ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΑΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΤΡΟΠΟΝΙΝΗΣ Ι

ΣΟΦΙΑ ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΣΤΙΣ
ΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
0260000348299

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΑΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΤΡΟΠΟΝΙΝΗΣ Ι

ΣΟΦΙΑ ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΣΤΙΣ
ΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΤΣΙΚΑΡΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Αρ. εισ.: 519/2015

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Στους γονείς μου, Φίλιππο και Σταυροούλα,
και στα αδέρφια μου, Δέσποινα και Κυριάκο.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα Ερευνητικά Εργαστήρια της Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2011 – Οκτώβριος 2014.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη για την ανάθεση του θέματος και την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Χημείας Πεπτιδίων. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη του, αλλά και για την συνεχή επίβλεψη και καθοδήγησή του στα πλαίσια της συνεργασίας μας.

Θέλω να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μάμαντο Προδρομίδη για την άριστη συνεργασία μας και τη συνεχή καθοδήγηση και επίβλεψη του κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω το συνάδελφο Δημήτρη Στεργίου για την ευχάριστη συνεργασία μας, καθώς και για την πολύτιμη συμβολή του στην εκτέλεση των πειραμάτων.

Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευγενία Πάνου - Πομώνη του τμήματος Χημείας για το άμεσο ενδιαφέρον και τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου από το Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων και Πρωτεϊνών, καθώς και τους συναδέλφους μου από το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας για τη βοήθεια. τη συμπαράσταση και την άψογη συνεργασία που μου πρόσφεραν.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, που με στήριξαν και με στηρίζουν σε κάθε μου προσπάθεια, στους ανθρώπους που με αγαπούν και στους πραγματικούς μου φίλους.

Σοφία Σιδηροπούλου

Ιωάννινα 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν μια μεγάλη απειλή για την παγκόσμια υγεία. Ως εκ τούτου, υπάρχει αυξανόμενη ζήτηση για την ανάπτυξη φορητών, γρήγορων και χαμηλού κόστους συσκευών για την ανίχνευση τους. Οι βιοαισθητήρες μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην πρώιμη διάγνωση μιας καρδιαγγειακής νόσου, χωρίς να είναι απαραίτητο οι επισκέψεις στο νοσοκομείο, όπου συνίστανται δαπανηρές και χρονοβόρες εργαστηριακές δοκιμές. Κατά την τελευταία δεκαετία, έχουν αναπτυχθεί πολλοί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση ενός ευρέως φάσματος καρδιακών δεικτών, με σκοπό τη μείωση του κόστους για την υγειονομική περίθαλψη.

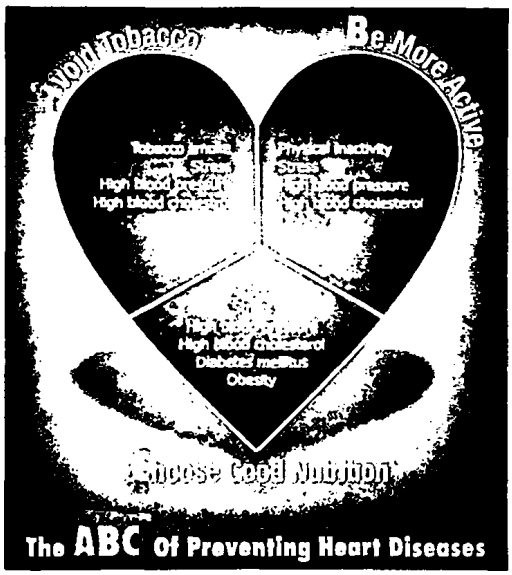
Οι τροπονίνες εισήχθησαν στον εργαστηριακό έλεγχο ως εξαιρετικά ειδικοί και ευαίσθητοι βιολογικοί δείκτες μυοκαρδιακής βλάβης. Πρόκειται για μια ομάδα δομικών πρωτεϊνών οι οποίες εδράζονται στα λεπτά νημάτια των ραβδωτών μυών, συγκροτημένες σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, το σύμπλοκο της τροπονίνης. Το εν λόγω σύμπλοκο είναι ένα ετεροτριμερές, το οποίο αποτελείται από τρεις πρωτεϊνικές υπομονάδες: την τροπονίνη C (TnC), την τροπονίνη I (TnI) και την τροπονίνη T (TnT), καθεμία από τις οποίες είναι υπεύθυνη για διαφορετικές βιοχημικές λειτουργίες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός ευαίσθητου και εξειδικευμένου εμπεδησιομετρικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της cTnI. Για την ανάπτυξη της δοκιμασίας ανίχνευσης της cTnI στον ορό του αίματος επιλέχθηκε το πεπτίδιο FYSHSHENWPS, το οποίο έχει προταθεί ως ισχυρός προσδέτης της cTnI, τροποποιημένο στο N-τελικό άκρο με την προσθήκη μιας κυστεΐνης, ενώ στο C-τελικό άκρο συντέθηκε ως αμίδιο.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο



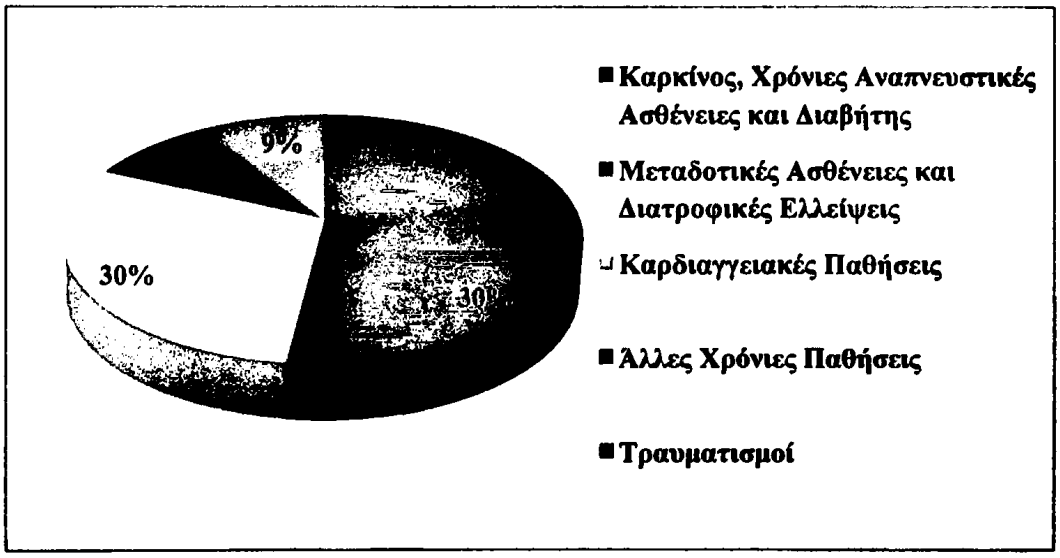
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν σήμερα ένα σοβαρότατο πρόβλημα υγείας σε ολόκληρο τον κόσμο[1], καθώς είναι η αιτία για έναν στους τρεις θανάτους παγκοσμίως[2]. Μέχρι το 2030, υπολογίζεται ότι 7 στους 10 θανάτους σε όλο τον κόσμο θα είναι αποτέλεσμα μιας χρόνιας ασθένειας, με τις καρδιαγγειακές παθήσεις να αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό[3]. Εξίσου ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι, ενώ η εμφάνιση των καρδιαγγειακών παθήσεων έχει μειωθεί σε ορισμένες χώρες υψηλού εισοδήματος, βρίσκεται σε άνοδος σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος[1], η οποία οφείλεται εν μέρει, ότι η πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη, σε αυτές τις χώρες, περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό[4]. Γνωστοί παράγοντες κινδύνου για τις καρδιαγγειακές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένων της υπερβολικής απώλειας βάρους, του διαβήτη, καθώς και της έλλειψης σωματικής άσκησης, βρίσκονται επίσης σε άνοδο σε παγκόσμιο επίπεδο[5–7]. Το 2010, οι τρεις παραπάνω παράγοντες κινδύνου, μαζί με την υψηλή πίεση του αίματος, το κάπνισμα και τη διατροφή με χαμηλές ποσότητες φρούτων,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κατατάσσονταν στους 10 πρώτους[8]. Με αυτόν τον τρόπο, οι καρδιαγγειακές παθήσεις έχουν χαρακτηριστεί ως ένα "παγκόσμιο τσουνάμι"[1]. Οι μελλοντικές οικονομικές προβλέψεις για τις επιπτώσεις των καρδιαγγειακών παθήσεων είναι επίσης δυσοίωνες σε παγκόσμια κλίμακα[9]. Επειδή οι προβλέψεις για τις καρδιαγγειακές παθήσεις είναι ανησυχητικές, μια πρόσφατη έκθεση του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) αναφέρει πως σχεδόν το ένα τέταρτο όλων των θανάτων από καρδιαγγειακές νόσους στις Ηνωμένες Πολιτείες μπορούν να αποφευχθούν, υποδεικνύοντας πως αυτές οι ανησυχητικές προβλέψεις μπορούν να αλλάξουν, εάν ληφθούν μέτρα[10].



Σχήμα 1.1.1. Αιτίες θανάτου παγκοσμίως[2].

1.2. ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

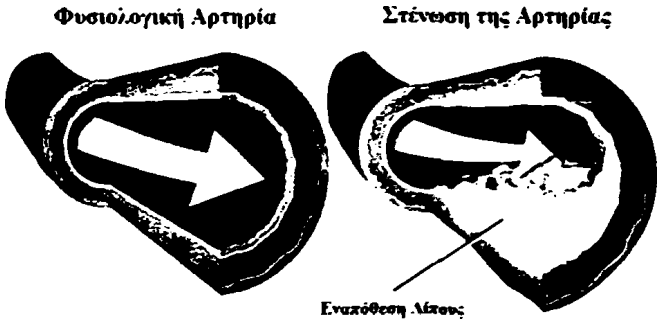
Τα καρδιαγγειακά νοσήματα προκαλούνται από αρτηριακές βλάβες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τοπική πάχυνση του έσω χιτώνα (ενδοθήλιο). Αποτέλεσμα της αρτηριακής στένωσης είναι η καρδιαγγειακή νόσος, το εγκεφαλικό επεισόδιο και η περιφερική αρτηριακή νόσος. Οι παράγοντες κινδύνου που οδηγούν στην ανάπτυξη και την εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου είναι η αρτηριακή υπέρταση, το κάπνισμα, η υπερχοληστερολαιμία, η υπερτριγλυκεριδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης και το θετικό οικογενειακό ιστορικό. Πρόσθετοι παράγοντες που ευνοούν την εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου είναι η παχυσαρκία, η καθιστική ζωή (ανεπαρκής σωματική δραστηριότητα) και το συναισθηματικό στρες[11].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών, τα οποία προσβάλλουν την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία, και περιλαμβάνουν:

❑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

Η στεφανιαία νόσος (γνωστή και ως ισχαιμική καρδιοπάθεια[12]) είναι ο πιο κοινός τύπος καρδιακής νόσου, καθώς αποτελεί την αιτία των καρδιακών προσβολών. Η νόσος προκαλείται εξαιτίας της δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας, κυρίως εξαιτίας της εναπόθεσης λίπους, κατά μήκος του εσωτερικού τοιχώματος των αρτηριών της καρδιάς, με αποτέλεσμα να στενεύουν και να σκληραίνουν οι αρτηρίες και να μειώνεται η ροή του αίματος προς την καρδιά.



Στεφανιαία Νόσος

Εικόνα 1.2.1. Σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας.

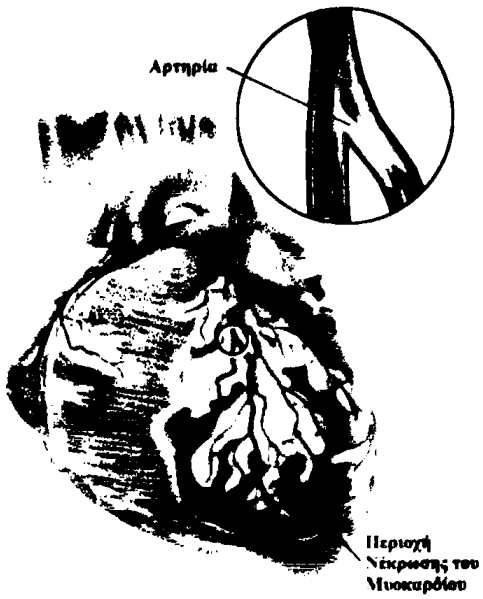
Μπορεί να εκδηλωθεί είτε με τη μορφή της στηθάγχης, είτε με τη μορφή εμφράγματος.

- **ΣΤΗΘΑΓΧΗ:** Πρόκειται για ένα έντονο θωρακικό πόνο, ο οποίος οφείλεται σε ανεπαρκή εφοδιασμό του καρδιακού μυός σε αίμα, εξαιτίας της στένωσης των στεφανιαίων αρτηριών.

- **ΈΜΦΡΑΓΜΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ:** Αποτελεί τον ιατρικό όρο για την καρδιακή προσβολή, και προκαλείται από αιφνίδια διακοπή της ροής του αίματος προς την καρδιά.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Εικόνα 1.2.2. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου συμβαίνει όταν μια αθηρωματική πλάκα συσσωρεύεται αργά στο εσωτερικό τοίχωμα μιας στεφανιαίας αρτηρίας και ξαφνικά παθαίνει ρήξη, προκαλώντας το σχηματισμό θρόμβου, φράσσοντας εντελώς την αρτηρία και εμποδίζει τη ροή του αίματος.



Έμφραγμα του Μυοκαρδίου

Το 2012 ήταν η πιο κοινή αιτία θανάτου στον κόσμο[13], καθώς και μια σημαντική αιτία των εισαγωγών σε νοσοκομεία[14].

Αγγειακο Εγκεφαλικο Επεισοδιο

Πρόκειται για τη διαταραχή της εγκεφαλικής αιματικής κυκλοφορίας. Μπορεί να προκληθεί είτε από διακοπή της αιματικής ροής του εγκεφάλου (ισχαιμικό επεισόδιο), είτε από ρήξη των εγκεφαλικών αγγείων (αιμορραγικό επεισόδιο)[15–17] και έχει ως αποτέλεσμα, η πληγείσα περιοχή του εγκεφάλου να μην μπορεί να λειτουργήσει κανονικά[18].

Οι παράγοντες κινδύνου για το εγκεφαλικό επεισόδιο περιλαμβάνουν το γήρας, υψηλή αρτηριακή πίεση, προηγούμενο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ή παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο, διαβήτη, υψηλή χοληστερόλη, κάπνισμα και κολπική μαρμαρυγή[18]. Η υψηλή αρτηριακή πίεση είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για το εγκεφαλικό επεισόδιο, ο οποίος μπορεί να μεταβληθεί[19].

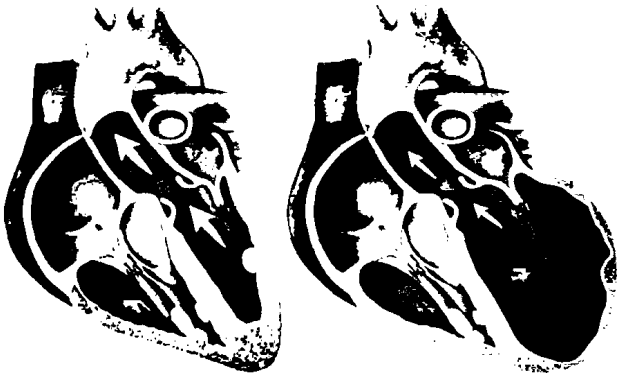
Μυοκαρδιοπαθεια

Η μυοκαρδιοπάθεια είναι η μετρήσιμη υποβάθμιση της λειτουργίας του μυοκαρδίου για οποιοδήποτε λόγο, η οποία συνήθως οδηγεί σε καρδιακή ανεπάρκεια. Κοινά συμπτώματα είναι η δύσπνοια και το περιφερικό οίδημα (πρήξιμο) των ποδιών. Τα άτομα με μυοκαρδιοπάθεια βρίσκονται συχνά σε κίνδυνο εξαιτίας του ακανόνιστου καρδιακού

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

παλμού και του αιφνίδιου καρδιακού θανάτου[15]. Η κοινή μορφή μυοκαρδιοπάθειας είναι η διατατική μυοκαρδιοπάθεια[20].

Κανονική Καρδιά Διατατική Μυοκαρδιοπάθεια



Εικόνα 1.2.3. Διατατική μυοκαρδιοπάθεια.

ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Η καρδιακή ανεπάρκεια εμφανίζεται όταν η καρδιά δεν βρίσκεται σε θέση να λειτουργήσει σωστά ως αντλία, ούτως ώστε να διατηρηθεί η ροή του αίματος, για να καλυφθούν οι ανάγκες του σώματος[21]. Μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από συμπτώματα, όπως δυσκολία στην αναπνοή, πρήξιμο στα πόδια και καθόλου διάθεση για άσκηση. Η πάθηση διαγιγνώσκεται με τη φυσική εξέταση του ασθενούς και επιβεβαιώνεται με το υπερηχοκαρδιογράφημα, ενώ οι εξετάσεις αίματος βοηθούν στον προσδιορισμό της αιτίας. Η θεραπεία εξαρτάται από τη σοβαρότητα και την αιτία της καρδιακής ανεπάρκειας.

Κοινές αιτίες της καρδιακής ανεπάρκειας περιλαμβάνουν έμφραγμα του μυοκαρδίου και άλλες μορφές στεφανιαίας νόσου, υπέρταση, βαλβιδική καρδιακή νόσο και μυοκαρδιοπάθεια[22].

ΚΑΡΔΙΑΚΕΣ ΑΡΡΥΘΜΙΕΣ

Οι καρδιακές αρρυθμίες είναι οι ανωμαλίες του κανονικού ρυθμού των καρδιακών παλμών. Παρά το γεγονός ότι πολλές αρρυθμίες δεν αποτελούν απειλή για τη ζωή, μερικές μπορούν να προκαλέσουν καρδιακή ανακοπή[23].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΒΑΛΒΙΔΟΠΑΘΕΙΑ

Η βαλβιδοπάθεια είναι η πάθηση μιας ή περισσοτέρων από τις τέσσερις βαλβίδες της καρδιάς. Τα προβλήματα των βαλβίδων μπορεί να είναι συγγενείς (εκ γενετή) ή επίκτητα (λόγω άλλης αιτίας αργότερα στη ζωή). Η θεραπεία μπορεί να γίνει με φαρμακευτική αγωγή, αλλά συχνά (ανάλογα με τη σοβαρότητα) περιλαμβάνει επιδιόρθωση ή αντικατάσταση με άλλη προσθετική βαλβίδα[24].

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συχνότερες μορφές καρδιαγγειακής νόσου είναι η στεφανιαία νόσος και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.

1.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Στοιχεία δείχνουν πως υπάρχει μια σειρά παραγόντων κινδύνου, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων: η ηλικία, το φύλο, η υψηλή αρτηριακή πίεση, η υπερλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα, η κατανάλωση ζάχαρης[25,26], το οικογενειακό ιστορικό, η παχυσαρκία, η έλλειψη σωματικής δραστηριότητας, ψυχοκοινωνικοί παράγοντες και η ατμοσφαιρική ρύπανση[27]. Ενώ η συμβολή του κάθε παράγοντα κινδύνου ξεχωριστά ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων κοινοτήτων ή εθνικών ομάδων, η συνοχή της συνολικής συμβολής των παραγόντων κινδύνου σε επιδημιολογικές μελέτες είναι εξαιρετικά έντονη[28]. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες κινδύνου, όπως η ηλικία, το φύλο ή το οικογενειακό ιστορικό είναι αμετάβλητοι. Ωστόσο, πολλοί σημαντικοί παράγοντες κίνδυνοι καρδιαγγειακών νόσων μπορούν να τροποποιηθούν από την αλλαγή του τρόπου ζωής, τις κοινωνικές αλλαγές, τη φαρμακευτική αγωγή, καθώς από την πρόληψη της υπέρτασης, της υπερλιπιδαιμίας και του διαβήτη.

1.3.1. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΙΜΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΙ

ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Παγκοσμίως, σχεδόν ένα δισεκατομμύριο κόσμος πάσχει από υψηλή αρτηριακή πίεση[29]. Η υπέρταση είναι μια από τις πιο σημαντικές αιτίες πρόωρου θανάτου σε όλον τον κόσμο, καθώς αποτελεί την κύρια αιτία καρδιαγγειακής νόσου[30], ενώ παράλληλα το πρόβλημα συνεχίζει να αυξάνεται. Άτομα με υπέρταση είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν επιπλοκές του διαβήτη[31]. Η υψηλή αρτηριακή πίεση χαρακτηρίζεται ως "σιωπηλός δολοφόνος", διότι συχνά δεν εμφανίζονται προειδοποιητικά σημάδια ή συμπτώματα, με αποτέλεσμα αρκετοί άνθρωποι

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

να μην συνειδητοποιούν πως πάσχουν από αυτήν. Γι' αυτό είναι σημαντικό να ελέγχεται τακτικά η αρτηριακή πίεση.

- **ΚΑΠΝΙΣΜΑ**

Το κάπνισμα εκτιμάται πως προκαλεί περίπου 10% του συνόλου όλων των καρδιαγγειακών παθήσεων[30]. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου είναι υψηλότερος σε γυναίκες καπνίστριες, σε νέους άντρες και σε μανιώδεις καπνιστές[32]. Εντός δυο ετών από τη διακοπή του καπνίσματος, ο κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου μειώνεται, ενώ μέσα σε 15 χρόνια ο κίνδυνος αντιστοιχεί σε αυτόν ενός μη καπνιστή[33,34].

- **ΔΙΑΒΗΤΗΣ**

Το 2008, ο διαβήτης ήταν υπεύθυνος για 1,3 εκατομμύρια θανάτους, παγκοσμίως. Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αντιπροσωπεύουν περίπου το 60% του συνόλου της θνησιμότητας σε άτομα με διαβήτη. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων είναι δυο έως τρεις φορές υψηλότερος σε άτομα με διαβήτη τύπου 1 ή τύπου 2. Σε ορισμένες ηλιακές ομάδες, τα άτομα με διαβήτη παρουσιάζουν διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου, ενώ ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου αυξάνεται με την αύξηση των τιμών της γλυκόζης. Έλλειψη της έγκαιρης διάγνωσης και φροντίδας του διαβήτη οδηγεί σε σοβαρές επιπλοκές, όπως καρδιακή προσβολή, εγκεφαλικό επεισόδιο, νεφρική ανεπάρκεια, ακρωτηριασμός και τύφλωση[30].

- **ΈΛΛΕΙΨΗ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ**

Η ανεπαρκής σωματική δραστηριότητα είναι ο τέταρτος κύριος παράγοντας κινδύνου θνησιμότητας. Περίπου 3,2 εκατομμύρια θάνατοι κάθε χρόνο οφείλονται στην ανεπαρκή φυσική δραστηριότητα. Άτομα, τα οποία δεν είναι αρκετά σωματικά δραστήρια, έχουν 20-30% αύξηση του κινδύνου θνησιμότητας, σε σύγκριση με όσους επιδίδονται σε τουλάχιστον 30 λεπτά μέτριας έντασης σωματικής δραστηριότητας τις περισσότερες μέρες τις εβδομάδας[30].

- **ΑΝΘΥΓΙΕΙΝΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ**

Υψηλή διαιτητική πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών, trans-λιπαρών οξέων και αλατιού, καθώς και χαμηλή πρόσληψη φρούτων, λαχανικών και ψαριών συνδέονται με τι κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Περίπου 1,7 εκατομμύρια (1%) των θανάτων παγκοσμίως οφείλονται σε χαμηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών. Η υψηλή κατανάλωση

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κορεσμένων λιπαρών και trans-λιπαρών οξέων συνδέεται με καρδιακή νόσο. Η εξάλειψη των trans-λιπαρών οξέων, καθώς και η αντικατάσταση των κορεσμένων με πολυακόρεστα φυτικά έλαια μειώνουν τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, όπως επίσης, και η επαρκής κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μειώνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου[30].

- **ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ**

Τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα αυξάνουν τον κίνδυνο καρδιακής νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου. Παγκοσμίως, το 1/3 της ισχαιμικής καρδιοπάθειας αποδίδεται στην υψηλή χοληστερόλη, ενώ υπολογίζεται πως 2,6 εκατομμύρια θάνατοι προκαλούνται από τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, σε παγκόσμιο επίπεδο[30].

- **ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ**

Η παχυσαρκία είναι στενά συνδεδεμένη με σημαντικούς παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου, όπως είναι η υψηλή αρτηριακή πίεση, η δυσανεξία στη γλυκόζη, ο διαβήτης τύπου 2 και η δυσλιπιδαιμία. Παγκοσμίως, τουλάχιστον 2,8 εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο εξαιτίας της παχυσαρκίας[30].

1.3.2. ΜΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΙΜΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΙ

- **ΗΛΙΚΙΑ**

Η ηλικία αποτελεί μακράν τον πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων, με το κίνδυνο να τριπλασιάζεται με κάθε δεκαετία της ζωής[13]. Εκτιμάται ότι το 82% των ανθρώπων που πεθαίνουν από στεφανιαία νόσο είναι 65 ετών και άνω. Την ίδια στιγμή, ο κίνδυνος εγκεφαλικού επεισοδίου διπλασιάζεται σε κάθε δεκαετία μετά την ηλικία των 55[35].

Έχουν προταθεί πολλαπλές εξηγήσεις γιατί η ηλικία αυξάνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων. Μια από αυτές σχετίζεται με τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα. Στους περισσότερους πληθυσμούς, τα επίπεδα της συνολικής χοληστερόλης αυξάνονται όσο αυξάνεται η ηλικία[36].

Η γήρανση συνδέεται επίσης με τις αλλαγές στις μηχανικές και δομικές ιδιότητες του αγγειακού τοιχώματος, γεγονός το οποίο οδηγεί σε απώλεια της ελαστικότητας και σε μειωμένη αρτηριακή συμμόρφωση, με αποτέλεσμα να οδηγήσει σε στεφανιαία νόσο[37].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

- **ΦΥΛΟ**

Οι άντρες διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο καρδιακής νόσου από ότι οι γυναίκες, οι οποίες βρίσκονται πριν την εμμηνόπαυση. Αμέσως μετά την εμμηνόπαυση, υποστηρίζεται πως ο κίνδυνος για τις γυναίκες είναι ιδίως με αυτόν των αντρών, αν και πρόσφατα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και των Ηνωμένων Εθνών διαφωνούν με αυτό[13].

Στους μεσήλικες. η στεφανιαία νόσος είναι 2 με 5 φορές πιο συχνή στους άντρες απ' ότι στις γυναίκες. Μια από τις προτεινόμενες εξηγήσεις για τη διαφορά μεταξύ των δυο φύλων είναι η ορμονική διαφορά. Στις γυναίκες, τα οιστρογόνα είναι η κυρίαρχη ορμόνη του φύλου. Τα οιστρογόνα μπορεί να έχουν προστατευτικές επιδράσεις μέσω του μεταβολισμού της γλυκόζης και το αιμοστατικό σύστημα, και μπορεί επίσης να έχει άμεση επίδραση στην βελτίωση της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η παραγωγή των οιστρογόνων μειώνεται μετά την εμμηνόπαυση, και μπορεί να αλλάξει το γυναικείο μεταβολισμό των λιπιδίων προς μια αθηρογενική μορφή μειώνοντας τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και αυξάνοντας τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης[36].

1.4. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ

Σήμερα, τα μέτρα τα οποία εφαρμόζονται για την πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων περιλαμβάνουν:

- ✓ διατροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και πλούσια σε φυτικές ίνες, συμπεριλαμβανομένων δημητριακά ολικής αλέσεως, καθώς και άφθονα φρέσκα φρούτα και λαχανικά[38],
- ✓ διακοπή του καπνίσματος,
- ✓ περιορισμό της κατανάλωσης αλκοόλ[39],
- ✓ έλεγχο αρτηριακής πίεσης,
- ✓ μείωση του δείκτη μάζας σώματος, σε περίπτωση παχυσαρκίας[40],
- ✓ αύξηση της καθημερινής δραστηριότητας,
- ✓ μείωση της κατανάλωσης ζάχαρης,
- ✓ μείωση ψυχοκοινωνικού στρες[41–43].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

1.5. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

1.5.1. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

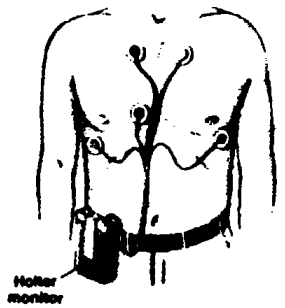
Συνεχώς εισάγονται νέες και προηγμένες διαγνωστικές εξετάσεις και εργαλεία για την περαιτέρω κατανόηση της πολυπλοκότητας των καρδιαγγειακών νοσημάτων, της ζημιάς που προκαλούν, καθώς και των συγγενών (εκ γενετής) ή επίκτητων ανωμαλιών. Παρακάτω αναφέρονται μερικές από τις διαγνωστικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται για την περαιτέρω κατανόηση και τον προσδιορισμό της καρδιαγγειακής νόσου.

ΗΛΕΚΤΡΟΚΑΡΔΙΟΓΡΑΦΙΑ

Το ηλεκτροκαρδιογράφημα καταγράφει την ηλεκτρική δραστηριότητα των μυών της παλλόμενης καρδιάς, δια μέσου μεταλλικών ηλεκτροδίων, που τοποθετούνται στην επιφάνεια του σώματος[44]. Με το ηλεκτροκαρδιογράφημα μπορούμε να διαπιστώσουμε οξείες (π.χ. οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου) αλλά και χρόνιες (κολπική μαρμαρυγή, καρδιακές αρρυθμίες) διαταραχές που μπορούν να αφορούν τον καρδιακό ρυθμό αλλά και την αρχιτεκτονική της καρδιάς. Στην ίδια αρχή της ηλεκτροκαρδιογραφικής καταγραφής στηρίζονται και άλλες εξετάσεις της καρδιάς, όπως η 24ωρη καταγραφή ηλεκτροκαρδιογραφήματος – Holter[45] και το τεστ κοπώσεως, με διαφορετικές όμως ενδείξεις ως προς τη διενέργειά τους.

ΠΕΡΙΠΑΤΗΤΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΚΑΡΔΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η συνεχής καταγραφή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος (Holter ρυθμού)[45], συνήθως για 1-2 24ωρα, αποτελεί μια μέθοδος, η οποία βοηθά κυρίως στην ανεύρεση διαταραχών του καρδιακού ρυθμού, δεδομένου ότι αυτές οι διαταραχές είναι συνήθως παροδικές.



Εικόνα 1.5.1.4. Η συσκευή του Holter.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Τεστ Κοπώσεως

Το τεστ κοπώσεως είναι μια απλή, ανώδυνη και αναίμακτη εξέταση, η οποία συμβάλλει στη διάγνωση και παρακολούθηση της στεφανιαίας νόσου. Τα δυο κύρια χαρακτηριστικά της δοκιμασίας κοπώσεως είναι η εκτέλεση ελεγχόμενης σωματικής άσκησης από τον εξεταζόμενο και η συνεχής ηλεκτροκαρδιογραφική παρακολούθηση αυτού κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της άσκησης, καθώς και μετά από αυτήν.

Ραδιολογικες Εξετασεις

Η ακτινογραφία θώρακος μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες που αφορούν το μέγεθος και το σχήμα της καρδιάς. Σήμερα, η χρήση της υπερηχοκαρδιογραφίας δίνει συγκριτικά λεπτομερέστερες ανατομικές πληροφορίες για την καρδιά, με αποτέλεσμα η χρήση της ακτινογραφίας θώρακος να έχει περιορισθεί. Η μόνη χρησιμότητα της είναι η εκτίμηση του μεγέθους της καρδιάς, καθώς και η κατάσταση των πνευμόνων.

Υπερηχοκαρδιογραφια

Το υπερηχοκαρδιογράφημα ξεκαθαρίζει πιθανά ανατομικά προβλήματα των μεγάλων αγγείων της καρδιάς, των τοιχωμάτων της, καθώς και των βαλβίδων της. Επίσης, δείχνει αν υπάρχει υγρό στο περικάρδιο, δηλ. στο "σακουλάκι" που περιβάλλει και προστατεύει το μυ της καρδιάς. Το ΥΚΓ είναι πολύ σημαντικό για την διαχρονική παρακολούθηση των ασθενών με χρόνια καρδιολογικά προβλήματα. Επιπλέον, είναι απολύτως ακίνδυνο και δεν εκθέτει τον ασθενή σε ραδιενεργό ακτινοβολία.

Στεφανιαια Αγγειογραφια

Η στεφανιαία αγγειογραφία ανήκει στην ομάδα των ιατρικών διαδικασιών που πραγματοποιούνται με καθετηριασμό της καρδιάς. Κατά τη διάρκεια της, εγχέεται στα αγγεία της καρδιάς μια σκιαγραφική ουσία, η οποία επιτρέπει την απεικόνισή της μέσω ακτίνων Χ.

Αξονικη Τομογραφια

Η αξονική τομογραφία καρδιάς αποτελεί καινοτόμο αναίμακτη διαγνωστική μέθοδο με την οποία μπορούν να απεικονιστούν με ακρίβεια η καρδιά και τα στεφανιαία αγγεία της. Πρόκειται για μια εξαιρετικά απλή εξέταση που δεν απαιτεί καμία προετοιμασία. Η ενδοφλέβια χορήγηση σκιαγραφικού υλικού επιτρέπει την απεικόνιση των στεφανιαίων αγγείων, έτσι ώστε να είναι δυνατόν να εντοπιστούν οι στενώσεις.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Μαγνητική Τομογραφία

Η μαγνητική τομογραφία καρδιάς αποτελεί άριστη μέθοδος για τη μελέτη της ανατομίας της καρδιάς και των μεγάλων αγγείων. Επίσης, οι καρδιακοί όγκοι και ο τρόπος που συνδέονται με τις καρδιακές δομές απεικονίζονται άριστα και σε ορισμένες περιπτώσεις δίνονται πληροφορίες για τη σύστασή τους. Εκτός από τη λειτουργικότητα των κοιλιών, η μαγνητική τομογραφία αποτελεί πολύ καλή μέθοδο μέτρησης της καρδιακής μάζας.

1.5.2. Αιματολογικές Εξετασεις – Βιοχημικοι Δεικτες

Με τις αιματολογικές εξετάσεις ελέγχονται τα επίπεδα λιπαρών ουσιών, χοληστερόλης, γλυκόζης, καθώς και πρωτεϊνών στο αίμα. Τα μη φυσιολογικά επίπεδα μπορεί να είναι σημάδι κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου. Οι εξετάσεις αίματος βοηθούν επίσης στον εντοπισμό αναιμίας, η οποία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για στεφανιαία νόσο.

Κατά τη διάρκεια μιας καρδιακής προσβολής, τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα πεθαίνουν και απελευθερώνουν πρωτεΐνες (βιοχημικοί δείκτες) στην κυκλοφορία του αίματος. Με τις εξετάσεις αίματος οι ποσότητες αυτών των πρωτεϊνών μπορούν να μετρηθούν, ενώ σε περίπτωση που τα επίπεδα τους είναι υψηλά, αποτελεί σημάδι πρόσφατης καρδιακής προσβολής.

Βιοχημικοι Δεικτες

Κάθε μόριο, κύτταρο, ιστός ή μετρήσιμη απεικόνιση μιας φυσιολογικής, παθολογικής ή θεραπευτικής απόκρισης μπορεί να θεωρηθεί ως βιοδείκτης[46]. Για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας βιοδείκτης θα πρέπει να πληρεί τα ακόλουθα κριτήρια:

- Ακρίβεια, δηλ. να έχει την ικανότητα να εντοπίζεται σε άτομα που διατρέχουν κίνδυνο.
- Αξιοπιστία, δηλ. να παραμένουν σταθερά τα αποτελέσματά του όταν επαναλαμβάνονται.
- Θεραπευτική επίδραση με έγκαιρη παρέμβαση[47].

Οι βιοδείκτες μπορούν να δείξουν αν κάποιος είναι υγιής ή φέρει χαρακτηριστικά κάποιας νόσου, συμπεριλαμβανομένου του επιπέδου ή του είδους έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, της γενετικής προδιάθεσης, της γενετικής απόκρισης σε εκθέσεις, των δεικτών υποκλινικής ή κλινικής νόσου, ή των δεικτών ανταπόκρισης στη θεραπεία. Έτσι, πιο απλά, οι βιοδείκτες αποτελούν δείκτες ενός χαρακτηριστικού της νόσου

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(παράγοντας κινδύνου), της κατάστασης της νόσου (προκλινική ή κλινική) ή του ποσοστού της νόσου (εξέλιξη)[48].

Πιο συγκεκριμένα, για τους καρδιακούς βιοδείκτες, υπάρχουν πολλά σημαντικά χαρακτηριστικά, τα οποία πρέπει να έχει ένας ιδανικός καρδιακός βιοδείκτης. Αυτά περιλαμβάνουν:

- υψηλή κλινική ευαισθησία και εξειδίκευση,
- γρήγορη απελευθέρωση του βιοδείκτη στο αίμα, επιτρέποντας έτσι την έγκαιρη διάγνωση,
- ικανότητα να παραμένει σε υψηλά επίπεδα για μεγάλο χρονικό διάστημα στο αίμα, και τέλος,
- δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού[49].

Είναι δύσκολο να επιλεχθεί ένας συγκεκριμένος καρδιακός βιοδείκτης για τη διάγνωση καρδιαγγειακής νόσου. Ως εκ τούτου, επιλέγεται μια σειρά δεικτών μπορούν ενδεχομένως να αναλυθούν ταυτόχρονα για την ακριβή διάγνωση της νόσου[49–54]. Πρόσφατα, οι πιο συχνά μελετημένοι βιοδείκτες συνοψίζονται σε σχέση με τους διάφορους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, όπως η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, φλεγμονή, οξειδωτικό στρες, πρωτεόλυση και θρόμβωση[49].

Παρακάτω γίνεται μια σύντομη αναφορά στους καρδιακούς δείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρύτατα σε κλινικό επίπεδο.

Μυογλοβίνη (Myoglobin, Mb)

Η μυογλοβίνη είναι μια πρωτεΐνη, με την οποία συνδέεται το οξυγόνο στους γραμμωτούς μυς (καρδιακούς και σκελετικούς). Είναι μια σχετικά μικρή πρωτεΐνη, η οποία απελευθερώνεται στον ορό μέσα στην πρώτη ώρα μετά την εμφάνιση του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Οι τιμές της κορυφώνονται μεταξύ 4-12 ωρών, ενώ στη συνέχεια απομακρύνεται ταχέως. Το σημαντικό πλεονέκτημα της μυογλοβίνης ως καρδιακός δείκτης είναι ότι απελευθερώνεται νωρίτερα από τα κατεστραμμένα κύτταρα απ' ότι άλλοι καρδιακοί δείκτες, επιτρέποντας έτσι την έγκαιρη διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου[55–58]. Ο κύριος λόγος που η μυογλοβίνη δεν χρησιμοποιείται από τα περισσότερα νοσοκομεία για την αξιολόγηση του θωρακικού πόνου, είναι η χαμηλή κλινική εξειδίκευσή της (60-90%), εξαιτίας την παρουσίας μεγάλων ποσοτήτων μυογλοβίνης στους σκελετικούς μύες. Ως εκ τούτου,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον αποκλεισμό αλλά όχι για την επιβεβαίωση της διάγνωσης τους εμφράγματος του μυοκαρδίου[59].

C-ΑΝΤΙΡΔΩΣΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ (C-REACTIVE PROTEIN, CRP)

Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη είναι μια πρωτεΐνη του αίματος, τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται γρήγορα σε απόκριση φλεγμονής. Χαρακτηρίζεται ως πρωτεΐνη οξείας φάσης, όρος που χαρακτηρίζει τις πρωτεΐνες που η συγκέντρωση τους αυξάνει τουλάχιστον 25% κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα της CRP έχουν αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν διαβήτη[60,61], υπέρταση ή καρδιαγγειακή νόσο.

Η αρτηριακή καταστροφή είναι αποτέλεσμα της εισβολής των λευκών αιμοσφαιρίων και της φλεγμονής εντός του τοιχώματος. Η CRP είναι ένας γενικός δείκτης για φλεγμονή και μόλυνση, έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Επειδή όμως πολλά πράγματα μπορούν να προκαλέσουν την αύξηση της CRP, δεν αποτελεί πολύ συγκεκριμένο προγνωστικό δείκτη[62]. Παρ' όλα αυτά, ένα επίπεδο πάνω από 2,4 mg/mL έχει συσχετισθεί με ένα διπλάσιο κίνδυνο εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου σε σύγκριση με τα επίπεδα κάτω από 1 mg/mL[63]. Ωστόσο, παραμένει ασαφής αν τα αυξημένα επίπεδα CRP έχουν κάποια προγνωστική αξία για τα οξέα στεφανιαία επεισόδια στο γενικό πληθυσμό όλων των ηλικιών.

ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΚΡΕΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ CK-MB (CREATINE KINASE, CK)

Η μέτρηση των επιπέδων της κινάσης της κρεατίνης και του ισοενζύμου MB, χρησιμοποιείται εδώ και καιρό για τη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Η κινάση της κρεατίνης, η οποία είναι ένα ένζυμο που υπάρχει σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του μυοκαρδίου και των σκελετικών μυών, αποτελείται από 3 ισοένζυμα: MM, MB και BB. Το ισοένζυμο CK-MB βρίσκεται σε μια σχετικά υψηλή συγκέντρωση στο μυοκάρδιο (περίπου 20% της συνολικής CK στο μυοκάρδιο), ενώ η συγκέντρωση του CK-MM είναι υψηλότερη στους σκελετικούς μύες (98% της συνολικής CK στους μύες), με μόνο μια μικρή ποσότητα του CK-MB (συνήθως περίπου 2%). Ωστόσο, υγιείς σκελετικοί μύες μπορεί να έχουν μέχρι 5% CK-MB, ενώ υψηλότερα επίπεδα (έως 20%) του CK-MB μπορεί να βρεθούν σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια και χρόνιο μυοσκελετικό τραυματισμό ή στο μυϊκό ιστό των εκπαιδευομένων αθλητών. Μολονότι το CK-MB αποτελεί περίπου το 20% της συνολικής CK στο μυοκάρδιο, θα πρέπει να σημειωθεί πως το CK-MM

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

εξακολουθεί να είναι η πιο άφθονη μορφή ισοενζύμου της CK στο μυοκαρδιακό ιστό. Αύξηση του επιπέδου της συνολικής CK δεν αποτελεί ειδικό καρδιακό δείκτη, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί σε ασθενείς με μυοσκελετικό τραυματισμό ή άλλες διαταραχές[59].

Το ισοένζυμο CK-MB μπορεί να διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση υψηλής τάσης σε δυο ισομορφές: CK-MB 1 και CK-MB 2[64]. Η ισομορφή CK-MB 1 βρίσκεται στο πλάσμα, ενώ η ισομορφή CK-MB 2 βρίσκεται στον ιστό και απελευθερώνεται από το κατεστραμμένο μυοκάρδιο. Το CK-MB 2 αρχίζει να αυξάνεται 2 ώρες αργότερα από την εμφάνιση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, ενώ κορυφώνεται στις 4-6 ώρες. Η μέτρηση των ισομορφών του CK-MB μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να βελτιώσει την έγκαιρη διάγνωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου[65].

➤ Νατριοουριτικο Πεπτιδιο Β-Τυπου (B-Type Natriuretic Peptide, BNP)

Το νατριουριτικό πεπτίδιο Β-τύπου φαίνεται πως αποτελεί ένα νέο διαγνωστικό δείκτη της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας. Έχει αποδειχθεί πως τα επίπεδα του BNP στο πλάσμα σχετίζονται με μακροπρόθεσμη καρδιαγγειακή θνησιμότητα σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας και της καρδιακής ανεπάρκειας σε αυτούς τους ασθενείς. Τα επίπεδα του BNP σχετίζονται με το μέγεθος της κοιλιακής δυσλειτουργίας παρουσία του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, και μπορεί, στο μέλλον, να αποδειχθεί ένα χρήσιμο τεστ ανίχνευσης για τον εντοπισμό ασθενών που διατρέχουν πολύ υψηλό κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας[59].

