

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός σε Στερεή Κατάσταση.

Ένα ανεκτίμητο εργαλείο στη Φαρμακευτική Χημεία.

Θ. Μαυρομούστακος*, Ι. Νταλιάνη, Π. Ζουμπουλάκης, Α. Κολοκούρης

Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Βασιλέως Κων/νου 48, Αθήνα 11635

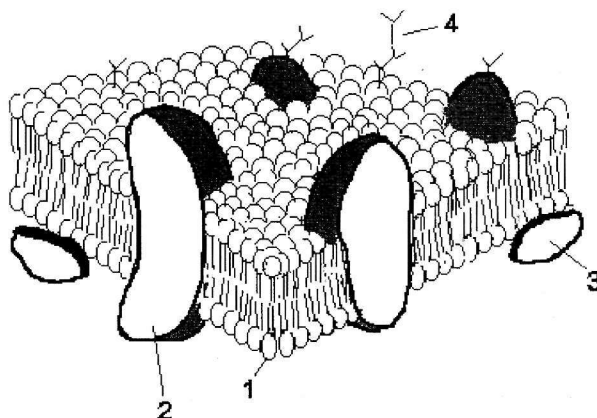
Περίληψη □ Η δημοσίευση αυτή αποτελεί άρθρο ανασκόπησης στο οποίο παρουσιάζονται παραδείγματα από την ερευνητική δραστηριότητα της ομάδας Φαρμακευτικής Χημείας, Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης, Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Στο άρθρο αυτό εξαιρείται η σημασία του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Στερεής Κατάστασης στην επίλυση προβλημάτων τα οποία αναφέρονται στην κατανόηση της δράσης φαρμακευτικών μορίων και το σχεδιασμό άλλων με πιθανά βελτιωμένη βιολογική δράση.

Εισαγωγή

1. Γιατί μελετώνται οι αλληλεπιδράσεις φαρμακευτικών μορίων με τις βιολογικές μεμβράνες;

Στο παρελθόν η έρευνα στη Φαρμακευτική Χημεία εστίαζε την προσοχή της στις Ποσοτικές Σχέσεις Δομής Δράσης (Quantitative Structure Activity Relationships) μεταξύ φαρμακευτικών μορίων και υποδοχέα στον οποίο δρούσαν. Το γεγονός όμως ότι το δραστικό μέρος του υποδοχέα στο οποίο οφείλεται η δράση του φαρμακευτικού μορίου μπορεί να είναι ενσωματωμένο στις μεμβράνες (Σχήμα 1) δεν είχε ληφθεί ιδιαίτερα υπόψιν από την επιστημονική κοινότητα.

Ένα φαρμακευτικό μόριο, ιδιαίτερα αν είναι λιπόφιλο, για να προσδεθεί στο μεμβρανικό τμήμα του υποδοχέα πρέπει πρώτα να διεισδύσει στην λιποειδή διπλοστιβάδα και μετά να διαχυθεί προς τον υποδοχέα^{1,3}. Επομένως κατά την αλληλεπίδραση των φαρμακευτικών μορίων στις μεμβράνες μπορούν να παρατηρηθούν αλλαγές τόσο στις μεμβράνες όσο και στο φαρμακευτικό μόριο.



Σχήμα 1: Παράσταση της κυτταρικής μεμβράνης. 1: λιπίδιο, 2: διαμπερές πρωτεΐνη, 3: περιφερική πρωτεΐνη, 4: αλυσίδα υδατάνθρακα.

Οι αλλαγές αυτές συνοψίζονται παρακάτω:

