah.edu>, Health Science Library, University of UTAH.
82. www.novonordisk.gr