➤ Φωσφορυλαση του Γλυκογονου και GPBB (Glycogen Phosphorylase, GP)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα βασικό ένζυμο στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου[66–70]. Στον ανθρώπινο οργανισμό έχουν εντοπιστεί τρεις διαφορετικές μορφές ισοενζύμων GP: α) ισοένζυμο GPLL (ήπαρ), β) ισοένζυμο GPMM (μύες) και γ) ισοένζυμο GPBB (εγκέφαλος)[66,67]. Οι σκελετικοί μύες περιέχουν αποκλειστικά το ισοένζυμο GPMM, ενώ το ισοένζυμο GPLL βρίσκεται σε όλους τους ιστούς εκτός από τον εγκέφαλο, την καρδιά και τους σκελετικούς μύες. Το ισοένζυμο GPBB ανιχνεύεται κυρίως στον εγκέφαλο, αλλά μπορεί επίσης να βρεθεί σε υψηλή συγκέντρωση στον καρδιακό μυ[66,67]. Όταν υπάρχει υποξία των ιστών και ισχαιμία, η γλυκογονόλυση ξεκινάει με τη μετατροπή της GP στην πιο δραστική, διαλυτή και κυτταροπλασματική μορφή της από την κινάση της φωσφορυλάσης[68]. Καθώς είναι διαπερατή της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνει επίσης κατά τη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

διάρκεια της υποξίας. Με αυτόν τον τρόπο η υψηλή συγκέντρωση της GP στο σαρκοπλασματικό δίκτυο επιτρέπει την εκροή της στην κυκλοφορία του αίματος[68]. Με βάση την κατανομή του ισοενζύμου GPBB στον καρδιακό μυ και η αυξημένη συγκέντρωση της GP στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και υποξίας, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι το GPBB στο πλάσμα αποτελεί ένα βιοδείκτη των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων[68–71].

➤ ΤΡΟΠΟΝΙΝΕΣ

Η τροπονίνη είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο αποτελείται από τρεις διαφορετικές υπομονάδες, την τροπονίνη C (TnC), την τροπονίνη T (TnT) και την τροπονίνη I (TnI), κάθε μια από τις οποίες είναι υπεύθυνη για τη λειτουργία μέρους του συμπλόκου της τροπονίνης. Εντοπίζεται κυρίως στα μυϊκά ινίδια (94-97%) και μικρό ποσοστό (3-6%) στο κυτταρόπλασμα. Οι αλληλουχίες των αμινοξέων των σκελετικών και καρδιακών ισομορφών τόσο της TnT όσο και της TnI είναι μοναδικές, γεγονός που επιτρέπει την ανάπτυξη ανοσοαναλύσεων με μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία είναι ειδικά για την καρδιακή τροπονίνη T (cTnT) και την τροπονίνη I (cTnI). Τόσο η TnT όσο και η TnI απελευθερώνονται παρόμοια από το κατεστραμμένο μυοκάρδιο, καθώς τα επίπεδα και των δυο αυξάνονται στον ορό μέσα σε 4-9 ώρες μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, με μια κορύφωση στις 12-24 ώρες, ενώ παραμένουν υψηλά μέχρι και 14 ημέρες[72,73]. Μια κατάλληλη στρατηγική δοκιμών είναι η δειγματοληψία TnT ή TnI κατά την έναρξη του εμφράγματος, μετά από 8 και 16 ώρες, αφού έχει αποδειχθεί πως αποτελεί την βέλτιστη επιλογή για τη διάγνωση της νέκρωσης του μυοκαρδίου[74]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η cTnT και η cTnI δεν ανιχνεύονται κανονικά στο αίμα υγιών ατόμων. Ως εκ τούτου, οι σημαντικές αυξήσεις τους θεωρούνται πως αντανακλούν πιθανότατα σε νέκρωση του μυοκαρδίου.

1.6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Anand, S. S. & Yusuf, S. Stemming the global tsunami of cardiovascular disease. *Lancet* **377,** 529–32 (2011).

2. Deaton, C. *et al.* The global burden of cardiovascular disease. *J. Cardiovasc. Nurs.* **26,** S5–S14 (2011).

3. Paradis, G. & Chiolero, A. The cardiovascular and chronic diseases epidemic in low- and middle-income countries: A global health challenge. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57,** 1775–1777 (2011).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

4. Joshi, R., Jan, S., Wu, Y. & MacMahon, S. Global inequalities in access to cardiovascular health care: Our greatest challenge. *J. Am. Coll. Cardiol.* **52,** 1817–1825 (2008).

5. Danaei, G. *et al.* National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *Lancet* **378,** 31–40 (2011).

6. Finucane, M. M. *et al.* National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants. *Lancet* **377,** 557–567 (2011).

7. Lee, I.-M. *et al.* Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet* **380,** 219–229 (2012).

8. Lim, S. S. *et al.* A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380,** 2224–2260 (2012).

9. Labarthe, D. R. & Dunbar, S. B. Global cardiovascular health promotion and disease prevention: 2011 and beyond. *Circulation* **125,** 2667–2676 (2012).

10. Vital Signs: Avoidable Deaths from Heart Disease, Stroke, and Hypertensive Disease — United States, 2001–2010. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **62,** 721–727 (2013).

11. Pešek, K. *Atherosclerotic Cardiovascular Disease.* (2011).

12. Bhatia, S. K. *Biomaterials for clinical applications.* (2010).

13. Finegold, J. A., Asaria, P. & Francis, D. P. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int. J. Cardiol.* **168,** 934–945 (2013).

14. The global burden of disease: 2004 update. *World Heal. Organ. Dep. Heal. Stat. Informatics Inf.* (2004).

15. Longo, D. L. *et al. Harrison's Principles of Internal Medicine 18th Edition.* (2011).

16. Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C. & Fausto, N. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease 8th edition.* (2009).

17. Feigin, V. L. *et al.* Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies. *Stroke* **36,** 2773–2780 (2005).

18. Donnan, G. A. *et al.* Stroke. *Lancet* **371,** 1612–1623 (2008).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

19. Mathers, C. D., Boerma, T. & Ma Fat, D. Global and regional causes of death. *Br. Med. Bull.* **92,** 7–32 (2009).

20. Moini, J. *Cardiopulmonary pharmacology for Respiratory care.* 320 (2012).

21. Shiel, W. C. & Stöppler, M. C. *Webster's New World™ Medical Dictionary 3rd Edition.* 480 (2008).

22. McMurray, J. J. V. & Pfeffer, M. A. Heart failure. *Lancet* **365,** 1877–89 (2005).

23. Mandel, W. J. *Cardiac Arrhythmias: Their Mechanisms, Diagnosis, and Management 3rd Edition.* 860 (1995).

24. Bonow, R. O. *et al.* ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **114,** e84–e231 (2006).

25. Howard, B. V. & Wylie-Rosett, J. Sugar and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the committee on nutrition of the council on nutrition, physical activity, and metabolism of the american heart association. *Circulation* **106,** 523–527 (2002).

26. Finks, S. W. *et al.* Key articles of dietary interventions that influence cardiovascular Mortality. *Pharmacotherapy* **32,** e54–e87 (2012).

27. Fuster, V. & Kelly, B. B. *Promoting cardiovascular health in the developing world: A critical challenge to achieve global health.* 484 (2010).

28. Yusuf, S. *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* **364,** 937–952 (2004).

29. Hypertension fact sheet. *World Heal. Organ.* (2011).

30. Mendis, S., Puska, P. & Norrving, B. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. *World Heal. Organ.* (2011).

31. Sowers, J. R., Epstein, M. & Frohlich, E. D. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: An update. *Hypertension* **37,** 1053–1059 (2001).

32. Teo, K. K. *et al.* Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet* **368,** 6476–58 (2006).

33. The health consequences of smoking: A Report of the Surgeon General. *Centers Dis. Control Prev.* (2004).

34. Women and smoking: a report of the Surgeon General. *Centers Dis. Control Prev.* (2001).

35. The atlas of heart disease and stroke. *World Heal. Organ.* (2004).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

36. Jousilahti, P., Vartiainen, E., Tuomilehto, J. & Puska, P. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease : A prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation* **99,** 1165–1172 (1999).

37. Jani, B. & Rajkumar, C. Ageing and vascular ageing. *Postgrad. Med. J.* **82,** 357–362 (2006).

38. Ignarro, L. J., Balestrieri, M. L. & Napoli, C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. *Cardiovasc. Res.* **73,** 326–340 (2007).

39. Klatsky, A. L. Alcohol and cardiovascular diseases. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **7,** 499–506 (2009).

40. McTigue, K. M., Hess, R. & Ziouras, J. Obesity in older adults: A systematic review of the evidence for diagnosis and treatment. *Obesity* **14,** 1485–1497 (2006).

41. Linden, W., Stossel, C. & Maurice, J. Psychosocial interventions for patients with coronary artery disease: A meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* **156,** 745–752 (1996).

42. Marshall, I. J., Wolfe, C. D. A. & McKevitt, C. Lay perspectives on hypertension and drug adherence : Systematic review of qualitative research. *Br. Med. J.* **345,** e3953 (2012).

43. Dickinson, H. O. *et al.* Lifestyle interventions to reduce raised blood pressure: A systematic review of randomized controlled trials. *J. Hypertens.* **24,** 215–233 (2006).

44. Walraven, G. *Basic Arrhythmias 7th Edition.* (2010).

45. Hilbel, T., Helms, T. M., Mikus, G., Katus, H. A. & Zugck, C. Telemetry in the clinical setting. *Herzschrittmacherther. Elektrophysiol.* **19,** 146–154 (2008).

46. Atkinson, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69,** 89–95 (2001).

47. Redberg, R. F. *et al.* Task force #3—what is the spectrum of current and emerging techniques for the noninvasive measurement of atherosclerosis? *J. Am. Coll. Cardiol.* **41,** 1886–1898 (2003).

48. Fox, N. & Growdon, J. H. Biomarkers and surrogates. *Am. Soc. Exp. Neurother.* **1,** 181 (2004).

49. Martín-Ventura, J. L. *et al.* Biomarkers in cardiovascular medicine. *Rev. Española Cardiol.* **62,** 677–688 (2009).

50. Stubbs, P. & Collinson, P. O. Point-of-care testing: A cardiologist's view. *Clin. Chim. Acta* **311,** 57–61 (2001).

51. Kost, G. J. & Tran, N. K. Point-of-care testing and cardiac biomarkers: The standard of care and vision for chest pain centers. *Cardiol. Clin.* **23,** 467–490 (2005).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

52. McDonnell, B., Hearty, S., Leonard, P. & O'Kennedy, R. Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing. *Clin. Biochem.* **42,** 549–561 (2009).

53. Vasan, R. S. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* **113,** 2335–2362 (2006).

54. Anderson, L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J. Physiol.* **563,** 23–60 (2005).

55. Gibler, W. B. *et al.* Myoglobin as an early indicator of acute myocardial infarction. *Ann. Emerg. Med.* **16,** 851–856 (1987).

56. Adams, J. E., Abendschein, D. R. & Jaffe, A. S. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation* **88,** 750–763 (1993).

57. Mair, J. *et al.* Equivalent early sensitivities of myoglobin, creatine kinase MB mass, creatine kinase isoform ratios, and cardiac troponins I and T for acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* **41,** 1266–72 (1995).

58. Mercer, D. W. Role of cardiac markers in evaluation of suspected myocardial infarction. Selecting the most clinically useful indicators. *Postgrad. Med.* **102,** 113–122 (1997).

59. Lewandrowski, K., Chen, A. & Januzzi, J. Cardiac markers for myocardial infarction: A brief review. *Pathol. Patterns Rev.* **118,** S93–S99 (2002).

60. Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E. & Ridker, P. M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Med. Assoc.* **286,** 327–334 (2001).

61. Dehghan, A. *et al.* Genetic variation, C-reactive protein levels, and incidence of diabetes. *Diabetes* **56,** 872–878 (2007).

62. Lloyd-Jones, D. M., Liu, K., Tian, L. & Greenland, P. Narrative review: Assessment of C-reactive protein in risk prediction for cardiovascular disease. *Ann. Intern. Med.* **145,** 35–42 (2006).

63. Pepys, M. B. & Hirschfield, G. M. C-reactive protein: A critical update. *J. Clin. Invest.* **111,** 1805–1812 (2003).

64. Wu, A. H. B., Wang, X.-M., Gornet, T. G. & Ordóñez-Llanos, J. Creatine kinase MB isoforms in patients with skeletal muscle injury: Ramifications for early detection of acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* **38,** 2396–2400 (1992).

65. Puleo, P. R. *et al.* Use of a rapid assay of subforms of creatine kinase-MB to diagnose or rule out acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **331,** 561–566 (1994).

66. Newgard, C. B., Hwang, P. K. & Fletterick, R. J. The family of glycogen phosphorylases: Structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24,** 69–99 (1989).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

67. Kato, K., Shimizu, A., Kurobe, N., Takashi, M. & Koshikawa, T. Human brain-type glycogen phosphorylase: Quantitative localization in human tissues determined with an immunoassay system. *J. Neurochem.* **52,** 1425–1432 (1989).

68. Krause, E.-G., Rabitzsch, G., Noll, F., Mair, J. & Puschendorf, B. Glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of myocardial ischaemic injury and infarction. *Mol. Cell. Biochem.* **160-161,** 289–295 (1996).

69. Apple, F. S. *et al.* Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin. Chem.* **51,** 810–824 (2005).

70. Peetz, D. *et al.* Glycogen phosphorylase BB in acute coronary syndromes. *Clin. Chem. Lab. Med.* **43,** 1351–1358 (2005).

71. Rabitzsch, G. *et al.* Immunoenzymometric assay of human glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of ischemic myocardial injury. *Clin. Chem.* **41,** 966–978 (1995).

72. Wu, A. H. B. *et al.* National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin. Chem.* **45,** 1104–1121 (1999).

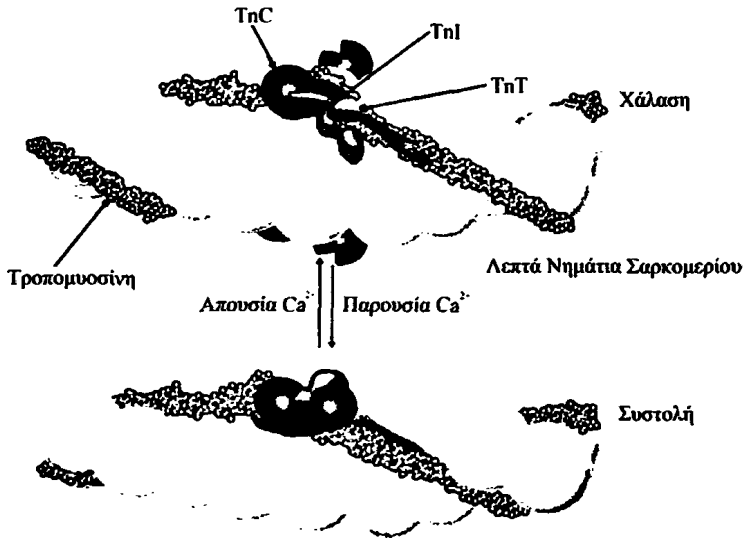
73. Bertinchant, J.-P. *et al.* Release kinetics of serum cardiac troponin I in ischemic myocardial injury. *Clin. Biochem.* **29,** 587–594 (1996).

74. Newby, L. K. *et al.* Value of serial troponin T measures for early and late risk stratification in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **98,** 1853–1859 (1998).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο



ΤΡΟΠΟΝΙΝΕΣ

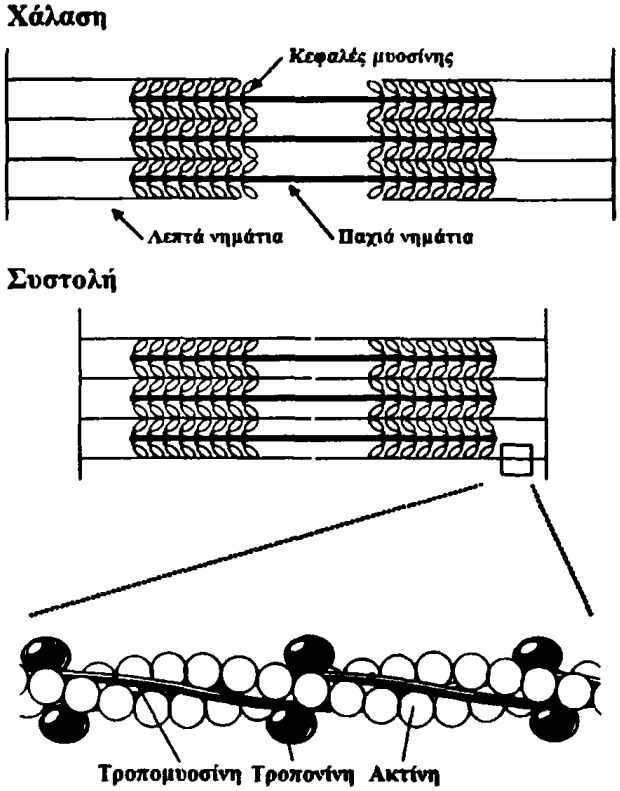
ΔΟΜΗ, ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μυϊκή συστολή προκαλείται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο κύριων πρωτεϊνών, της μυοσίνης και της ακτίνης. Στους σκελετικούς και καρδιακούς μύες, είτε η ακτίνη είτε η μυοσίνη πολυμερίζεται για το σχηματισμό νηματίων, τα λεπτά και τα παχιά νημάτια, αντίστοιχα. Η ολισθαίνουσα δράση αυτών των δυο νηματίων, η οποία οδηγεί σε μυϊκή συστολή, ρυθμίζεται από τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις του Ca^{2+}. Η μοριακή βάση για τη ρύθμιση του Ca^{2+} καθιερώθηκε για πρώτη φορά από τον S. Ebashi κα τους συνεργάτες του, οι οποίοι προσδιόρισαν την τροπονίνη και την τροπομυοσίνη ως κύριες πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία[1]. Η τροπονίνη, με μια σχετική μοριακή μάζα περίπου 80.000 (80 kDa), αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την τροπονίνη T (TnT), την τροπονίνη I (TnI) και την τροπονίνη C (TnC), ενώ βρίσκεται κατά μήκος της πολυμερισμένης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ακτίνης μαζί με την τροπομυοσίνη, σχηματίζοντας τον κορμό του νηματίου με μια αναλογία τροπονίνης:τροπομυοσίνης:ακτίνης 1:1:7 (**Εικόνα 2.1.1**)[2–5].



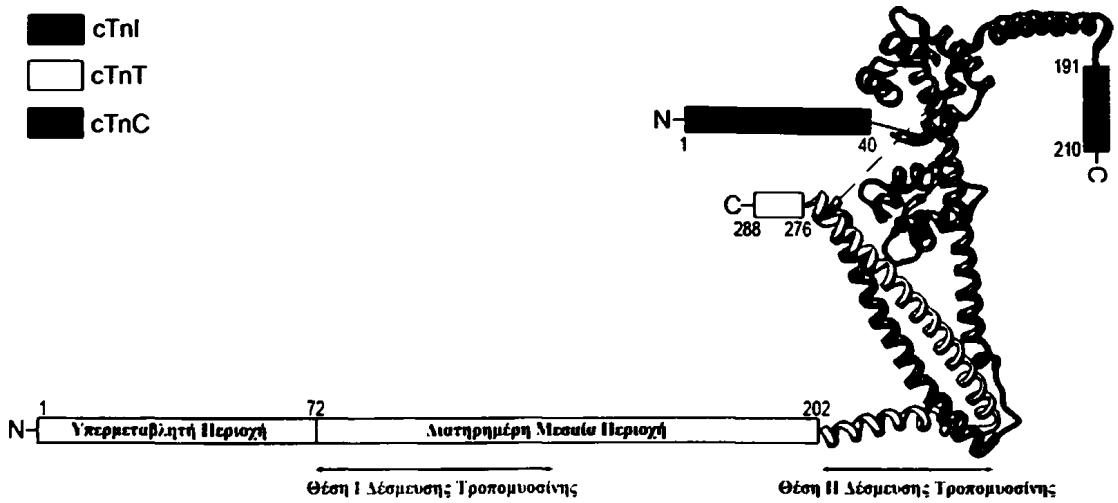
Εικόνα 2.1.1. Σχηματική απεικόνιση της υπερδομής των γραμμωτών μυών[6].

2.2. Οι Τρεις Υπομονάδες του Συμπλοκου της Τροπονινης

Το σύμπλοκο της τροπονίνης είναι ένα ετεροτριμερές, το οποίο αποτελείται από τρεις πρωτεϊνικές υπομονάδες. Κάθε μια υπομονάδα ονομάζεται σύμφωνα με τη λειτουργία που εκτελεί. Ως εκ τούτου, έχουμε την **τροπονίνη C (Calcium-binding Protein, TnC)**, η οποία ανήκει σε μια μεγάλη κατηγορία ασβέστιο-δεσμευτικών πρωτεϊνών, την **τροπονίνη I (Inhibitor, TnI)**, η οποία είναι υπεύθυνη για την αναστολή της ATPασης της ακτινομυοσίνης, και τέλος, την **τροπονίνη T (Tropomyosin-binding, TnT)**, η οποία αλληλεπιδρά στα λεπτά νημάτια των μυϊκών ιστών με την τροπομυοσίνη[7] (**Εικόνα 2.2.2**). Μελέτες χαμηλής ανάλυσης κρυσταλλογραφίας ακτίνων X[8] και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο[9] έδειξαν πως το σύμπλοκο της τροπονίνης μπορεί να διαιρεθεί σε δυο δομικές περιοχές: την επέκταση της TnT, η οποία δεσμεύει την τροπομυοσίνη, και τον βασικό τομέα, ο οποίος φέρει το μεγαλύτερο μέρος της ρυθμιστικής λειτουργίας της τροπονίνης. Επιπλέον, κρυσταλλογραφικές δομές υψηλής ανάλυσης έδειξαν ότι ο βασικός τομέας της καρδιακής τροπονίνης περιέχει δυο διακριτές

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

δομικά υποπεριοχές, οι οποίες αποτελούν την ρυθμιστική κεφαλή (αμινοξική αλληλουχία 3-84 της TnC και 150-159 της TnI) και το βραχίονα I-T (αμινοξική αλληλουχία 93-161 της TnC, 42-136 της TnI και 203-271 της TnT). Σε αυτές τις περιοχές κυριαρχεί η μορφή της α-έλικας, οι οποίες συνδέονται με εύκαμπτα συνδετικά μόρια, και κάνουν το μόριο να είναι ασύμμετρο και εξαιρετικά ευέλικτο, το οποίο αποτελεί ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό της τροπονίνης στη ρύθμιση της συστολής των μυών και της χάλασης[10,11].



Εικόνα 2.2.2. Σχηματική απεικόνιση της καρδιακής τροπονίνης[10].

Οι τρεις υπομονάδες της τροπονίνης κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Η έκφρασή τους ρυθμίζεται κατά την εμβρυϊκή και μεταγεννητική ανάπτυξη, καθώς και οι φυσιολογικές και παθολογικές προσαρμογές[12–14]. Τόσο η TnI όσο και η TnT εμφανίζουν τρεις ισομορφές, εκ των οποίων οι δυο εκφράζονται στους μυοσκελετικούς ιστούς (ισομορφή αργής και γρήγορης μυϊκής σύσπασης) και μόνο μια στο μυοκάρδιο[12,13,15]. Αντίθετα, η TnC παρουσιάζει μόνο δυο ισομορφές, με την πρώτη να είναι αμιγώς μυοσκελετική, ενώ η δεύτερη απαντάται τόσο στους σκελετικούς μύες όσο και στο μυοκάρδιο[16–18].

2.2.1. Τροπονινη C (TnC)

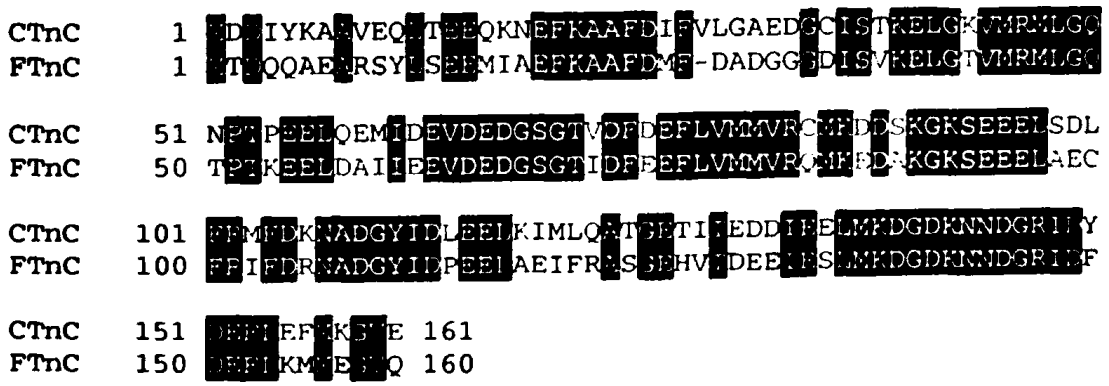
Η τροπονίνη C ανήκει στην υπεροικογένεια των γονιδίων που κωδικοποιούν την καλμοδουλίνη, σχηματίζοντας μια μονάδα διαμόρφωσης έλικας-θηλιάς-έλικας, η οποία περιέχει τέσσερα μοτίβα "χέρι-EF" (EF-hand), όπου βρίσκονται οι θέσεις δέσμευσης δισθενών μεταλλοϊόντων[17,19]. Το C-τελικό άκρο της TnC περιέχει δυο θέσεις δέσμευσης υψηλής συγγένειας για Ca^{2+} ή Mg^{2+} (Θέση III και Θέση IV), οι οποίες καταλαμβάνονται κυρίως από Mg^{2+} όταν τα μυϊκά κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας και μπορεί να δεσμευτεί

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

μερικώς Ca^{2+} κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης της συστολής[20]. Το C-τελικό άκρο της TnC παίζει δομικό ρόλο για τη διατήρηση της δέσμευσης ολόκληρου του συμπλόκου της τροπονίνης στο λεπτό νημάτιο[21].

Το N-τελικό άκρο των σκελετικών μυών γρήγορης μυϊκής σύσπασης της TnC διαθέτει δυο χαμηλής συγγένειας θέσεις δέσμευσης μεταλλοϊόντων, οι οποίες ορίζονται ως Θέση I και Θέση II και αποτελούν τις ρυθμιστικές θέσεις δέσμευσης του Ca^{2+}, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της μυϊκής συστολής[22,23]. Η παροδική αύξηση του Ca^{2+} στο κυτοσόλιο κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης της συστολής έχει σαν αποτέλεσμα τη δέσμευση του Ca^{2+} στο N-τελικό άκρο της TnC και διεγείρει μια αλληλουχία διαμορφωτικών αλλαγών στο σύμπλοκο της τροπονίνης και στα λεπτά νημάτιο του σαρκομερίου[5,17,20,24]. Οι διαμορφωτικές αλλαγές αυξάνουν τη συγγένεια δέσμευσης της TnC για την TnI, προωθώντας μια αποδέσμευση της TnI από την ακτίνη, η οποία απελευθερώνει την αναστολή της ATPασης της ακτινομυοσίνης και ενεργοποιεί την ολίσθηση των μυονηματίων και τη βράχυνση του σαρκομερίου[25].

Διαφορετικό από τους σκελετικούς μύες γρήγορης σύσπασης της TnC, το N-τελικό άκρο των καρδιακών και σκελετικών μυών αργής σύσπασης της TnC περιέχει μόνο μια ενεργή θέση δέσμευσης του Ca^{2+} (Θέση II), ενώ η Θέση I έχει χάσει την ικανότητα να δεσμεύσει το Ca^{2+}[26]. Απαλοιφή της Θέσης II στους καρδιακούς και σκελετικούς μύες αργής σύσπασης της TnC καθιστά τις καρδιακές ίνες αδρανείς στο Ca^{2+}, ενώ η αναδιοργάνωση της ενεργής Θέσης I δεν αντισταθμίζει την επίδραση τη μετάλλαξης της Θέσης II. Ως εκ τούτου, η Θέση II διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο, υπεύθυνο για τη ρυθμιστική λειτουργία των καρδιακών και σκελετικών μυών αργής σύσπασης της TnC[23].



Εικόνα 2.2.1.3. Αμινοξική αλληλουχία των ισομορφών της τροπονίνης C (CTnC: καρδιακή και σκελετική τροπονίνη C αργής σύσπασης και FTnC: σκελετική τροπονίνη C γρήγορης σύσπασης)[27].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

2.2.2. Τροπονινη Τ (TnT)

Η τροπονίνη Τ είναι μια ειδική πρωτεΐνη των γραμμωτών μυών, η οποία αποτελείται περίπου από 250-305 αμινοξέα, ενώ το μοριακό της βάρος κυμαίνεται από 31-36 kDa. Όπως και με τα διαφοροποιημένα γονίδια των ισομορφών της TnI, υπάρχουν τρία γονίδια για τις ισομορφές της TnT[12,43]. Εκτός από την ειδική έκφραση σε καρδιομυοκύτταρα, η καρδιακή TnI εκφράζεται επίσης σε σημαντικά επίπεδα σε εμβρυϊκούς σκελετικούς μύες[44,45] και σε μυοπαθητικούς σκελετικούς μύες ασθενών, καθώς και όσων πάσχουν από μυϊκή δυστροφία τύπου Duchenne[46], υποδεικνύοντας πιθανόν την ενεργή ανάπτυξη ή την αναγέννηση.

```
CTnT 1     MSDIEEVVEEYEEEEQEEAAVEEQEEAAEEDAEAEAETEETRAEEDEEEE
FTnT 1     --------MSDEEVEQVEEQYEEEEEAQEEE-----EVQEDTAEEDAEEE
STnT 1     MSDTEEQ--EYEEEQPEEEAAEEEEEAPEEP------EPVAEPEEERPK

CTnT 51    EAKEAEDGPMEESKPKPRSFMPNLVPPKIPDGERVDFDDIHRKRMEKDLN
FTnT 38    K---------------PR---PKLTAPKIPEGEKVDFDDIQKKRQNKDLM
STnT 42    P---------------SRPVVPPLIPPKIPEGERVDFDDIHRKRMEKDLL

CTnT 101   ELQALIEAHFENRKKEEEELVSLKDRIERRRAERAEQQRIRNEREKERQN
FTnT 70    ELQALIDSHFEARKKEEEELVALKERIEKRRAERAEQQRIRAEKERERQN
STnT 77    ELQTLIDVHFEQRKKEEEELVALKERIERRRSERAEQQRFRTEKERERQA

CTnT 151   RLAEERARREEEENRRKAEDEARKKKALSNMMHFGGYIQKQAQTERKSGK
FTnT 120   RLAEEKARREEEDAKRRAEDDLKKKKALSSMG--ANYSSYLAKADQKRGK
STnT 127   KLAEEKMRKEEEEAKKRAEDDAKKKKVLSNMG--AHFGGYLVKAEQKRGK

CTnT 201   RQTEREKKKKILAERRKVLAIDHLNEDQLR----------------EKAK
FTnT 168   KQTAREMKKKILAERRKPLNIDHLGEDKLR----------------DKAK
STnT 175   RQTGREMKVRILSERKKPLDIDYMGEEQLRARSAWLPPSQPSCPAREKAQ

CTnT 235   ELWQSIYNLEAEKFDLQEKFKQQKYEINVLRNRINDNQKVSKTRG---KA
FTnT 202   ELWETLHQLEIDKFEFGEKLKRQKYDITTLRSRIDQAQKHSKKAGTPAKG
STnT 225   ELSDWIHQLESEKFDLMAKLKQQKYEINVLYNRISHAQKFRKGAG---KG

CTnT 282   KVTGRWK 288
FTnT 252   KVGGRWK 258
STnT 272   RVGGRWK 278
```

Εικόνα 2.2.2.4. Αμινοξική αλληλουχία των ισομορφών της τροπονίνης Τ (CTnT: καρδιακή τροπονίνη Τ, FTnT: σκελετική τροπονίνη Τ γρήγορης σύσπασης και STnT: σκελετική τροπονίνη Τ αργής σύσπασης)[27].

✦ Δομικες και Λειτουργικες Περιοχες της TnT

Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν πως η δομή της TnT είχε διαχωριστεί σε δυο λειτουργικές περιοχές, ανάλογα με τα θραύσματα που προκύπτουν όταν χρησιμοποιηθούν η

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

χυμοθρυψίνη και το CNBr, δηλ. τα θραύσματα T1 και T2 (αμινοξική αλληλουχία 1-158 και 159-259, αντίστοιχα, σε σκελετική TnT κουνελιού)[47,48]. Το θραύσμα T1 δεσμεύει τη σύνδεση κεφαλή-ουρά της τροπομυοσίνης, κυρίως μέσω ενός τμήματος 39 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της διατηρημένης μεσαίας περιοχής της TnT[49]. Το C-τελικό άκρο του θραύσματος T2 περιέχει θέσεις σύνδεσης για την TnC, την TnI και την F-ακτίνη[48,50,51], καθώς και μια άλλη περιοχή σύνδεσης της τροπομυοσίνης σε ένα θραύσμα 25 αμινοξέων κοντά στην αρχή της T2 περιοχής[49], η οποία δεσμεύει την κεντρική περιοχή της τροπομυοσίνης[52]. Το τρέχον μοντέλο δηλώνει πως η TnT παίζει ρόλο αγκυρώσεως και μεταδίδει το σήμα της Ca^{2+}-TnC πρόσδεσης στο ρυθμιστικό σύστημα των λεπτών νηματίων στους γραμμωτούς μύες[48].

Το N-τελικό άκρο της TnT είναι μια "υπερμεταβλητή" περιοχή[48]. Η συγκεκριμένη περιοχή έχει μεταβλητά μήκη και μεταβλητές αλληλουχίες αμινοξέων. Η καρδιακή TnT έχει μεγαλύτερο μέγεθος απ' ότι η σκελετική TnT γρήγορης και αργής σύσπασης, κυρίως λόγω του μεγαλύτερου μεταβλητού N-τελικού άκρου[14,48]. Η μεταβλητή περιοχή του N-τελικού άκρου της TnT δεν περιέχει θέσεις πρόσδεσης για άλλες γνωστές πρωτεΐνες μυονηματίων[12,14,48].

2.2.3. ΤΡΟΠΟΝΙΝΗ I (TnI)

Η τροπονίνη I είναι η ανασταλτική υπομονάδα του συμπλόκου της τροπονίνης. Απουσία Ca^{2+}, η ανασταλτική της περιοχή συνδέεται με την ακτίνη, και έτσι αναστέλλει την ATPαση της ακτινομυοσίνης[28]. Παρουσία Ca^{2+}, το C-τελικό άκρο της TnC αλληλεπιδρά με την TnI για να προκαλέσει διαμορφωτικές αλλαγές στην TnI, απελευθερώνει την ανασταλτική της δράση και αρχίζει η σύσπαση των μυών[28,29].

Στους γραμμωτούς μύες τα γονίδια των τριών ισομορφών της TnI[13,29,30] εκφράζονται διαφορετικά. Οι μυϊκές ίνες γρήγορης σύσπασης εκφράζουν μόνο την TnI γρήγορης σύσπασης, όπως και οι μυϊκές ίνες αργής σύσπασης εκφράζουν την TnI αργής σύσπασης. Κατά συνέπεια, η εναλλαγή της TnI (και TnT) αργής σύσπασης σε γρήγορη συμβαίνει κατά τη διάρκεια της μετάβασης των ινών αργής σύσπασης σε γρήγορη στη μυϊκή προσαρμογή[31,32].

Όπως αναφέρεται παραπάνω, οι καρδιακοί μύες αλλάζουν τις ισομορφές της TnI κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης[33]. Το γονίδιο των σκελετικών μυών αργής σύσπασης της TnI εκφράζεται στην εμβρυϊκή καρδιά και απενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Στη γέννηση, η έκφραση του γονιδίου της καρδιακής TnI αυξορρυθμίζεται για να αντικαταστήσει πλήρως την TnI αργής σύσπασης στους καρδιακούς μύες ενός ενηλίκου[33,34]. Η καρδιά ενός ενήλικου εκφράζει την καρδιακή TnI ως τη μοναδική ισομορφή και δεν αλλάζει κάτω από

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

παθολογικές συνθήκες, όπως ισχαιμική καρδιοπάθεια, διατατική μυοκαρδιοπάθεια ή στο τελικό στάδιο καρδιακής ανεπάρκειας[34]. Αυτή η αναπτυξιακή μετάβαση της ισομορφής της TnI μπορεί να συμβάλει στις διαφορές της ευαισθησίας του Ca^{2+} και της απόκρισης του pH στην ανάπτυξη δύναμης των μυοκαρδιακών κυττάρων[35]. Η υπερέκφραση της TnI αργής σύσπασης στους καρδιακούς μύες ενήλικων διαγονιδιακών ποντικιών μείωσε τη χάλαση των μυοκαρδιακών κυττάρων και τη διαστολική καρδιακή λειτουργία λόγω της αυξημένης ευαισθησίας του Ca^{2+}[36]. Από την άλλη πλευρά, η TnI αργής σύσπασης αύξησε την ανοχή των μυοκαρδιακών κυττάρων στην οξέωση, η οποία προκαλεί αύξηση της ευαισθησίας του Ca^{2+} στα μυονημάτια[37]. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν πως η TnI αργής σύσπασης παράγει Ca^{2+} υψηλότερης συγγένειας του συμπλόκου της τροπονίνης από εκείνο της καρδιακής TnI, η οποία μπορεί να διατηρήσει την ευαισθησία του Ca^{2+} των μυονηματίων σε χαμηλότερο pH (6.5 έναντι 7.0) στα εμβρυϊκά καρδιομυοκύτταρα[38].

Εικόνα 2.2.3.5. Αμινοξική αλληλουχία των ισομορφών της τροπονίνης I (CTnI: καρδιακή τροπονίνη I, FTnI: σκελετική τροπονίνη I γρήγορης σύσπασης και STnI: σκελετική τροπονίνη I αργής σύσπασης)[27].

✦ Δομικά Χαρακτηριστικά της Καρδιακής TnI

Με βάση τις *in vitro* μελέτες σχέσης δομής-λειτουργίας, η δομή της καρδιακής TnI μπορεί να χωριστεί σε έξι λειτουργικά τμήματα[39] (**Εικόνα 2.2.2**):

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

1. **Αμινοξική Αλληλουχία (1-30):** N-τελικό άκρο, το οποίο είναι παρόν μόνο στην καρδιακή TnI και όχι στην TnI γρήγορης και αργής σύσπασης.
2. **Αμινοξική Αλληλουχία (42-79):** Περιοχή του N-τελικού άκρου, η οποία δεσμεύεται με το C-τελικό άκρο της TnC.
3. **Αμινοξική Αλληλουχία (80-136):** Δεσμεύεται με την TnT.
4. **Αμινοξική Αλληλουχία (128-147):** Αποτελεί την ανασταλτική περιοχή.
5. **Αμινοξική Αλληλουχία (148-163):** Περιοχή, η οποία δεσμεύεται με N-τελικό άκρο της TnC.
6. **Αμινοξική Αλληλουχία (164-210):** C-τελικό άκρο, το οποίο δεσμεύει την ακτίνη-τροπομυοσίνη, και αποτελεί το πιο διατηρημένο τμήμα, πολύ παρόμοιο μεταξύ των ισομορφών και των ειδών[12,40].

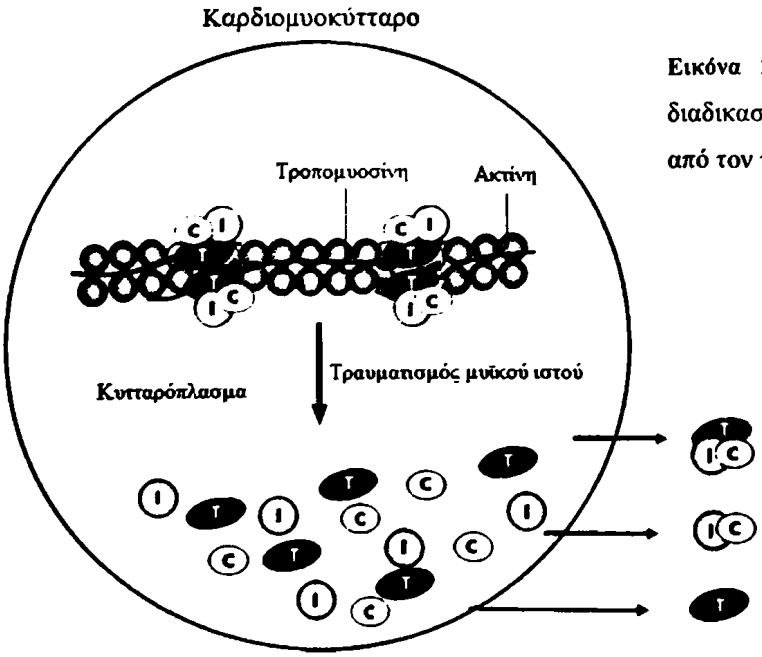
Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι τα τελευταία 20 αμινοξέα του C-τελικού άκρου της TnI (αμινοξική αλληλουχία 191-210), τα οποία κωδικοποιούνται από 8 εξώνια, είναι μια ασβέστιο-διαμορφωμένη αλλοστερική δομή[40,41]. Πειράματα δέσμευσης πρωτεΐνης έδειξαν πως αυτό το τμήμα λειτουργεί μέσω ασβέστιο-ρυθμιζόμενων διαμορφωτικών αλλαγών και αλληλεπιδράσεων με την τροπομυοσίνη[41,42].

2.3. ΚΑΡΔΙΑΚΕΣ ΤΡΟΠΟΝΙΝΕΣ

Οι καρδιακές τροπονίνες είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες ελέγχουν το ασβέστιο στην αλληλεπίδραση ακτίνης και μυοσίνης και έχει σαν αποτέλεσμα τη συστολή και χάλαση των γραμμωτών μυών. Όπως αναφέρθηκε πριν, το σύμπλοκο της τροπονίνης αποτελείται από τρεις υπομονάδες: την τροπονίνη C, η οποία δεσμεύει το ασβέστιο, την τροπονίνη I, η οποία αναστέλλει την αλληλεπίδραση ακτίνης-μυοσίνης, και την τροπονίνη T, μέσω της οποίας το σύμπλοκο της τροπονίνης δεσμεύεται στην τροπομυοσίνη και διευκολύνει τη συστολή. Η TnC εκφράζεται τόσο από τα καρδιακά όσο και από τα μυοσκελετικά κύτταρα. Αντίθετα, οι αμινοξικές αλληλουχίες των TnI και TnT είναι μοναδικές στον καρδιακό μυ. Αυτή η διαφορά επέτρεψε την ανάπτυξη γρήγορων, ποσοτικών δοκιμών για την ανίχνευση αυξήσεων των καρδιακών τροπονινών στον ορό. Το επίπεδο της τροπονίνης του πλάσματος σε υγιή άτομα θεωρείται πως είναι 0,1-0,2 ng/L, εξαιτίας της συνεχούς μικροσκοπικής απώλειας καρδιομυοκυττάρων κατά την κανονική ζωή[53].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Το μεγαλύτερο μέρος της τροπονίνης δεσμεύεται δομικά από το σύστημα συστολής του μυονηματίου, εκτός του 7% της τροπονίνης Τ και του 3-5% της τροπονίνης Ι, οι οποίες βρίσκονται ελεύθερες στο κυτταρόπλασμα[54]. Αφού συμβεί ζημιά στα μυοκύτταρα, υπάρχει μια διφασική αύξηση της τροπονίνης στον ορό, η οποία αντιστοιχεί στην αρχική απελευθέρωση της ελεύθερης τροπονίνης που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ακολουθούμενη από την σταδιακή διασπορά του συμπλόκου της τροπονίνης, το οποίο είναι δεσμευμένο στα μυονημάτια[55,56]. Η διατοιχωματική νέκρωση του μυοκαρδίου απαιτεί τουλάχιστον 2-4 ώρες, ενώ σε περιπτώσεις προετοιμασίας, παράπλευρης κυκλοφορίας ή διαλείπουσα απόφραξη στεφανιαίας αρτηρίας μπορεί να απαιτείται περισσότερος χρόνος[57]. Μολονότι η κινητική της τροπονίνης δεν επιτρέπει με αξιοπιστία την έγκαιρη διάγνωση (αρχικά 1-2 ώρες) της νέκρωσης του μυοκαρδίου, η τροπονίνη μπορεί να ανιχνευθεί περίπου 2-4 ώρες αργότερα από την έναρξη της μυοκαρδιακής βλάβης[58,59]. Ως εκ τούτου, τα δείγματα αίματος συνίσταται να συλλέγονται, τόσο κατά την εμφάνιση όσο και 6-9 ώρες αργότερα για να βελτιστοποιηθεί τόσο η κλινική ευαισθησία όσο και η εξειδίκευση[57,59]. Τα επίπεδα στον ορό μπορούν να παραμένουν αυξημένα μέχρι 4-7 ημέρες για την TnI και 10-14 ημέρες για την TnT[60]. Αν και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο απομακρύνεται η τροπονίνη είναι άγνωστος, δεδομένου το σχετικώς μεγάλο μοριακό της μέγεθος, πιστεύεται πως η τροπονίνη απομακρύνεται από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα[61]. Ωστόσο, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν πως η TnT κατακερματίζεται σε μόρια τα οποία είναι αρκετά μικρά για να απεκκρίνονται από τους νεφρούς, γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγήσει τα υψηλά ποσοστά της TnT σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια[62].