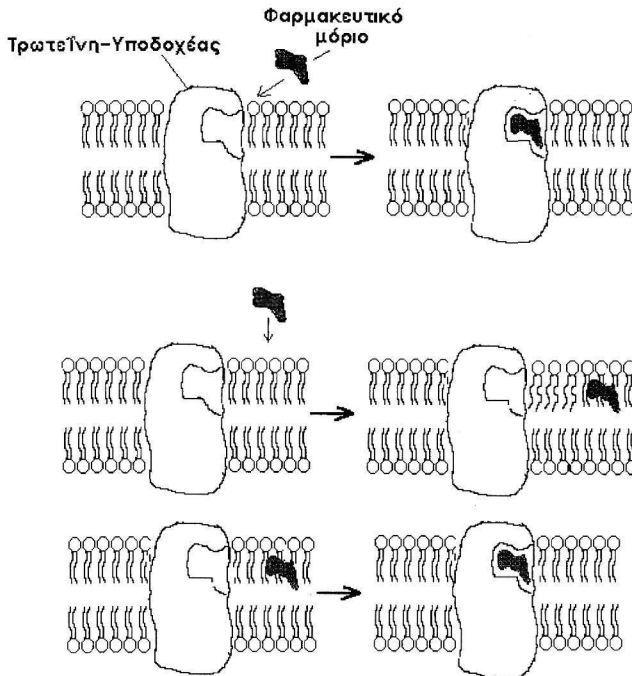
(α) Στη δομή της μεμβράνης.

- (i) Αλλαγή στη διαμόρφωση των ακυλικών ομάδων (trans-gauche ισομερειώσεις).
- (ii) Αύξηση της μεμβρανικής επιφάνειας.
- (iii) Αλλαγή στην περιοδικότητα (πάχος) της μεμβράνης (d-spacing).
- (iv) Αλλαγή στη φάση μετασχηματισμού (ρευστότητα, συνεργατικότητα).
- (v) Αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης και την εμφάνιση της πολικής κεφαλής.

(β) Διαμόρφωση και φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμακευτικού μορίου.

- (i) Η διάχυση του φαρμακευτικού μορίου στις μεμβράνες μπορεί να έχει καθοριστική σημασία στην εξάσκηση της βιολογικής δράσης του. Συγκεκριμένα, η μεμβράνη μπορεί να βοηθά ή να παρεμποδίζει τη διάχυσή του και επομένως να συνιστά τον παράγοντα ελέγχου στην εξά-

*Υπεύθυνος αλληλογραφίας



Σχήμα 2: Μηχανισμοί δράσης φαρμακευτικών μορίων στην κυτταρική μεμβράνη (άνω). Το φαρμακευτικό μόριο δρα απευθείας στο μεμβρανικό υποδοχέα (κάτω). Το μόριο διαχέεται πλευρικά και προσδένεται στον υποδοχέα. (μέσο). Το μόριο εξασκεί τη βιολογική του δράση απευθείας μέσω των λιπιδίων.

σηση της φαρμακολογικής του δράσης.

(ii) Η είσοδος ενός μορίου στις μεμβράνες μπορεί να προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωσή του. Η αλλαγή της διαμόρφωσής του μπορεί να επιταχύνει, να επιβραδύνει ή και ακόμη να παρεμποδίσει τη βιολογική του δράση (Σχήμα 2).

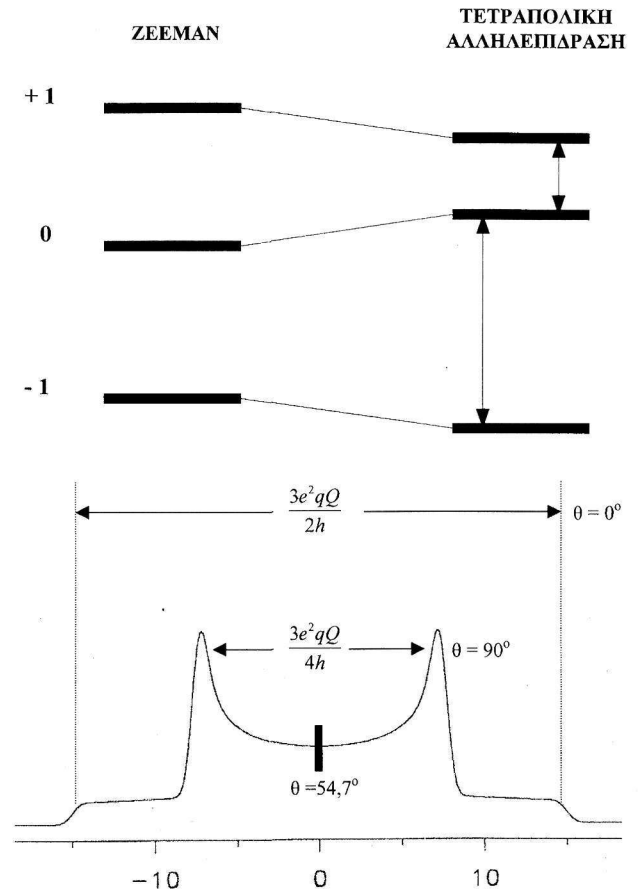
Καθίσταται σαφές από την παραπάνω σύντομη συζήτηση ότι το σύστημα μεμβράνη:φαρμακευτικό μόριο μεταβάλλεται κατά την αλληλεπίδρασή του. Αυτές οι αλλαγές συμβαίνουν τόσο στις μεμβράνες όσο και στο ίδιο το φαρμακευτικό μόριο και είναι αποφασιστικοί παράγοντες για την εξάσκηση βιολογικής δράσης.