Εικόνα 2.3.6. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απελευθέρωσης της τροπονίνης από τον τραυματισμένο ιστό.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

2.4. Ευαισθησια και Εξειδικευση Τροπονινης

Η κινητική της τροπονίνης υπαγορεύει πως η ευαισθησία της τροπονίνης βελτιώνεται με το χρόνο. Χρησιμοποιώντας συμβατικές δοκιμές, η ευαισθησία της TnT κατά τη στιγμή της εισαγωγής στο νοσοκομείο κυμαίνεται από 25-65%, ενώ αυξάνεται στο 59-90% από 2-6 ώρες μετά την εμφάνιση[63–65]. Η ευαισθησία προσεγγίζει το 100% από 6-12 ώρες μετά την εισαγωγή[63,64]. Η ευαισθησία της TnI κατά την εισαγωγή είναι μικρότερη από 45%, η οποία αυξάνεται στο 69-82%, όταν μετράται 2-6 ώρες αργότερα, και παρόμοια με την TnT, επιτυγχάνει 100% ευαισθησία στις 6-12 ώρες μετά την εισαγωγή[63–65]. Έτσι, η μέγιστη ευαισθησία της δοκιμής πρότυπης τροπονίνης επιτυγχάνεται μετά τις 6 ώρες από την έναρξη της μυοκαρδιακής νέκρωσης[58,66]. Ως εκ τούτου, συνίσταται τα δείγματα αίματος για τη μέτρηση των επιπέδων της τροπονίνης να συλλέγονται κατά την εμφάνιση και 6-9 ώρες αργότερα, ούτως ώστε να βελτιστοποιηθεί τόσο η κλινική ευαισθησία όσο και η εξειδίκευση για τη διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου[59]. Η θετική προγνωστική αξία της τροπονίνης αυξάνεται επίσης με το σειριακό έλεγχο, βελτιώνοντας από το 25% της TnI και το 35% της TnT κατά την εμφάνιση στο 89% και 57%, αντίστοιχα, ύστερα από 12 ώρες[64].

Η εξειδίκευση δεν μεταβάλλεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Η εξειδίκευση της TnI κυμαίνεται από 83-98%[64,65,67], ενώ της TnT κυμαίνεται από 86-98%[64,65]. Η αρνητική προγνωστική αξία της TnI και TnT κατά την εμφάνιση είναι 85% και 88%, αντίστοιχα, και αυξάνεται στο 98% και 99%, αντίστοιχα, μετά από 12 ώρες[64]. Ως αποτέλεσμα της υψηλής εξειδίκευσης του ιστού, η καρδιακή τροπονίνη συνδέεται με λιγότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα στον καθορισμό ταυτόχρονης μυοσκελετικής βλάβης από ότι άλλοι βιοδείκτες, όπως το CK-MB. Αυτό το εγγενές χαρακτηριστικό της τροπονίνης έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της μυοκαρδιακής βλάβης σε ασθενείς με χρόνιες παθήσεις των μυών, συνθλιπτικά τραύματα, καθώς και σε μαραθωνοδρόμους, μετά από ηλεκτρική ανάνηψη[67–70]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η εξειδίκευση του ιστού της καρδιακής τροπονίνης είναι διακριτή από την εξειδίκευση για το μηχανισμό της μυοκαρδιακής βλάβης, έτσι ώστε, σε περίπτωση που βρεθούν αυξημένα επίπεδα τροπονίνης απουσία μυοκαρδιακής ισχαιμίας, πρέπει να επιδιωχθεί μια αξιολόγηση για εναλλακτικές αιτιολογίες της μυοκαρδιακής βλάβης.

2.5. Βιβλιογραφια

1. Ebashi, S. & Endo, M. Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **18**, 123–166 (1968).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

2. Ohtsuki, I., Maruyama, K. & Ebashi, S. Regulatory and cytoskeletal proteins of vertebrate skeletal muscle. *Adv. Protein Chem.* **38,** 1–67 (1986).

3. Zot, A. S. & Potter, J. D. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16,** 535–559 (1987).

4. Farah, C. S. & Reinach, F. C. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.* **9,** 755–767 (1995).

5. Gordon, A. M., Homsher, E. & Regnier, M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* **80,** 853–924 (2000).

6. Takeda, S. Crystal structure of troponin and the molecular mechanism of muscle regulation. *J. Electron Microsc. (Tokyo).* **54,** i35–i41 (2005).

7. Greaser, M. L. & Gergely, J. Reconstitution of troponin activity from three protein components. *J. Biol. Chem.* **246,** 4226–4233 (1971).

8. White, S. P., Cohen, C. & Phillips, G. N. Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* **325,** 826–828 (1987).

9. Flicker, P. F., Phillips, G. N. & Cohen, C. Troponin and its interactions with tropomyosin: An electron microscope study. *J. Mol. Biol.* **162,** 495–501 (1982).

10. Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K. & Maéda, Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form. *Nature* **424,** 35–41 (2003).

11. Vinogradova, M. V. *et al.* Ca(2+)-regulated structural changes in troponin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 5038–5043 (2005).

12. Jin, J.-P., Zhang, Z. & Bautista, J. A. Isoform diversity, regulation, and functional adaptation of troponin and calponin. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **18,** 93–124 (2008).

13. Chong, S. M. & Jin, J.-P. To investigate protein evolution by detecting suppressed epitope structures. *J. Mol. Evol.* **68,** 448–460 (2009).

14. Wei, B. & Jin, J.-P. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function. *Arch. Biochem. Biophys.* **505,** 144–154 (2011).

15. Feng, H.-Z., Wei, B. & Jin, J.-P. Deletion of a genomic segment containing the cardiac troponin I gene knocks down expression of the slow troponin T gene and impairs fatigue tolerance of diaphragm muscle. *J. Biological Chemistry* **284,** 31798–31806 (2009).

16. Schreier, T., Kedes, L. & Gahlmann, R. Cloning, structural analysis, and expression of the human slow twitch skeletal muscle/cardiac troponin C gene. *J. Biol. Chem.* **265,** 21247–21253 (1990).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

17. Collins, J. H. Myosin light chains and troponin C: Structural and evolutionary relationships revealed by amino acid sequence comparisons. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **12,** 3–25 (1991).

18. Prigozy, T. I., Dalrymple, K., Shuler, C. & Kedes, L. Differential expression of troponin C genes during tongue myogenesis. *Dev. Dyn.* **209,** 36–44 (1997).

19. Kawasaki, H., Nakayama, S. & Kretsinger, R. H. Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals* **11,** 277–295 (1998).

20. Robertson, S. P., Johnson, J. D. & Potrer, J. D. The time-course of Ca2+ exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca2+. *Biophys. J.* **34,** 559–569 (1981).

21. Zot, H. G. & Potter, J. D. A structural role for the Ca2+-Mg2+ sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils. *J. Biol. Chem.* **257,** 7678–7683 (1982).

22. Sheng, Z., Strauss, W. L., Francois, J. M. & Potter, J. D. Evidence that both Ca2+-specific sites of skeletal muscle TnC are required for full activity. *J. Biol. Chem.* **265,** 21554–21560 (1990).

23. Sweeney, L. H., Britot, R. M. M., Roseveart, P. R. & Putkeyt, J. A. The low-affinity Ca2+-binding sites in cardiac/slow skeletalmuscle troponin C performdistinct functions: site I alone cannot trigger contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87,** 9538–9542 (1990).

24. Solaro, R. J. Sarcomere control mechanisms and the dynamics of the cardiac cycle. *J. Biomed. bBotechnology* **105648,** 1–8 (2010).

25. Grabarek, Z., Tao, T. & Gergely, J. Molecular mechanism of troponin-C function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **13,** 383–393 (1992).

26. Van Eerd, J.-P. & Takahshi, K. Determination of the complete amino acid sequence of bovine cardiac troponin C. *Biochemistry* **15,** 1171–1180 (1976).

27. Gomes, A. V., Potter, J. D. & Szczesna-Cordary, D. The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB Life* **54,** 323–333 (2002).

28. Farah, C. S. *et al.* Structural and regulatory functions of the NH2- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *J. Biol. Chem.* **269,** 5230–5240 (1994).

29. Perry, S. V. Troponin I: inhibitor or facilitator. *Mol. Cell. Biochem.* **190,** 9–32 (1999).

30. Hastings, K. E. M. Molecular evolution of the vertebrate troponin I gene family. *Cell Struct. Funct.* **22,** 205–211 (1997).

31. Stevens, L., Bastide, B., Kischel, P., Pette, D. & Mounier, Y. Time-dependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282,** C1025–C1030 (2002).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

32. Yu, Z.-B., Gao, F., Feng, H.-Z. & Jin, J.-P. Differential regulation of myofilament protein isoforms underlying the contractility changes in skeletal muscle unloading. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292,** C1192–C1203 (2007).

33. Saggin, L., Gorza, L., Ausoni, S. & Schiaffino, S. Troponin I switching in the developing heart. *J. Biol. Chem.* **264,** 16299–16302 (1989).

34. Sasse, S. *et al.* Troponin I gene expression during human cardiac development and in end- stage heart failure. *Circ. Res.* **72,** 932–938 (1993).

35. Westfall, M. V., Albayya, F. P. & Metzger, J. M. Functional analysis of troponin I regulatory domains in the intact myofilament of adult single cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **274,** 22508–22516 (1999).

36. Fentzke, R. C. *et al.* Impaired cardiomyocyte relaxation and diastolic function in transgenic mice expressing slow skeletal troponin I in the heart. *J. Physiol.* **517,** 143–57 (1999).

37. Westfall, M. V., Albayya, F. P., Turner, I. I. & Metzger, J. M. Chimera analysis of troponin I domains that influence Ca(2+)-activated myofilament tension in adult cardiac myocytes. *Circ. Res.* **86,** 470–477 (2000).

38. Solaro, R. J., Lee, J. A., Kentish, J. C. & Allen, D. G. Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. *Circ. Res.* **63,** 779–787 (1988).

39. Li, M. X., Wang, X. & Sykes, B. D. Structural based insights into the role of troponin in cardiacmuscle pathophysiology. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **25,** 559–579 (2004).

40. Jin, J.-P. *et al.* The highly conserved COOH terminus of troponin I forms a Ca^{2+}-modulated allosteric domain in the troponin complex. *Biochemistry* **40,** 2623–2631 (2001).

41. Zhang, Z., Akhter, S., Mottl, S. & Jin, J.-P. Calcium-regulated conformational change in the C-terminal end segment of troponin I and its binding to tropomyosin. *FEBS J.* **278,** 3348–3359 (2011).

42. Solaro, R. J., Rosevear, P. & Kobayashi, T. The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369,** 82–87 (2008).

43. Wei, B. & Jin, J.-P. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function. *Arch. Biochem. Biophys.* **505,** 144–1454 (2011).

44. Anderson, P. A., Malouf, N. N., Oakeley, A. E., Pagani, E. D. & Allen, P. D. Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ. Res.* **69,** 1226–1233 (1991).

45. Jin, J.-P. Alternative RNA splicing-generated cardiac troponin T isoform switching: a non-heart-restricted genetic programming synchronized in developing cardiac and skeletal muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225,** 883–889 (1996).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

46. Ricchiuti, V. & Apple, F. S. RNA expression of cardiac troponin T isoforms in diseased human skeletal muscle. *Clin. Chem.* **45,** 2129–2135 (1999).

47. Tanokura, M., Tawada, Y., Ono, A. & Ohtsuki, I. Chymotryptic subfragments of troponin T from rabbit skeletal muscle. Interaction with tropomyosin, troponin I and troponin C. *J. Biochem.* **93,** 331–337 (1983).

48. Perry, S. V. Troponin T: Genetics, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19,** 575–602 (1998).

49. Jin, J.-P. & Chong, S. M. Localization of the two tropomyosin-binding sites of troponin T. *Arch. Biochem. Biophys.* **500,** 144–150 (2010).

50. Heeley, D. H., Golosinska, K. & Smillie, L. B. The effects of troponin T fragments T1 and T2 on the binding of nonpolymerizable tropomyosin to F-actin in the presence and absence of troponin I and troponin C. *J. Biol. Chem.* **262,** 9971–9978 (1987).

51. Schaertl, S., Lehrer, S. S. & Geeves, M. A. Separation and characterization of the two functional regions of troponin involved in muscle thin filament regulation. *Biochemistry* **34,** 15890–15894 (1995).

52. Morris, E. P. & Lehrer, S. S. Troponin-tropomyosin interactions. Fluorescence studies of the binding of troponin, troponin T and chymotryptic troponin T fragments to specifically labeled tropomyosin. *Biochemistry* **10,** 26–29 (1984).

53. Missov, E. D. & De Marco, T. Clinical insights on the use of highly sensitive cardiac troponin assays. *Clin. Chim. Acta* **284,** 175–185 (1999).

54. Wu, A. H. & Feng, Y. J. Biochemical differences between cTnT and cTnI and their significance for diagnosis of acute coronary syndromes. *Eur. Heart J.* **19,** N25–29 (1998).

55. Higgins, J. P. & Higgins, J. A. Elevation of cardiac troponin I indicates more than myocardial ischemia. *Clin. Investig. Med.* **26,** 133–147 (2003).

56. Katus, H. A., Remppis, A., Scheffold, T., Diederich, K. W. & Kuebler, W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am. Jouranl Cardiol.* **67,** 1360–1367 (1991).

57. Thygesen, K., Alpert, J. S. & White, H. D. Universal definition of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50,** 2173–2195 (2007).

58. Jaffe, A. S., Babuin, L. & Apple, F. S. Biomarkers in acute cardiac disease: The present and the future. *J. Am. Coll. Cardiol.* **48,** 1–11 (2006).

59. Morrow, D. A. *et al.* National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin. Chem.* **53,** 552–574 (2007).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

60. Adams, J. E., Abendschein, D. R. & Jaffe, A. S. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation* **88,** 750–763 (1993).

61. Freda, B. J., Tang, W. H. W., Van Lente, F., Peacock, W. F. & Francis, G. S. Cardiac troponins in renal insufficiency: Review and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40,** 2065–2071 (2002).

62. Diris, J. H. C. *et al.* Impaired renal clearance explains elevated troponin T fragments in hemodialysis patients. *Circulation* **109,** 23–25 (2004).

63. Panteghini, M., Pagani, F. & Bonetti, G. The sensitivity of cardiac markers: An evidence-based approach. *Clin. Chem. Lab. Med.* **37,** 1097–106 (1999).

64. Tucker, J. F. *et al.* Early diagnostic efficiency of cardiac troponin I and Troponin T for acute myocardial infarction. *Acad. Emerg. Med.* **4,** 13–21 (1997).

65. Balk, E. M., Ioannidis, J. P. A., Salem, D., Chew, P. W. & Lau, J. Accuracy of biomarkers to diagnose acute cardiac ischemia in the emergency department: A meta-analysis. *Ann. Emerg. Med.* **37,** 478–494 (2001).

66. Eggers, K. M., Oldgren, J., Nordenskjöld, A. & Lindahl, B. Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: Limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction. *Am. Heart J.* **148,** 574–581 (2004).

67. Adams III, J. E. *et al.* Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* **88,** 101–106 (1993).

68. Georgew, J.-L. *et al.* Time course of troponin I, myoglobulin, and cardiac enzyme release after electrical cardioversion. *Am. J. Cardiol.* **78,** 825–827 (1996).

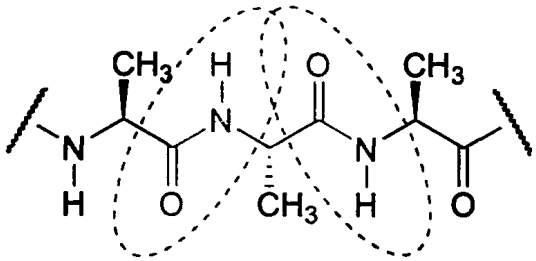
69. Adams III, J. E. *et al.* Improved detection of cardiac confusion with cardiac troponin I. *Am. Heart J.* **131,** 308–312 (1996).

70. Adams III, J. E. *et al.* Diagnosis of perioperative myocardial infarction with measurement of cardiac troponin I. *N. Engl. J. Med.* **330,** 670–674 (1994).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

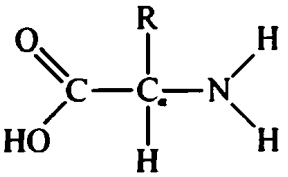


ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

3.1. ΑΜΙΝΟΞΕΑ: ΟΙ ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Το όνομα πρωτεΐνες δόθηκε το 1830 από τον Ολλανδό χημικό G. J. Mulder, ο οποίος διαισθανόμενος ίσως την τεράστια σημασία τους, και καθ' υπόδειξη του J. J. Berzelius, έδωσε και το όνομα πρωτεΐνη από τη λέξη πρώτος[1], καθώς είναι απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη και ανακατασκευή των ιστών, την καλή λειτουργία και δομή όλων των ζωντανών κυττάρων. Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από αμινοξέα, τις δομικές τους μονάδες. Υπάρχουν είκοσι διαφορετικά αμινοξέα που συναντάμε συνήθως στα φυτά και τα ζώα. Κάθε πρωτεΐνη έχει δικό της αριθμό και τη δική της αλληλουχία αμινοξέων. Ανάλογα με την ακολουθία με την οποία συνδυάζονται τα αμινοξέα, η προκύπτουσα πρωτεΐνη πραγματοποιεί συγκεκριμένες λειτουργίες στο σώμα. Η δομή του μορίου είναι σημαντική, δεδομένου ότι συχνά καθορίζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Και τα είκοσι αμινοξέα που συναντάμε στη φύση είναι *α*-αμινοξέα, δηλαδή αποτελούνται από ένα τετραεδρικό άτομο ασύμμετρου άνθρακα ο οποίος ονομάζεται *α*-άνθρακας (C_α). Οι τέσσερις υποκαταστάτες του *α*-άνθρακα είναι μια αμινική και μια καρβοξυλική ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μια χαρακτηριστική ομάδα R, η οποία συνήθως αναφέρεται ως πλευρική αλυσίδα. Έχοντας τέσσερις διαφορετικές ομάδες συνδεδεμένες στο τετραεδρικό άτομο του *α*-άνθρακα, τα *α*-



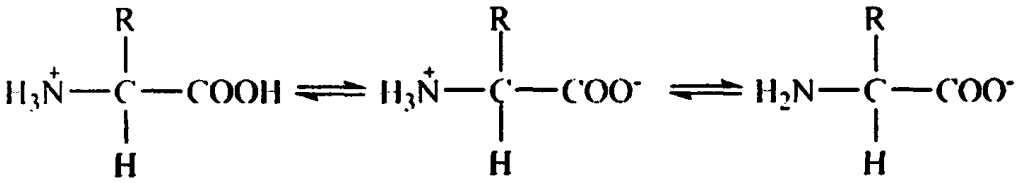
Σχήμα 3.1.1. Μορφή ενός *α*-αμινοξέος

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αμινοξέα είναι χειρόμορφα. Οπότε αν εξαιρέσουμε τη γλυκίνη, όλοι οι άνθρακες των αμινοξέων είναι στερεογονικά κέντρα. Παρόλο που τα αμινοξέα μπορούν να υπάρξουν σε δυο εναντιομερείς μορφές (L- και D-ισομερές), η φύση χρησιμοποιεί στη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών μόνο τα L-αμινοξέα.

Τα είκοσι αμινοξέα μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω, ως ουδέτερα, όξινα ή βασικά, ανάλογα με τη δομή της πλευρικής αλυσίδας. Δεκαπέντε από τα είκοσι αμινοξέα έχουν ουδέτερες πλευρικές αλυσίδες, δυο διαθέτουν μια επιπλέον καρβοξυλική ομάδα (ασπαραγινικό οξύ και γλουταμινικό οξύ), ενώ τρία φέρουν στις πλευρικές αλυσίδες βασικές αμινομάδες (λυσίνη, αργινίνη και ιστιδίνη).

Επειδή τα αμινοξέα περιέχουν μια όξινη (-COOH) και μια βασική ($-NH_2$) λειτουργική ομάδα, υφίστανται μια ενδομοριακή οξεοβασική αντίδραση, με αποτέλεσμα να απαντούν υπό μορφή διπολικών ιόντων. Σ' ένα διάλυμα οξέος με χαμηλή τιμή pH, τα αμινοξέα πρωτονιώνονται ($-NH_3^+$) και απαντούν ως κατιόντα, ενώ σ' ένα διάλυμα βάσης με υψηλή τιμή pH, τα αμινοξέα αποπρωτονιώνονται ($-COO^-$) και απαντούν ως ανιόντα. Σε κάποια τιμή pH, τα αμινοξέα εξισορροπούνται ανάμεσα στην ανιονική ($-COO^-$) και κατιονική ($-NH_3^+$) μορφή και βρίσκονται υπό την ουδέτερη μορφή του διπολικού ιόντος. Η τιμή αυτή του pH ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο (**Σχήμα 3.1.2**).



Χαμηλή τιμή pH **Ισοηλεκτρικό Σημείο** **Υψηλή τιμή pH**

Σχήμα 3.1.2. Η κατάσταση ιοντισμού των αμινοξέων σχετίζεται με το pH.

Στον **Πίνακα 3.1.1** δίνονται η ονομασία, ο συμβολισμός, το μοριακό βάρος καθώς και το ισοηλεκτρικό σημείο των είκοσι αμινοξέων που απαντώνται στη φύση.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Πίνακας 3.1.1. Τα 20 συνήθη αμινοξέα των πρωτεϊνών.

Ονομασία	Συμβολισμός	Μοριακό Βάρος	Ισοηλεκτρικό Σημείο
Γλυκίνη	Gly (G)	75,02	5,97
Αλανίνη	Ala (A)	89,09	6,00
Βαλίνη[α]	Val (V)	117,14	5,96
Λευκίνη[α]	Leu (L)	131,17	5,98
Ισολευκίνη[α]	Ile (I)	131,17	6,02
Ασπαραγανικό Οξύ	Asp (D)	133,10	2,77
Ασπαραγίνη	Asn (N)	132,12	5,41
Γλουταμινικό Οξύ	Glu (E)	147,13	3,22
Γλουταμίνη	Gln (Q)	146,14	5,65
Λυσίνη[α]	Lys (K)	146,19	9,74
Αργινίνη	Arg (R)	174,20	10,76
Ιστιδίνη[α]	His (H)	155,15	7,59
Σερίνη	Ser (S)	105,09	5,68
Θρεονίνη [α]	Thr (T)	119,12	5,60
Φαινυλαλανίνη[α]	Phe (F)	165,19	5,48
Τυροσίνη	Tyr (Y)	181,19	5,66
Τρυπτοφάνη[α]	Trp (W)	204,23	5,89
Κυστεΐνη	Cys (C)	121,15	5,07
Μεθειονίνη[α]	Met (M)	149,12	5,60
Προλίνη	Pro (P)	115,13	6,30

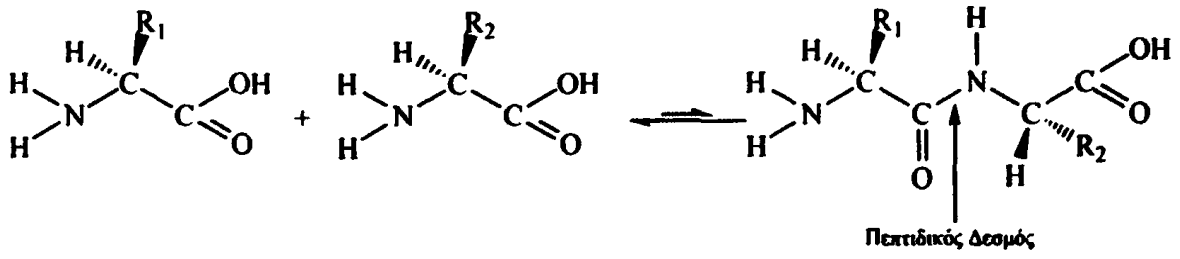
Και τα είκοσι αμινοξέα είναι απαραίτητα στην πρωτεϊνική σύνθεση, όμως ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να τα βιοσυνθέσει όλα. Ορισμένα από αυτά ονομάζονται απαραίτητα αμινοξέα, γιατί ο οργανισμός πρέπει να τα αποκτήσει με τη διατροφή (σημειωμένα με α στον **Πίνακα 3.1.1**)[2,3].

3.2. Ο ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ

Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή που δημιουργούνται δεσμεύοντας την καρβοξυλική ομάδα ενός αμινοξέος στην *α*-αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέος με έναν πεπτιδικό δεσμό. Η δημιουργία ενός διπεπτιδίου από τα δυο αμινοξέα συνοδεύεται από την απώλεια ενός μορίου ύδατος (**Σχήμα 3.2.3**). Η ισορροπία της αντίδρασης βρίσκεται προς την πλευρά της υδρόλυσης παρά της σύνθεσης. Επομένως, η βιοσύνθεση του πεπτιδικού δεσμού

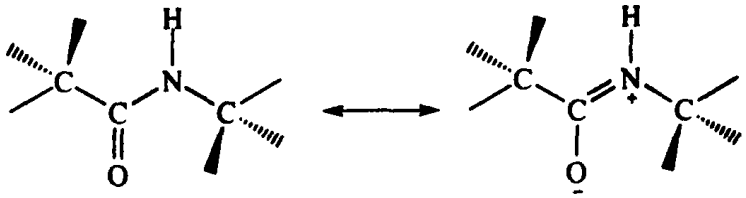
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

χρειάζεται την προσθήκη ελεύθερης ενέργειας. Παρ' όλα αυτά οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι αρκετά σταθεροί κινητικά · η διάρκεια ζωής ενός πεπτιδικού δεσμού σε υδάτινο διάλυμα, όταν δεν υπάρχει καταλύτης, πλησιάζει τα 1000 χρόνια.



Σχήμα 3.2.3. Η δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού.

Η έρευνα γύρω από τη διαμόρφωση των πεπτιδικών αλυσίδων άρχισε από τους L. Pauling και R. B. Corey που χρησιμοποίησαν τη μέθοδο περιθλάσεως ακτίνων X σε κρυσταλλογραφικές μελέτες αμινοξέων και πεπτιδίων[4]. Ο πεπτιδικός δεσμός είναι επίπεδος. Έτσι, λοιπόν, για κάθε ζεύγος αμινοξέων τα οποία συνδέονται με πεπτιδικό δεσμό υπάρχουν έξι άτομα που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο: το άτομο α-άνθρακα και η ομάδα CO του πρώτου αμινοξέος, καθώς και η ομάδα NH και το άτομο α-άνθρακα του δεύτερου αμινοξέος. Η εξήγηση αυτής της γεωμετρικής προτίμησης βρίσκεται στη φύση του χημικού δεσμού του πεπτιδίου. Ο πεπτιδκός δεσμός έχει, εν μέρει, χαρακτήρα διπλού δεσμού, ο οποίος αποτρέπει την περιστροφή γύρω από τον εαυτό του.



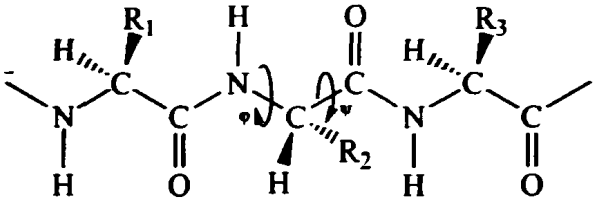
Σχήμα 3.2.4. Δομές συντονισμού του πεπτιδικού δεσμού.

Το γεγονός ότι ο δεσμός δεν περιστρέφεται περιορίζει τις στερεοδιατάξεις του πεπτιδικού κορμού και εξηγεί την επίπεδη φύση του δεσμού. Αυτός ο χαρακτήρας διπλού δεσμού εκφράζεται και στην απόσταση μεταξύ των ομάδων CO και NH. Η απόσταση C – N σε έναν πεπτιδικό δεσμό είναι 1,32 Å, δηλαδή μια τιμή που βρίσκεται μεταξύ των αναμενόμενων για ένα απλό C – N δεσμό (1,49 Å) και ένα διπλό δεσμό C = N (1,27 Å). Τέλος, ο πεπτιδικός δεσμός δεν έχει φορτίο, επιτρέποντας έτσι στα πολυμερή των αμινοξέων

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς να δημιουργήσουν σφαιρικές κατασκευές χωρίς ενδιάμεσα κενά.

Σε αντίθεση με τον πεπτιδικό δεσμό, οι δεσμοί που ενώνουν τις αμινομάδες και τις καρβονυλικές ομάδες με το άτομα *α*-άνθρακα είναι καθαροί απλοί δεσμοί. Τα δυο γειτονικά άκαμπτα πεπτιδικά επίπεδα μπορούν επομένως να περιστραφούν γύρω από τους δεσμούς αυτούς αποκτώντας διάφορους προσανατολισμούς. Η ελευθερία περιστροφής γύρω από τους δυο δεσμούς κάθε αμινοξέος επιτρέπει στις πρωτεΐνες να αναδιπλωθούν με πολλούς και διάφορους τρόπους. Οι περιστροφές γύρω από τους δεσμούς είναι δυνατόν να προσδιοριστούν από τις δίεδρες γωνίες (**Σχήμα 3.2.5**)[2].



Σχήμα 3.2.5. Η δομή κάθε αμινοξέος σε ένα πολυπεπτίδιο μπορεί να ρυθμιστεί από την περιστροφή γύρω από δυο απλούς δεσμούς.

3.3. Εισαγωγή στην Πεπτιδική Χημεία


E. Fischer

Η αρχή της πεπτιδικής χημείας χρονολογείται το 1901, όταν ο E. Fischer συνέθεσε το διπεπτίδιο Gly-Gly, με μερική υδρόλυση της δικετοπιπεραζίνης της γλυκίνης[5,6]. Ένα χρόνο αργότερα, στη 14η συνεδρίαση των γερμανών φυσικών επιστημόνων και γιατρών, ο E. Fischer επινόησε το όρο "πεπτίδιο", η οποία προέρχεται από την ελληνική λέξη πέψη. Η έλλειψη αναστρέψιμων αμινο-προστατευτικών ομάδων εμπόδιζε τις προσπάθειες του E. Fischer για την περαιτέρω πρόοδο της πεπτιδικής χημείας. Ωστόσο, αυτό άλλαξε το 1932 με την εισαγωγή της βενζυλοξυκαρβονυλομάδας (Z ή Cbz) από το Λ. Ζέρβα[7]. Η σύνθεση του εννιαπεπτιδίου ωκυτοκίνης από τον V. du Vigneaud, το 1953, ήταν ένα σημαντικό ορόσημο στην ιστορία της πεπτιδικής σύνθεσης, για το οποίο έλαβε το βραβείο Nobel Χημείας το 1955[8]. Ωστόσο, η μέθοδος της σύνθεσης σε υγρή φάση του V. du Vigneaud ήταν κουραστική, διότι ήταν αναγκαίο η απομόνωση και ο καθαρισμός των ενδιάμεσων θραυσμάτων. Οι περιορισμοί των μεθόδων σύνθεσης σε υγρή φάση για τη σύνθεση μεγαλύτερων αλληλουχιών, οδήγησε στην ανακάλυψη της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS), η οποία


Λ. Ζέρβας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

έφερε την επανάσταση στην πεπτιδική χημεία[9]. Η πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση έχει υποστεί σημαντικές βελτιώσεις από τότε, ιδίως με την εισαγωγή της 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδας (Fmoc), από το L. Carpino το 1972[10]. Η ανάπτυξη νέων στερεών υποστρωμάτων (ρητίνες), τα οποία χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση, αποτελεί άλλη μια σημαντική συμβολή, η οποία έχει οδηγήσει στην πρόοδο της πεπτιδικής σύνθεσης[11-15]. Τεχνολογικές εξελίξεις οδήγησαν στην εισαγωγή υψηλής τεχνολογίας αυτοματοποιημένες συσκευές για την σύνθεση πεπτιδίων, καθιστώντας την σύνθεση μεγάλων πολυπεπτιδίων μια εργασία ρουτίνας για τους πεπτιδοχημικούς. Η έλευση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)[16] πρόσθεσε στον τομέα αυτό μια άλλη διάσταση, απλοποιώντας το δύσκολο έργο της ανάλυσης και του καθαρισμού των συνθετικών πεπτιδίων που παρασκευάζονται με την πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση.

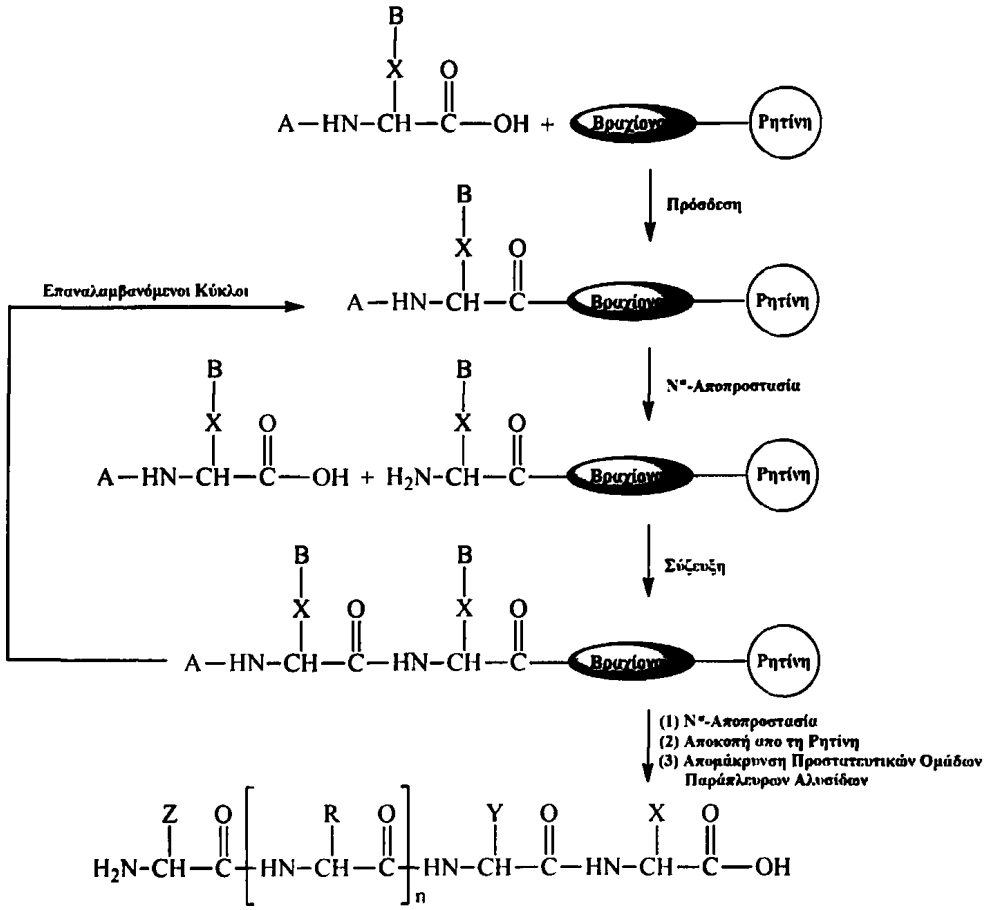
3.4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ

Η πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS), η οποία αναπτύχθηκε το 1963 από τον R. B. Merrifield[9], έχει αποδειχθεί πως είναι η μέθοδος που επιλέγεται για την αποτελεσματική παραγωγή πεπτιδίων και μικρών πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τον R. B. Merrifield, ένα αμινοξύ συνδέεται σε ένα αδιάλυτο πολυμερές υπόστρωμα (ρητίνη).


R. B. Merrifield

Μετά την πρόσδεση του α-αμινο προστατευμένου C-τελικού αμινοξέος στη ρητίνη, απομακρύνεται η α-αμινο προστατευτική ομάδα (αποπροστασία), ενώ παράλληλα πραγματοποιείται η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του επόμενου α-αμινο προστατευμένου αμινοξέος και στη συνέχεια γίνεται η σύζευξη με το σκοπό την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας. Στο ενδιάμεσο γίνονται οι απαραίτητες εκπλύσεις με τους κατάλληλους οργανικούς διαλύτες για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων αλλά και της περίσσειας των αντιδραστηρίων. Η επανάληψη των σταδίων αποπροστασίας – σύζευξης πραγματοποιείται μέχρις ότου ληφθεί η επιθυμητή αλληλουχία αμινοξέων. Τέλος, το πεπτίδιο αποκόπτεται από την ρητίνη με τη χρήση κατάλληλου αντιδραστηρίου, το οποίο ταυτόχρονα απομακρύνει και τις προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων, οι οποίες είναι σταθερές κατά την αποπροστασία του α-αμινο προστατευμένου αμινοξέος. Σχηματικά τα στάδια της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση φαίνονται στο **Σχήμα 3.4.6**.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

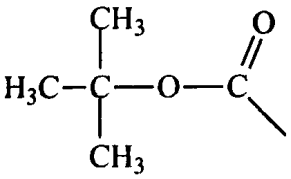


Σχήμα 3.4.6. Σχηματική απεικόνιση της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερή φάση.

Σύμφωνα με τη χρήση της παροδικής προστασίας της *α*-αμινομάδας κάθε αμινοξέος, καθώς και την παρουσία των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων, η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση πραγματοποιείται με δυο κυρίως τεχνικές, την Boc/Bzl ή την Fmoc/*t*-Bu στρατηγική.

- **Boc/Bzl ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ**

Η Boc/Bzl στρατηγική χρησιμοποιεί την *tert*-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc) για την προστασία της *α*-αμινομάδας, η οποία απομακρύνεται με τριφθοροοξικό οξύ (TFA), ενώ η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη πραγματοποιείται παρουσία ισχυρού οξέος, συνήθως υδροφθόριο (HF). Επίσης οι προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων έχουν σχεδιαστεί έτσι, ούτως ώστε να μην επηρεάζονται από τα επαναλαμβανόμενα στάδια της αφαίρεσης της Boc-ομάδας και να απομακρύνονται παρουσία υδροφθορίου.

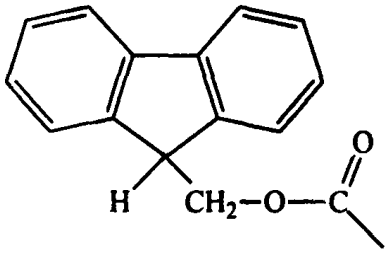


Σχήμα 3.4.7. Boc-ομάδα.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

- **Fmoc/*t*-Bu ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ**

Σε αντίθεση με την Boc/Bzl στρατηγική, η Fmoc/*t*-Bu στρατηγική χρησιμοποιεί για την προστασία της *α*-αμινομάδας την 9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc). Έχει το πλεονέκτημα, ότι η αποπροστασία της *α*-αμινομάδας να γίνεται σε βασικές συνθήκες (πιπεριδίνη σε *N, N'*-διμεθυλοφοραμίδιο ή *N*-μεθυλοπυρρολιδόνη), ενώ η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων και η αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό υπόστρωμα να γίνεται παρουσία οξέων (συνήθως με TFA) και μάλιστα σε ηπιότερες συνθήκες με την Boc/Bzl στρατηγική. Επίσης, υπάρχει και η δυνατότητα σύνθεσης προστατευμένων πεπτιδίων. Αυτό μπορεί να γίνει επιλέγοντας τέτοια ρητίνη, ώστε η αποκοπή της από το πεπτίδιο να γίνεται σε ασθενείς όξινες συνθήκες χωρίς να επηρεάζονται καθόλου οι προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι τέτοια ώστε να προτιμάται έναντι της Boc/Bzl στρατηγικής.



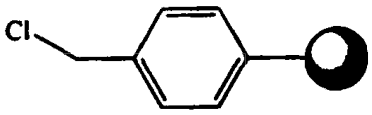
Σχήμα 3.4.8. Fmoc-ομάδα.

3.5. ΤΟ ΣΤΕΡΕΟ ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Η επιτυχής πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση εξαρτάται από την επιλογή του στερεού υποστρώματος, του βραχίονα (μεταξύ του στερεού υποστρώματος και του πεπτιδίου που συντίθεται), των κατάλληλων προστατευμένων αμινοξέων, της μεθόδου σύζευξης, καθώς και του πρωτοκόλλου για την αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό υπόστρωμα[17]. Η επιλογή του σωστού στερεού υποστρώματος είναι συχνά υψίστης σημασίας για την επιτυχή σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου. Σήμερα, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός εμπορικών διαθέσιμων ρητινών, οι οποίες είναι κατάλληλες για πολύπλοκες πεπτιδικές συνθέσεις. Στη συνέχεια αναφέρονται ορισμένες από τις ρητίνες που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση.

- **ΡΗΤΙΝΗ MERRIFIELD**

Η βασικότερη υποκατεστημένη ρητίνη πολυστυρενίου είναι η χλωρομεθυλιωμένη, η οποία κοινώς ονομάζεται ρητίνη Merrifield και πήρε το όνομά της από το βραβευμένο με Nobel Χημείας, το 1984, B. R. Merrifield[9]. Το πεπτίδιο προσδένεται στη ρητίνη με πυρηνόφιλη υποκατάσταση του χλωρίου. Ο προκύπτων δεσμός μεταξύ της ρητίνης και του πεπτιδίου είναι γενικά



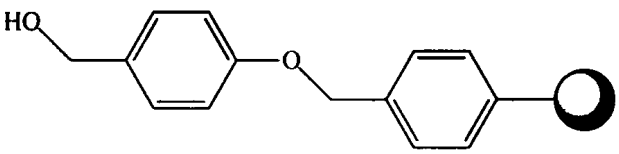
Σχήμα 3.5.9. Ρητίνη Merrifield.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

σταθερός παρουσία οξέος και απαιτούνται ισχυρές όξινες συνθήκες για τη διάσπαση του. Μολονότι τα πεπτίδια, τα οποία είναι προσδεμένα στη ρητίνη Merrifield, δεν αποκόπτονται εύκολα κάτω από όξινες συνθήκες, άλλες μέθοδοι αποκοπής, οι οποίες περιλαμβάνουν τη σαπωνοποίηση[18,19], την τρανσεστεροποίηση[20–22] και την κυκλοποίηση-αποδέσμευση[23–25], έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές.

- **WANG ΡΗΤΙΝΗ**

Η Wang ρητίνη είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ρητίνη για τη λήψη πεπτιδίων με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο. Ο βραχίονας της είναι συνδεδεμένος με το πολυστυρένιο μέσω της 4-υδροξυβενζυλικής αλκοόλης[26], ο οποίος συνδέεται στη ρητίνη μέσω ενός φαινολικού αιθέρα, ενώ το πεπτίδιο είναι γενικά συνδεδεμένο με το βραχίονα μέσω ενός βενζολικού εστέρα ή αιθέρα. Αυτός ο δεσμός είναι αρκετά σταθερός σε ποικίλες συνθήκες, αλλά μπορεί εύκολα να διασπαστεί παρουσία οξέος, όπως τριφθοροξικό οξύ (TFA). Παραπροϊόντα μπορούν να σχηματιστούν, αν ένα τμήμα του βραχίονα είναι συνδεδεμένο στη ρητίνη μέσω της βενζυλικής θέσης, αφήνοντας έτσι τη φαινολική μεριά δραστική. Αυτό μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της σύνδεσης του βραχίονα, αν δεν διατηρηθούν οι ακριβείς συνθήκες της αντίδρασης[27].



Σχήμα 3.5.10. Wang Ρητίνη.

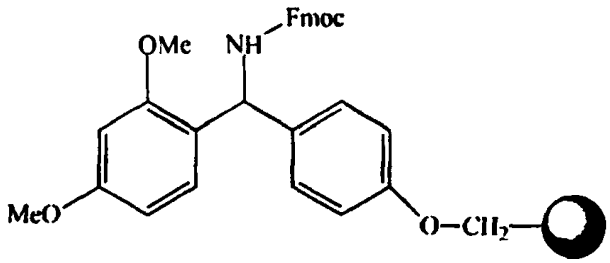
Η πρόσδεση του πεπτιδίου γενικά επιτυγχάνεται με τη σύζευξη της πυρηνόφιλης ρητίνης με ένα επιθυμητό ηλεκτρονιόφιλο ή μέσω της Mitsunobu αντίδρασης [28]. Η προσθήκη οπτικών ενεργών πεπτιδίων, όπως είναι τα παράγωγα των *α*-αμινοξέων, θα πρέπει να γίνεται με προσοχή, εξαιτίας του σταδίου ενεργοποίησης, το οποίο οδηγεί σε ρακεμοποίηση, ενώ παράλληλα έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές για την ελαχιστοποίηση του προβλήματος[29–33]. Σε περιπτώσεις, όπου το πεπτίδιο έχει προστατευτικές ομάδες, οι οποίες απομακρύνονται παρουσία βάσεως, όπως η Fmoc-ομάδα, είναι σημαντικό είτε να χρησιμοποιείται *N,N'*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) απαλλαγμένο από αμίνες είτε να αποφεύγεται εντελώς η χρήση του DMF ως διαλύτη.

- **RINK ΡΗΤΙΝΗ**

Το πιο δημοφιλές στερεό υπόστρωμα για το σχηματισμό *C*-τελικών αμιδικών πεπτιδίων, ακολουθώντας την Fmoc/*t*-Bu στρατηγική, είναι η Rink ρητίνη. Η συγκεκριμένη ρητίνη προτιμάται εξαιτίας της εύκολης απομάκρυνσης τους παρουσία

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

οξέων, δηλ. μπορεί να αποκοπεί σε ήπιες όξινες συνθήκες, όπως 1% TFA[34]. Για να παρέχεται σταθερότητα στη ρητίνη κατά την αποθήκευσή της, η αμινομάδας της είναι Fmoc-προστατευμένη, και ως εκ τούτου απαιτείται προεργασία με πιπεριδίνη.

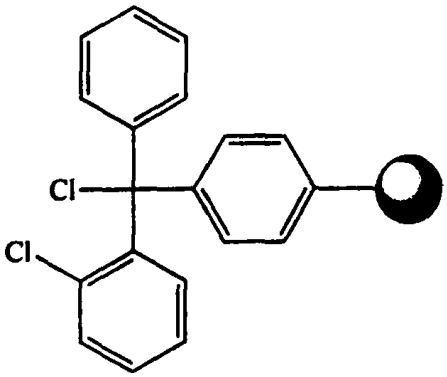


Σχήμα 3.5.11. Rink Ρητίνη

Όπως ο βραχίονας της Wang ρητίνης, έτσι και ο βραχίονας της Rink ρητίνης είναι συνδεδεμένος με το πολυστυρένιο μέσω ενός αιθερικού δεσμού[34].

- **Τριτυλο και 2-Χλωροτριτυλο Ρητινη**

Οι τριτυλο ρητίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τόσο στην οργανική χημεία σε στερεή φάση όσο και στην πεπτιδική χημεία. Αυτές οι ρητίνες είναι πολύ ευαίσθητες παρουσία οξέων, καθώς το πεπτίδιο μπορεί να αποκοπεί με οξικό οξύ[35]. Προστατευμένα πεπτίδια μπορούν να αποκοπούν με διάλυμα εξαφθοροϊσοπρόπυλο αλκοόλης/διχλωρομεθανίου : 1/4 (v/v)[36], με όλες τις προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων να παραμένουν άθικτες, ακόμη και οι τρίτυλο-ομάδες της σουλφυδρυλομάδας της ομοκυστεΐνης[37]. Οι συγκεκριμένες ρητίνες είναι ιδιαιτέρως χρήσιμες, όταν απαιτούνται προστατευτικές ομάδες, λιγότερο ευαίσθητες σε οξέα, για το πεπτίδιο μετά την αποκοπή ή σε περιπτώσεις όταν το πεπτίδιο μπορεί να κυκλοποιηθεί, προσδένοντας στο βραχίονα, προκαλώντας έτσι την πρόωρη αποκοπή του. Οι ογκώδεις τριφαινυλομεθυλομάδες αποτρέπουν τέτοιες αντιδράσεις, εξαιτίας της στερικής παρεμπόδισης. Εκτός από το ότι χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση καρβοξυλικών οξέων και αλκοολών, οι τριτυλο ρητίνες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την πρόσδεση αμινών ή θειολών.



Σχήμα 3.5.12. 2-Χλωροτριτυλο Ρητίνη

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η 2-χλωροτριτυλο ρητίνη εμφανίζει καλύτερη σταθερότητα κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης απ' ότι η τριτυλο ρητίνη[35]. Η

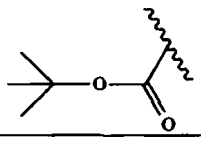
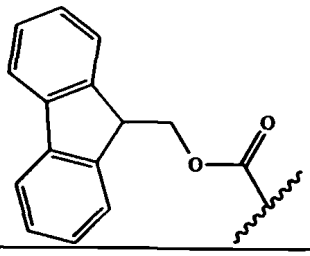
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

συγκεκριμένη ρητίνη είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην υγρασία, ενώ ο χειρισμός και η αποθήκευσή της θα πρέπει να γίνονται σε αδρανείς συνθήκες. Σε περίπτωση απενεργοποίησης της ρητίνης, η κατεργασία της με θειονυλοχλωρίδιο αμέσως πριν τη χρήση της αποκαθιστά τη δραστικότητά της.

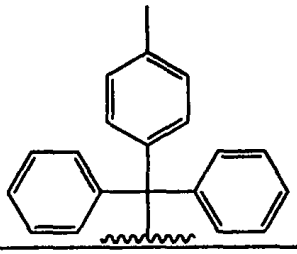
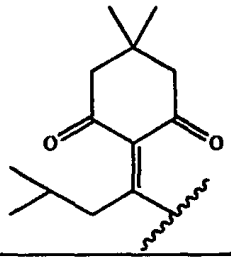
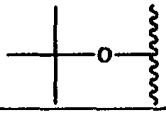
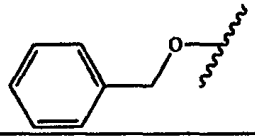
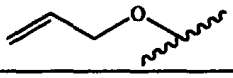
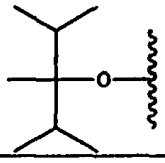
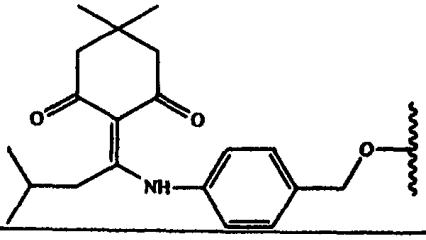
3.6. ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ

Ο E. Fischer ήταν ο πρώτος που συνειδητοποίησε την ανάγκη για χρήση προσωρινής προστασίας των λειτουργικών ομάδων για να πραγματοποιηθεί μια τοποεκλεκτική αντίδραση[38]. Ωστόσο, η πρώτη "μοντέρνα" προστατευτική ομάδα ήταν η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z), η οποία αναπτύχθηκε από τους M. Bergmann και Λ. Ζέρβας[7]. Τα χαρακτηριστικά της Z-ομάδας συμπίπτουν με αυτά που πρέπει να έχει μια προστατευτική ομάδα: α) να εισάγεται εύκολα, β) να είναι σταθερή σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών της αντίδρασης, και γ) να αφαιρείται με ασφάλεια στο τέλος της σύνθεσης. Ένα άλλο σημαντικό γεγονός στον τομέα αυτό περιγράφεται από τον G. Barany κ τους συνεργάτες του[39,40], όταν εισήγαγαν την έννοια της ορθογωνικότητας, εννοώντας πως δυο ή περισσότερες προστατευτικές ομάδες ανήκουν σε ανεξάρτητες κατηγορίες και απομακρύνονται με διαφορετικούς μηχανισμούς. Ως εκ τούτου, οι ομάδες αυτές μπορούν να απομακρυνθούν με οποιαδήποτε σειρά και παρουσία των υπολοίπων.

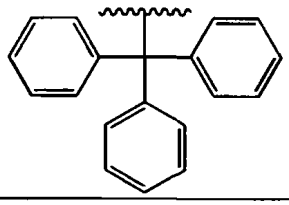
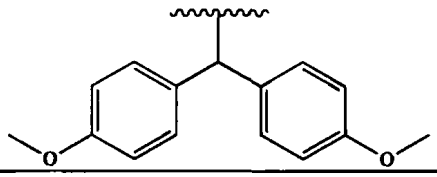
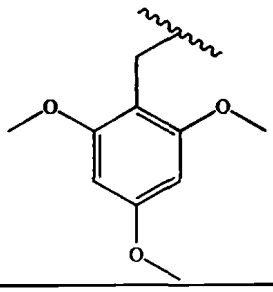
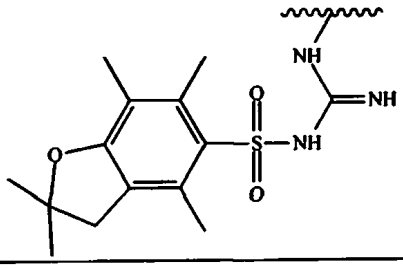
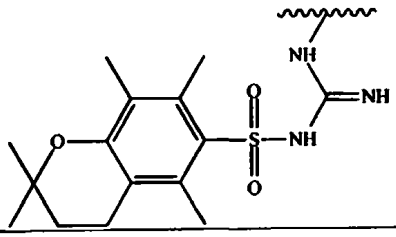
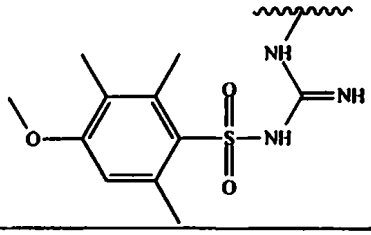
Πίνακας 3.6.2. Οι κυριότερες προστασίες των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων στα N^{α}-Fmoc προστατευμένα αμινοξέα.

Αμινοξύ	Ονομασία και Δομή	Συνθήκες Αποπροστασίας
Lys	*tert*-Βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc)[41] 	25-50% TFA-DCM
Lys	9-Φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc)[42] 	1) 20% piperidine-DMF 2) 1-5% DBU-DMF

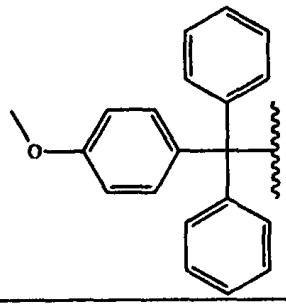
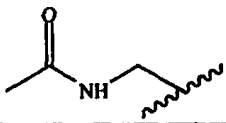
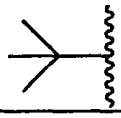
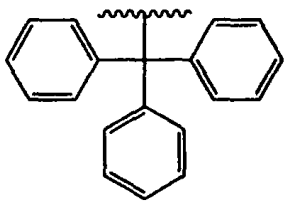
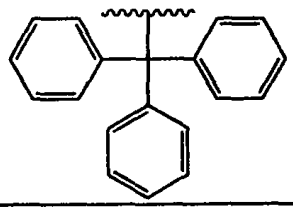
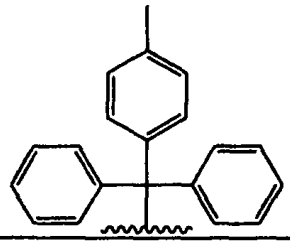
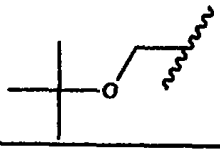
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

	4-Μεθυλοτριτυλομάδα (Mtt)[43,44]	
Lys		1) 1% TFA-DCM 2) AcOH-TFE-DCM (1:2:7)
	1-(4,4-Διμεθυλ-2,6-διοξοκυκλοεξ-1-υλιδεν)-3-μεθυλ-βουτυλομάδα (ivDde)[45–50]	
Lys		2% $N_2H_4 \cdot H_2O$-DMF
	tert-Βουτυλοξυομάδα (OtBu)[51]	
Asp, Glu		95% TFA
	Βενζυλοξυομάδα (OBzl)[52]	
Asp, Glu		H_2/Pd, HF
	Αλλυλοξυομάδα (OAll)[53]	
Asp, Glu		Pd(PPh_3) σε $CHCl_3$/AcOH/NMM
	2,3,4-Τριμεθυλ-πεντ-3-οξυομάδα (ODie)[54]	
Asp, Glu		95% TFA
	1-(4,4-Διμεθυλ-2,6-διοξο- κυκλοεξυλιδεν)3-μεθυλ-βουτυλ-βενζυλοξυομάδα (ODmab)[55]	
Asp, Glu		2% $N_2H_4 \cdot H_2O$-DMF

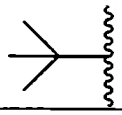
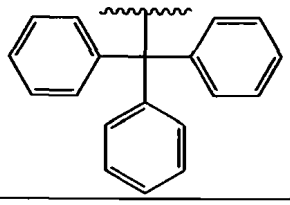
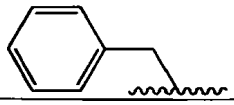
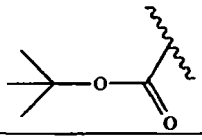
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Asn, Gln	Τριτυλομάδα (Trt)[56,57] 	TFA-H_2O-EDT (90:5:5)
Asn, Gln	4,4΄- Διμεθοξυβενζιδρυλομάδα (Mbh)[58–60] 	1 M TMSBr-θειοανισόλη-EDT-*m*-κρεσόλη σε TFA (2 ώρες στους 0°C)
Asn, Gln	2,4,6-Τριμεθοξυβενζυλομάδα (Tmob)[57,61] 	95% TFA-DCM και "μόρια-παγίδες"
Arg	2,2,4,6,7-Πενταμεθυλο-διϋδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλομάδα (Pbf)[62] 	90% TFA-"μόρια-παγίδες" (H_2O και TIS)
Arg	2,2,5,7,8-Πενταμεθυλο-χρωμανο-6-σουλφονυλομάδα (Pmc)[63] 	90% TFA-"μόρια-παγίδες" (H_2O και TIS)
Arg	4-Μεθοξυ-2,3,6-τριμεθυλοφαινυλο- σουλφονυλομάδα (Mtr)[64] 	95% TFA-θειοανισόλη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Cys	4-Μεθοξυτριτυλομάδα (Mmt)[65] 	1) 1% TFA, "μόρια-παγίδες" (SH) 2) $Hg(OAc)_2$ (SH) 3) $AgNO_3$ (SH) 4) I_2 (S-S) 5) $Tl(TFA)_3$ (S-S)
Cys	Ακεταμιδομεθυλομάδα (Acm)[66–71] 	1) I_2 (S-S) 2) $Tl(TFA)_3$ (S-S) 3) Ag(TFMSO) (SH) 4) Hg (II) (SH)
Cys	*tert*-Βουτυλομάδα (*t*-Bu)[67,72,73] 	1) HF (20°C) και "μόρια παγίδες" (SH) 2) TFMSA-TFA και "μόρια παγίδες" 3) $Hg(OAc)_2$ (SH)
Cys	Τριτυλομάδα (Trt)[74–77] 	1) 1% TFA, "μόρια-παγίδες" (SH) 2) $Hg(OAc)_2$ (SH) 3) $AgNO_3$ (SH) 4) I_2 (S-S) 5) $Tl(TFA)_3$ (S-S)
His	Τριτυλομάδα (Trt)[78–80] 	95% TFA
His	4-Μεθυλοτριτυλομάδα (Mtt)[80] 	5% TFA, DCM, 1 h
His	*tert*-Βουτοξυμεθυλομάδα (Bum)[81,82] 	TFA, "μόρια-παγίδες"

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ser, Thr, Tyr	*tert*-Βουτυλομάδα (*t*-Bu)[83,84] 	90% TFA-DCM
Ser, Thr, Tyr	Τριτυλομάδα (Trt)[85,86] 	1% TFA-DCM
Ser, Thr, Tyr	Βενζυλομάδα (Bzl)[87] 	1) HF, "μόρια-παγίδες" 2) TFMSA-TFA
Trp	*tert*-Βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc)[88] 	TFA-DCM

➢ **ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ *ε*-ΑΜΙΝΟΜΑΔΑΣ ΤΗΣ ΛΥΣΙΝΗΣ**

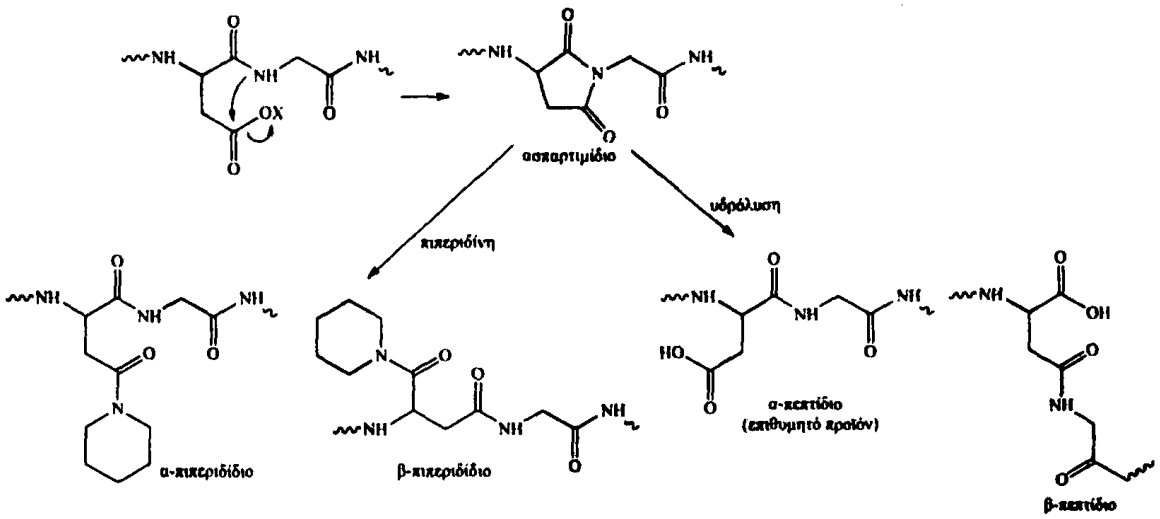
Η προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της λυσίνης είναι απαραίτητη στην πεπτιδική σύνθεση προκειμένου να αποφευχθεί η ακυλίωση της, η οποία μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό ανεπιθύμητων διακλαδισμένων πεπτιδίων. Πολλές ομάδες που χρησιμοποιούνται για την προστασία της *α*-αμινομάδας εφαρμόζονται και για την προστασία της παράπλευρης αμινομάδας.

➢ **ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΟΥ ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ**

Η καρβοξυλική ομάδα της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαραγινικού και γλουταμινικού οξέος πρέπει να είναι προστατευμένη προκειμένου να αποφευχθεί η ενεργοποίηση της κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα διακλαδισμένα πεπτίδια.

Επιπλέον, στην περίπτωση του ασπαραγινικού οξέος, οι προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται πρέπει επίσης να προλαμβάνουν ή έστω να ελαχιστοποιούν το σχηματισμό του ασπαρταμιδίου (**Σχήμα 3.6.13**).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 3.6.13. Σχηματισμός ασπαρταμιδίου, ακολουθούμενος από το σχηματισμό των πιπεριδιδίων, κατά την επεξεργασία με πιπεριδίνη.

Το ίδιο είδος ενδομοριακής κυκλοποίησης μπορεί επίσης να λάβει χώρα στην περίπτωση του γλουταμινικού οξέος, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό του πυρογλουταμινικού οξέος[89]. Ωστόσο, στην περίπτωση του γλουταμινικού οξέος η αντίδραση αυτή είναι λιγότερο σοβαρή από αυτή του ασπαραγινικού οξέος.

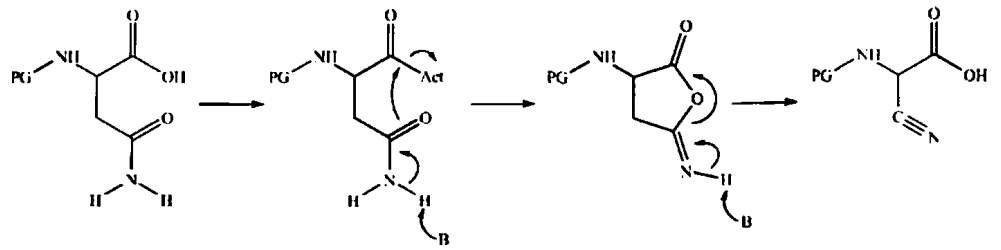
➢ **ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΒΟΞΑΜΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗΣ**

Η ασπαραγίνη και η γλουταμίνη χρησιμοποιούνται συχνά χωρίς προστασία της παράπλευρης αλυσίδας τους.

Παρ' όλα αυτά, τα μη προστατευμένα παράγωγά τους δείχνουν μικρή διαλυτότητα, και ως εκ τούτου, αργούς ρυθμούς σύζευξης. Επιπλέον, τα ελεύθερα πρωτοταγή αμίδια τους μπορούν να υποστούν δυο κύριες παράπλευρες αντιδράσεις:

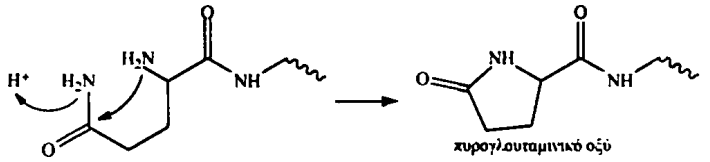
➢ Αφυδάτωση κατά τη διάρκεια της σύζευξης (**Σχήμα 3.6.14**), η οποία είναι μια παράπλευρη αντίδραση που καταλύεται από βάση. Αυτό μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη χρήση των αντίστοιχων *α*-αμινο προστατευμένων πενταφθοροφαινυλεστέρων ή των καρβοδιιμιδίων ως αντιδραστήρια σύζευξης παρουσία του HOBt[58,90].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 3.6.14. Αφυδάτωση ασπαραγίνης.

- Ο σχηματισμός του πυρογλουταμινικού οξέος (**Σχήμα 3.6.15**) είναι μια παράπλευρη αντίδραση, η οποία καταλύεται από ασθενή οξέα. Λαμβάνει χώρα στη *N*-τελική γλουταμίνη και οδηγεί σε αποκομμένες πεπτιδικές αλυσίδες[91].

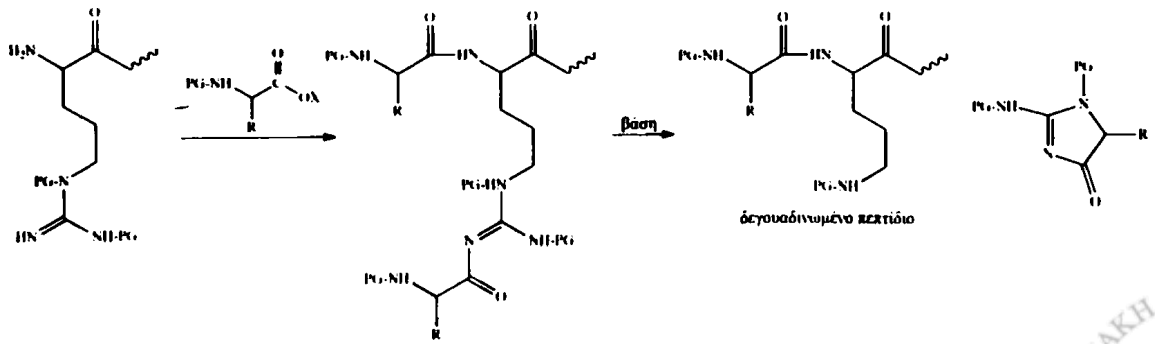


Σχήμα 3.6.15. Σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος.

Η επαρκής προστασία των παράπλευρων αλυσίδων της ασπαραγίνης και της γλουταμίνης εμποδίζει τις παράπλευρες αντιδράσεις. Όσον αφορά την αφυδάτωση, δεν είναι απαραίτητο για την προστατευτική ομάδα που επιλέγεται να είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης, αλλά μόνο κατά το στάδιο της σύζευξης.

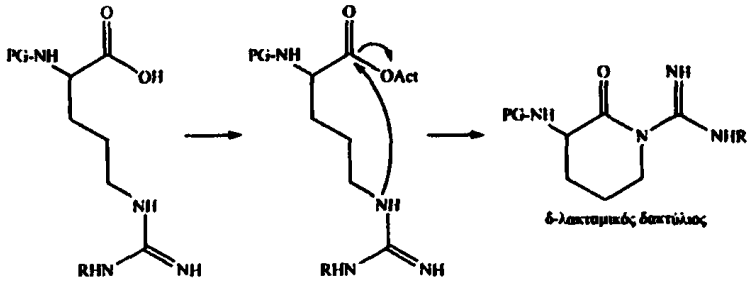
- **ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ ΓΟΥΑΝΙΔΙΝΟΜΑΔΑΣ ΤΗΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ**

Η προστασία της γουανιδινομάδας της αργινίνης απαιτείται για να αποφευχθεί η δεγουανιδίνωση, από την οποία προκύπτει ορνιθίνη (Orn) (**Σχήμα 3.6.16**)[92], και ο σχηματισμός λακταμικού δακτυλίου (**Σχήμα 3.6.17**), εξαιτίας του πυρηνόφιλου χαρακτήρα της γουανιδινομάδας.



Σχήμα 3.6.16. Ακυλίωση της παράπλευρης αλυσίδας της αργινίνης κατά τη σύζευξη.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 3.6.17. Μηχανισμός σχηματισμού λακταμικού δακτυλίου (R= H ή PG).

Δεδομένου ότι η γουανιδινομάδα είναι βασική (pKa 12,5), παραμένει πρωτονιωμένη στις περισσότερες συνθήκες που χρησιμοποιούνται για την πεπτιδική σύνθεση [93,94]. Για να αποφευχθεί η αποπρωτονίωση στην Fmoc/*t*-Bu στρατηγική, πραγματοποιούνται εκπλύσεις με 0,25 M HOBt μεταξύ του σταδίου της απομάκρυνσης της Fmoc-ομάδας και της επόμενης σύζευξης. Ωστόσο αν πραγματοποιηθεί αποπρωτονίωση, η δεγουανιδίνωση συμβαίνει μετά από ακυλίωση της ουδέτερης γουανιδινομάδας.

Τα παράγωγα της αργινίνης τείνουν να είναι τα χειρότερα ακυλιωτικά μέσα σε σύγκριση με άλλα παράγωγα αμινοξέων, κυρίως λόγω του σχηματισμού του λακταμικού δακτυλίου (Σχήμα 3.6.17). Στην στερεή φάση, η παρουσία του λακταμικού δακτυλίου μπορεί να μην θεωρηθεί ως παραπροϊόν, αλλά ως ένα λιγότερο δραστικό αντιδραστήριο για να συζευχθεί.

➢ Προστασια της Θειολομαδας της Κυστεΐνης

Η προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της κυστεΐνης είναι υποχρεωτική στην πεπτιδική σύνθεση, εξαιτίας του πυρηνόφιλου χαρακτήρα της θειολομάδας, η οποία μπορεί είτε να ακυλιωθεί, είτε να αλκυλιωθεί, είτε να οξειδωθεί από τον αέρα, δημιουργώντας δισουλφιδικούς δεσμούς.

➢ Προστασια του Θειοαιθερα της Μεθειονινης

Η θειοαιθερική ομάδα της μεθειονίνης μπορεί να υποστεί δυο παράπλευρες αντιδράσεις, να οξειδωθεί προς σουλφοξείδιο και *S*-αλκυλίωση[95].

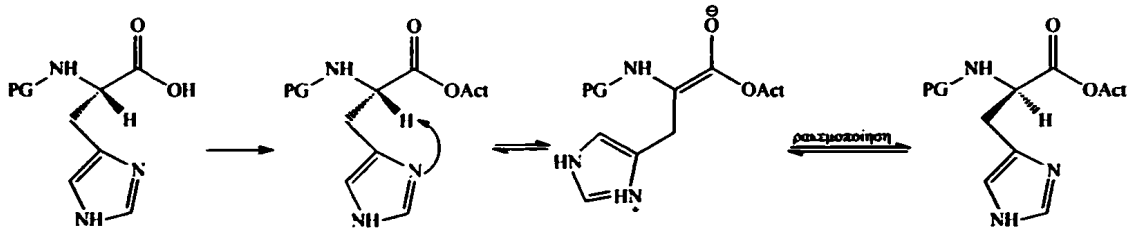
Στην Fmoc/*t*-Bu στρατηγική, η μεθειονίνη χρησιμοποιείται στις περισσότερες περιπτώσεις χωρίς προστασία. Για να αποφευχθεί η οξείδωση κατά τη διάρκεια της αποπροστασίας των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων και της αποκοπής από τη ρητίνη, χρησιμοποιείται το αιθυλομεθυλοσουλφοξείδιο ή η θειοανισόλη[96,97].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

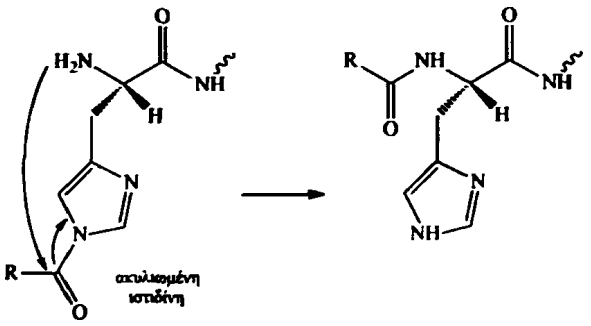
➢ **ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΙΜΙΔΑΖΟΛΙΚΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ ΤΗΣ ΙΣΤΙΔΙΝΗΣ**

Ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της ιστιδίνης έχει δυο πυρηνόφιλα σημεία, το *π*- και το *τ*-άζωτο.

Η μη προστατευμένη ιστιδίνη είναι ιδιαίτερα επιρρεπής στη ρακεμοποίηση κατά τη διάρκεια της σύζευξης (**Σχήμα 3.6.18**), και στην ακυλίωση κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, ακολουθούμενη από N^{τ}- σε *α*-αμινο μετάθεση (**Σχήμα 3.6.19**)[98,99].



Σχήμα 3.6.18. Προτεινόμενος μηχανισμός ρακεμοποίησης της ιστιδίνης κατά τη διάρκεια της σύζευξης.



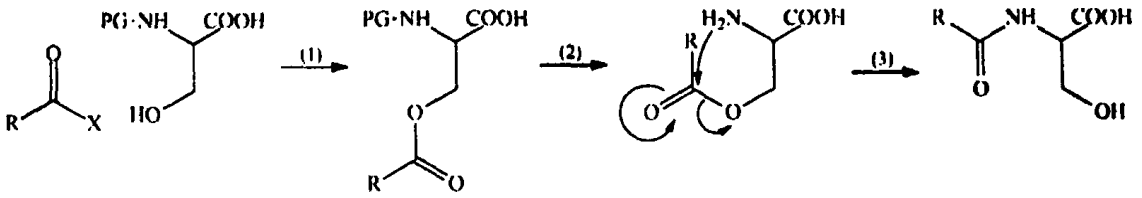
Σχήμα 3.6.19. N^{τ}- σε *α*-αμινο μετάθεση ύστερα από ακυλίωση της ιστίδινης κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης.

Το βασικό και πυρηνόφιλο *π*-άζωτο είναι αυτό που εμπλέκεται στο μηχανισμό της ρακεμοποίησης, η οποία μπορεί να αποφευχθεί με δυο τρόπους: α) την άμεση προστασία, και β) την προστασία του *τ*-αζώτου με ογκώδης ομάδες ή ομάδες οι οποίες είναι δέκτες ηλεκτρονίων και μειώνουν τη βασικότητα του *π*-αζώτου.

➢ **ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΩΝ ΥΔΡΟΞΥΛΟΜΑΔΩΝ ΤΗΣ ΣΕΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ**

Αμινοξέα τα οποία περιέχουν υδροξυλομάδες, όπως η σερίνη και η θρεονίνη, μπορούν να υποστούν παράπλευρες αντιδράσεις, όπως αφυδάτωση ή *O*-ακυλίωση, ακολουθούμενη από *O – N* μετάθεση μετά από αποπροστασία της αμινομάδας (**Σχήμα 3.6.20**).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 3.6.20. *O*-ακυλίωση ακολουθούμενη από *O – N* μετάθεση ύστερα από την αποπροστασία του αμινοξέος: (1) *O*-ακυλίωση, (2) απομάκρυνση της αμινο προστατευτικής ομάδας (PG) και (3) *O – N* μετάθεση.

Μολονότι η σερίνη και η θρεονίνη είναι ασφαλέστερο να εισαχθούν ως προστατευμένα παράγωγα στην πεπτιδική αλληλουχία, μπορούν επίσης και να χρησιμοποιηθούν με ελεύθερη την υδροξυλομάδα τους. Η προστασία είναι απαραίτητη στη σύνθεση σε στερεή φάση, εξαιτίας της περίσσειας των ακυλιωτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται, ιδίως για τη σερίνη, της οποίας η πρωτοταγής υδροξυλομάδα είναι πιο επιρρεπής στην ακυλίωση απ' ότι η δευτεροταγής υδροξυλομάδα της θρεονίνης, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς χωρίς προστασία σε διάφορες συνθέσεις[100,101].

➢ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ ΦΑΙΝΥΛΟΜΑΔΑΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ

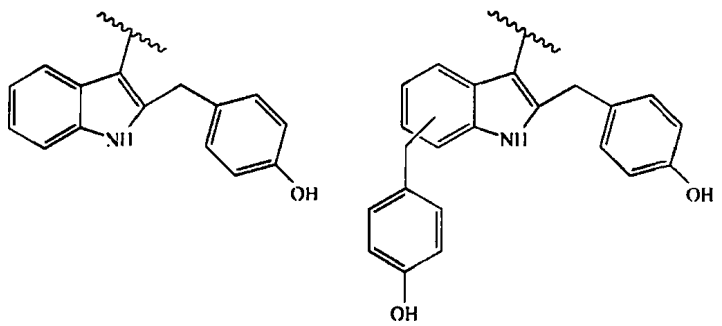
Η χρήση μη προστατευμένης τυροσίνης μπορεί να οδηγήσει σε αλκυλίωση της φαινυλομάδας, εξαιτίας του πυρηνόφιλου χαρακτήρα του φαινολικού ιόντος υπό βασικές συνθήκες. Επιπλέον, ο πλούσιος σε ηλεκτρόνια αρωματικός δακτύλιος μπορεί να υποστεί αλκυλίωση στην *ortho*-θέση. Η οξύτητα της φαινυλομάδας καθιστά τις αλκυλο-προστατευτικές ομάδες λιγότερο σταθερές απ' ότι στην περίπτωση της σερίνης και της θρεονίνης.

➢ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΙΝΔΟΛΙΚΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ ΤΗΣ ΤΡΥΠΤΟΦΑΝΗΣ

Ο ινδολικός δακτύλιος της τρυπτοφάνης μπορεί να υποστεί οξείδωση και αλκυλίωση αν δεν είναι προστατευμένος[102].

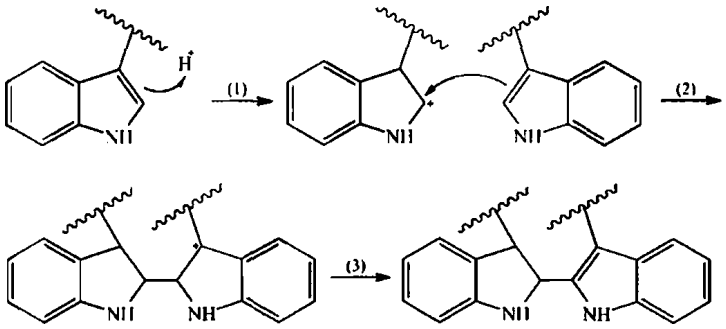
Η αλκυλίωση, κατά τη διάρκεια της όξινης επεξεργασίας, μπορεί να συμβεί από τα καρβοκατιόντα που απελευθερώνονται από τις προστατευτικές ομάδες ή τη ρητίνη, με την τελευταία περίπτωση να οδηγεί σε μη αντιστρεπτό δεσμό του πεπτιδίου με το υπόστρωμα **(Σχήμα 3.6.21)**[103].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 3.6.21. Αλκυλίωση της τρυπτοφάνης από το βραχίονα της Wang ρητίνης.

Επίσης, έχει παρατηρηθεί διμερισμός της τρυπτοφάνης μέσω αλκυλίωσης από μια άλλη πρωτονιωμένη τρυπτοφάνη (**Σχήμα 3.6.22**).



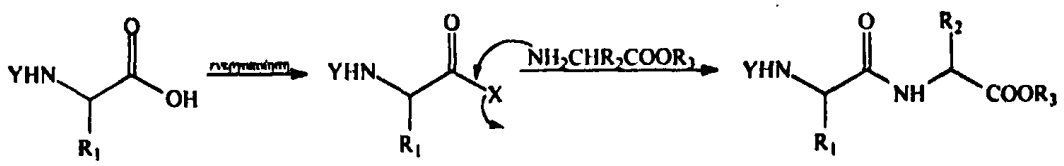
Σχήμα 3.6.22. Μηχανισμός διμερισμού της τρυπτοφάνης.

Στην Boc/Bzl στρατηγική, η προστασία της τρυπτοφάνης είναι απαραίτητη λόγω του υψηλού κινδύνου οξείδωσης και αλκυλίωσης, εξαιτίας των όξινων συνθηκών. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν και τα μόρια-παγίδες (scavengers) που επιλέγονται στην τελική αποκοπή. Για παράδειγμα, η θειοανισόλη πρέπει να αποφεύγεται, διότι τα κατιόντα που προκύπτουν μπορούν να αλκυλιώσουν την τρυπτοφάνη, ενώ θα πρέπει να χρησιμοποιείται το TIS (τριισοπροπυλοσιλάνιο) αντί του TES (τριαιθυλοσιλάνιο), για να αποφεύγεται η αναγωγή του ινδολικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης σε ινδόλιο[104]. Σε αντίθεση, στην Fmoc/*t*-Bu στρατηγική, η τρυπτοφάνη χρησιμοποιείται συχνά χωρίς προστασία. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις, η προστασία είναι απαραίτητη.

3.7. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ

Η επιτυχία της σύνθεσης των πεπτιδίων, καθώς και η δημιουργία βιβλιοθηκών πεπτιδίων, στηρίζεται σε ένα αποτελεσματικό συνδυασμό των προστατευτικών ομάδων και των αντιδραστηρίων σύζευξης (**Σχήμα 3.7.23**).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 3.7.23. Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού.

Ο σχηματισμός ενός πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα σε δυο αμινοξέα περιλαμβάνει δυο στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η ενεργοποίηση της καρβοξυλικής ομάδας αυτό το στάδιο αντιπροσωπεύει ένα βασικό βήμα στη σύνθεση ενός μεγάλου αριθμού βιοοργανικών μορίων, ιδίως κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης[105]. Αν η ενεργοποίηση του καρβοξυλικού οξέος είναι αργή, τότε το αντιδραστήριο σύζευξης θα αποικοδομηθεί και δεν θα είναι πλέον σε θέση να ενεργοποιήσει την καρβοξυλομάδα.

Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή από την αμινομάδα του άλλου αμινοξέος στην ενεργοποιημένη καρβοξυλομάδα[106–112]. Αυτή η διαδικασία είναι μια αντίδραση η οποία απαιτεί ενέργεια[113], και ως εκ τούτου μια από τις καρβοξυλικές ομάδες πρέπει να ενεργοποιηθεί πριν πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Δυστυχώς, το στάδιο ενεργοποίησης, μαζί με το επόμενο στάδιο, το οποίο είναι η αντίδραση σύζευξης, προκαλεί μια απώλεια της διαμόρφωσης στο καρβοξύλιο, το οποίο υποβάλλεται στη διαδικασία της ενεργοποίησης.

Τα πεπτίδια, ως εκ τούτου, συντίθενται με το σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ των οπτικών ενεργών μονομερών. Υπό αυτές τις συνθήκες, πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν το ενδεχόμενο απώλειας της χηλικής ακεραιότητας, ενώ η κατανόηση του μηχανισμού της ρακεμοποίησης είναι σίγουρα απαραίτητη για την πρόληψή της[113–116].

Στη βήμα προς βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση[117] το πρόβλημα της ρακεμοποίησης είναι λιγότερο δραματικό από άλλες μεθόδους. Διάφορες παράμετροι έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση τέτοιων παράπλευρων αντιδράσεων κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων σύζευξης. Ένα βασικό ζήτημα είναι η α-αμινο προστατευτική ομάδα του αμινοξέος που πρόκειται να συζευχθεί, η οποία συνήθως είναι μια ουρεθανικού τύπου ομάδα (ουραθάνη: $CH_3CH_2OCONH_2$), όπως η Boc-[118] και Fmoc-ομάδα[119].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

3.8. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των τεχνικών που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση είναι η χρήση μεγάλης περίσσειας των αντιδραστηρίων. Οι αντιδράσεις σύζευξης είναι γενικά ταχύτερες στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση παρά σε υγρή, ελαχιστοποιώντας έτσι την απώλεια της διαμόρφωσης. Αν και είναι ευρέως αποδεκτό πως στη βήμα προς βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση ο κίνδυνος ρακεμοποίησης είναι πρακτικά μηδέν, αυτό δεν είναι απόλυτα αληθές, και η πιθανότητα απώλειας της διαμόρφωσης πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπ' όψιν, ειδικά για ευαίσθητα αμινοξέα, όπως η κυστεΐνη και η ιστιδίνη.

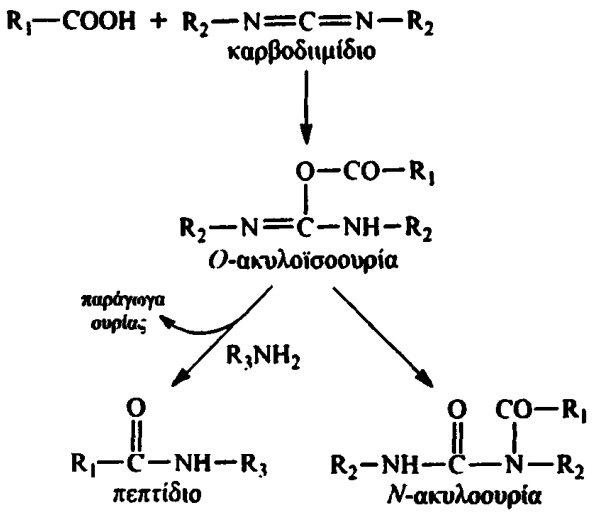
Τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια σύζευξης είναι τα καρβοδιιμίδια και τα φωσφονικά και αμινικά άλατα (**Σχήμα 3.8.24**)[105,120–125].

Σχήμα 3.8.24. Αντιδραστήρια σύζευξης.

3.8.1. ΚΑΡΒΟΔΙΙΜΙΔΙΑ

Η πιο παραδοσιακή τεχνική που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού είναι η μέθοδος των καρβοδιιμιδίων, χρησιμοποιώντας το *N,N'*-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο (DCC). Τα καρβοδιιμίδια περιέχουν δυο άτομα αζώτου, τα οποία είναι ασθενώς βασικά. Αυτό είναι αρκετό για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση ανάμεσα σε ένα καρβοδιιμίδιο και ένα οξύ, ούτως ώστε να παραχθεί *O*-ακυλοϊσοουρία (**Σχήμα 3.8.1.25**)[105,126–130].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

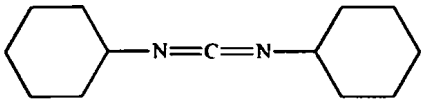


Σχήμα 3.8.1.25. Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με τη μέθοδο των καρβοδιιμιδίων.

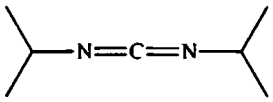
Η *O*-ακυλοϊσοουρία ενός *N*-ακυλοκαρβονυλο-αμινοξέος ή ενός πεπτιδίου είναι πολύ δραστική και υφίσταται ταχέως αμινόλυση παρουσία μιας αμίνης για να δώσει το πεπτιδίο. Ωστόσο, μια ανεπιθύμητη αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα εξαιτίας της υψηλής δραστικότητας της *O*-ακυλοϊσοουρίας. Η αντίδραση αυτή αποτελείται από την αναδιάταξή της σε *N*-ακυλοουρία, μια σταθερή αδρανή μορφή του εισερχόμενου οξέος. Η αντίδραση, η οποία είναι μη αναστρέψιμη και καταναλώνει το αρχικό οξύ, χωρίς να παράγει πεπτίδιο, είναι πολύ γρήγορη σε *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και πολύ αργή σε διχλωρομεθάνιο (DCM).

Το άφθονο ίζημα της *N,N'*-δικυκλοεξυλοουρίας (DCU) διαχωρίζεται μέσα σε λίγα λεπτά σε οποιαδήποτε αντίδραση χρησιμοποιώντας το DCC, το οποίο είναι διαλυτό μόνο σε τριφθοροξικό οξύ (TFA). Έτσι, παρά το γεγονός το ότι είναι συμβατό το DCC με την Boc/Bzl στρατηγική, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην Fmoc/*t*-Bu στρατηγική. Όταν το DCC χρησιμοποιείται σε διάλυμα, τα υπολείμματα της DCU είναι δύσκολο να απομακρυνθούν, ακόμη και μετά από τη διέλευση μέσω χρωματογραφικής στήλης. Έτσι το DCC έχει αντικατασταθεί από τα αντιδραστήρια *N,N'*-διισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC), *N*-αιθυλο-*N'*-(3-διμεθυλοαμινοπροπυλο)καρβοδιιμίδιο (EDC) και *N*-κυκλοεξυλο-*N'*-ισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (CIC)[131], τα οποία είναι σχετικά διαλυτά σε DCM και ως εκ τούτου είναι πιο κατάλληλα για την Fmoc/*t*-Bu στρατηγική.

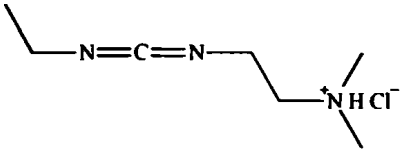
N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο (DCC)[105]



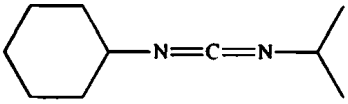
N,N'-διισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC)[132]



N-αιθυλο-*N'*-(3-διμεθυλοαμινοπροπυλο)καρβοδιιμίδιο (EDC)[132]



N-κυκλοεξυλο-*N'*-ισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (CIC)[131]

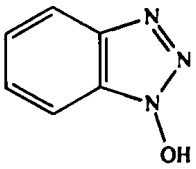


Σχήμα 3.8.1.26. Διάφορα καρβοδιιμίδια.

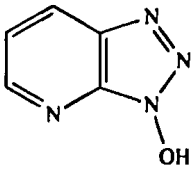
Οι αντίστοιχοι ενεργοί εστέρες των βοηθητικών πυρηνόφιλων, όπως είναι τα *N*-υδροξυ παράγωγα (HOXt), είναι λιγότερο δραστικοί από την *O*-ακυλοϊσοουρία. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα βοηθητικά πυρηνόφιλα αυξάνουν την αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων των καρβοδιιμιδίων. Πρώτα από όλα, καταστέλλουν το σχηματισμό της *N*-ακυλοουρίας. Η ευεργετική επίδραση των HOXt αποδίδεται στην ικανότητα τους να πρωτονιώνουν την *O*-ακυλοϊσοουρία, εμποδίζοντας έτσι την ενδομοριακή αντίδραση να συμβεί και να μετατοπιστεί, και να σχηματίσει το αντίστοιχο ενεργό εστέρα, μειώνοντας έτσι το βαθμό της ρακεμοποίησης σε πολλές περιπτώσεις[133,134].

Διάφορα βοηθητικά πυρηνόφιλα με δομή τριαζολίου και τετραζολίου, παρουσία του DIC, έχουν αναπτυχθεί στην Fmoc/*t*-Bu στρατηγική[135]. Πρόσφατα, ο A. El-Faham και ο F. Albericio[136,137] ανέφεραν ένα ασφαλές και εξαιρετικά αποτελεσματικό βοηθητικό πυρηνόφιλο, τον 2-κυανο-2-(υδροξυϊμινο) οξικός αιθυλεστέρα (Oxyma), κυρίως για χρήση στη μέθοδο των καρβοδιιμιδίων για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού. Το συγκεκριμένο πυρηνόφιλο εμφανίζει μια αξιοσημείωτη ικανότητα να καταστέλλει τη ρακεμοποίηση και μια εντυπωσιακή απόδοση σύζευξης, τόσο στην αυτοματοποιημένη όσο και στη μη αυτοματοποιημένη σύνθεση.

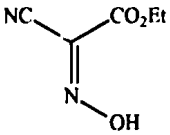
1-Υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBt)[105]



1-Υδροξυ-7-αζαβενζοτριαζόλιο (HOAt)[134]



2-Κυανο-2-(υδροξυϊμινο) οξικός αιθυλεστέρας (Oxyma)[137]



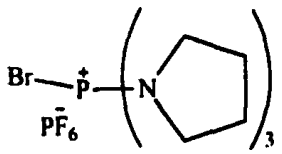
Σχήμα 3.8.1.27. Διάφορα βοηθητικά πυρηνόφιλα.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

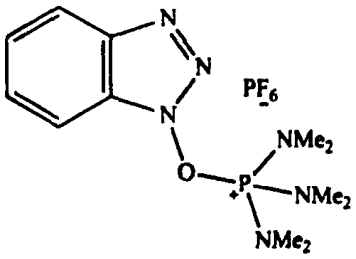
3.8.2. ΦΩΣΦΟΝΙΚΑ ΑΛΑΤΑ

Τα φωσφονικά άλατα αντιδρούν με καρβοξυλικούς εστέρες, και επομένως η παρουσία ενός τουλάχιστον ισοδύναμου βάσεως είναι απαραίτητο. Όσον αφορά το μηχανισμό, αρκετοί ερευνητές[138–141] έχουν προτείνει πως το ίδιο το ακυλοφωσφονικό άλας είναι το δραστικό είδος. Ωστόσο, οι B. Castro και J. R. Dormoy[120] πρότειναν πως αυτό το άλας είναι πολύ δραστικό, και πως ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες θα αντιδράσει αμέσως με τα ιόντα που υπάρχουν στο μέσο και θα δώσει το συμμετρικό ανυδρίτη[142]. Αρκετά χρόνια αργότερα, οι M. H. Kim και D. V. Patel[143] ανέφεραν, πως το συγκεκριμένο ενδιάμεσο μπορεί να εμφανιστεί στους -20 °C, όταν χρησιμοποιείται το BOP ως αντιδραστήριο σύζευξης. Ωστόσο, οι J. Coste και J. M. Campagne [144] πρότειναν πως αυτό το είδος είναι εξαιρετικά ασταθής ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες υφίσταται μετατροπή προς τον ενεργό εστέρα. Παρά αυτήν την διαμάχη, είναι ευρέως αποδεκτό πως το δραστικό είδος είναι ένας ενεργός εστέρας όταν το φωσφονικό άλας που χρησιμοποιείται, περιέχει πυρηνόφιλα παράγωγα. Αυτές οι συζεύξεις πραγματοποιούνται με μια περίσσεια βάσεως, συνήθως δυο ισοδυνάμων *N,N*-διισοπροπυλαιθυλαμίνης (DIEA), και παρουσία ενός ισοδυνάμου του υδροξυλαμινο-παραγώγου, το οποίο συνήθως είναι HOBt ή HOAt.

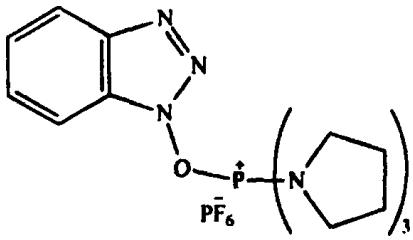
Βρωμο-τρις-(πυρολιδινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας (PyBrop)[145]



Βενζοτριαζολ-οξυ-τρις-(διμεθυλαμινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας (BOP)[138]



Βενζοτριαζολ-οξυ-τρις-(πυρολιδινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας (PyBOP)



Σχήμα 3.8.2.28. Διάφορα φωσφονικά παράγωγα.

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα των φωσφονικών αλάτων έναντι των αμινικό/ουρονικών αλάτων είναι ότι το φωσφόνιο δεν αντιδρά με την αμινομάδα του εισερχόμενου αμινοξέος, και ως εκ τούτου το φωσφόνιο δεν τερματίζει την πεπτιδική αλυσίδα. Το συγκεκριμένο έχει σημασία στη σύζευξη θραυσμάτων και στην κυκλοποίηση, όταν και τα δυο αντιδρώντα είναι ισομοριακά και μια περίσσεια αντιδραστηρίου σύζευξης αντιδρά με την αμινο-συστατικό[107].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

3.8.3. ΑΜΙΝΙΚΑ/ΟΥΡΟΝΙΚΑ ΑΛΑΤΑ

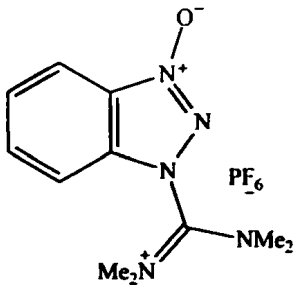
Τα αμινικά άλατα φέρουν ένα θετικά φορτισμένο άτομο άνθρακα στη θέση του φωσφονίου, ενώ αποδίδεται για πρώτη φορά η ουρονική-τύπου δομή, η οποία είναι ανάλογη με την αντίστοιχη του φωσφονικού άλατος.

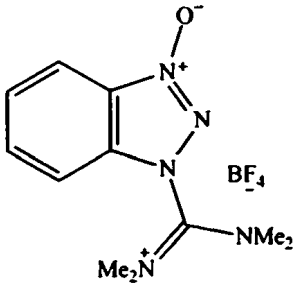
Τα αμινικά/ουρονικά άλατα αντιδρούν απευθείας με την αμινομάδα του αμινοξέος για να δώσουν ένα γουανιδινο-παραπροϊόν, το οποίο τερματίζει την ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας[107]. Αυτό το αποτέλεσμα εμφανίζεται συχνά λόγω της αργής προενεργοποίησης του καρβοξυλικού οξέος ή της χρήσης περίσσειας ουρονικού αντιδραστηρίου. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη διάρκεια της σύζευξης θραυσμάτων και της κυκλοποίησης, όταν και τα δυο αντιδρώντα βρίσκονται σε ισομοριακές ποσότητες. Επιπλέον, στη βήμα προς βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση, η χρήση μιας μικρής ποσότητας (0,95 ισοδύναμα) αμινικού/ουρονικού άλατος συνίσταται για να αποφευχθεί η αντίδραση με την αμινομάδα.

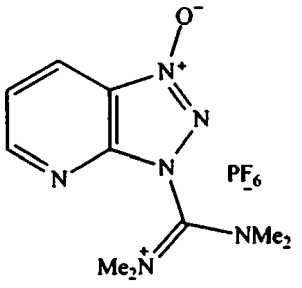
Βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο- εξαφθοροφωσφορικό άλας (HBTU)[146]

Βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο- τετραφθοροβορικό άλας (TBTU)[146]

Εξαφωσφορικό άλας της O-(7-αζαβενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλοουρίας (HATU)







Σχήμα 3.8.3.29. Διάφορα αμινικά παράγωγα.

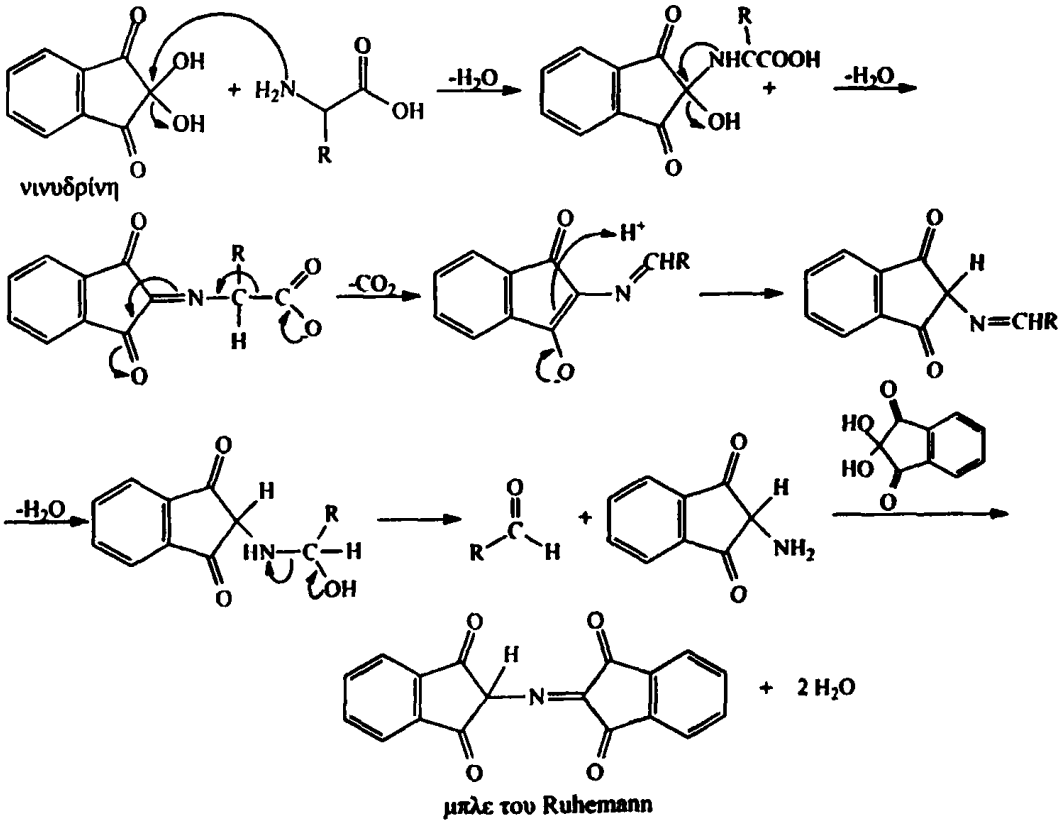
3.9. ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για να επαληθευθούν οι διαδικασίες της αποπροστασίας και της σύζευξης του κάθε αμινοξέος κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης, πρέπει να διεξαχθεί μια χρωματομετρική μέθοδος, για την παρουσία ελεύθερων αμινομάδων. Πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί, όπως ο σχηματισμός του άλατος της αμινομάδας στη ρητίνη με πικρικό οξύ (2,4,6-τρινιτροφαινόλη), και στη συνέχεια, απελευθέρωση του αντίστοιχου φαινολικού εστέρα με *N,N*-διισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIEA)[147], ή η πυρηνόφιλη υποκατάσταση της αλογονο-1,4-ναφθοκινόνης ή της νιτρο-αλογονο-1,4-ναφθοκινόνης από τις αμινομάδες της ρητίνης, και στη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

συνέχεια, απελευθέρωση της 2-αμινο-3-αλογονο-1,4-ναφθοκινόνης με όξινη υδρόλυση[148]. Ωστόσο, δεν υπάρχει καμία άλλη μέθοδος, τόσο διαδεδομένη όσο η αντίδραση της νινυδρίνης (Test Kaiser)[149–151]. Η συγκεκριμένη δοκιμή περιλαμβάνει της αντίδραση μιας πρωτοταγούς ή δευτεροταγούς αμινομάδας με τη νινυδρίνη. Το αποτέλεσμα της είναι μια ένωση με απόχρωση σκούρο μπλε, γνωστή και ως μπλε του Ruhemann, στην περίπτωση της πρωτοταγούς αμινομάδας, ενώ για τις δευτεροταγείς αμινομάδας προκύπτει μια ένωση με καφέ απόχρωση[152,153].

Η χρήση των οργανικών διαλυτών στο Test Kaiser, όπως αλκοόλη, πυριδίνη και φαινόλη, βοηθούν στην επιτάχυνση της εμφάνισης του χρώματος[151]. Το ορατό φάσμα της ένωσης Ruhemann σε πυριδίνη είναι μετατοπισμένο προς το μπλε, σε σύγκριση με άλλους διαλύτες, όπως *N,N'*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Ο μηχανισμός της αντίδρασης μεταξύ μιας πρωτοταγούς αμινομάδας ενός α-αμινοξέος και της νινυδρίνης φαίνεται στο **Σχήμα 3.9.30**.

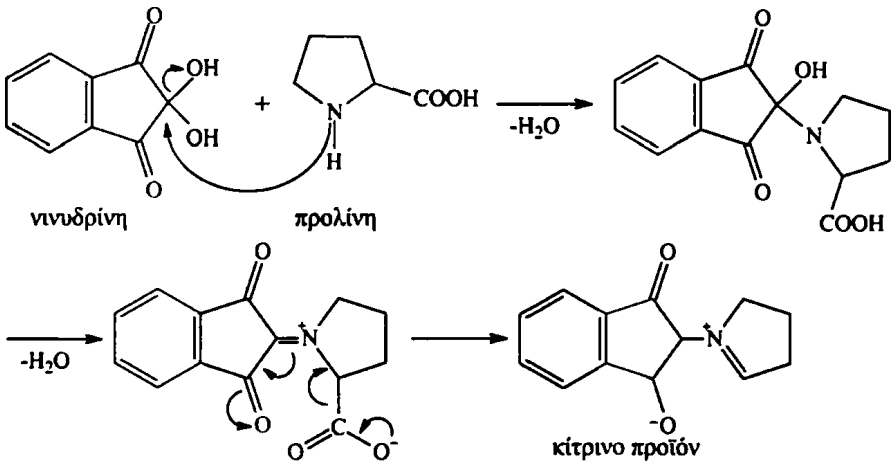


Σχήμα 3.9.30. Μηχανισμός αντίδρασης της νινυδρίνης με μια πρωτοταγής αμινομάδα ενός *α*-αμινοξέος.

Το Test Kaiser μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για όλα τα αμινοξέα, εκτός από την προλίνη. Σε αυτήν την περίπτωση, μια άλλη χρωματομετρική μέθοδος, η οποία

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

συμπεριλαμβάνει επίσης νινυδρίνη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί, δίνοντας ένα κίτρινο προϊόν[153,154]. Ο μηχανισμός της αντίδρασης της νινυδρίνης με την προλίνη φαίνεται στο **Σχήμα 3.9.31**.



Σχήμα 3.9.31. Μηχανισμός αντίδρασης της νινυδρίνης με την προλίνη.

3.10. ΑΠΟΚΟΠΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΡΗΤΙΝΗ

Μετά την ολοκλήρωση της ανοικοδόμησης της πεπτιδικής αλυσίδας πάνω στο στερεό πολυμερές, ακολουθεί η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η αποπροστασία του. Ανάλογα με την λειτουργική ομάδα της ρητίνης και το σύστημα προστασίας, η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και η αποπροστασία του διεξάγονται με την κατεργασία οξέων κατάλληλων συγκεντρώσεων. Οι συνθήκες αποκοπής και αποπροστασίας του πεπτιδίου πρέπει να σχεδιάζονται έτσι, ούτως ώστε να είναι όσο το δυνατόν πιο ήπιες, αλλιώς ευαίσθητες προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων μπορούν να τροποποιηθούν από κατιόντα, τα οποία σχηματίζονται κατά την απομάκρυνση των Bzl- και *t*-Bu-τύπων προστατευτικών ομάδων. Κατιόντα, τα οποία προέρχονται από τη ρητίνη και σχηματίζονται κατά την όξινη κατεργασία, μπορούν να προσδεθούν μη αντιστρεπτά στο πεπτίδιο. Για την αποτελεσματική αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και την ταυτόχρονη αποπροστασία του από τις προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι, καθώς και διάφορα διαλύματα αποκοπής. Τα περισσότερα διαλύματα, εκτός από το οξύ, το HF για την Boc/Bzl στρατηγική και το TFA για την Fmoc/*t*-Bu στρατηγική, περιέχουν και κάποια πυρηνόφιλα, όπως θειοανισόλη, διμεθυλοσουλφίδιο (DMS), αιθανοδιθειόλη (EDT), διθειοθρεϊτόλη (DTT) και σιλάνια, τα οποία συμπεριφέρονται ως μόρια-παγίδες (scavengers), εξαιτίας των ηλεκτρονιόφιλων σωματιδίων που βρίσκονται στο μίγμα της

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αντίδρασης αποκοπής. Ανάλογα με την αλληλουχία του πεπτιδίου και τη φύση των προστατευτικών ομάδων, η πλήρη αποπροστασία του πεπτιδίου, καθώς και η απομάκρυνσή του από τη ρητίνη, πρέπει να βελτιστοποιείται πολύ προσεκτικά για το κάθε πεπτίδιο. Εκτός από τη σύσταση των διαλυμάτων αποκοπής, παράμετροι όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του πεπτιδίου, η συγκέντρωση των κατιόντων που σχηματίζονται στο μίγμα της αντίδρασης της αποκοπής, καθώς και η διάρκεια της αποπροστασίας είναι σημαντικές για να ληφθούν τα προϊόντα σε βέλτιστη απόδοση και καθαρότητα[155].

3.11. Τεχνικες Καθαρισμου και Ταυτοποιησης Πεπτιδιων

Υπάρχει μια σημαντική πτυχή της πεπτιδικής σύνθεσης που δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα, αλλά αποτελεί σημαντικό παράγοντα: ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των πεπτιδίων. Παράλληλα με την εντατική ανάπτυξη των συνθετικών μεθοδολογιών για την παραγωγή πεπτιδίων, σημαντική πρόοδος έγινε για την αντιμετώπιση αυτών των παραγόντων. Σήμερα, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιημένη μέθοδος, και μάλιστα μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος για τον καθαρισμό, επιτρέποντας τον καθημερινό διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων[156]. Αντίθετα, η φασματομετρία μάζας είναι το πιο ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση του προϊόντος: προσδιορισμός της ακριβής μάζας ενός δείγματος είναι η καλύτερη απόδειξη για το αν η σύνθεση ήταν, τουλάχιστον εν μέρει, επιτυχής ή όχι. Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών στην φασματομετρία μάζας επιτρέπει την ανάλυση της αλληλουχίας των πεπτιδίων ή πρωτεϊνών και ως εκ τούτου αντιπροσωπεύει μια άμεση ανάλυση των πρωτοταγών δομών τους.

3.11.1. Υγρη Χρωματογραφια Υψηλης Αποδοσης Αναστροφης Φασης (Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)

Η χρωματογραφία RP-HPLC διαχωρίζει πρωτεϊνικά θραύσματα μιας καθαρισμένης πρωτεΐνη, τα οποία προέρχονται είτε από χημική αποκοπή είτε από ενζυμική πέψη. Ωστόσο, η χρήση της χρωματογραφίας RP-HPLC για τον καθαρισμό πρωτεϊνών είναι περιορισμένη, επειδή κατά τη διαδικασία του καθαρισμού οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και καταστρέφεται η βιολογική τους δράση. Ο διαχωρισμός ενός μίγματος πεπτιδίων ή πρωτεϊνών εξαρτάται από την ισχύ των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων του κάθε συστατικού στο μίγμα με την υδρόφοβη επιφάνεια του υλικού πλήρωσης της στήλης, καθώς και από την ισχύ των οργανικών διαλυτών έκλουσης στην κινητή φάση. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

οργανικών διαλυτών, τόσο οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα πεπτίδια ή τις πρωτεΐνες και του υλικού πλήρωσης της στήλης μειώνονται, και έτσι προηγείται η έκλουση των πολικών ενώσεων από εκείνην των μη πολικών. Τα μίγματα πεπτιδίων ή πρωτεϊνών προστίθενται σε στήλη RP-HPLC, της οποίας ο υδροφοβικός χαρακτήρας του υλικού πλήρωσης είναι γνωστός. Τα προσροφημένα πεπτίδια ή πρωτεΐνες εκλούονται κατά σειρά, από το ασθενέστερο προς το ισχυρότερο προσδεμένο μόριο, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης.

Υπάρχει ένας αριθμός μεταβλητών που επηρεάζουν την χρωματογραφική συμπεριφορά των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Όσον αφορά το υλικό πλήρωσης, υπάρχει το μήκος της άλκυλο παράπλευρης αλυσίδας (C_1, C_3, C_4, C_8 και C_{18}), η μέση διάμετρος των σωματιδίων (3-10 μm), το μέσο μέγεθος των πόρων (60, 100 και 300 Å), καθώς και η ποσότητα της αλκυλο αλυσίδας, η οποία είναι συνδεδεμένη πυριτικό ή πολυμερικό υλικό πλήρωσης. Σε γενικές γραμμές, η ανάλυση θα είναι καλύτερη σε στήλες που αποτελούνται μικρότερα μεγέθους σωματίδια. Οι ομάδες του πυριτικού υλικού πλήρωσης ως σημεία ανταλλαγής κατιόντων, το οποίο μπορεί να επηρεάσει το διαχωρισμό και την ανάκτηση βασικών πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Η χρήση πολυμερικού – μη πυριτικού – υλικού πλήρωσης, εξαλείφει αυτό το πρόβλημα, δίνοντας τη δυνατότητα χρήσης ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH > 7, τα οποία καταστρέφουν το πυριτικό υλικό πλήρωσης. Η σειρά έκλουσης των πεπτιδίων και πρωτεϊνών προσδιορίζεται από το pH και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος, καθώς και από την αύξηση της γραμμικής βαθμίδωσης (linear gradient) του οργανικού διαλύτη (π. χ. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή προπανόλη).

Γενικά, η χρωματογραφία RP-HPLC είναι πιο ευρέως χρωματογραφία που χρησιμοποιείται για πεπτίδια με < 30-40 αμινοξέα, τα οποία επιδεικνύουν, σε γενικές γραμμές, υψηλές ανακτήσεις. Σε αντίθεση, οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται σε συνθήκες υγρής χρωματογραφίας, δύσκολα μπορεί να ανακτηθεί η βιολογικά ενεργή τους μορφή, και είναι συχνά δύσκολα να ανακτηθούν με υψηλές αποδόσεις, εξαιτίας της μη αναστρέψιμης κατακρήμνισης στην στήλη.

3.11.2. Φασματομετρια Μαζας (Mass Spectrometry, MS)

Η φασματομετρία μάζας είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική μέθοδος μέτρησης της μάζας, η οποία χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση γνωστών υλικών, για τον προσδιορισμό αγνώστων ενώσεων μέσα σε ένα δείγμα, καθώς και τη διευκρίνιση της δομής

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

και των χημικών ιδιοτήτων διαφόρων μορίων. Η πλήρης διαδικασία περιλαμβάνει τη μετατροπή του δείγματος σε ιόντα, με ή χωρίς θραυσματοποίηση, τα οποία στη συνέχεια χαρακτηρίζονται από τις τιμές του λόγου της μάζας προς το φορτίο τους (m/z) και τη σχετική τους ένταση (αριθμός ιόντων δεδομένης τιμής m/z που φθάνουν στον ανιχνευτή).

Η συγκεκριμένη τεχνική μελετά ουσιαστικά την επίδραση της ιονίζουσας ενέργειας στα μόρια. Αυτό εξαρτάται από τις χημικές αντιδράσεις στην αέρια φάση, στην οποία τα μόρια του δείγματος καταναλώνονται κατά τη διάρκεια σχηματισμού των ιοντικών και ουδέτερων θραυσμάτων.

▶ ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Ένας φασματογράφος μάζας δημιουργεί πολλαπλά ιόντα από το υπό διερεύνηση δείγμα, ο οποίος αρχικά τα διαχωρίζει ανάλογα με τις τιμές του λόγου m/z, και στη συνέχεια καταγράφει τη σχετική ένταση του κάθε τύπου ιόντος.

Το πρώτο βήμα στην ανάλυση των ενώσεων στη φασματομετρία μάζας είναι η παραγωγή των ιόντων της ένωσης στην αέρια φάση, κυρίως με ιοντισμό ηλεκτρονίων. Το μοριακό ιόν υφίσταται θραυσματοποίηση. Κάθε κύριο ιόν που προκύπτει και προέρχεται από το μοριακό ιόν, με τη σειρά του, υφίσταται θραυσματοποίηση, και ούτω καθεξής. Τα ιόντα διαχωρίζονται στο φασματογράφο μάζας, σύμφωνα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο, και ανιχνεύονται σε αναλογία με την ένταση τους. Το φάσμα μαζών του μορίου που προκύπτει, παριστάνεται συνήθως ως γράφημα, με τη μάζα (τιμές m/z) στον οριζόντιο άξονα και την ένταση στον κάθετο άξονα. Τα ιόντα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη φύση και τη δομή του αρχικού μορίου. Στο φάσμα μιας καθαρής ένωσης, το μοριακό ίον, αν υπάρχει, εμφανίζεται στην υψηλότερη τιμή m/z, και δίνει το μοριακό βάρος της ένωσης.

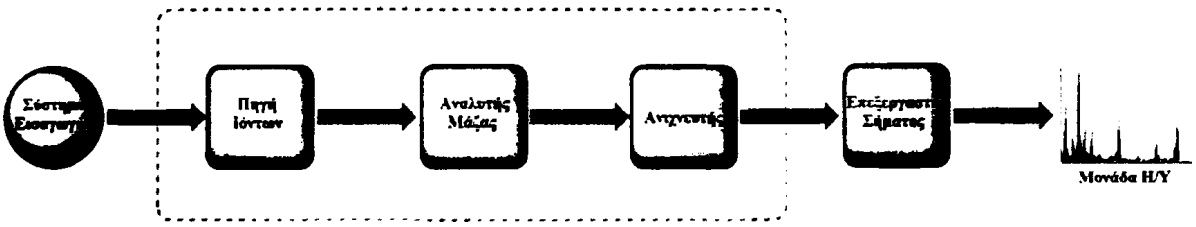
▶ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΑΣ

Το όργανο αποτελείται από τρία βασικά τμήματα:

1. **Πηγή ιόντων:** Για την παραγωγή ιόντων (αέρια κατάσταση) από την υπό διερεύνηση ουσία.
2. **Αναλυτής μαζών:** Για το διαχωρισμό των ιόντων ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές των λόγων m/z.
3. **Ανιχνευτής ιόντων:** Για την ανίχνευση των ιόντων και την καταγραφή της σχετικής έντασης.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Επιπλέον, απαιτείται ένα σύστημα εισαγωγής για την προετοιμασία του δείγματος, διατηρώντας τις υψηλές συνθήκες κενού (~10^{-6} – 10^{-8} mm Hg). Τέλος, απαραίτητος είναι κα ένας υπολογιστής για τον έλεγχο του οργάνου, την καταγραφή και την επεξεργασία των δεδομένων, καθώς και για την σύγκριση των φασμάτων.



Σχήμα 3.11.2.32. Επιμέρους τμήμα ενός φασματογράφου μάζας.

- Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, ένας φασματογράφος μάζας θα πρέπει πάντα να κάνει τις ακόλουθες διαδικασίες:

1. Παραγωγή ιόντων από το δείγμα στην πηγή ιοντισμού.
2. Διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με τις τιμές του λόγου m/z στον αναλυτή μαζών.
3. Θραυσματοποίηση των επιλεγμένων ιόντων και ανάλυση των θραυσμάτων σε ένα δεύτερο αναλυτή μαζών.
4. Ανίχνευση των ιόντων, που προκύπτουν από τον τελευταίο αναλυτή, και μέτρηση της έντασής τους, με τον ανιχνευτή, ο οποίος μετατρέπει τα ιόντα σε ηλεκτρικά σήματα.
5. Επεξεργασία των σημάτων από τον ανιχνευτή ιόντων, τα οποία μεταδίδονται στον υπολογιστή.

3.12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Perrett, D. From "protein" to the beginnings of clinical proteomics. *Proteomics Clininical Appl.* **1**, 720–738 (2007).

2. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemistry 5th Edition*. (2002).

3. McMurry, J. E. *Organic Chemistry 8th Edition*. (2011).

4. Pauling, L., Corey, R. B. & Branson, H. R. The structure of proteins. Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **37**, 205–211 (1951).

5. Fischer, E. Synthese von Polypeptiden. XVII. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **40**, 1754–1767 (1907).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

6. Fischer, E. & Fourneau, E. Ueber einige derivate des glykocolls. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **34,** 2868–2879 (1901).

7. Bergmann, M. & Zervas, L. Ueber ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **65,** 1192–1201 (1932).

8. Du Vigneaud, V. *et al.* The synthesis of an octapeptide amide with the homonal activity of oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.* **75,** 4879–4880 (1953).

9. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85,** 2149–2154 (1963).

10. Carpino, L. A. & Han, G. Y. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* **37,** 3404–3409 (1972).

11. Meldal, M. Properties of solid supports. *Methods Enzymol.* **289,** 83–104 (1997).

12. García-Martín, F. & Albericio, F. Solid supports for the synthesis of peptides. From the first resin used to the most. *Chim. Oggi* **26,** 29–34 (2008).

13. Jensen, K. J. *et al.* Backbone Amide Linker (BAL) strategy for solid-phase synthesis of C-terminal-modified and cyclic peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **120,** 5441–5452 (1998).

14. García-Martín, F. *et al.* ChemMatrix, a poly(ethylene glycol)-based support for the solid-phase synthesis of complex peptides. *J. Comb. Chem.* **8,** 213–220 (2006).

15. García-Martín, F., Bayó-Puxan, N., Cruz, L. J., Bohling, J. C. & Albericio, F. Chlorotrityl chloride (CTC) resin as a reusable carboxyl protecting group. *QSAR Comb. Sci.* **26,** 1027–1035 (2007).

16. Horvath, C. & Lipsky, S. R. Column Design in High Pressure Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **7,** 109–116 (1969).

17. Fields, G. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. *Methods Enzymol. Solid-Phase Pept. Synth.* **289,** (1997).

18. Chamoin, S., Houldsworth, S., Kruse, C. G., Bakker, W. I. & Snieckus, V. The Suzuki-Miyaura cross coupling reactions on solid support. Link to solution phase directed ortho metalation. The Leznoff acetal linker approach to biaryl and heterobiaryl aldehydes. *Tetrahedron Lett.* **39,** 4179–4182 (1998).

19. Frenette, R. & Friesen, R. W. Biaryl synthesis via Suzuki coupling on a solid support. *Tetrahedron Lett.* **35,** 9177–9180 (1994).

20. Marquals, S. & Arlt, M. Aryl-aryl cross coupling on a solid support using zinc organic reagents and palladium catalysis. *Tetrahedron Lett.* **37,** 5491–5494 (1996).

21. Pulley, S. R. & Hegedus, L. S. Solid-phase, solution, and segment condensation peptide syntheses incorporating chromium carbene complex-derived nonproteinogenic ("unnatural") amino acid fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **115,** 9037–9047 (1993).

22. Tortolani, D. R. & Biller, S. A. A solid phase synthesis of miconazole analogs via an iodoetherification reaction. *Tetrahedron Lett.* **37,** 5687–5690 (1996).

23. Hanessian, S. & Yang, R.-Y. Solution and solid phase synthesis of 5-alkoxyhydantoin libraries with a three-fold functional diversity. *Tetrahedron Lett.* **37,** 5835–5838 (1996).

24. Le Hetet, C., David, M., Carreaux, F., Carboni, B. & Sauleau, A. Synthesis of functionalized γ-and δ-lactones via polymer-bound epoxides. *Tetrahedron Lett.* **38,** 5153–5156 (1997).

25. Park, K.-H., Abbate, E., Najdi, S., Olmstead, M. M. & Kurth, M. J. Solution- and solid-phase synthesis of novel hydantoin and isoxazoline-containing heterocycles. *Chem. Commun.* 1679–1680 (1998). doi:10.1039/a803400a

26. Wang, S.-S. p-Alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **95,** 1328–1333 (1973).

27. Lu, G., Mojsov, S., Tam, J. P. & Merrifield, R. B. Improved synthesis of 4-alkoxybenzyl alcohol resin. *J. Org. Chem.* **46,** 3433–3436 (1981).

28. Fancelli, D., Fagnolab, M. C., Severino, D. & Bedeschib, A. Solid phase synthesis of 2-substituted benzofurans via the palladium-catalysed heteroannulation of acetylenes. *Tetrahedron Lett.* **38,** 2311–2314 (1997).

29. Van Nispen, J. W., Polderdijk, J. P. & Greven, H. M. Suppression of side-reactions during the attachment of FMOC-amino acids to hydroxymethyl polymers. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **104,** 99–100 (1985).

30. Sieber, P. An improved method for anchoring of 9-fluorenylmethoxycarbonyl-amino acids to 4-alkoxybenzyl alcohol resins. *Tetrahedron Lett.* **28,** 6147–6150 (1987).

31. Grandas, A., Jorba, X., Giralt, E. & Pedroso, E. Anchoring of Fmoc-amino acids to hydroxymethyl resins. *Int. J. Pept. Protein Res.* **33,** 386–390 (1989).

32. Daniels, S. B., Bernatowicz, M. S., Coull, J. M. & Köster, H. Membranes as solid supports for peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **30,** 4345–4348 (1989).

33. Harth-Fritschy, E. & Cantacuzène, D. Esterification of 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-glycosylated serine and cysteine derivatives with an hydroxymethyl resin. *J. Pept. Res.* **50,** 415–420 (1997).

34. Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.* **28,** 3787–3790 (1987).

35. Barlos, K. *et al.* Darstellung geschützter peptid-fragmente unter einsatz substituierter triphenylmethyl-harze. *Tetrahedron Lett.* **30,** 3943–3946 (1989).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

36. Bollhagen, R., Schmiedberger, M., Barlos, K. & Grell, E. A new reagent for the cleavage of fully protected peptides synthesised on 2-chlorotrityl chloride resin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 2559–2560 (1994).

37. Cyr, J. E. *et al.* Somatostatin receptor-binding peptides suitable for tumor radiotherapy with Re-188 or Re-186. Chemistry and initial biological studies. *J. Med. Chem.* **50,** 1354–1364 (2007).

38. Fischer, E. & Bergmann, M. Ueber das Tannin und die Synthese aehnlicher Stoffe. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **51,** 1760–1804 (1918).

39. Barany, G. & Merrifield, R. B. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. *J. Am. Chem. Soc.* **99,** 7363–7365 (1977).

40. Barany, G. & Albericio, F. Three-dimensional orthogonal protection scheme for solid-phase peptide synthesis under mild conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **107,** 4936–4942 (1985).

41. Schwyzer, R. & Rittel, W. Synthese von Peptid-Zwischenprodukten für den Aufbau eines corticotrop wirksamen Nonadecapeptids. I. N^{ε}-t-Butyloxycarbonyl-L-lysin, N^{ε}-(N^{ε}-t-Butyloxycarbonyl-L-lysyl)-N^{ε}-t-butyloxycarbonyl-L-lysin, N^{ε}-t-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycin und. *Helv. Chim. Acta* **44,** 159–169 (1961).

42. Albericio, F. *et al.* Convenient syntheses of fluorenylmethyl-based side chain derivatives of glutamic and aspartic acids, lysine, and cysteine. *Synthesis (Stuttg).* **2,** 119–122 (1990).

43. Aletras, A., Barlos, K., Gatos, D., Koutsogianni, S. & Mamos, P. Preparation of the very acid-sensitive Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Application in the synthesis of side-chain to side-chain cyclic peptides and oligolysine cores suitable for the solid-phase assembly of MAPs and TASPs. *Int. J. Pept. Protein Res.* **45,** 488–496 (1995).

44. Matysiak, S., Bibdicke, T., Tegge, W. & Frank, R. Evaluation of monomethoxytrityl and dimethoxytrityl as orthogonal amino protecting groups in Fmoc solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **39,** 1733–1734 (1998).

45. Chhabra, S. R. *et al.* An appraisal of new variants of Dde amine protecting group for solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **39,** 1603–1606 (1998).

46. Wittmann, V. & Seeberger, S. Combinatorial solid-phase synthesis of multivalent cyclic neoglycopeptides. *Angew. Chemie Int. Ed.* **39,** 4348–4352 (2000).

47. Bycroft, B. W., Chan, W. C., Chhabra, S. R. & Hone, N. D. A novel lysine-protecting procedure for continuous flow solid phase synthesis of branched peptides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 778–779 (1993).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

48. Bloomberg, G. B., Askin, D., Gargaro, A. R. & Tanner, M. J. A. Synthesis of a branched cyclic peptide using a strategy employing Fmoc chemistry and two additional orthogonal protecting groups. *Tetrahedron Lett.* **34,** 4709–4712 (1993).

49. Dumy, P. *et al.* A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **36,** 1255–1258 (1995).

50. Rohwedder, B., Mutti, Y., Dumy, P. & Mutter, M. Hydrazinolysis of Dde: Complete orthogonality with Aloc protecting groups. *Tetrahedron Lett.* **39,** 1175–1178 (1998).

51. Chang, C.-D. *et al.* Preparation and properties of Nα-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert-butyl side chain protection. *Int. J. Pept. Protein Res.* **15,** 59–66 (1980).

52. Benoiton, N. L. A synthesis of isoasparagine from β-benzyl aspartate. *Can. J. Chem.* **40,** 570–572 (1962).

53. Bourne, G. T. *et al.* A backbone linker for Boc-based peptide synthesis and on-resin cyclization: Synthesis of Stylostatin 1. *J. Org. Chem.* **64,** 3095–3101 (1999).

54. Mergler, M. & Dick, F. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part III. *J. Pept. Sci.* **11,** 650–657 (2005).

55. Chan, W. C., Bycroft, B. W., Evans, D. J. & White, P. D. A novel 4-minobenzyl ester-based carboxy-protecting group for synthesis of atypical peptides by Fmoc-But solid-phase chemistry. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 2209–2210 (1995).

56. Friede, M. *et al.* Incomplete TFA deprotection of N-terminal trityl-asparagine residue in fmoc solid-phase peptide chemistry. *Pept. Res.* **5,** 145–147 (1992).

57. Sieber, P. & Riniker, B. Protection of carboxamide functions by the trityl residue. Application to peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **32,** 739–742 (1991).

58. Gausepohl, H., Kraft, M. & Frank, R. W. Asparagine coupling in Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **34,** 287–294 (1989).

59. König, W. & Geiger, R. Eine neue Amid-Schutzgruppe. *Chem. Ber.* **1,** 2041–2051 (1970).

60. Funakoshi, S. *et al.* Combination of a new amide-precursor reagent and trimethylsilyl bromide deprotection for the Fmoc-based solid phase synthesis of human pancreastatin and one of its fragments (Fmoc = fluoren-9-ylmethoxycarbonyl). *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1588–1590 (1988).

61. Shah, D. *et al.* Alkylation of tryptophan during deprotection of Tmob-protected carboxamide side chains. *Pept. Res.* **5,** 241–244 (1992).

62. Carpino, L. A. *et al.* The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. *Tetrahedron Lett.* **34,** 7829–7832 (1993).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

63. Ramage, R., Green, J. & Blake, Alexander, J. An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: NG-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine. *Tetrahedron* **41,** 6353–6370 (1991).

64. Atherton, E., Sheppard, R. C. & Wade, J. D. Side chain protected Nα-fluorenylmethoxycarbonylamino-acids for solid phase peptide synthesis. Nα-Fluorenylmethoxycarbonyl-NG-4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulphonyl-L-arginine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1060–1062 (1983).

65. Barlos, K., Gatos, D., Hatzi, O., Koch, N. & Koutsogianni, S. Synthesis of the very acid-sensitive Fmoc-Cys(Mmt)-OH and its application in solid-phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **47,** 148–153 (1996).

66. Engebretsen, M., Agner, E., Sandosham, J. & Fischer, P. M. Unexpected lability of cysteine acetamidomethyl thiol protecting group Tyrosine ring alkylation and disulfide bond formation upon acidolysis. *J. Pept. Res.* **49,** 341–346 (1997).

67. Fujii, N. *et al.* Silver trifluoromethanesulphonate as an S-deprotecting reagent for the synthesis of cystine peptides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 283–284 (1989).

68. Veber, D. F., Milkowski, J. D., Varga, S. L., Denkewalter, R. G. & Hirschmann, R. Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine. *J. Am. Chem. Soc.* **66,** 5456–5461 (1972).

69. Kamber, B. Cystine peptides from (S-acetamidomethyl-cysteine)-peptides through oxidation with iodine: Synthesis of cyclo-L-cystine. *Helv. Chim. Acta* **54,** 927–930 (1971).

70. Lyle, T. A. *et al.* Chemical synthesis of rat atrial natriuretic factor by fragment assembly on a solid support. *J. Org. Chem.* **52,** 3752–3759 (1987).

71. Singh, P. R., Rajopadhye, M., Clark, S. L. & Williams, N. E. Effect of scavengers in acidolytic cleavage of Cys(Acm)-containing peptides from solid support: Isolation of an ethanedithiol disulfide adduct. *Tetrahedron Lett.* **37,** 4117–4120 (1996).

72. Nishimura, O., Kitada, C. & Fujino, M. New Method for Removing the S-p-Methoxybenzyl and S-t-Butyl Groups of Cysteine Residues with Mercuric Trifluoroacetate. *Chem. Pharm. Bull.* **26,** 1576–1585 (1978).

73. Pastuszak, J. J. & Chimiak, A. tert-Butyl group as thiol protection in peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **46,** 1868–1873 (1981).

74. Han, Y., Albericio, F. & Barany, G. Occurrence and minimization of cysteine racemization during stepwise solid-phase peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **62,** 4307–4312 (1997).

75. Akabori, S., Sakakibara, S., Shimonishi, Y. & Nobuhara, Y. A new method for the protection of the sulfhydryl group during peptide synthesis. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **37,** 433–434 (1964).

76. Zervas, L. & Photaki, I. On cysteine and cystine peptides. I. New S-protecting groups for cysteine. *J. Am. Chem. Soc.* **84,** 3887–3897 (1962).

77. Yajima, H. *et al.* New strategy for the chemical synthesis of proteins. *Tetrahedron* **44,** 805–819 (1988).

78. Barlos, K., Papaioannou, D. & Theodoropoulos, D. Efficient "one-pot" synthesis of N-tritylamino acids. *J. Org. Chem.* **47,** 1324–1326 (1982).

79. Sieber, P. & Riniker, B. Protection of histidine in peptide synthesis: A reassessment of the trityl group. *Tetrahedron Lett.* **28,** 6031–6034 (1987).

80. Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D. & Tsegenidis, T. Fmoc-His(Mmt)-OH und Fmoc-His(Mtt)-OH. Zwei neue histidin-derivative Nim-geschützt mit säure-hochempfindlichen gruppen. Darstellung, eigenschaften und einsatz in der peptidsynthese. *Tetrahedron Lett.* **32,** 475–478 (1991).

81. Colombo, R., Colombo, F. & Jones, J. H. Acid-labile histidine side-chain protection: the N(π)-t-butoxymethyl group. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 292–293 (1984).

82. Mergler, M., Dick, F., Sax, B., Schwindling, J. & Vorherr, T. H. Synthesis and application of Fmoc-His(3-Bum)-OH. *J. Pept. Sci.* **7,** 502–510 (2001).

83. Adamson, J. G., Blaskovich, M. A., Groenevelt, H. & Lajoie, G. Simple and convenient synthesis of tert-butyl ethers of Fmoc-serine, Fmoc-threonine, and Fmoc-tyrosine. *J. Org. Chem.* **56,** 3447–3449 (1991).

84. Arzeno, H. B., Bingenheimer, W., Blanchette, R., Morgans, D. J. & Robinson, J. Temporary serine protection in solid phase synthesis of LH-RH analogs. *Int. J. Pept. Protein Res.* **41,** 342–346 (1993).

85. Barlos, K. *et al.* Darstellung und einsatz von N-Fmoc-O-Trt-hydroxyaminosäuren zur "solid phase" synthese von peptiden. *Tetrahedron Lett.* **32,** 471–474 (1991).

86. Barlos, K., Gatos, D. & Koutsogianni, S. Fmoc/Trt-amino acids: Comparison to Fmoc/tBu-amino acids in peptide synthesis. *J. Pept. Res.* **51,** 194–200 (1998).

87. Reid, G. E. & Simpson, R. J. Automated solid-phase peptide synthesis: Use of 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tert-butyloxycarbonyl amino acids. *Anal. Biochem.* **200,** 301–309 (1992).

88. Smith, C. W. & Ferger, M. F. Synthesis and some pharmacological properties of [3-.beta.-(2-thienyl)-L-alanine]-8-lysine-vasopressin. *J. Med. Chem.* **18,** 822–825 (1975).

89. Feinberg, R. S. & Merrifield, R. B. Modification of peptides containing glutamic acid by hydrogen fluoride-anisole mixtures. γ-Acylation of anisole or the glutamyl nitrogen. *J. Am. Chem. Soc* **97,** 3485–3496 (1975).

90. Mojsov, S., Mitchell, A. R. & Merrifield, R. B. A quantitative evaluation of methods for coupling asparagine. *J. Org. Chem.* **45,** 555–560 (1980).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

91. Dimarchi, R. D., Tam, J. P., Kent, S. B. H. & Merrifield, R. B. Weak acid-catalyzed pyrrolidone carboxylic acid formation from glutamine during solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **19,** 88–93 (1982).

92. Rink, H., Sieber, P. & Raschdorf, F. Conversion of NG-urethane protected arginine to ornithine in peptide solid phase synthesis. *Tetrahedron Lett.* **25,** 621–624 (1984).

93. Du Vigneaud, V., Gish, D. T., Katsoyannis, P. G. & Hess, G. P. Synthesis of the pressor-antidiuretic hormone, arginine-vasopressin. *J. Am. Chem. Soc* **80,** 3355–3358 (1958).

94. Jones Jr., D. A., Mikulec, R. A. & Mazur, R. Simple, high yield synthesis of arginine vasopressin. *J. Org. Chem.* **38,** 2865–2869 (1973).

95. Gairi, M., Lloyd-Williams, P., Albericio, F. & Giralt, E. Severe side-reaction in the acidolytic cleavage of a C-terminal Met-containing peptide from the solid support. Formation of the homoserine lactone peptide. *Tetrahedron Lett.* **35,** 175–178 (1994).

96. Guttmann, S. & Boissonnas, R. A. Synthèse de l'α-Mélanotropine (α-MSH) de Porc. *Helv. Chim. Acta* **42,** 1257–1264 (1959).

97. Yajima, H., Kanaki, J., Kitajima, M. & Funakoshi, S. Studies on peptides. LXXXVI. Application of the trifluoroacetic acid-thioanisole deprotecting procedure for the synthesis of a wasp venom, mastoparan. *Chem. Pharm. Bull.* **28,** 1214–1218 (1980).

98. Kusunoki, M., Nakagawa, S., Seo, K., Hamana, T. & Fukuda, T. A side reaction in solid phase synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **36,** 381–386 (1990).

99. Ishiguro, T. & Eguchi, C. Unexpected Chain-Terminating Side Reaction Caused by Histidine and Acetic Anhydride in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Chem. Pharm. Bull.* **37,** 506–508 (1989).

100. Fischer, P. M., Retson, K. V., Tyler, M. I. & Howden, M. E. H. Solid-phase peptide synthesis without side-chain hydroxyl protection of threonine. *Int. J. Pept. Protein Res.* **38,** 491–493 (1991).

101. Reissman, S. *et al.* Highly selective bradykinin agonists and antagonists with replacement of proline residues by N-methyl-D- and L-phenylalanine. *J. Med. Chem.* **39,** 929–936 (1996).

102. Fontana, A. & Toniolo, C. The chemistry of tryptophan in peptides and proteins. *Fortschritte der Chemie Org. Naturstoffe* **33,** 309–449 (1976).

103. Giraud, M., Cavelier, F. & Martinez, J. A side-reaction in the SPPS of Trp-containing peptides. *J. Pept. Sci.* **5,** 457–461 (1999).

104. Pearson, D. A., Blanchette, M., Baker, M. Lou & Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengres for the trifluoroacetoc acod deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **30,** 2739–2742 (1989).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

105. Sheehan, J. C. & Hess, G. P. A new method of forming peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **77,** 1067–1068 (1955).

106. Albericio, F. & Carpino, L. A. Coupling reagents and activation. *Methods Enzymol. Solid-Phase Pept. Synth.* **289,** 104–126 (1997).

107. Albericio, F., Bofill, J. M., El-faham, A. & Kates, S. A. Use of onium salt-based coupling reagents in peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **63,** 9678–9683 (1998).

108. Albeiicio, F., Chinchilla, R., Dodsworth, D. J. & Nájera, C. New Trends in Peptide Coupling Reagents. *Org. Prep. Proced. Int.* **33,** 203–303 (2001).

109. Albericio, F. & Kates, S. A. *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide.* (2000).

110. Han, S.-Y. & Kim, Y.-A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **60,** 2447–2467 (2004).

111. Benoiton, N. L. *Chemistry of Peptide Synthesis.* (2006).

112. El-Faham, A., Khattab, S. N., Abdul-Ghani, M. & Albericio, F. Design and synthesis of new immonium-type coupling reagents. *European J. Org. Chem.* **2006,** 1563–1573 (2006).

113. Bodanszky, M. *Principles of Peptide Synthesis.* (Springer Berlin Heidelberg, 1993).

114. Antonovics, I. & Young, G. T. Amino-acids and peptides. Part XXV. The mechanism of the base-catalysed racemisation of the p-nitrophenyl esters of acylpeptides. *J. Chem. Soc. C Org.* 595–601 (1967).

115. Carpino, L. A. Methyl ester nonequivalence in the 1H NMR spectra of diastereomeric dipeptide esters incorporating N-terminal .alpha.-phenylglycine units. *J. Org. Chem.* **53,** 875–878 (1988).

116. Lloyd-Williams, P., Albericio, F. & Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins.* (1997).

117. Merrifield, R. B. Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed. English* **24,** 799–810 (1985).

118. McKay, F. C. & Albertson, N. F. New amine-masking groups for peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **79,** 4686–4690 (1957).

119. Carpino, L. A. The 9-fluorenylmethyloxycarbonyl family of base-sensitive amino-protecting groups. *Acc. Chem. Res.* **20,** 401–407 (1987).

120. Castro, B., Dormoy, J. R., Evin, G. & Selve, C. Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Lett.* **16,** 1219–1222 (1975).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

121. Coste, J., Le-Ngyen, D. & Castro, B. PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **31,** 205–208 (1990).

122. Li, P. & Xu, J.-C. The X-ray structures of HOBt-based immonium-type coupling reagents and the rearrangement of benzotriazolyl esters of N^{α}-protected amino acids or peptides: N- vs. O-substituted forms. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 113–120 (2001).

123. Carpino, L. A. *et al.* The uronium/guanidinium Peptide coupling reagents: Finally the true uronium salts. *Angew. Chemie Int. Ed.* **41,** 441–445 (2002).

124. Williams, A. & Ibrahim, I. T. Carbodiimide chemistry: Recent advances. *Chem. Rev.* **81,** 589–636 (1981).

125. Al-Warhi, T. I., Al-Hazimi, H. M. A. & El-Faham, A. Recent development in peptide coupling reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **16,** 97–116 (2012).

126. Rebek, J. & Feitler, D. Mechanism of the carbodiimide reaction. II. Peptide synthesis on the solid phase. *J. Am. Chem. Soc.* **96,** 1606–1607 (1974).

127. Benoiton, N. L. & Chen, F. M. F. Not the alkoxycarbonylamino-acid O-acylisourea. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 543 (1981).

128. Benoiton, N. L. & Chen, F. M. F. 2-Alkoxy-5(4H)-oxazolones from N-alkoxycarbonylamino acids and their implication in carbodiimide-mediated reactions in peptide synthesis. *Can. J. Chem.* **59,** 384–389 (1981).

129. Benoiton, N. L. & Chen, F. M. F. Reaction of N-t-butoxycarbonylamino acid anhydrides with tertiary amines and carbodi-imides. New precursors for 2-t-butoxyoxazol-5(4H)-one and N-acylureas. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1225–1227 (1981).

130. Ślebioda, M., Wodecki, Z. & Kolodziejczyk, A. M. Formation of optically pure N-acyl-N,N′-dicyclohexylurea in N,N′-dicyclohexylcarbodiimide-mediated peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **35,** 539–541 (1990).

131. Izdebski, J., Pachulska, M. & Orłowska, A. N-Cyclohexyl-N′ -isopropylcarbodiimide: a hybrid that combines the structural features of DCC and DIC. *Int. J. Pept. Protein Res.* **44,** 414–419 (1994).

132. Benoiton, N. L. & Chen, F. M. F. Not the alkoxycarbonylamino-acid O-acylisourea. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 543–545 (1981).

133. König, W. & Geiger, R. Eine neue methode zur synthese von peptiden: aktivierung der carboxylgruppe mit dicyclohexylcarbodiimid unter zusatz von 1-hydroxy-benzotriazolen. *Chem. Ber.* **798,** 788–798 (1970).

134. Carpino, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.* **115,** 4397–4398 (1993).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

135. Spetzler, J. C., Meldal, M., Felding, J., Vedsø, P. & Begtrup, M. Novel acylation catalysts in peptide synthesis: derivatives of N-hydroxytriazoles and N-hydroxytetrazoles. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1727–1732 (1998).

136. El-Faham, A. & Albericio, F. Synthesis and application of N-hydroxylamine derivatives as potential replacements for HOBt. *European J. Org. Chem.* **2009,** 1499–1501 (2009).

137. Subirós-Funosas, R., Prohens, R., Barbas, R., El-Faham, A. & Albericio, F. Oxyma: An efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chem. - A Eur. J.* **15,** 9394–403 (2009).

138. Gawne, G., Kenner, G. W. & Sheppard, R. C. Acyloxyphosphonium salts as acylating agents. A new synthesis of peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **91,** 5669–5671 (1969).

139. Barstow, L. E. & Hruby, V. J. Simple method for the synthesis of amides. *J. Org. Chem.* **36,** 1305–1306 (1971).

140. Yamada, S. & Takeuchi, Y. A new method for the synthesis of peptides using the adducts of phosphorus compounds and tetrahalomethanes. *Tetrahedron Lett.* **12,** 3595–3598 (1971).

141. Bates, A. J. *et al.* A New Reagent for Polypeptide Synthesis: μ-Oxo-bis-[tris-(dimethylamino)-phosphonium]-bis-tetrafluoroborate. *Helv. Chim. Acta* **58,** 688–696 (1975).

142. Hudson, D. Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. 1. Comparison of different coupling procedures. *J. Org. Chem.* **53,** 617–624 (1988).

143. Kim, M. H. & Patel, D. V. "BOP" as a reagent for mild and efficient preparation of esters. *Tetrahedron Lett.* **35,** 5603–5606 (1994).

144. Coste, J. & Campagne, J.-M. A propos de l'estérification des acides carboxyliques par le BOP ou le PyBOP. *Tetrahedron Lett.* **36,** 4253–4256 (1995).

145. Costa, J., Frérot, E. & Jouin, P. Coupling N-methylated amino acids using PyBroP and PyCloP halogenophosphonium salts: Mechanism and fields of application. *J. Org. Chem.* **59,** 2437–2446 (1994).

146. Abdelmoty, I., Albericio, F., Carpino, L. A., Foxman, B. M. & Kates, S. A. Structural studies of reagents for peptide bond formation: Crystal and molecular structures of HBTU and HATU. *Lett. Pept. Sci.* **1,** 57–67 (1994).

147. Gisin, B. F. The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid. *Anal. Chim. Acta* **58,** 248–249 (1972).

148. Blackburn, C. Solid-phase synthesis of 2-amino-3-chloro-5- and 8-nitro-1,4-naphthoquinones: a new and general colorimetric test for resin-bound amines. *Tetrahedron Lett.* **46,** 1405–1409 (2005).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

149. Shelton, P. T. & Jensen, K. J. Linkers, resins, and general procedures for solid-phase peptide synthesis. *Methods Mol. Biol.* **1047,** 23–42 (2013).

150. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. & Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34,** 595–598 (1970).

151. Troll, W. & Cannan, R. K. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. *J. Biol. Chem.* **200,** 803–811 (1953).

152. Friedman, M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J. Agric. Food Chem.* **52,** 385–406 (2004).

153. McCaldin, D. J. The chemistry of ninhydrin. *Chem. Rev.* **60,** 39–51 (1960).

154. Kaupp, G., Naimi-Jamal, M. R. & Schmeyers, J. Quantitative reaction cascades of ninhydrin in the solid state. *Chem. - A Eur. J.* **8,** 594–600 (2002).

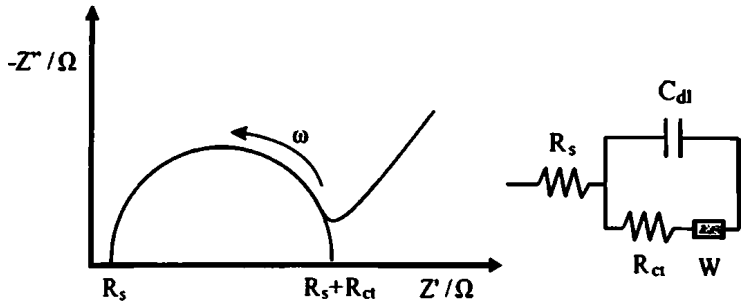
155. Hughes, A. B. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry, Volume 3.* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011).

156. Aguilar, M.-I. in *Methods Mol. Biol.* **251,** (2004).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο



ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

4.1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ

Η Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (Electochemical Impedance Spectroscopy, EIS), παρέχει πληροφορίες για την κινητική και το μηχανισμό διαφόρων ηλεκτροχημικών συστημάτων και χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη διάβρωσης των μετάλλων, στην επιστήμη των ημιαγωγών, στην ανάπτυξη βιοχημικών πυκνωτών και εμπεδησιομετρικών βιοαισθητήρων, στην ανάπτυξη εκλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων, στη μελέτη οργανικών ηλιακών κυψελίδων, στην έρευνα και ανάπτυξη ηλεκτρικών στοιχείων και μπαταριών, στον έλεγχο της ποιότητας επιστρώσεων (βερνίκια, λάκες, χρώματα), στη μελέτη φαινομένων διάβρωσης, στη μελέτη της αλληλεπίδρασης φαρμάκων – πρωτεϊνών κ.ά.

Σημαντικό πλεονέκτημα της EIS είναι η δυνατότητα προσομοίωσης του υπό μελέτη ηλεκτροχημικού συστήματος με ένα ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα. Η διεπιφάνεια ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη είναι τυπικά ανάλογη προς ένα ηλεκτρικό κύκλωμα, το οποίο αποτελείται από ένα συνδυασμό ηλεκτρικών στοιχείων (εξαρτήματα ηλεκτρικών κυκλωμάτων) όπως αντιστάσεις, πυκνωτές και πηνία. Σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο, η (αργή) κινητική μιας ηλεκτροδιακής αντίδρασης, οι (αργές) χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα και τα φαινόμενα διάχυσης, μπορούν να παρεμποδίζουν τη ροή ηλεκτρονίων και ως εκ τούτου, μπορούν να θεωρηθούν ανάλογα με ωμικές, χωρητικές, ή επαγωγικές

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αντιστάσεις δηλαδή ηλεκτρικά στοιχεία, τα οποία μπορούν να παρεμποδίζουν τη ροή ηλεκτρονίων σε ένα κύκλωμα εναλλασσόμενου ρεύματος[1].

4.1.1. Αρχη της Μεθοδου

Η θεωρία της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης περιγράφει την απόκριση ενός κυκλώματος σε ένα σήμα εναλλασσόμενου ρεύματος ή τάσης ως συνάρτηση της συχνότητας. Σε ένα κύκλωμα συνεχούς ρεύματος (μια μερική περίπτωση εναλλασσόμενου ρεύματος, με συχνότητα 0 Hz) η αντίσταση του κυκλώματος καθορίζεται από το νόμο του Ohm, ο οποίος συνδέει το ρεύμα I (ampere), το οποίο διαρρέει τον αγωγό, με την τάση V (volt), που εφαρμόζεται στα άκρα του αγωγού, σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$V = I\,R \qquad (4.1.1.1)$$

όπου R, η αντίσταση του αγωγού σε Ohm (Ω). Σε ένα κύκλωμα συνεχούς ρεύματος, η ωμική αντίσταση είναι το μόνο στοιχείο που παρεμποδίζει τη ροή των ηλεκτρονίων. Σε ένα κύκλωμα εναλλασσόμενου ρεύματος, όπου η συχνότητα είναι μη μηδενική, η ανάλογη εξίσωση είναι:

$$V_{ac} = I_{ac}\,Z \qquad (4.1.1.2)$$

Τα μεγέθη V_{ac} και I_{ac} ορίζονται ανάλογα ως εναλλασσόμενη τάση και εναλλασσόμενο ρεύμα αντίστοιχα, ενώ το Z ορίζεται ως εμπέδηση (**σύνθετη αντίσταση**) και αποτελεί το ισοδύναμο μέγεθος της ωμικής αντίστασης σε ένα κύκλωμα εναλλασσόμενου ρεύματος. Στα κυκλώματα εναλλασσόμενου ρεύματος, η εμπέδηση είναι ίση με το πηλίκο της εφαρμοζόμενης εναλλασσόμενης τάσης προς το παραγόμενο εναλλασσόμενο ρεύμα:

$$Z = V_{ac} / I_{ac} = V_{(t)} / I_{(t)} \qquad (4.1.1.3)$$

Η εμπέδηση μετρείται επίσης σε Ohm και εκφράζει τη συνολική αντίσταση όλων των στοιχείων του κυκλώματος στην κίνηση των ηλεκτρονίων. Στα κυκλώματα εναλλασσόμενου ρεύματος, εκτός από τις αντιστάσεις, στοιχεία όπως οι πυκνωτές και τα πηνία παρεμποδίζουν επίσης τη ροή των ηλεκτρονίων.

Η στιγμιαία τιμή της εναλλασσόμενης τάσης που εφαρμόζεται σε ένα κύκλωμα δίνεται από την εξίσωση:

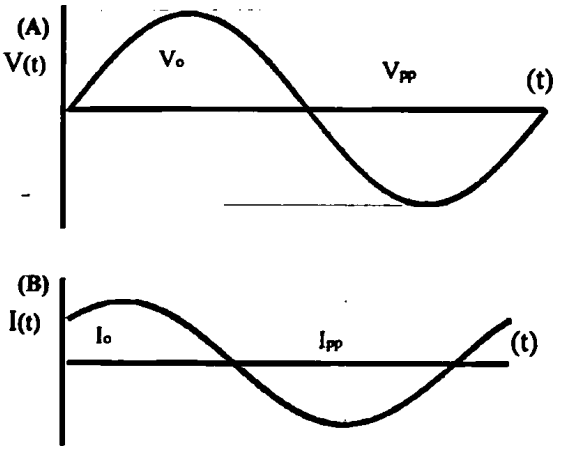
$$V_{(t)} = V_0 \sin(\omega t) \qquad (4.1.1.4)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Αντίστοιχα, η στιγμιαία τιμή του εναλλασσόμενου ρεύματος που διαρρέει το κύκλωμα περιγράφεται από την εξίσωση:

$$I_{(t)} = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \qquad (4.1.1.5)$$

όπου V_0, η τάση κορυφής ή πλάτος τάσης, I_0, το ρεύμα κορυφής ή πλάτος ρεύματος (**Σχήμα 4.1.1.1**), ω, η γωνιακή ταχύτητα ή κυκλική συχνότητα, η οποία είναι ίση με 2πf (όπου f η συχνότητα σε hertz) και φ, η φάση σε radians.



Σχήμα 4.1.1.1. Χαρακτηριστικά μεγέθη για την κυματομορφή (A) εναλλασσόμενης τάσης και (B) εναλλασσόμενου ρεύματος.

Η τιμή από κορυφή σε κορυφή ή διακορυφή είναι το μήκος της μέγιστης διαδρομής τιμών του σήματος και στα ημιτονικά σήματα, οι τιμές τάσεις από κορυφή σε κορυφή, V_{pp}, και ρεύματος, I_{pp}, είναι προφανώς διπλάσιες από τις αντίστοιχες τιμές κορυφής, V_0 και I_0 αντίστοιχα.

Η ενεργός τιμή (V_{ef}) ενός περιοδικού σήματος τάσης ή έντασης ισοδυναμεί με την τιμή του αντιστοίχου συνεχούς σήματος, που εάν εφαρμοζόταν ένα καθαρά ωμικό φορτίο, θα παρείχε την ίδια ισχύ (π.χ. υπό μορφή θερμότητας). Η ενεργός τιμή τάσης για ημιτονικά περιοδικά σήματα ισούται με:

$$V_{ef} = V_0 / \sqrt{2} = 0,707\, V_0 \qquad (4.1.1.5)$$

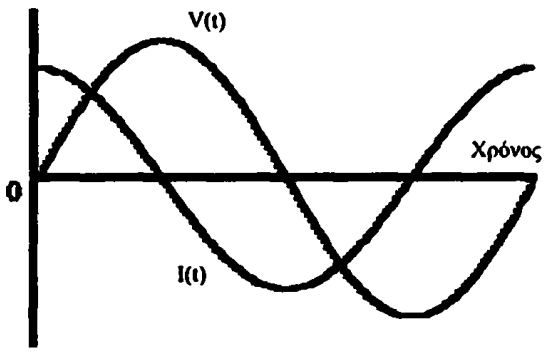
Αντίστοιχα, η ενεργός τιμή ρεύματος, ισούται με:

$$I_{ef} = I_0 / \sqrt{2} = 0,707\, I_0 \qquad (4.1.1.6)$$

Λόγω της μορφής των παραπάνω εξισώσεων που περιγράφουν τις ενεργές τιμές τάσης και ρεύματος ονομάζονται συνήθως μέσες τετραγωνικές τιμές (root-mean-square values, rms).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Σε ένα απλό κύκλωμα πηγής ημιτονικού σήματος και αντίστασης, οι κυματομορφές εναλλασσόμενης τάσης και ρεύματος παρουσιάζουν μέγιστες και ελάχιστες τιμές την ίδια χρονική στιγμή. Αντίθετα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4.1.1.2**, για την περίπτωση ενός κυκλώματος ημιτονικού σήματος και ενός πυκνωτή, οι κυματομορφές της εφαρμοζόμενης εναλλασσόμενης τάσης, V(t), και του παραγόμενου εναλλασσόμενου ρεύματος, I(t), εμφανίζουν μέγιστα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, εξαιτίας της διαφορετικής γωνίας φάσης ή διαφοράς φάσης μεταξύ των αντίστοιχων περιστρεφόμενων διανυσμάτων. Το ρεύμα προηγείται σε φάση ως προς την τάση κατά 90° ή (ισοδύναμα) η τάση καθυστερεί σε φάση ως προς το ρεύμα κατά 90°.



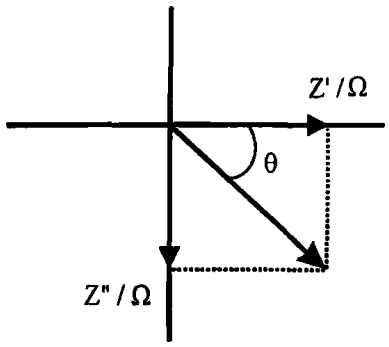
Σχήμα 4.1.1.2. Κυματομορφές εναλλασσόμενης τάσης και ρεύματος σε ένα κύκλωμα ημιτονικής πηγής και ενός πυκνωτή.

4.1.2. Ο ΟΡΟΣ ΕΜΠΕΔΗΣΗ

Η εμπέδηση σε ένα σύνθετο κύκλωμα, π.χ. ενός εναλλασσόμενου κυκλώματος αντίστασης και πυκνωτή σε σειρά (R−C), δεν μπορεί να υπολογισθεί με απλή πρόσθεση της ωμικής αντίστασης R και της χωρητικής αντίστασης X_C. Και οι δύο αντιστάσεις έχουν τις ίδιες μονάδες και συνολικά εκφράζουν την αντίσταση του συγκεκριμένου τμήματος του κυκλώματος στη διέλευση του ρεύματος, ωστόσο η δράση τους δεν είναι ταυτόχρονη. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην ωμική αντίσταση το ρεύμα είναι ανάλογο της τάσης οποιαδήποτε χρονική στιγμή, δηλαδή ρεύμα και τάση δεν εμφανίζουν διαφορά φάσης, ενώ στη χωρητική αντίσταση, η τάση καθυστερεί σε φάση ως προς το ρεύμα κατά 90°.

Για διευκόλυνση της ανάλυσης σύνθετων κυκλωμάτων, η εμπέδηση (Z) εκφράζεται ως μιγαδική ποσότητα. Η ωμική αντίσταση αποτελεί το πραγματικό μέρος της μιγαδικής ποσότητας (Z_{real} ή Z′− in phase), ενώ η χωρητική αντίσταση, με αρνητικό πρόσημο, αποτελεί το φανταστικό ($-Z_{im}$ ή Z′′− out of phase) μέρος. Στο **Σχήμα 4.1.2.3** απεικονίζεται η παράσταση της εμπέδησης στο πεδίο των μιγαδικών αριθμών. Η επαγωγική αντίσταση, X_L = 2πfL, λόγω της παρουσίας ενός πηνίου στο κύκλωμα, θεωρείται ως φανταστικό μέρος με

θετικό πρόσημο επειδή σε κυκλώματα πηγής ημιτονικής τάσης–καθαρά επαγωγικού φορτίου, το ρεύμα καθυστερεί σε φάση ως προς την τάση κατά 90°.



Σχήμα 4.1.2.3. Μιγαδική παράσταση της εμπέδησης κυκλώματος εναλλασσόμενου ρεύματος.

Η εμπέδηση Z, ως μιγαδική ποσότητα εκφράζεται με τη σχέση:

$$Z = Z' + j\,Z'' \qquad (4.1.2.7)$$

όπου, j είναι η φανταστική μονάδα με τη γνωστή ιδιότητα $j \cdot j = -1$. Το μέτρο της εμπέδησης είναι ίσο με το μέτρο του μιγαδικού αριθμού:

$$|Z| = \sqrt{Z'^{2} + Z''^{2}} \qquad (4.1.2.8)$$

και η γωνία θ αποδίδει τη διαφορά φάσης τάσης–ρεύματος και δίδεται από τη σχέση:

$$\tan\theta = Z'' / Z' \qquad (4.1.2.9)$$

Συνεπώς, το μέγεθος της εμπέδησης περιγράφεται είτε από τις τιμές για το φανταστικό και πραγματικό μέρος αυτής, Z΄΄ και Z΄, είτε από το μέτρο της συνολικής εμπέδησης και τη διαφορά φάσης, θ. Για να προσδιοριστεί η συνολική εμπέδηση ενός κυκλώματος, συνδυάζονται οι τιμές εμπέδησης των επιμέρους στοιχείων. Για στοιχεία τα οποία συνδέονται σε σειρά, η εμπέδηση ισούται με το διανυσματικό άθροισμα των επιμέρους τιμών εμπέδησης (**Εξίσωση 4.1.2.10**), ενώ στην περίπτωση παράλληλης σύνδεσης, η ολική εμπέδηση ισούται με το άθροισμα των επιμέρους τιμών (**Εξίσωση 4.1.2.11**).

$$Z_{ΟΛ} = Z_1 + Z_2 + \ldots + Z_n \qquad (4.1.2.10)$$

$$\frac{1}{Z_{ΟΛ}} = \frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2} + \ldots + \frac{1}{Z_n} \qquad (4.1.2.11)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

4.1.3. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ

Ένα φάσμα εμπέδησης μπορεί να απεικονιστεί γραφικά με διαφόρους τύπους διαγραμμάτων, προκειμένου να εξαχθούν αριθμητικά δεδομένα για τη συνολική εμπέδηση, Z, το πραγματικό και το φανταστικό μέρος αυτής Z΄, και Z΄΄ αντίστοιχα, τη διαφορά φάσης, θ, την αντίσταση του διαλύματος, R_s, την αντίσταση μεταφοράς φορτίου, R_{ct}, ή την αντίσταση πόλωσης, R_p τη χωρητικότητα της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας, C_{dl}, και να προκύψει μια σαφής εικόνα της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς του υπό μελέτη συστήματος για ένα συγκεκριμένο εύρος συχνοτήτων. Διαγράμματα του τύπου:

- **Z" = f (Z'),**
- **Z' = f (ωZ"),**
- **Y" = f (Y'),**
- **Y"/ω = f (Y'/ω),**
- **Z', -Z" = f (f),**
- **log|Z| , -phase = f [log(f)],**
- **Z', -Z" = f [sqr(ω)]** κ.α.

μπορούν να δημιουργηθούν εύκολα με τη βοήθεια των λογισμικών πακέτων επεξεργασίας δεδομένων, με τα οποία είναι εφοδιασμένοι οι περισσότεροι ηλεκτροχημικοί αναλυτές. Σημειώνεται ότι τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτουν από τα δεδομένα του αυτού φάσματος. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες απεικονίσεις φασμάτων εμπέδησης είναι το **διάγραμμα Nyquist** και το **διάγραμμα Bode**.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ NYQUIST

Στο διάγραμμα Nyquist, **-Z" = f (Z')**, απεικονίζεται το φανταστικό μέρος της εμπέδησης ως προς το πραγματικό μέρος σε κάθε συχνότητα διέγερσης. Κατά κανόνα, σε ένα διάγραμμα Nyquist οι δύο άξονες είναι ισομήκεις, ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις για λόγους ευκρινείας η παρουσίαση διαγραμμάτων Nyquist γίνεται με άνισους άξονες. Σημαντικό μειονέκτημα στη χρήση του διαγράμματος Nyquist αποτελούν: α) η μη διακριτή απεικόνιση του φάσματος στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων, αφού οι μεγάλες τιμές εμπέδησης στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων καθορίζουν την κλίμακα των αξόνων, β) η αδυναμία άμεσης αντιστοίχισης συχνοτήτας – εμπέδησης και γ) η αδυναμία άμεσου υπολογισμού της χωρητικότητας του συστήματος.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ BODE

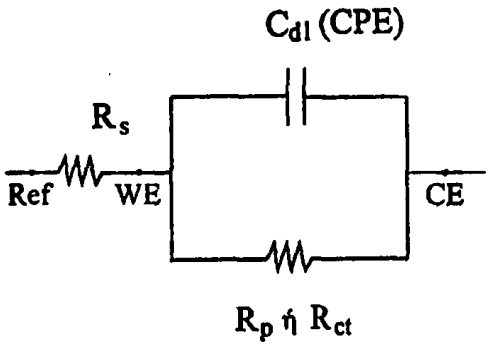
Στο διάγραμμα Bode απεικονίζονται δύο καμπύλες: η **log|Z| = f [log(f)]**, και η **– θ = f [log(f)]** και, ως εκ τούτου, είναι δυνατή η άμεση ανάγνωση των τιμών της απόλυτης τιμής της εμπέδησης, |Z| και της διαφοράς φάσης θ, συνάρτηση της συχνότητας. Επίσης, επειδή οι άξονες |Z| και f είναι λογαριθμικοί η απεικόνιση των τιμών |Z| για μεγάλο εύρος συχνοτήτων είναι ευκρινής. Αυτό είναι σημαντικό πλεονέκτημα ιδίως, όταν η εμπέδηση του συστήματος εξαρτάται έντονα από τη συχνότητα, όπως στην περίπτωση ενός ηλεκτροχημικού πυκνωτή.

Επίσης, η χρήση του διαγράμματος Bode ενδείκνυται όταν υπάρχει διασπορά μεταξύ των μετρούμενων τιμών εμπέδησης. Αυτό παρατηρείται κυρίως στις μικρές συχνότητες, όπου ο χρόνος που απαιτείται για τη μέτρηση της εμπέδησης είναι μεγάλος (π.χ. σε f = 1 mHz είναι $1/10^{-3}$ s ή 1000 s) και πιθανόν, εντός αυτού του διαστήματος το υπό μελέτη στοιχείο να μην είναι σταθερό (μελέτες διάβρωσης).

4.1.4. ΚΥΚΛΩΜΑ RANDLES

Το κύκλωμα Randles είναι ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα ισοδύναμα κυκλώματα για την περιγραφή διαφόρων φυσικών διεργασιών ή χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου–ηλεκτρολύτη. Το κύκλωμα Randles αποτελείται από μια αντίσταση (R_s) σε σειρά με ένα σύστημα πυκνωτή/αντίστασης, σε παράλληλη σύνδεση, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4.1.4.4**. Η R_s εκφράζει την ωμική αντίσταση του φέροντα ηλεκτρολύτη μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας (WE) και αναφοράς (Ref). Η R_p, εκφράζει την αντίσταση πόλωσης, όταν οι μετρήσεις γίνονται απουσία κάποιου οξειδοαναγωγικού ζεύγους στο διάλυμα μέτρησης, ενώ παρουσία ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους αναφερόμαστε στην αντίσταση μεταφοράς–φορτίου, R_{ct}, η οποία εκφράζει τη φαρανταϊκή αντίδραση που λαμβάνει χώρα στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου–ηλεκτρολύτη. Τέλος, το στοιχείο C_{dl} (ή CPE) περιγράφει τη χωρητικότητα της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας.

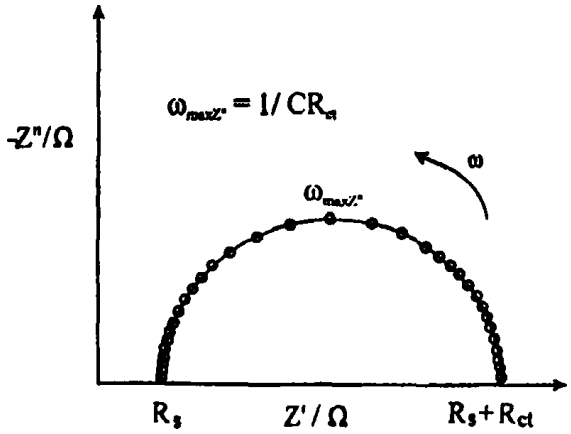
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 4.1.4.4. Κύκλωμα Randles. Τα Ref, WE και CE αναφέρονται στα ηλεκτρόδια αναφοράς, εργασίας και στο αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο, αντίστοιχα.

Σε υψηλές συχνότητες, ο πυκνωτής ενεργεί ως βραχυκύκλωμα απομακρύνοντας την αντίσταση R_p από το κύκλωμα. Αντίθετα, στις πολύ χαμηλές συχνότητες ο πυκνωτής δρα ως ανοικτό κύκλωμα και ουσιαστικά παύει να υπάρχει το κύκλωμα. Σε αυτήν την περίπτωση, η εμπέδηση του κυκλώματος Randles είναι ο συνδυασμός δύο αντιστάσεων R_s και R_p σε σειρά.

Συνεπώς, τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές τιμές συχνοτήτων, το κύκλωμα Randles συμπεριφέρεται πρωτίστως ως αντίσταση. Με άλλα λόγια, σε αυτές τις τιμές συχνοτήτων το φανταστικό μέρος της εμπέδησης είναι πολύ μικρό ή δε λαμβάνεται υπόψη, η γωνία φάσης πλησιάζει τις 0° και η συνολική εμπέδηση του κυκλώματος δεν εξαρτάται από τη συχνότητα. Στις ενδιάμεσες τιμές συχνοτήτων, η χωρητικότητα του πυκνωτή επιδρά σημαντικά στη μετρούμενη εμπέδηση, το κύκλωμα αποκτά χωρητική συμπεριφορά, η γωνία φάσης λαμβάνει υψηλότερες τιμές $0^o<\theta \leq 90^o$ και η συνολική εμπέδηση του κυκλώματος εξαρτάται από τη συχνότητα. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4.1.4.5**, σε υψηλές συχνότητες (>100 kHz), η εμπέδηση του κυκλώματος οφείλεται εξολοκλήρου στην ωμική αντίσταση, R_s, ενώ σε μικρές τιμές συχνότητας (τυπικά <1 Hz), η εμπέδηση του κυκλώματος ισούται με $(R_s + R_p)$.



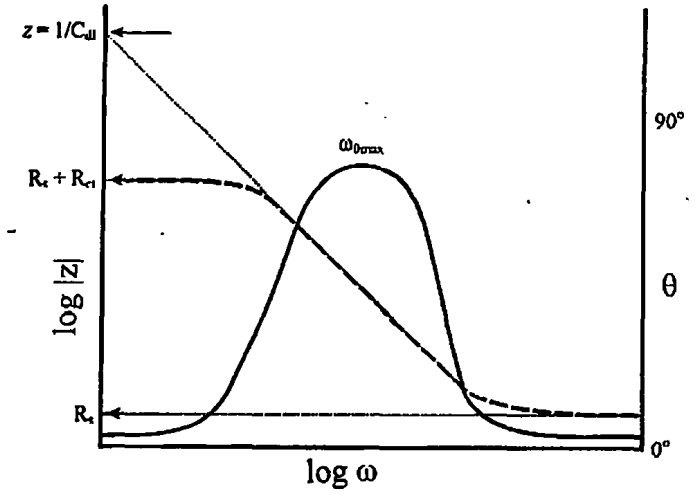
Σχήμα 4.1.4.5. Διάγραμμα Nyquist για ένα κύλωμα Randles.

Έτσι, η τιμή της R_s βρίσκεται από την πρώτη τομή του φάσματος με τον άξονα της πραγματικής εμπέδησης, ενώ η διάμετρος του ημικυκλίου ισούται με την R_p. Επιπρόσθετα, αν

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

είναι γνωστή η συχνότητα ($\omega_{maxZ''}$) στο ανώτερο σημείο του φάσματος, για το οποίο παρατηρείται μέγιστη τιμή για τη φανταστική εμπέδηση, είναι δυνατό να υπολογιστεί η χρονοσταθερά, $\tau = RC$, του κυκλώματος.

Αντίστοιχα, για το κύκλωμα Randles, το διάγραμμα Bode έχει τη μορφή του **Σχήματος 4.1.4.6**, το οποίο, παρέχει άμεσες πληροφορίες για τη συχνότητα και τη φάση του υπό μελέτη συστήματος.



Σχήμα 4.1.4.6. Διάγραμμα Bode για ένα κύλωμα Randles, όπου (——) φάση, (- - -) εμπέδηση.

Οι τιμές R_p ή R_{ct} και R_s υπολογίζονται επίσης εύκολα και από τα διαγράμματα Bode. Σε υψηλές συχνότητες, η εμπέδηση του συστήματος οφείλεται αποκλειστικά στην R_s, η οποία μπορεί εύκολα να υπολογιστεί από την προέκταση της καμπύλης εμπέδησης στον άξονα $\log|Z|$. Ομοίως, ο όρος $\log(R_s + R_{ct})$ μπορεί να υπολογιστεί προεκρίνοντας το τμήμα της καμπύλης εμπέδησης στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων στον άξονα $\log|Z|$.

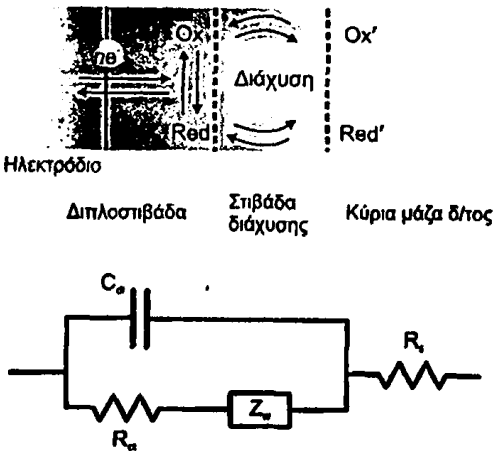
Το διάγραμμα Bode παρέχει επίσης πληροφορίες για τη γωνία φάσης, θ. Σε υψηλές κα χαμηλές τιμές συχνότητας, όπου η συμπεριφορά του κυκλώματος είναι κυρίως ωμική, η γωνία φάσης είναι σχεδόν μηδενική, ενώ σε ενδιάμεσες τιμές συχνότητας, η θ λαμβάνει τιμές ανάλογα με τον όρο Z''. Η τιμή $\omega_{\theta max}$, αποτελεί τη συχνότητα στην οποία η φάση λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της και βρίσκεται από το μέγιστο της καμπύλης $\theta = f(\log \omega)$ όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4.1.4.6**. Χρησιμοποιώντας την τιμή αυτή, η τιμή της C_{dl} μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με την **Εξίσωση 4.1.4.12**:

$$\omega_{\theta max} = \sqrt{\left(1 + \frac{R_{ct}}{R_s}\right)\left(\frac{1}{C_{dl}R_{ct}}\right)} \qquad (4.1.4.12)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Πρέπει να σημειωθεί ότι η συχνότητα αυτή δεν είναι η ίδια με τη συχνότητα στην οποία το διάγραμμα Nyquist στο **Σχήμα 4.1.4.5** παρουσιάζει μέγιστο.

Στις διεργασίες που λαμβάνει χώρα μεταφορά ιόντων ή ηλεκτρενεργών ουσιών (**Σχήμα 4.1.4.7**) από την κύρια μάζα του ηλεκτρολύτη προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, η συμπεριφορά των υπό μελέτη ηλεκτροχημικών συστημάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διάχυση των παραπάνω σωματιδίων προς και από το ηλεκτρόδιο. Σε αυτή την περίπτωση για την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων εισάγεται το στοιχείο Warburg και το αντίστοιχο κύκλωμα Randles φαίνεται στο **Σχήμα 4.1.4.7**.



Σχήμα 4.1.4.7. Το φαινόμενο της διάχυσης και το αντίστοιχο ισοδύναμο κυκλωμα Randles.

Σε ηλεκτροχημικά συστήματα που ελέγχονται πλήρως από τη διάχυση, η εμπέδηση Warburg, Z_w, δίνεται από την **Εξίσωση 4.1.4.13**:

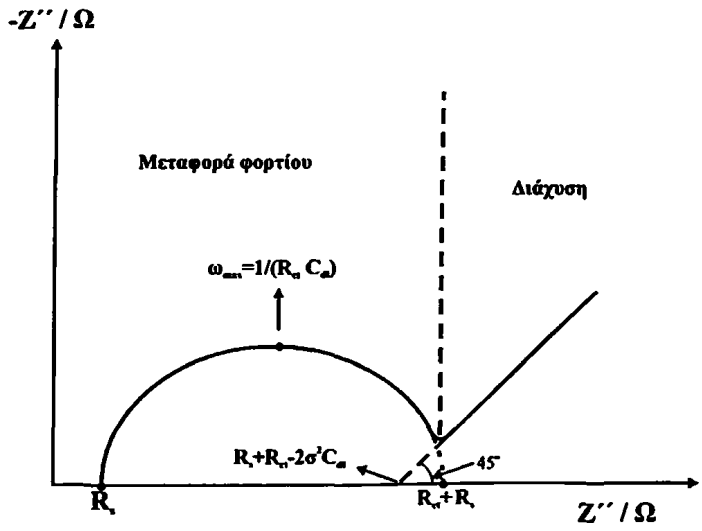
$$Z_W = \sigma (1 - j)/\sqrt{\omega} \qquad (4.1.4.13)$$

όπου σ, ο συντελεστής Warburg, από τον οποίο μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής διάχυσης των ηλεκτρενεργών σωματιδίων, σύμφωνα με την **Εξίσωση 4.1.4.14:**

$$\sigma = R\,T / F^2 z^2 c\,A \sqrt{2D} \qquad (4.1.4.14)$$

όπου R η παγκόσμια σταθερά των αερίων, F η σταθερά Faraday, z το φορτίο του σωματιδίου, c η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη, A η επιφάνεια του ηλεκτροδίου και D ο μέσος συντελεστής διάχυσης των σωματιδίων.

Ο συντελεστής Warburg, σ, μπορεί επίσης να υπολογιστεί γραφικά, προεκτείνοντας την ευθεία γραμμή με κλίση 1 (45°) στο **Σχήμα 4.1.4.8**, στο οποίο απεικονίζεται το φάσμα εμπέδησης για το κύκλωμα του **Σχήματος 4.14.7**.



Σχήμα 4.1.4.8. Διάγραμμα Nyquist για ένα κύκλωμα Randles με διάχυση.

Το διάγραμμα Nyquist του **Σχήματος 4.1.4.8** αποτελεί μια τυπική μορφή φάσματος φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης μιας διεπιφάνειας ηλεκτροδίου–ηλεκτρολύτη, στην οποία η επιφάνεια του ηλεκτροδίου έχει τροποποιηθεί με ένα λεπτό υμένιο ενός ημιαγώγιμου ή διηλεκτρικού υλικού. Προκειμένου να λάβουμε ένα "καλοσχηματισμένο", συμμετρικό δηλαδή, ημικύκλιο ώστε να είναι εφικτή η προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων με κάποιο, σχετικά απλό, ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα (π.χ. το κύκλωμα Randles) και, κατά συνέπεια, εύκολη η εξαγωγή αριθμητικών δεδομένων για τα επιμέρους στοιχεία του, οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν παρουσία ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους (π.χ. σιδηρικυανιούχο/σιδηροκυανιούχο κάλιο, $[Ru(NH_2)_6]^{2+/3+}$ ή Fe^{3+}/Fe^{2+}) εφαρμόζοντας σταθερή τάση ίση με το κανονικό δυναμικό αναγωγής του. Με την προσθήκη του οξειδοαναγωγικού ζεύγους στο φέροντα ηλεκτρολύτη, επιτυγχάνεται η λήψη μικρών τιμών R_{ct} σε σχετικά μεγάλες τιμές συχνότητας (π.χ. 1–10 Hz) οπότε η καμπύλη εμπέδησης «καμπυλώνει» εύκολα και είναι συμμετρική. Απουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγος, η «καμπύλωση» του φάσματος, είτε δεν είναι δυνατή, είτε συμβαίνει σε πολύ μικρότερες τιμές συχνότητας (π.χ. 1–10 mHz) επιμηκύνοντας έτσι σημαντικά το χρόνο που απαιτείται για τη λήψη του φάσματος. Επιπλέον, οι μετρήσεις σε πολύ χαμηλές τιμές συχνότητας ενδέχεται να είναι λιγότερο επαναλήψιμες.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4.1.4.8**, το διάγραμμα Nyquist χωρίζεται σε δύο μέρη. Ένα ημικύκλιο στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων και μια ευθεία γραμμή στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων. Στη διαχωριστική γραμμή αυτών των δύο περιοχών εντοπίζεται γραφικά (συνήθως με πολύ καλή ακρίβεια) η R_{ct}. Το καμπύλο τμήμα περιγράφει μια διαδικασία όπου η ταχύτητα μεταφοράς φορτίου είναι το αργό στάδιο, αυτό που καθορίζει το μετρούμενο ρεύμα, ενώ αντίθετα, στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων, η όλη διαδικασία ελέγχεται από τη διάχυση

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

του οξειδοαναγωγικού ζεύγους προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, όπου και πραγματοποιείται η αντίδραση μεταφοράς φορτίου. Συνεπώς, για δεδομένες πειραματικές συνθήκες, η τιμή της R_{ct} ή αντίστοιχα η διάμετρος του ημικυκλίου R_sR_{ct} αποτελεί μέτρο της ευκολίας πρόσβασης του οξειδοαναγωγικού ζεύγους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Επομένως, εάν η επιφάνεια του ηλεκτρόδιου έχει τροποποιηθεί με κάποιο υμένιο, η τιμή της R_{ct} μπορεί να μας δώσει πληροφορίες σχετικά με το ποσοστό επικάλυψης του ηλεκτροδίου ή το διηλεκτρικό χαρακτήρα της επικάλυψης. Αναφερόμενοι σε μια συγκεκριμένη επικάλυψη οι τιμές της R_{ct} είναι ανάλογες του ποσοστού επικάλυψης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Μείωση της R_{ct} από μια δεδομένη αρχική τιμή αποδίδεται στην εκρόφηση ή την αποδόμηση της επικάλυψης ενώ αύξηση της R_{ct} από μια δεδομένη αρχική τιμή αποδίδεται στην ενίσχυση (διόγκωση) της επικάλυψης, λόγω π.χ. της πρόσδεσης κάποιων ουσιών πάνω στο αρχικά σχηματιζόμενο υμένιο[1].

4.2. ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Οι βιοαισθητήρες είναι συσκευές, οι οποίες καταγράφουν μια φυσική, χημική ή βιολογική αλλαγή και μετατρέπουν αυτή την αλλαγή σε ένα μετρήσιμο σήμα[2]. Ο βιοαισθητήρας περιέχει ένα σωματίδιο αναγνώρισης, το οποίο επιτρέπει την επιλεκτική απόκριση σε ένα συγκεκριμένο αναλύτη ή μια ομάδα αναλυτών, ελαχιστοποιώντας έτσι παρεμβολές από άλλα συστατικά του δείγματος. Ένα άλλο κύριο εξάρτημα ενός αισθητήρα είναι ο μεταλλάκτης ή η συσκευή ανίχνευσης, η οποία παράγει το ηλεκτρικό σήμα. Ένας επεξεργαστής σήματος συλλέγει, ενισχύει και εμφανίζει το σήμα.

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι αποτελούν μια υποκατηγορία των χημικών αισθητήρων, συνδυάζουν την ευαισθησία των ηλεκτροχημικών μεταλλακτών, όπως υποδεικνύεται από τα χαμηλά όρια ανίχνευσης, με την υψηλή εξειδίκευση των διαδικασιών βιολογικής αναγνώρισης. Οι συγκεκριμένες συσκευές περιέχουν ένα σωματίδιο βιολογικής αναγνώρισης (ένζυμα, πρωτεΐνες, αντισώματα, νουκλεϊκά οξέα, κύτταρα, ιστούς ή υποδοχεία), το οποίο αντιδρά εκλεκτικά με τον αναλύτη – στόχο και παράγει ένα ηλεκτρικό σήμα, το οποίο σχετίζεται με τη συγκέντρωση του υπό προσδιορισμό αναλύτη. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες με βάση τη φύση των διαδικασιών βιολογικής αναγνώρισης[3]:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

- **ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ:** Ενσωματώνουν ένζυμα, ολόκληρα κύτταρα ή κομμάτια ιστών, τα οποία αναγνωρίζουν τον αναλύτη – στόχο και παράγουν ηλεκτροενεργά είδη.
- **ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ:** Βασίζονται σε μια αλληλεπίδραση εκλεκτικής δέσμευσης μεταξύ του αναλύτη και ενός βιολογικού συστατικού, όπως ένα αντίσωμα, νουκλεϊκό οξύ ή έναν υποδοχέα.

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι οι πιο διαδεδομένοι και συχνά χρησιμοποιούμενη βιοαιθητήρες. Ο μεταλλάκτης είναι ηλεκτροχημικός και συνήθως είναι ένα ηλεκτρόδιο, ο οποίος μετατρέπει το αποτέλεσμα μιας ηλεκτροχημικής διεργασίας σε ηλεκτρικό σήμα [2,3]. Οι αισθητήρες που περιλαμβάνουν χωρίζονται σε[4]:

- **ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΚΟΙ/ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ:** Οι βολταμετρικές και αμπερομετρικές τεχνικές χαρακτηρίζονται από την εφαρμογή ενός δυναμικού σε ένα ηλεκτρόδιο εργασίας έναντι ενός ηλεκτροδίου εργασίας και τη μέτρηση του ρεύματος. Το ρεύμα είναι ένα αποτέλεσμα της ηλεκτρόλυσης εξαιτίας κάποιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, που λαμβάνει χώρα στο ηλεκτρόδιο εργασίας, και περιορίζεται από το ρυθμό μεταφορά μάζας των μορίων στο ηλεκτρόδιο[5].
- **ΧΩΡΗΤΙΚΟΙ Η ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ:** Η φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης (EIS), η οποία περιγράφθηκε από τους W. Lorenz και K. D. Schulz το 1975[6], μετρά τις ωμικές και χωρητικές ιδιότητες των υλικών μετά τη διατάραξη του συστήματος με μια διέγερση μικρού εύρους ημιτονοειδούς σήματος, το οποίο συνήθως είναι 2-10 mV[7,8].
- **ΑΓΩΓΙΜΕΤΡΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ:** Η αγωγιμετρική ανίχνευση παρακολουθεί τις αλλαγές στην ηλεκτρική αγωγιμότητα του διαλύματος του δείγματος ή ενός μέσου, καθώς η σύσταση του διαλύματος/μέσου αλλάζει κατά τη διάρκεια της χημικής αντίδρασης.
- **ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ:** Οι ποτενσιομετρικοί αισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση του δυναμικού ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου αντλώντας αμελητέο ρεύμα.

4.2.1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Η λειτουργία των εμπεδησιομετρικών βιοαισθητήρων βασίζεται και μπορεί να εξηγηθεί ικανοποιητικά με το μοντέλο του βιοχημικού πυκνωτή. Ένας πυκνωτής αποτελείται από δύο αγώγιμους οπλισμούς, οι οποίοι διαχωρίζονται από ένα διηλεκτρικό υλικό, ενώ η χωρητικότητα του είναι ανάλογη της μεταξύ τους απόστασης. Αυτό που προσπαθεί να επιτύχει

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

είναι η προσομοίωση της συμπεριφοράς της διεπιφάνειας του ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη, δηλαδή ενός ηλεκτροχημικού πυκνωτή με αυτήν ενός πυκνωτή.

Ένας ηλεκτρολυτικός πυκνωτής συνίσταται από το ηλεκτρόδιο εργασίας, το οποίο λειτουργεί ως ένας εκ των οπλισμών του πυκνωτή, το διηλεκτρικό και τον ηλεκτρολύτη, ο οποίος αντιπροσωπεύει το δεύτερο οπλισμό του πυκνωτή. Το διηλεκτρικό του ηλεκτρολυτικού πυκνωτή είναι μια μονωτική ως επί το πλείστον στιβάδα, η οποία αναπτύσσεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και φέρει έναν (βιο)υποδοχέα εκλεκτικό ως προς τον αναλύτη – στόχο, με αποτέλεσμα την (εκλεκτική) αλληλεπίδραση του αναλύτη – στόχου με την τροποποιημένη επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας.

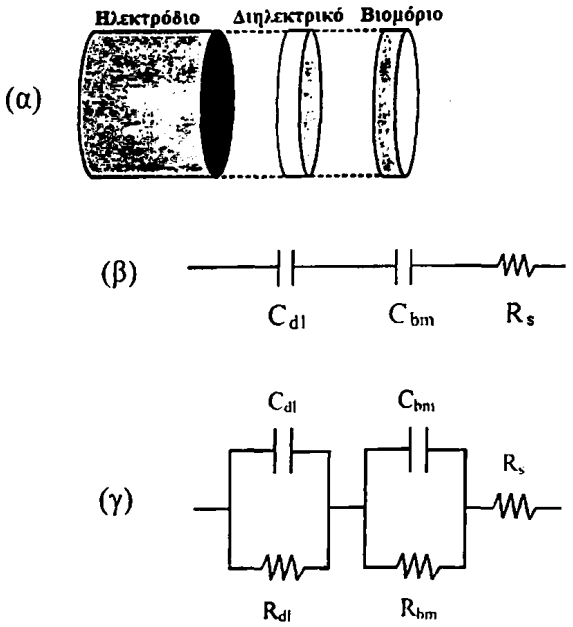
Στους ηλεκτροχημικούς πυκνωτές ή εφεξής χωρητικούς βιοαισθητήρες η αλληλεπίδραση μεταξύ βιομορίων γίνεται αντιληπτή λόγω της μεταβολής της διηλεκτρικής σταθεράς ή της αύξησης του πάχους της διηλεκτρικής διπλοστιβάδας στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου – ηλεκτρολύτη. Σε ιδανικές συνθήκες, η διαμόρφωση αυτή προσομοιάζει τη συμπεριφορά ενός πυκνωτή, ως προς την ικανότητα του τελευταίου να αποθηκεύει φορτία, και η χωρητικότητα του μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση:

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon A/d \qquad (4.2.1.15)$$

όπου ε, η διηλεκτρική σταθερά του μέσου μεταξύ των οπλισμών, ε_0, η διαπερατότητα του κενού (8,85419 $p \cdot Fm^{-1}$), A, η επιφάνεια των οπλισμών (m^2), και d, το πάχος της μονωτικής στιβάδας (m).

Κατά τη δέσμευση του αναλύτη στον εκλεκτικό υποδοχέα αναμένεται μείωση της συνολικής χωρητικότητας, εξαιτίας της αύξησης της απόστασης μεταξύ των οπλισμών, θεωρώντας ότι η διηλεκτρική σταθερά του μέσου δε μεταβάλλεται. Το όλο φαινόμενο μπορεί να αναπαρασταθεί από δύο πυκνωτές σε σειρά, έναν εσωτερικό, που αντιστοιχεί στη διηλεκτρική στιβάδα (C_{dl}) και έναν εξωτερικό, που αντιστοιχεί στη στιβάδα του βιομορίου (C_{bm}) ή, μετά την εμβάπτιση του βιοαισθητήρα στο διάλυμα του αναλύτη, στο σύμπλοκο του ακινητοποιημένου βιομορίου αναγνώρισης με τον αναλύτη (**Σχήμα 4.2.1.9.β**).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 4.2.1.9. Αναπαράσταση χωρητικού βιοαισθητήρα (α) και τα ισοδύναμα ηλεκτρικά κυκλώματα στην περίπτωση ιδανικής (β) και μη ιδανικής (γ) συμπεριφοράς. Εφόσον όλο το ρεύμα περνά μέσα από την αντίσταση του διαλύματος του ηλεκτρολύτη, η αντίσταση αυτή συνδέεται σε σειρά με το υπόλοιπο κύκλωμα.

Στην περίπτωση αυτή, η συνολική χωρητικότητα δίνεται από την εξίσωση:

$$1/C_t = 1/C_{dl} + 1/C_{bm} \qquad (4.2.1.16)$$

ή

$$C_t = C_{dl}C_{bm} / (C_{dl} + C_{bm}) \qquad (4.2.1.17)$$

ενώ η μερική παράγωγος της συνολικής χωρητικότητας ως προς τη χωριτικότητα του εξωτερικού πυκνωτή C_{bm} δίνεται από τη σχέση:

$$(\delta C_t) / (\delta C_{bm}) = C_{dl}^2 / (C_{dl} + C_{bm})^2 \qquad (4.2.1.18)$$

Σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση, η ευαισθησία ενός χωρητικού βιοαισθητήρα εξαρτάται, εκτός των άλλων παραμέτρων, από την τιμή της χωρητικότητας της διηλεκτρικής στιβάδας C_{dl}. Για μεγάλες τιμές C_{dl}, η **Εξίσωση 4.2.1.18** τείνει στη μονάδα, δηλαδή η μεταβολή της χωρητικότητας λόγω της δέσμευσης του αντιγόνου στη στιβάδα του αντισώματος θα παράγει μέγιστη μεταβολή του μετρούμενου σήματος. Σύμφωνα με την **Εξίσωση 4.2.1.15**, υψηλές τιμές χωρητικότητας παρέχουν λεπτές στιβάδες από υλικά με μεγάλη διηλεκτρική σταθερά.

Η διηλεκτρική σταθερά πρέπει ακόμα να πληρεί τις εξής προϋποθέσεις, προκειμένου να προκύψει ένας επιτυχής βιοαισθητήρας:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

- ✓ να είναι δυσδιάλυτη σε υδατικό περιβάλλον,
- ✓ να έχει κατάλληλη διηλεκτρική συμπεριφορά,
- ✓ να είναι συμπαγής (χωρίς οπές, οι οποίες βραχυκυκλώνουν το σύστημα),
- ✓ να έχει ικανοποιητική μηχανική αντοχή και
- ✓ να φέρει κατάλληλες δραστικές ομάδες (π.χ. – NH_2, – OH, – COOH) για την ακινητοποίηση του βιοϋποδοχέα ή κατάλληλη διαμόρφωση (πλέγμα πολυμερούς) για τη φυσική παγίδευση αυτού.

Η διηλεκτρική σταθερά συνήθως περιγράφεται ως στοιχείο σταθερής φάσης, μαθηματικά ίσο με: $\mathbf{CPE = (1/Q)^{-1}\ (j\omega)^{-n}}$, όπου $j = (-1)^{1/2}$. Το στοιχείο CPE εκφράζει την απόκλιση της χωρητικής συμπεριφοράς της στιβάδας ως προς αυτή ενός ιδανικού πυκνωτή, η οποία οφείλεται στην ανομοιογένεια της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Αν και η φυσική υπόσταση του στοιχείου σταθερής φάσης δεν είναι σαφής, αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε ένα ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα. Στην πράξη, η παρουσία του στοιχείου σταθερής φάσης αντί ενός πυκνωτή σημαίνει ότι η παρατηρούμενη χωρητικότητα του συστήματος εξαρτάται από τη συχνότητα και εκφράζεται συναρτήσει αυτής.

Η διηλεκτρική συμπεριφορά του ακινητοποιημένου βιομορίου είναι μια ακόμα σημαντική παράμετρος στην ανάπτυξη των βιοαισθητήρων εμπέδησης. Τα πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται κάτω από ένα ηλεκτρικό πεδίο συμπεριφέρονται σα διηλεκτρικά υλικά, με διηλεκτρική σταθερά ~20. Ωστόσο, τα πρωτεϊνικά μόρια δεν έχουν κατάλληλο διηλεκτρικό χαρακτήρα, λόγω της κίνησης ιόντων κα μορίων νερού από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη, μέσα και γύρω από αυτά, η οποία προκαλεί "βραχυκύκλωση" του συστήματος. Για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος έχει προταθεί η κάλυψη της βιοστιβάδας με μη αγώγιμα πολυμερή, όπως για παράδειγμα πολυαιθυλενογλυκόλη, ωστόσο η χρήση των πολυμερών αυτών έχει αποδειχθεί αναποτελεσματική, αφού μπλοκάρει επίσης και τις ενεργές ομάδες (αντιγονικές περιοχές) των βιομορίων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι αποκλίσεις που παρατηρούνται στη χωρητική συμπεριφορά του ηλεκτροχημικού πυκνωτή της διηλεκτρικής διπλοστιβάδας (C_{dl}) και του ηλεκτροχημικού πυκνωτή του βιομορίου (C_{bm}), ως προς την ιδανική συμπεριφορά ενός πυκνωτή, μπορούν να απεικονιστούν με την εισαγωγή μιας ωμικής αντίστασης παράλληλα συνδεδεμένης σε κάθε ηλεκτροχημικό πυκνωτή, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4.2.1.9.γ**. Σε αυτήν την περίπτωση, αντί της χωρητικότητας συνιστάται η μέτρηση της εμπέδησης (συνολική

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ωμική και χωρητική αντίσταση στην κίνηση ενός φορτίου κατά μήκος του κυκλώματος) της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη.

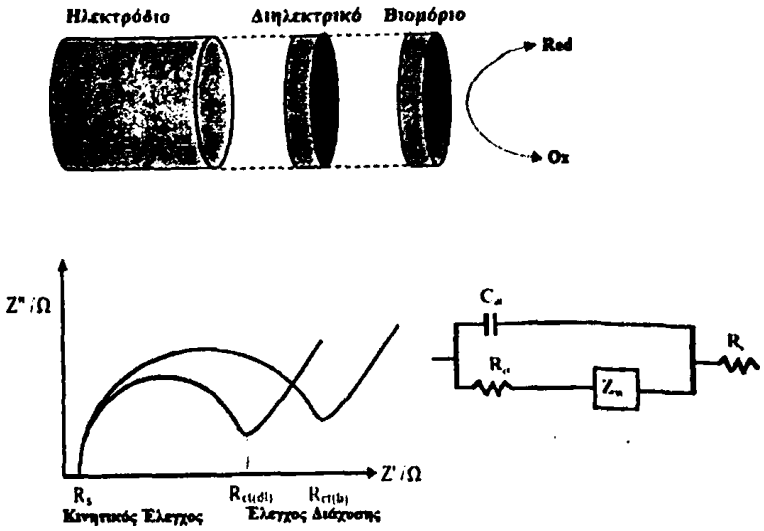
4.2.2. Κατατάξη Εμπεδησιομετρικών Βιοαισθητήρων

Με βάση τη φύση του μετρούμενου σήματος, οι εμπεδησιομετρικοί βιοαισθητήρες μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής δύο βασικές κατηγορίες[9]:

- **Χωρητικοί Αισθητήρες:** Η επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι πλήρως καλυμμένη από τη διηλεκτρική στιβάδα και ολόκληρη η συγκρότηση του αισθητήρα συμπεριφέρεται σα μονωτής. Η μεταβολή του χωρητικού ρεύματος μετρείται υπό την επίδραση μιας ημιτονικής τάσης μικρής έντασης και σε χαμηλές συχνότητες διέγερσης συνήθως 10 – 100 Hz. Στους αισθητήρες αυτού του τύπου οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων αναμένεται να προκαλέσουν μείωση της μετρούμενης χωρητικότητας ή αντίστοιχα αύξηση της εμπέδησης, αφού τα λιγότερο πολικά μόρια αντικαθιστούν τα πολικά μόρια νερού στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων (π.χ. σύζευξη αντισώματος – αντιγόνου) αυξάνει το πάχος της βιοχημικής στιβάδας και κατ' επέκταση την απόσταση μεταξύ των δύο οπλισμών του ηλεκτροχημικού πυκνωτή (ηλεκτρόδιο εργασίας – ηλεκτρολύτης).

- **Φαραντάϊκοι Εμπεδησιομετρικοι Αισθητηρες:** Η επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι μερικώς ή πλήρως καλυμμένη από μια μη μονωτική στιβάδα ή μερικώς καλυμμένη από μια μονωτική στιβάδα. Στην περίπτωση αυτή, η επιφάνεια του ηλεκτροδίου καταλύει την οξείδωση ή την αναγωγή ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους που υπάρχει στο μετρούμενο διάλυμα. Στους φαραντάϊκούς αισθητήρες η μετρούμενη παράμετρος είναι η αντίσταση μεταφοράς φορτίου, δηλαδή το πραγματικό μέρος της εμπέδησης σε χαμηλές τιμές συχνότητας, συνήθως 0.1–1.0 Hz. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων προκαλούν αύξηση της τιμής της αντίστασης μεταφοράς φορτίου, καθώς η φαραντάϊκή αντίδραση παρεμποδίζεται όλο και περισσότερο, όσο η επιφάνεια του ηλεκτροδίου που καταλύει την οξειδοαναγωγική αντίδραση καλύπτεται από τα πρωτεϊνικά μόρια (**Σχήμα 4.2.2.10**). Γενικά, οι φαραντάϊκοί εμπεδησιομετρικοί βιοαισθητήρες παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τους χωρητικούς, ωστόσο, τα σωματίδια του οξειδοαναγωγικού ζεύγους ενδέχεται να μειώσουν τη σταθερότητα και τη δραστικότητα της ενεργής επιφάνειας του ηλεκτροδίου.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 4.2.2.10. Αναπαράσταση φαρανταϊκού εμπεδησιομετρικού βιοαισθητήρα, το ισοδύναμο κύλωμα και η αύξηση μεταφοράς φορτίου κατά την πρόσδεση των βιομορίων.

Δύο σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν τις μετρήσεις και ακολούθως την απόδοση των εμπεδησιομετρικών βιοαισθητήρων είναι η διαφορά δυναμικού (dc) που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας και η τιμή της συχνότητας (ή η περιοχή συχνοτήτων) που πραγματοποιούνται οι μετρήσεις. Τυπικά, η μέτρηση της εμπέδησης της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεγάλο εύρος τιμών ηλεκτρικής τάσης. Ωστόσο, τόσο ο σχηματισμός των συμπλόκων μεταξύ αντισωμάτων και αντιγόνων, όσο και ο προσανατολισμός αυτών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου επηρεάζονται από την τιμή της εφαρμοζόμενης ηλεκτρικής τάσης, αφού οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένα σωματίδια. Όσον αφορά στις εφαρμοζόμενες συχνότητες σε πολύ χαμηλές συχνότητες (f<1 mHz) οι μετρήσεις είναι χρονοβόρες και λιγότερο αξιόπιστες, ενώ σε πολύ υψηλές συχνότητες (f>1 MHz) η επαγωγή του ηλεκτροχημικού στοιχείου και των καλωδίων σύνδεσης συνεισφέρουν στο φάσμα εμπέδησης. Συνεπώς, το τμήμα των φασμάτων εμπέδησης που ελέγχεται κυρίως από τις επιφανειακές ιδιότητες των τροποποιημένων ηλεκτροδίων βρίσκεται στην περιοχή συχνοτήτων από 100 kHz έως 0,01 Hz.

Η σύνδεση μεταξύ αντιγόνου – αντισώματος είναι πολύ ισχυρή με αποτέλεσμα, στις περισσότερες περιπτώσεις να μην είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίηση των βιοαισθητήρων. Οι διαδικασίες αναγέννησης της ενεργής τους επιφάνειας (δηλαδή λύση του συμπλόκου αντισώματος – αντιγόνου) περιλαμβάνουν τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων χαμηλού (<3,0) ή υψηλού (>9,0) pH, υψηλής ιοντικής ισχύς ή μη πολικών υδατοδιαλυτών διαλυτών, τα οποία κατά κανόνα μειώνουν τη δραστικότητα της ακινητοποιημένης βιοστιβάδας και τη σταθερότητα της εσωτερικής (π.χ. διηλεκτρικής) στιβάδας.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Γενικά, οι εμπεδησιομετρικοί βιοαισθητήρες έχουν χαμηλά όρια ανίχνευσης, αν και για παρόμοιους τύπους βιοαισθητήρων οι αναφερόμενες τιμές στη βιβλιογραφία διαφέρουν σημαντικά. Αυτή η απόκλιση οφείλεται εν μέρει στο μοριακό βάρος (όγκος) των βιομορίων – στόχων και στις διαφορετικές σταθερές σύνδεσης (k_f) μεταξύ των υπό μελέτη ανοσοχημικών ζευγών[1].

4.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Προδρομίδης, Μ. *Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες*. (2010).

2. Eggins, B. R. *Chemical sensors and biosensors*. 300 (2002).

3. Wang, J. *Analytical electrochemistry 3rd Edition*. (2006).

4. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. & Reimhult, E. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors* **8,** 1400–1458 (2008).

5. Kissinger, P. T., Heineman, W. R. & Dekker, M. *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry 2nd. Anthropol. Med.* **20,** 981 (1996).

6. Lorenz, W. & Schulze, K. D. Zur Anwendung der Transformations-Impedanzspektrometrie. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **65,** 141–153 (1975).

7. Barlett, P. N. *Bioelectrochemistry: Fundamentals, experimental techniques and applications*. (2008).

8. Suni, I. I. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *Trends Anal. Chem.* **27,** 604–611 (2008).

9. Prodromidis, M. I. Impedimetric immunosensors—A review. *Electrochim. Acta* **55,** 4227–4233 (2010).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο}

ΣΥΝΘΕΣΗ – ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

5.1. ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΟΡΓΑΝΑ – ΥΛΙΚΑ

Στην παρούσα εργασία έγινε η σύνθεση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των παρακάτω πεπτιδίων:

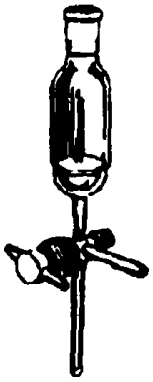
Πίνακας 5.1.3. Πεπτίδια που συντέθηκαν και μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

	Πεπτιδικά Ανάλογα	**Μοριακός Τύπος**	**Μοριακό Βάρος**
1	Ac-FYSHSFHENWPS-NH_2	$C_{75}H_{91}N_{19}O_{20}$	1578,64
2	Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2	$C_{76}H_{96}N_{20}O_{21}S$	1681,78

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε σε υάλινο αντιδραστήρα (**Σχήμα 5.1.1**) 2x10cm εφοδιασμένο στο άνω μέρος του με βιδωτό πώμα από Teflon και στο κάτω άκρο του με πορώδες φίλτρο, στρόφιγγα και ακροφύσιο για την απόρριψη των διηθημάτων, τα οποία απομακρύνονται με την εφαρμογή κενού. Η σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield, σύμφωνα με την Fmoc/*t*-Bu στρατηγική.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ως πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η 4-[2',4'-διμεθοξυφαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)αμινομεθυλ]-φαινοξυακεταμιδο-νορλευκυλαμινομεθυλο-ρητίνη (Rink Amide AM ρητίνη) (G.L. Biochem, Shangai, China).



Σχήμα 5.1.1. Υάλινος αντιδραστήρας σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση.

Οι διαλύτες, τα αντιδραστήρια σύζευξης, τα προστατευμένα αμινοξέα καθώς και τα άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των πεπτιδίων έχουν ως ακολούθως:

5.1.1. ΔΙΑΛΥΤΕΣ

- **Διχλωρομεθάνιο** (DCM, >99,9% Fluka Chemie AG, Switzerland) για τη διόγκωση των κόκκων της πεπτιδορητίνης.
- **Διμεθυλοφορμαμίδιο** (DMF, >99,9% Fluka Chemie AG, Switzerland) για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων κατά τα στάδια των εκπλύσεων της πεπτιδορητίνης. Το διμεθυλοφορμαμίδιο που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις σύζευξης είχε υποστεί μια επιπλέον κατεργασία προκειμένου να δεσμευτούν οι επιβλαβείς αμίνες που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της φωτοδιάσπασής του. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει:
  - Παραμονή του DMF σε ενεργοποιημένα molecular sieves (4 Å) για τουλάχιστον 3 ημέρες.
  - Διήθηση για να απομακρυνθούν τα αιωρήματα που δημιουργούνται από τα molecular sieves.
  - Φύλαξή του σε σκοτεινό μέρος.
- **Διαιθυλαιθέρας** (Et_2O, >99,5% Riedel-de Haën, Germany) για τη ξήρανση της πεπτιδορητίνης και την καταβύθιση του πεπτιδίου μετά την αποκοπή του από τη ρητίνη.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

- **Εξάνιο** (n-Hexane, LAB-SCAN, Dublin, Ireland) για την απομάκρυνση του τριφθοροξικού οξέος (TFA) στον περιστροφικό εξατμιστήρα.
- **Ακετονιτρίλιο** (CH_3CN, LAB-SCAN, Dublin, Ireland) και **μεθανόλη** (CH_3OH, LAB-SCAN, Dublin, Ireland) για τον καθαρισμό των πεπτιδίων σε (ημι-)παρασκευαστική ανάστροφης φάσης HPLC.

5.1.2. Αντιδραστήρια Σύζευξης

- **Διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο** (DIC, Fluka Chemie AG, Switzerland).
- **1-υδροξυβενζοτριαζόλιο** (HOBt, G.L. Biochem, Shangai, China), ως βοηθητικό πυρηνόφιλο στις αντιδράσεις σύζευξης.

5.1.3. Λοιπά Αντιδραστήρια

- **Τριφθοροξικό οξύ** (TFA, 99% Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany) για την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων και την τελική αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη.
- **Πιπεριδίνη** (Piperidine, 99% Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany) για την απομάκρυνση της N^{α}-Fmoc προστατευτικής ομάδας.
- **Τριϊσοπροπυλοσιλάνιο** (TIS, 98% Fluka Chemie AG, Switzerland) ως μόριο "παγίδα" για τη δέσμευση των καρβοκατιόντων που προκύπτουν κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη.
- **Αιθανοδιθειόλη** (EDT, 98% Fluka Chemie AG, Switzerland) για την προστασία της σουλφιδρυλομάδας της κυστεΐνης από την οξείδωση.
- **Οξικός ανυδρίτης** (Ac_2O, 99% Merk, Darmstadt, Germany) και **διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη** (DIEA, 98% Fluka Chemie AG, Switzerland) για την ακετυλίωση των ελεύθερων υδοξυλομάδων και αμινομάδων.
- **Νινυδρίνη** (Riedel-de Haën, Germany), **KCN** 0,001M (Fluka Chemie AG, Switzerland), **αιθανόλη** (Riedel-de Haën, Germany), **φαινόλη** (Riedel-de Haën, Germany) και **πυριδίνη** (Merk, Darmstadt, Germany) ως αντιδραστήρια για την παρασκευή του διαλύματος του Test Kaiser, το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των ελεύθερων αμινομάδων.

5.1.4. Fmoc – Προστατευμενα Αμινοξεα

- **Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH** (G.L. Biochem, Shangai, China).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

- **Fmoc-Pro-OH** (G.L. Biochem, Shangai, China).
- **Fmoc-Trp(Boc)-OH** (G.L. Biochem, Shangai, China).
- **Fmoc-Asn(Trt)-OH** (G.L. Biochem, Shangai, China).
- **Fmoc-Glu(OtBu)-OH** (G.L. Biochem, Shangai, China).
- **Fmoc-His(Trt)-OH** (G.L. Biochem, Shangai, China).
- **Fmoc-Phe-OH** (G.L. Biochem, Shangai, China).
- **Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH** (G.L. Biochem, Shangai, China).
- **Fmoc-Cys(Trt)-OH** (G.L. Biochem, Shangai, China).

όπου *t*-Bu:*tert*-βουτυλομάδα, Boc: *tert*-βουτοξυκαρβονυλομάδα, Trt: τριτυλομάδα, και OtBu: *tert*-βουτοξυομάδα.

5.1.5. Καθαρισμος και Ταυτοποιηση Πεπτιδιου

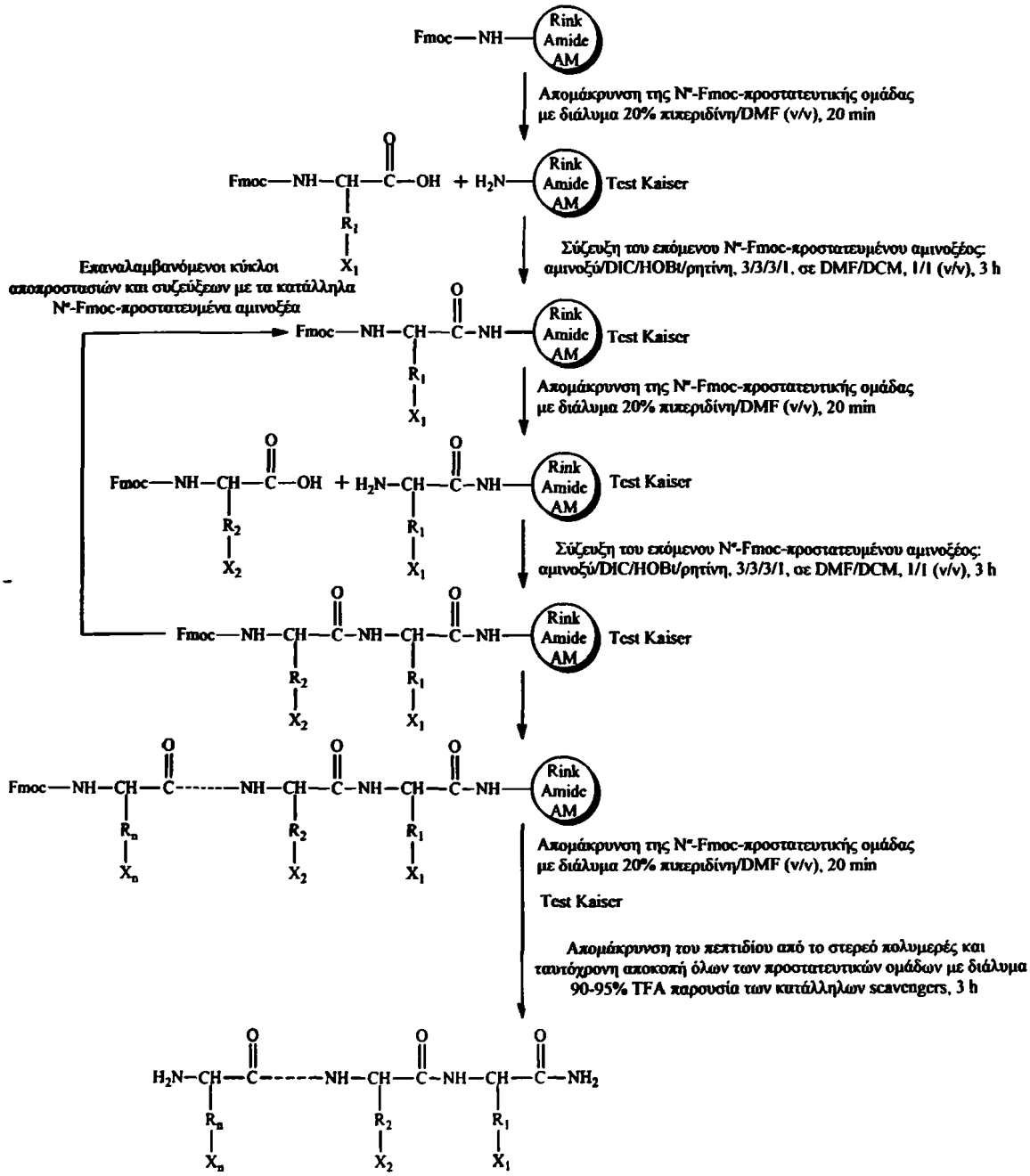
Ο καθαρισμός των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης σε συσκευή Waters Prep LC 4000 system (με ανιχνευτή Waters 486), χρησιμοποιώντας ως σταθερή φάση είτε ημιπαρασκευαστική (Supelco, Discovery C18 25cmx10mm, 5μm), είτε παρασκευαστική (C18 Interchrom, 25cmx21,2mm) χρωματογραφική στήλη. Η καθαρότητα των πεπτιδίων ελέγχθηκε με αναλυτική χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης σε συσκευή Waters 600S Controller (με ανιχνευτή Waters 996 και αντλία WatersTM 616) χρησιμοποιώντας ως στήλες την C8 Hypersil 25cmx4,6mm, 5μm και την C18 Supelco 25cmx3mm, 5μm. Τέλος, η ταυτοποίηση των πεπτιδίων έγινε σε φασματογράφο μάζας Micromass Platform LC Quandrupole και κάτω από συνθήκες ηλεκτροψεκασμού για την παραγωγή των "υπό ανίχνευση" ιόντων.

5.2. Γενικη Συνθετικη Διαδικασια

5.2.1. Fmoc/*t*-Bu Βημα προς Βημα Συνθετικη Μεθοδολογια

Η σύνθεση των πεπτιδίων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/*t*-Bu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας, χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα τη ρητίνη Rink Amide AM (**Σχήμα 5.2.1.2**).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 5.2.1.2. Γενικό σχήμα της Fmoc/t-Bu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμμα την ρητίνη Rink Amide AM.

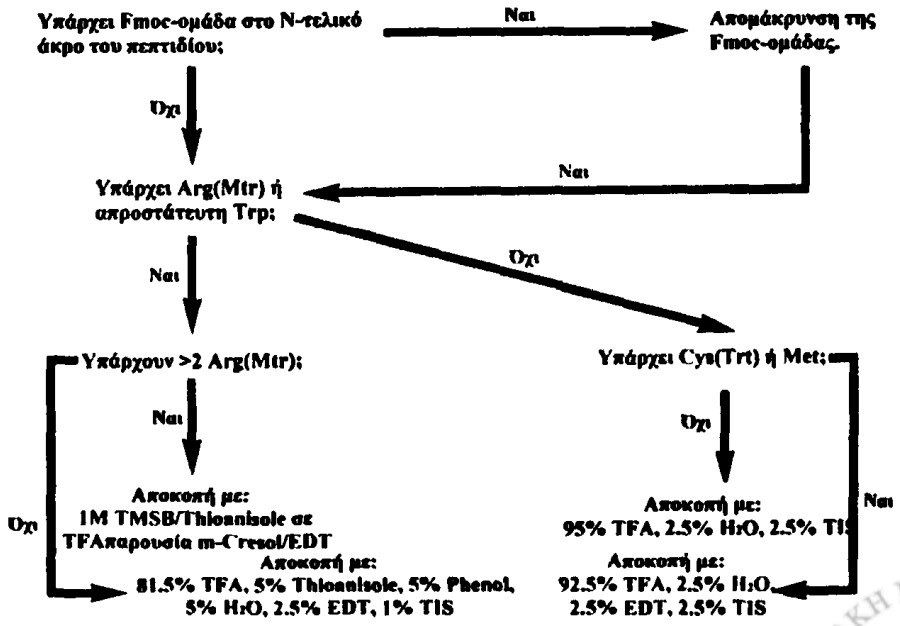
Αρχικά, προηγείται η απομάκρυνση της N^{α}-Fmoc προστατευτικής ομάδας του βραχίονα (linker) της ρητίνης με διάλυμα 20% πιπεριδίνης/DMF (v/v), οι απαραίτητες εκπλύσεις και ο ποιοτικός έλεγχος ύπαρξης ελεύθερων αμινομάδων. Η αντίδραση σύζευξης του πρώτου αμινοξέος όπως και των υπολοίπων πραγματοποιείται με την χρήση μοριακής αναλογίας αμινοξύ/DIC/HOBt/ρητίνη 3/3/3/1 σε διάλυμα DMF/DCM, 1/1 (v/v). Η διάρκεια της αντίδρασης κυμαίνεται από 2-4 ώρες, ανάλογα με το μήκος του πεπτιδίου και το αμινοξύ που πρόκειται να συζευχθεί. Ακολουθώντας επαναλαμβανόμενους κύκλους αποπροστασιών

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

και συζεύξεων με τα κατάλληλα N^{α}-Fmoc προστατευμένα αμινοξέα, επιτυγχάνουμε τη σύνθεση της επιθυμητής αμινοξικής αλληλουχίας.

Ο έλεγχος της ολοκλήρωσης των εκάστοτε συζεύξεων και αποπροστασιών πραγματοποιείται με το τεστ της νινυδρίνης (Test Kaiser), το οποίο παρέχει τη δυνατότητα ποιοτικής και όχι ποσοτικής αξιολόγησης των ελεύθερων αμινομάδων της πεπτιδορητίνης. Η αντίδραση της νινυδρίνης με τις πρωτοταγείς αμίνες παρέχει χρώση (συνήθως μωβ ή καφέ), δίνοντάς μας τη δυνατότητα να αξιολογούμε κάθε φορά την αποπεράτωση των συνθετικών κύκλων.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης και την απομάκρυνση της N^{α}-τελικής Fmoc ομάδας, η απομάκρυνση των πεπτιδίων από τη ρητίνη πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την αποκοπή όλων των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, σε σχετικά ήπιες συνθήκες (**Σχήμα 5.2.1.3**). Η πεπτιδορητίνη κατεργάζεται με διάλυμα 80-95% TFA, παρουσία των απαραίτητων scavengers (TIS, EDT, θειοανισόλη, φαινόλη, κ.ο.κ.), για 3-24 ώρες ανάλογα με την αμινοξική αλληλουχία, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διήθηση της ρητίνης και μεταφορά του μίγματος της αντίδρασης σε περιστροφικό εξατμιστήρα για τη συμπύκνωση του TFA. Στο ελαιώδες υπόλειμμα προστίθεται μίγμα διχλωρομεθανίου/εξανίου, 1:1 (v/v), και μετά από διαδοχικές εξατμίσεις ακολουθεί η καταβύθιση των πεπτιδίων με παγωμένο αιθέρα. Τα πεπτίδια παραλαμβάνονται στη στερεή τους μορφή, μετά από διάλυση σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποίηση.

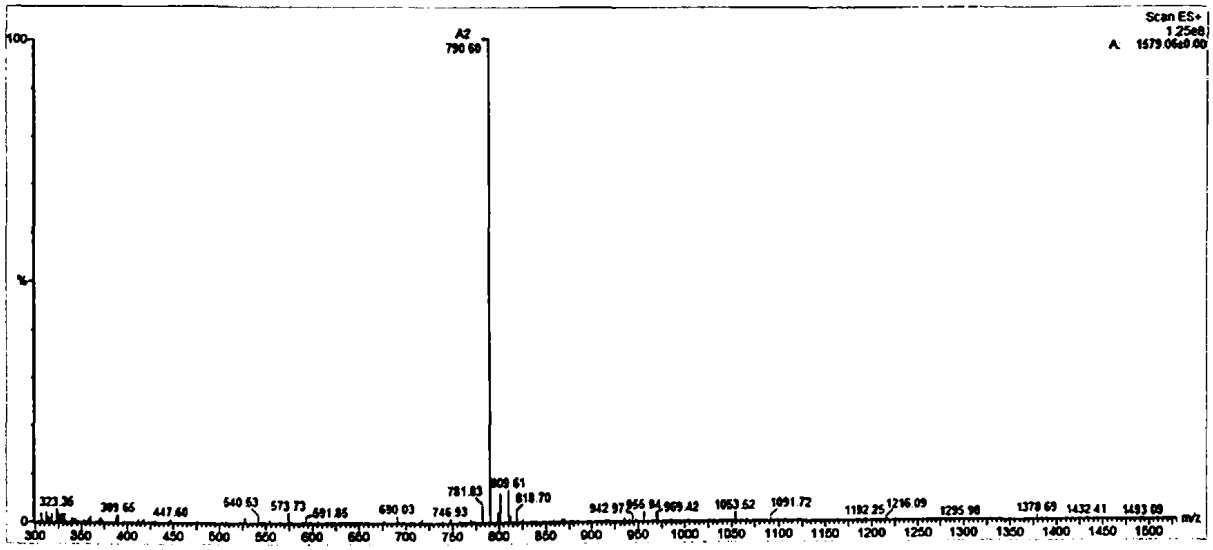


Σχήμα 5.2.1.3. Συνθήκες απομάκρυνσης των πεπτιδίων από τα στερεά πολυμερή σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/tBu συνθετικής μεθοδολογίας σε στερεή φάση.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

5.2.2. Σύνθεση του Πεπτιδικού Αναλογου Ac-FYSHSFHENWPS-NH_2

Η σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου Ac-FYSHSFHENWPS-NH_2 έλαβε χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/*t*-Bu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας, χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την Rink Amide AM ρητίνη, με υποκατάσταση 0,58 mmol ελεύθερων αμινομάδων/g ρητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^{α}-Fmoc-παράγωγα, ενώ οι διαδοχικές αντιδράσεις συζεύξεων τους στην πεπτιδορητίνη πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της μοριακής αναλογίας αμινοξύ/DIC/HOBt/ρητίνη:3/3/3/1, σε διάλυμα DMF/DMC, 1/1 (v/v). Η βήμα προς βήμα σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου ολοκληρώθηκε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα, με την απόδοση της, πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το πολυμερές να υπολογίζεται σε $\alpha_{\text{Συνθεσης}}$ = **95,6%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων του, έλαβε χώρα μετά από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα TFA/H_2O/TIS σε αναλογία 95/2,5/2,5 (v/v/v) για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ($\alpha_{\text{Αποκοπης}}$ = **92,6%**). Στο **Σχήμα 5.2.2.4** δίνεται το φάσμα μάζας για το ακάθαρτο (crude) Ac-FYSHSFHENWPS-NH_2 πεπτίδιο.



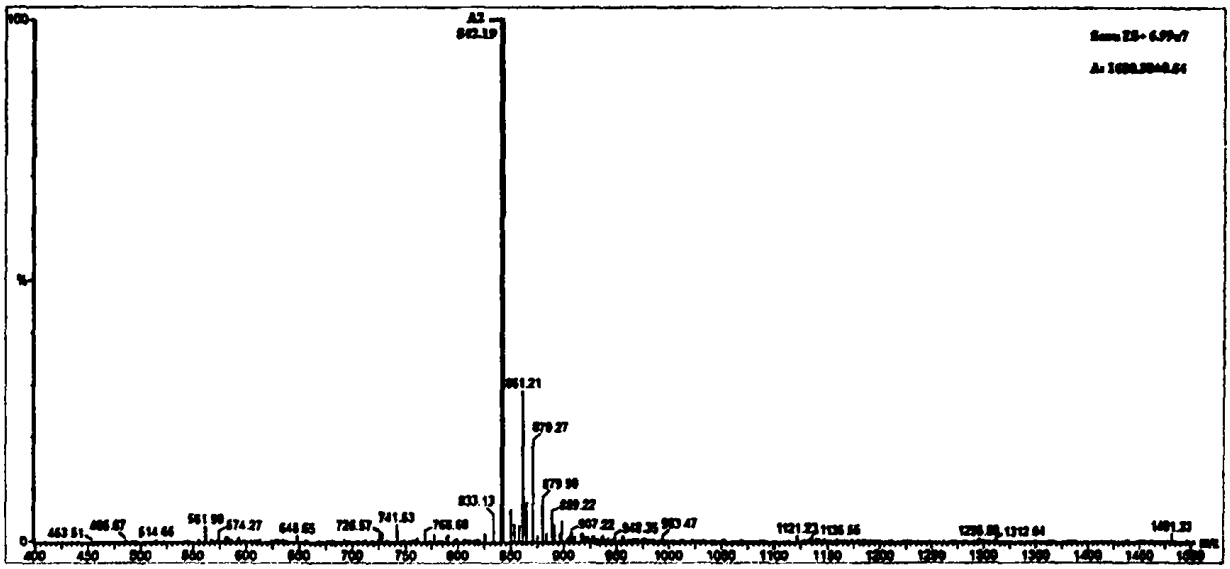
Σχήμα 5.2.2.4. Φάσμα μάζας MS-ESI(+) του crude πεπτιδίου Ac-FYSHSFHENWPS-NH_2, πριν τη διαδικασία του καθαρισμού. Αναμενόμενο ΜΒ: 1578,64 g/mol, ευρεθέν ΜΒ: 1579,06 g/mol.

5.2.3. Σύνθεση του Πεπτιδικού Αναλογου Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2

Η σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2 έλαβε χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Fmoc/*t*-Bu βήμα προς βήμα συνθετικής μεθοδολογίας, χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την Rink Amide AM ρητίνη, με υποκατάσταση

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

0,58 mmol ελεύθερων αμινομάδων/g ρητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^{α}-Fmoc-παράγωγα, ενώ οι διαδοχικές αντιδράσεις συζεύξεων τους στην πεπτιδορητίνη πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της μοριακής αναλογίας αμινοξύ/DIC/HOBt/ρητίνη:3/3/3/1, σε διάλυμα DMF/DMC, 1/1 (v/v). Η βήμα προς βήμα σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου 2 ολοκληρώθηκε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα, με την απόδοση της, πριν την απομάκρυνση του πεπτιδίου από το πολυμερές να υπολογίζεται σε $\alpha_{\Sigma\Upsilon\Nu\Theta\Epsilon\Sigma\Eta\Sigma}$ = 97,8%. Η αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων του, έλαβε χώρα μετά από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με διάλυμα TFA/H_2O/EDT/TIS σε αναλογία 92,5/2,5/2,5/2,5 (v/v/v/v) για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ($\alpha_{\Alpha\Pi\Omega\Kappa\Omega\Pi\Eta\Sigma}$ = 94,2%). Στο **Σχήμα 5.2.3.5** δίνεται το φάσμα μάζας για το ακάθαρτο (crude) Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2 πεπτίδιο.



Σχήμα 5.2.3.5. Φάσμα μάζας MS-ESI(+) του crude πεπτιδίου Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2, πριν τη διαδικασία του καθαρισμού. Αναμενόμενο ΜΒ: 1681,78 g/mol, ευρεθέν ΜΒ: 1680,38 g/mol.

Ακολούθησε η αναλυτική RP-HPLC ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες του συστήματος διαλυτών έκλουσης για τον καθαρισμό του πεπτιδίου με παρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C_{18} Interchrom, 250 x 21,2 mm. Το βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και οι υπόλοιπες παράμετροι καθαρισμού, δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

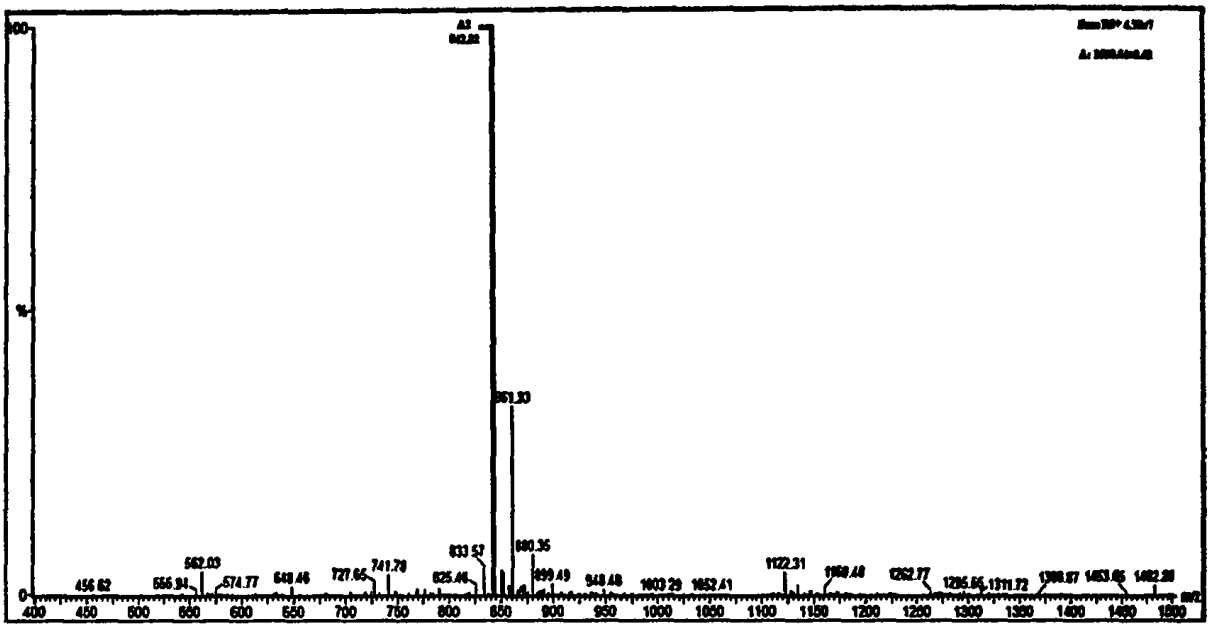
ΔΙΑΛΥΤΕΣ	(A) H_2O/0,1% TFA (B) CH_3CN/0,1% TFA
ΒΑΘΜΙΔΩΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ (GRADIENT)	A/B: 95/05 (t=0) → A/B: 60/40
ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΡΟΗΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	20 mL/min
ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	30 min
ΧΡΟΝΟΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ (RETENTION TIME, R_t)	20,56 min

Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η συλλογή και λυοφιλοποίηση των κατάλληλων κλασμάτων και από την ποσότητα του στερεού πεπτιδίου που ανακτήθηκε, υπολογίστηκε η απόδοση καθαρισμού HPLC σε $\alpha_{ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ}$ = **56,9%.**

Τέλος, η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός του απομονωμένου από HPLC τελικού επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 5.2.2.6**) και φασματοσκοπία μάζας ES+ (**Σχήμα 5.2.2.7**).

Σχήμα 5.2.3.6. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του απομονωμένου καθαρού πεπτιδικού αναλόγου Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

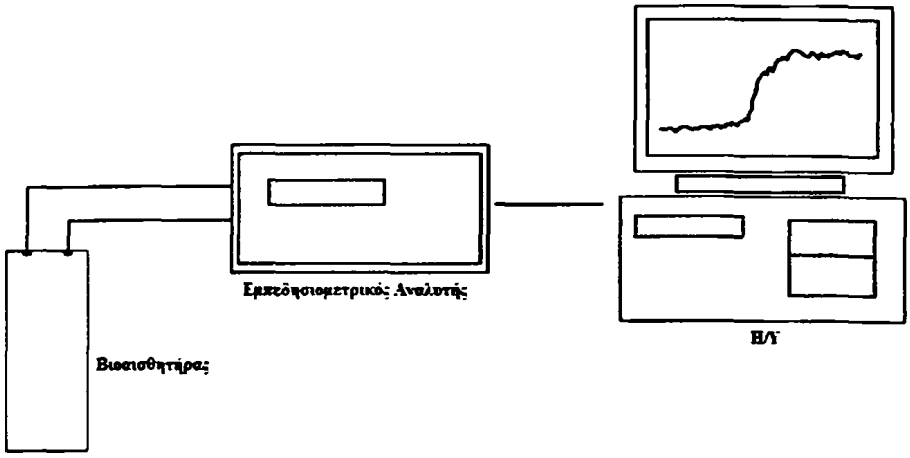


Σχήμα 5.2.3.7. Φάσμα μάζας MS-ESI(+) του απομονωμένου από RP-HPLC πεπτιδικού αναλόγου Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2. Αναμενόμενο MB: 1681,78 g/mol, ευρεθέν MB: 1680,64 g/mol.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{ο}



ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ

6.1. ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΟΡΓΑΝΑ – ΥΛΙΚΑ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη ενός εμπεδησιομετρικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της καρδιακής τροπονίνης I (cTnI). Η κατασκευή του βιοαισθητήρα βασίστηκε στην ακινητοποίηση του πεπτιδικού αναλόγου 2 Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2 πάνω στην επιφάνεια ηλεκτροδίων γραφίτη φασματοσκοπικής καθαρότητας, τα οποία αρχικά τροποποιήθηκαν με ενώσεις του τύπου $C_6H_5(CH_2)_3X$ (X = Cl, Br, I) και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε δείγματα αίματος ασθενών. Η μέθοδος βασίζεται στη μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου (R_{ct}, charge – transfer resistance) της διεπιφάνειας των ηλεκτροδίων γραφίτη/τροποποιητή/πεπτίδιο με το διάλυμα του ηλεκτρολύτη, παρουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους σιδηρι-/σιδηροκυανιούχων ιόντων. Διάφορες πειραματικές συνθήκες, όπως η συγκέντρωση του τροποποιητή, η συγκέντρωση του πεπτιδίου, το διάλυμα και το pH της αντίδρασης, καθώς και ο χρόνος αλληλεπίδρασης πεπτιδίου – cTnI, μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν με πειράματα φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης (EIS).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

6.1.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- **1-Βρωμο-3-φαινυλοπροπάνιο** (1-Bromo-3-phenylpropane, $C_6H_5(CH_2)_3Br$, 98% Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany) για την τροποποίηση της επιφάνειας των ηλεκτροδίων γραφίτη.
- **Πεπτιδικό ανάλογο 1 Ac-FYSHSFHENWPS-NH_2** ως στοιχείο επιβεβαίωσης για τη δημιουργία του θειοαιθερικού δεσμού.
- **Πεπτιδικό ανάλογο 2 Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2** ως στοιχείο αναγνώρισης για την cTnI.
- **4-Μερκαπτοφαινόλη** (4-Mercaptophenol, 97% Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany) για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων.
- **Δείγματα ορού ασθενών** (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων) για την ανίχνευση της cTnI, συγκέντρωσης 100 ng/mL.
- **Δισόξινο φωσφορικό νάτριο** ($NaH_2PO_4 \times H_2O$, 99% Fluka Chemie AG, Switzerland) και **χλωριούχο κάλιο** (KCl, 99,5% Merk, Darmstadt, Germany) για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών.
- **Σιδηρικυανιούχο κάλιο** ($K_3[Fe(CN)_6]$, 99% Merk, Darmstadt, Germany) και **σιδηροκυανιούχο κάλιο** ($K_4[Fe(CN)_6]$, 99% Merk, Darmstadt, Germany) για την αύξηση της ευαισθησίας των μετρήσεων.
- **Τρις(υδροξυμεθυλο)-αμινο-μεθάνιο** (Trisma Base, 99% Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany), **χλωριούχο νάτριο** (NaCl, 99,5% Merk, Darmstadt, Germany), **αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ** (EDTA, 99% Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany) και **Leupeptin, PMSF** και **Pepstatin** (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany) για την παρασκευή διαλύματος αραίωσης των δειγμάτων ορού.

6.1.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ

Η μετρητική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στις ηλεκτροχημικές μετρήσεις είναι ο ποτενσιοστάτης PGSTAT12/FRA2 (Metrohm Autolab). Το όλο σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή (IBM compatible) ενώ η συλλογή, καταγραφή και επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων γίνεται μέσω του ειδικού λογισμικού της εταιρίας με την ονομασία «GPES - FRA version 4.9».

Οι μετρήσεις έγιναν εντός ηλεκτροχημικής κυψελίδας τριών ηλεκτροδίων (VC2, BAS, IN). Ως ηλεκτρόδια εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένα ηλεκτρόδια γραφίτη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

φασματοσκοπικής καθαρότητας (Ringsdorff-Werke). Ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl/KCl 3 M (IJ Cambria) και ένα σύρμα Pt (BAS, IN), χρησιμοποιήθηκαν ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο, αντίστοιχα.

Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης (EIS) πραγματοποιήθηκαν στο εύρος συχνοτήτων 10^{-1} – 10^{5} Hz, χρησιμοποιώντας μία ημιτονική διατάραξη με τιμή τάσης (rms) 10 mV και εφαρμόζοντας μία συνεχή διαφορά δυναμικού +200 mV, εντός διαλύματος 50 mM PBS / 5 mM (1+1) $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, pH 7,0.

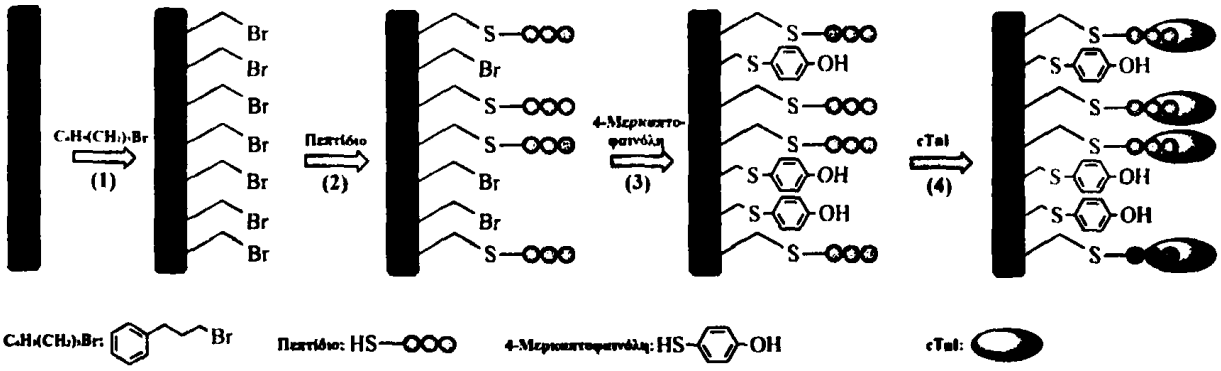
6.1.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ

Πριν από τη χρήση των ηλεκτροδίων, οι ράβδοι γραφίτη υποβλήθηκαν σε κατεργασία λείανσης της επιφάνειάς τους. Στόχος ήταν ο καθαρισμός και η ανανέωση τους. Τα ηλεκτρόδια εισήχθησαν σε θήκες από Teflon κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μείνει εκτεθειμένη μόνο η ενεργός επιφάνειά τους. Στη συνέχεια, ακολούθησε λείανση της επιφάνειά τους σε έφυγρα χαρτιά ανθρακοπυριτίου κοκκομετρικής διάστασης (grit) 1000 με συνεχείς κυκλικές κινήσεις. Έπειτα, εκπλύθηκαν με άφθονο δις-απεσταγμένο ύδωρ, έτσι ώστε να απομακρυνθούν διάφορα μικρά σωματίδια από την επιφάνεια και ακολούθησε ξήρανση σε πυριαντήριο σε θερμοκρασία 60 °C για 30 min. Τέλος, εισήχθησαν σε φούρνο σε θερμοκρασία 700 °C για 90 s, προκειμένου να απομακρυνθούν διάφορες ουσίες από την επιφάνειά τους και φυλάχθηκαν εντός ξηραντήρα. Για να αποφύγουμε την ηλεκτρική επαφή των πλευρικών κυλινδρικών επιφανειών του ηλεκτροδίου με το διάλυμα του ηλεκτρολύτη και για να εξασφαλίσουμε σταθερή ενεργό επιφάνεια, οι πλευρές του ηλεκτροδίου καλύφθηκαν με παραφίλμ.

Η αρχή λειτουργίας του αισθητήρα βασίστηκε στην αλληλεπίδραση της cTnI με το πεπτιδικό ανάλογο 2 Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2. Το πεπτίδιο ακινητοποιήθηκε στην επιφάνεια ηλεκτροδίων γραφίτη, τροποποιημένων με $C_6H_5(CH_2)_3Br$, μέσω σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού (-C-S-C-). Ο σχηματισμός του θειοαιθερικού δεσμού περιελάμβανε τη χημειοεκλεκτική αντίδραση μεταξύ της ελεύθερης σουλφιδριλικής ομάδας της N-τελικής κυστεΐνης του πεπτιδίου και του 1-βρωμο-3-φαινυλοπροπανίου. Παράλληλα με την ανάπτυξη του βιοαισθήτρα, ακινητοποιήθηκε στην επιφάνεια ηλεκτροδίων γραφίτη το πεπτιδικό ανάλογο 1 Ac-FYSHSFHENWPS-NH_2, για τη σύγκριση και την επιβεβαίωση του σχηματισμού του θειοαιθερικού δεσμού.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Τα ηλεκτρόδια τροποποιήθηκαν με απόθεση ποσότητας 10 μL από διάλυμα $C_6H_5(CH_2)_3Br/CH_3CN$ (1/100, v/v) και αφέθηκαν στον αέρα για 1 h μέχρι την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη. Ακολουθήθηκε έκπλυση των ηλεκτροδίων σε 10 mL CH_3CN (1×5 min), ξήρανση της επιφάνειας σε ρεύμα N_2 και εμβάπτιση σε διάλυμα 1,0 mg/mL πεπτιδίου εντός μίγματος 50 mM PBS/CH_3CN (5/2), pH 7,0 για 24 h στους 25°C. Τα ηλεκτρόδια εκπλύθηκαν σε 10 mL 50 mM PBS pH 7,0 (1×10 min) και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν εντός διαλύματος 2 mM 4-μερκαπτοφαινόλης για 2 h για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Στη συνέχεια, έγινε έκπλυση (1×10 min, 10 mL 50 mM PBS pH 7,0) και εμβάπτιση των ηλεκτροδίων σε ορό αραιωμένο με διάλυμα 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 μM Leupeptin, 200 μM PMSF, 1 μM Pepstatin (1/2, v/v), pH 7,0 για 24 h στους 4 °C. Τέλος, τα ηλεκτρόδια εκπλύθηκαν και διατηρήθηκαν σε διάλυμα 50 mM PBS pH 7,0.

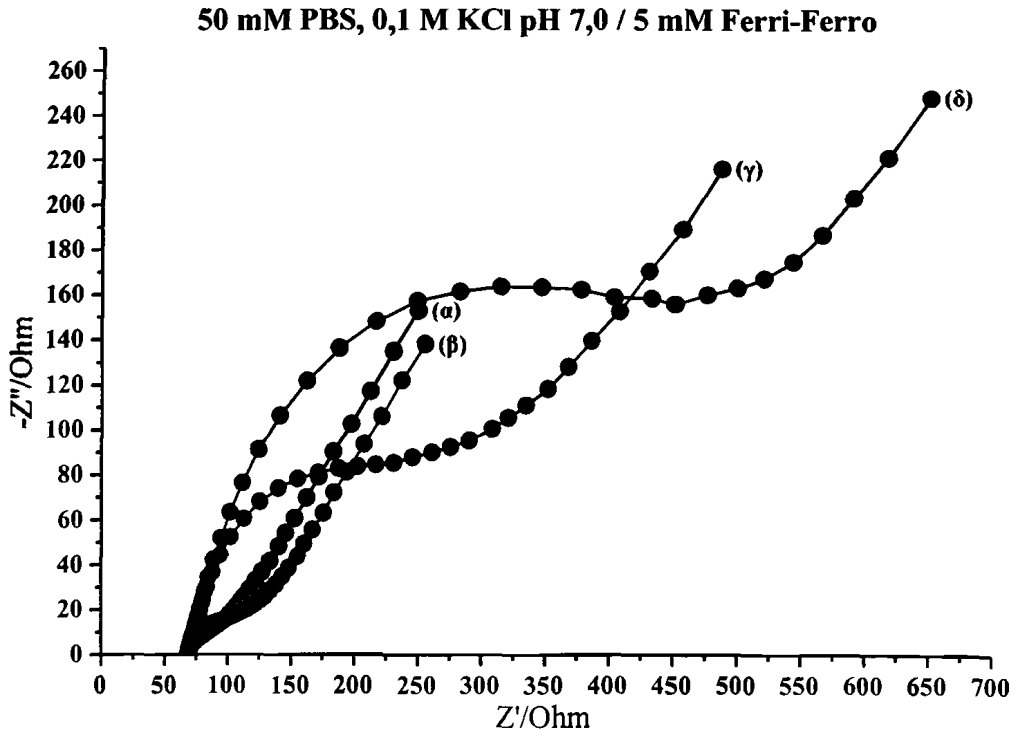


Σχήμα 6.1.3.1. Σχηματική απεικόνιση της τροποποίησης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου γραφίτη και της αλληλεπίδρασης πεπτιδίου – πρωτεΐνης: (1) τροποποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου γραφίτη, (2) ακινητοποίηση του πεπτιδίου Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2, (3) κάλυψη των μη ειδικών θέσεων με 4-μερκαπτοφαινόλη, και (4) δέσμευση και ανίχνευση του στόχου (cTnI).

6.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα διάφορα στάδια τροποποίησης των ηλεκτροδίων γραφίτη και η απόκριση των παραγόμενων βιοαισθητήρων σε δείγματα ορού ασθενών εξετάστηκαν με πειράματα φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

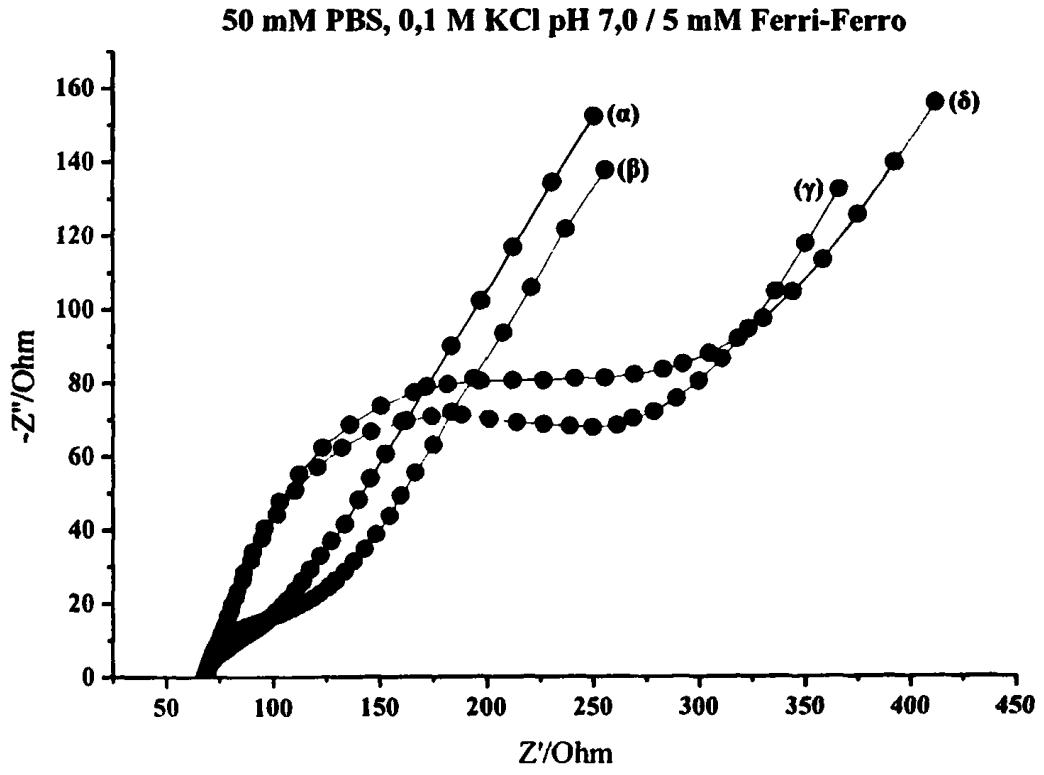


Σχήμα 6.2.2. Διάγραμμα Nyquist του τροποποιημένου ηλεκτροδίου γραφίτη $GR/C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτίδιο στα διάφορα στάδια τροποποίησης του και επιβεβαίωση σχηματισμού του θειοαιθερικού δεσμού: (α) ηλεκτρόδια γραφίτη, (β) ηλεκτρόδια $GR/C_6H_2(CH_2)_3Br$, (γ) ηλεκτρόδια $GR/C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτιδικό ανάλογο 1, και (δ) ηλεκτρόδια $GR/C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτιδικό ανάλογο 2.

Στα **Σχήματα 6.2.2**, **6.2.3** και **6.2.4** παρουσιάζονται διαγράμματα Nyquist φαρανταϊκής φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης, τα οποία ελήφθησαν παρουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους σιδηρο-/σιδηρικυανιούχων ιόντων. Στο **Σχήμα 6.2.2.α** το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο γραφίτη παρουσιάζεται ως ένα πολύ μικρό ημικύκλιο, ενδεικτικό της γρήγορης κινητικής της αντίδρασης μεταφοράς φορτίου από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη στην ενεργό επιφάνεια του ηλεκτροδίου, το οποίο ακολουθείται από τη γραμμή διάχυσης στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων. Στη συνέχεια, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.2.2.β**, **6.2.2.γ** και **6.2.2.δ**, μετά την τροποποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου με $C_6H_2(CH_2)_3Br$, καθώς και την ακινητοποίηση των πεπτιδικών αναλόγων, η αντίσταση μεταφοράς φορτίου αυξάνεται (αύξηση της διαμέτρου των αντίστοιχων ημικυκλίων). Πιο συγκεκριμένα, στο **Σχήμα 6.2.2.β** η κινητική της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης μειώνεται λόγω της κατάληψης των άλλοτε κενών θέσεων του ηλεκτροδίου από το $C_6H_2(CH_2)_3Br$, ενώ στο **Σχήμα 6.2.2.γ** και **6.2.2.δ** λόγω της ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ιόντων του οξειδοαναγωγικού ζεύγους και των αρνητικά φορτισμένων πεπτιδικών αναλόγων ($pH_{Μέτρησης}$ 7,0, pI_1 6,0 και pI_2 6,7). Και στις δύο περιπτώσεις μειώνεται ο ρυθμός μεταφοράς των ιόντων του

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

οξειδοαναγωγικού ζεύγους στην ενεργό επιφάνεια του ηλεκτροδίου με αποτέλεσμα την ελάττωση παραγωγής και μεταφοράς ηλεκτρονίων στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου–ηλεκτρολύτη. Στο **Σχήμα 6.2.2.γ** και **6.2.2.δ**, διακρίνεται η ακινητοποίηση του πεπτιδικού αναλόγου 2 Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2 μέσω του σχηματισμού ενός θειοαιθερικού δεσμού. Ο σχηματισμός του δεσμού λαμβάνει χώρα ανάμεσα στην ελεύθερη σουλφιδριλική ομάδα της N-τελικής κυστεΐνης του πεπτιδίου και το βρώμιο του 1-βρωμο-3-φαινυλοπροπανίου. Η συγκεκριμένη αντίδραση ευνοείται περισσότερο παρουσία μιας σουλφιδριλικής ομάδας της κυστεΐνης, λόγω του πυρηνόφιλου χαρακτήρα του θείου, ενώ είναι λιγότερο ευνοϊκή να πραγματοποιηθεί μεταξύ του αζώτου της παράπλευρης αλυσίδας της ιστίδινης του πεπτιδικού αναλόγου 1 Ac-FYSHSFHENWPS-NH_2 και του βρωμίου του 1-βρωμο-3-φαινυλοπροπανίου (**Σχήμα 6.2.2.γ**).



Σχήμα 6.2.3. Διάγραμμα Nyquist του βιοαισθητήρα GR/$C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτιδικό ανάλογο 2 στα διάφορα στάδια τροποποίησης και κατά την αλληλεπίδραση του με cTnI: (α) ηλεκτρόδια γραφίτη, (β) ηλεκτρόδια GR/$C_6H_2(CH_2)_3Br$, (γ) βιοαισθητήρας GR/$C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτιδικό ανάλογο 2 και (δ) βιοαισθητήρας GR/$C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτιδικό ανάλογο 2/Δείγμα θετικού ορού αίματος.

Στο **Σχήμα 6.2.3.** παρουσιάζεται το διάγραμμα Nyquist του υπό ανάπτυξη βιοαισθητήρα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο γραφίτη παρουσιάζει ένα πολύ μικρό ημικύκλιο (**Σχήμα 6.2.3.α**). Στη συνέχεια, όπως φαίνεται στο

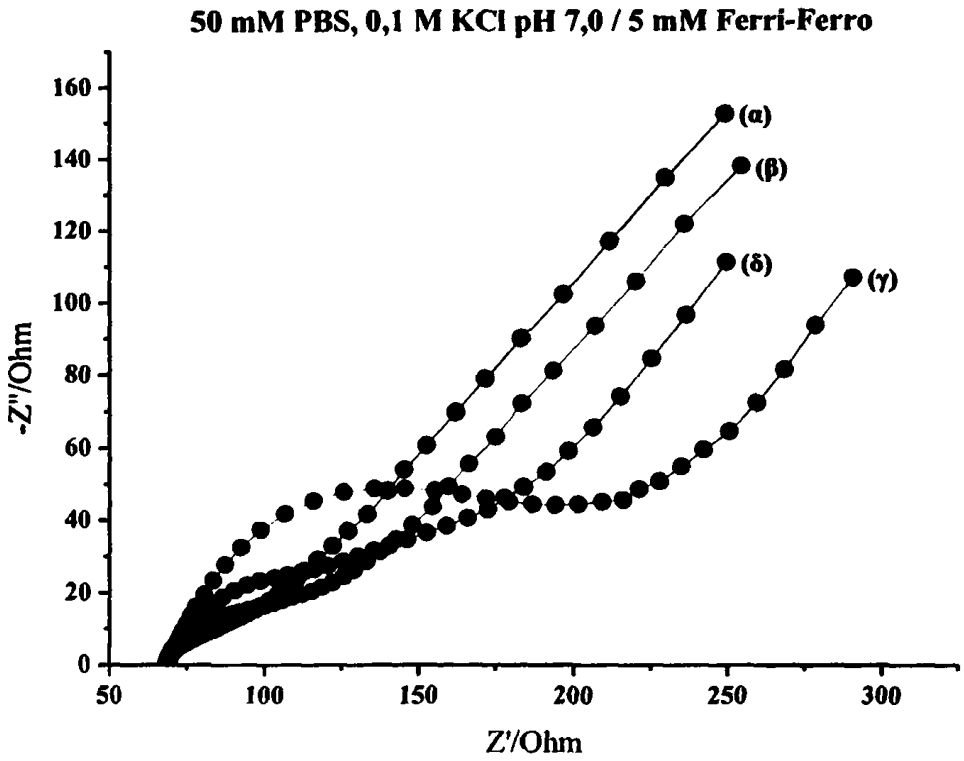
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Σχήμα 6.2.3.β και **6.2.3.γ**, μετά την τροποποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου με $C_6H_2(CH_2)_3Br$, καθώς και την ακινητοποίηση του πεπτιδίου Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2, μέσω του σχηματισμού ενός θειοαιθερικού δεσμού, η αντίσταση μεταφοράς φορτίου αυξάνεται. Η αύξηση αυτή οφείλεται στη μείωση της διάχυσης του οξειδοαναγωγικού ζεύγους σιδηρο-/σιδηρικυανιούχων ιόντων προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, η οποία επιτυγχάνεται για δυο λόγους:

- εξαιτίας της φυσικής παρουσίας του πεπτιδικού αναλόγου 1 Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2, και
- εξαιτίας της ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου πεπτιδίου ($pH_{Μέτρησης}$ 7,0 και pI 6,7) και του αρνητικά φορτισμένου οξειδοαναγωγικού ζεύγους.

Περαιτέρω αύξηση της μετρούμενης εμπέδησης παρατηρείται, επίσης, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.2.3.δ**, μετά την εμβάπτιση του τροποποιημένου ηλετροδίου GR/ $C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτιδικό ανάλογο 2 σε θετικό ορό αίματος, ο οποίος είναι αραιωμένος με διάλυμα 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 μM Leupeptin, 200 μM PMSF, 1 μM Pepstatin (1/2, v/v). Η συγκεκριμένη αύξηση αποδίδεται στο σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ του ακινητοποιημένου πεπτιδίου και της cTnI στον ορό αίματος. Ο σχηματισμός του παραπάνω συμπλόκου επιφέρει περαιτέρω μείωση στη διάχυση των μετρούμενων σωματιδίων (Ferri/Ferro) από το διάλυμα μέτρησης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με αποτέλεσμα την αύξηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου R_{ct}. Με άλλα λόγια, το σύμπλοκο πεπτιδίου-cTnI λειτουργεί ως μοριακό φράγμα και παρεμποδίζει την αντίδραση μεταφοράς φορτίου. Αντίθετα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.2.4.δ**, η εμβάπτιση του τροποποιημένου ηλεκτροδίου γραφίτη σε αρνητικό δείγμα ορού αίματος δεν προκάλεσε αύξηση στην τιμή της μετρούμενης εμπέδησης.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχήμα 6.2.4. Διάγραμμα Nyquist του βιοαισθητήρα GR/$C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτιδικό ανάλογο 2 στα διάφορα στάδια τροποποίησης και κατά την εμβάπτιση του σε αρνητικό ορό αίματος: (α) ηλεκτρόδια γραφίτη, (β) ηλεκτρόδια GR/$C_6H_2(CH_2)_3Br$, (γ) βιοαισθητήρας GR/$C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτιδικό ανάλογο 2 και (δ) βιοαισθητήρας GR/$C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτιδικό ανάλογο 2/Δείγμα αρνητικού ορού αίματος.

6.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται μια αρχική μελέτη για την ανάπτυξη ενός εμπεδησιομετρικού βιοαισθητήρα ανθρώπινης καρδιακής τροπονίνης I (cTnI) πάνω σε ηλεκτρόδια γραφίτη φασματοσκοπικής καθαρότητας, τα οποία είχαν τροποποιηθεί με $C_6H_2(CH_2)_3Br$ και χρησιμοποιήθηκαν για την ακινητοποίηση του πεπτιδικού αναλόγου 2 Ac-CFYSHSFHENWPS-NH_2 μέσω σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού.

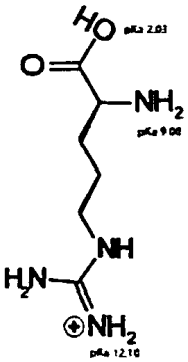
- Ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας GR/$C_6H_2(CH_2)_3Br$/Πεπτιδικό ανάλογο 2 δοκιμάστηκε επιτυχώς σε θετικά δείγματα ορού ασθενών, συγκέντρωσης 100 ng/mL cTnI, καθώς και σε αρνητικά δείγματα ορού ασθενών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο αναγνώρισε εκλεκτικά την cTnI στο θετικό ορό αίματος, ενώ στον αρνητικό ορό αίματος δεν παρατηρήθηκε αύξηση της μετρούμενης αντίστασης μεταφοράς φορτίου. Η παρατηρούμενη μείωση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου μπορεί να αποδοθεί στην εκρόφηση του πεπτιδικού αναλόγου.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

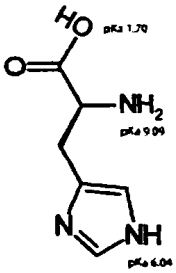
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΦΥΣΙΚΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

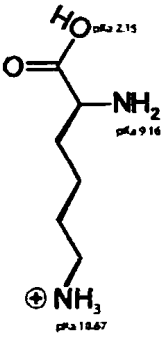
Αργινίνη (Arg) R



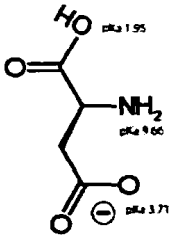
Ιστιδίνη (His) H



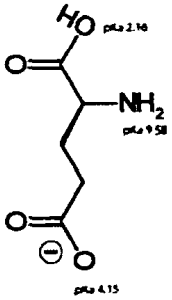
Λυσίνη (Lys) K



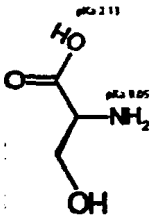
Ασπαραγινικό Οξύ (Asp) D



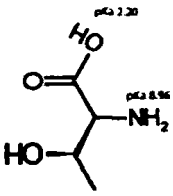
Γλουταμινικό Οξύ (Glu) E



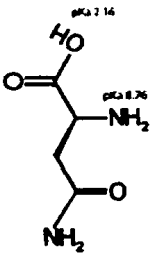
Σερίνη (Ser) S



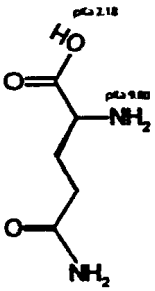
Θρεονίνη (Thr) T



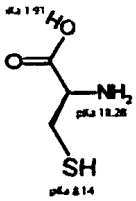
Ασπαραγίνη (Asn) N



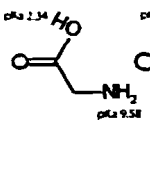
Γλουταμίνη (Gln) Q



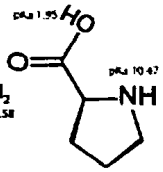
Κυστεΐνη (Cys) C



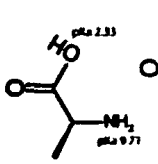
Γλυκίνη (Gly) G



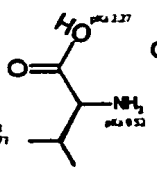
Προλίνη (Pro) P



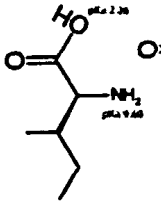
Αλανίνη (Ala) A



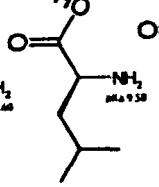
Βαλίνη (Val) V



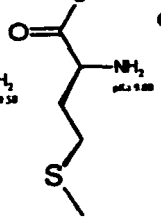
Ισολευκίνη (Ile) I



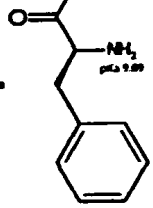
Λευκίνη (Leu) L



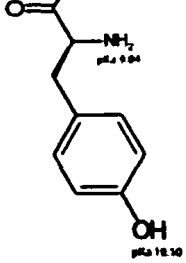
Μεθειονίνη (Met) M



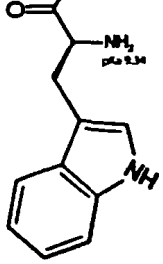
Φαινυλαλανίνη (Phe) F



Τυροσίνη (Tyr) Y



Τρυπτοφάνη (Trp) W



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Acm	Ακεταμιδομεθυλομάδα
Ala (A)	Αλανίνη
Arg (R)	Αργινίνη
Asn (N)	Ασπαραγίνη
Asp (D)	Ασπαραγινικό Οξύ
BNP	Νατριοουρτικό Πεπτίδιο Β-Τύπου
Boc	*tert*-Βουτυλοξυκαρβονυλομάδα
BOP	Βενζοτριαζολ-οξυ-τρις-(διμεθυλαμινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας
***t*-Bu**	*tert*-Βουτυλομάδα
Bum	*tert*-Βουτοξυμεθυλομάδα
Bzl	Βενζυλομάδα
CIC	*N*-Κυκλοεξυλο-*N'*-ισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο
CK	Κινάση της Κρεατίνης
CRP	C-Αντιδρώσα Πρωτεΐνη
Cys (C)	Κυστεΐνη
DCC	*N,N'*-Δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DCU	*N,N'*-Δικυκλοεξυλοουρία
DIC	*N,N'*-Διισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο
DIEA	*N,N*-Διισοπροπυλαιθυλαμίνη
DMF	*N,N'*-Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMS	Διμεθυλοσουλφίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DTT	Διθειοθρεϊτόλη
EDC	*N*-Αιθυλο-*N'*-(3-διμεθυλοαμινοπροπυλο)καρβοδιιμίδιο
EDT	Αιθανοδιθειόλη
FTnI	Σκελετική Τροπονίνη Ι Γρήγορης Σύσπασης
FTnC	Σκελετική Τροπονίνη C Γρήγορης Σύσπασης
FTnT	Σκελετική Τροπονίνη Τ Γρήγορης Σύσπασης
CTnI	Καρδιακή Τροπονίνη Ι
CTnC	Καρδιακή και Σκελετική Τροπονίνη C Αργής Σύσπασης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

CTnT	Καρδιακή Τροπονίνη Τ
EIS	Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης
Fmoc	9-Φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλομάδα
Gln (Q)	Γλουταμίνη
Glu (E)	Γλουταμινικό Οξύ
Gly (G)	Γλυκίνη
GP	Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου
HATU	Εξαφωσφορικό άλας της Ο-(7-αζαβενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλοουρίας
HBTU	Βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο- εξαφθοροφωσφορικό άλας
HF	Υδροφθόριο
His (H)	Ιστιδίνη
HOAt	1-Υδροξυ-7-αζαβενζοτριαζόλιο
HOBt	1-Υδροξυβενζοτριαζόλιο
Ile (I)	Ισολευκίνη
ivDde	1-(4,4-Διμεθυλ-2,6-διοξοκυκλοεξ-1-υλιδεν)-3-μεθυλ-βουτυλομάδα
Leu (L)	Λευκίνη
Lys (K)	Λυσίνη
Mb	Μυογλοβίνη
Mbh	4,4΄- Διμεθοξυβενζιδρυλομάδα
Met (M)	Μεθειονίνη
Mmt	4-Μεθοξυτριτυλομάδα
MS	Φασματομετρία Μάζας
Mtr	4-Μεθοξυ-2,3,6-τριμεθυλοφαινυλο- σουλφονυλομάδα
Mtt	4-Μεθυλοτριτυλομάδα
OAll	Αλλυλοξυομάδα
OBzl	Βενζυλοξυομάδα
ODie	2,3,4-Τριμεθυλ-πεντ-3-οξυομάδα
ODmab	1-(4,4-Διμεθυλ-2,6-διοξο- κυκλοεξυλιδεν)3-μεθυλ-βουτυλ-βενζυλοξυομάδα
Orn	Ορνιθίνη
OtBu	*tert*-Βουτυλοξυομάδα
Oxyma	2-Κυανο-2-(υδροξυϊμινο) οξικός αιθυλεστέρας
Pbf	2,2,4,6,7-Πενταμεθυλο-διϋδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλομάδα
Phe (F)	Φαινυλαλανίνη
Pmc	2,2,5,7,8-Πενταμεθυλο-χρωμανο-6-σουλφονυλομάδα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Pro (P)	Προλίνη
PyBOP	Βενζοτριαζολ-οξυ-τρις-(πυρολιδινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας
PyBroP	Βρωμο-τρις-(πυρολιδινο)-φωσφονιο εξαφθοροφωσφορικό άλας
RP-HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Ανάστροφης Φάσης
Ser (S)	Σερίνη
STnI	Σκελετική Τροπονίνη Ι Αργής Σύσπασης
STnT	Σκελετική Τροπονίνη Τ Αργής Σύσπασης
TBTU	Βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο- τετραφθοροβορικό άλας
TES	Τριαιθυλοσιλάνιο
TFA	Τριφθοροοξικό Οξύ
Thr (T)	Θρεονίνη
TIS	Τριισοπροπυλοσιλάνιο
Tmob	2,4,6-Τριμεθοξυβενζυλομάδα
Trp (W)	Τρυπτοφάνη
Tyr (Y)	Τυροσίνη
TnC	Τροπονίνη C
TnI	Τροπονίνη I
TnT	Τροπονίνη T
Trt	Τριτυλομάδα
Val (V)	Βαλίνη
Z	Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