Ακολουθεί περιγραφή των τεχνικών φασματογραφίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού όπως εξελίχθηκαν ιστορικά. Αρχικά αναπτύχθηκε ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός στερεής κατάστασης σε στατικά και στη συνέχεια σε περιστρεφόμενα δείγματα.

2. NMR δευτερίου ($^2\text{H-NMR}$) στερεών σε στατική κατάσταση.

Σε αυτή την τεχνική το δείγμα εισέρχεται στο μαγνητικό πεδίο χωρίς να περιστρέφεται και υπόκειται σε ακολουθία παλμών που επιτρέπει τη λήψη φασμάτων με ικανοποιητική τιμή σήμα/θόρυβο (S/N).

Είναι πλέον ρουτίνα η λήψη φασμάτων με αντιστροφή μορφή (spin) $I=1/2$ (^{13}C , ^{31}P , ^{15}N) και $I=1$ (^2H , ^{14}N). Τα φάσματα αυτά δίνουν αρκετές πληροφορίες για τη διαμόρφωση και τις δυναμικές ιδιότητες βιοπολυμερών (π.χ. μεμ-



Σχήμα 3: (άνω) Ενεργειακές στοιβάδες Zeeman και τετραπολική αλληλεπίδραση. (κάτω) Τυπικό φάσμα ^2H . Στο φάσμα δείχνονται οι τετραπολικές διασχίσεις των 90° και 90° καθώς και η θέση της μαγικής γωνίας.

βράνες και πρωτεΐνες), οργανικών και πολυμερών ενώσεων.

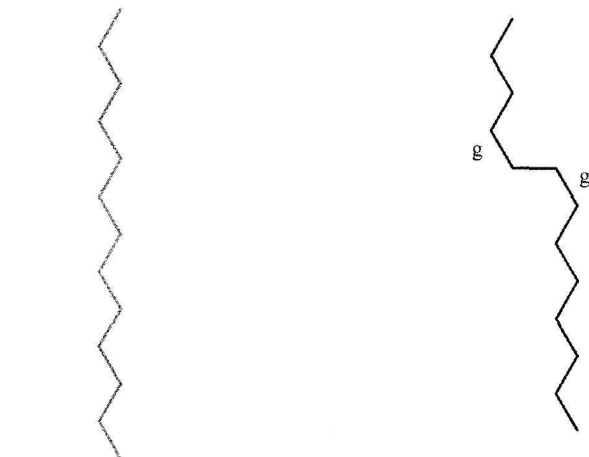
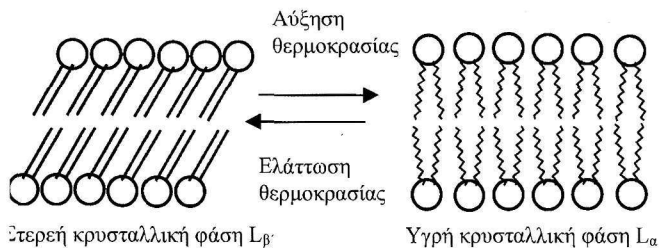
Το NMR δευτερίου ($I=1$) σε στερεή κατάσταση είναι κατάλληλο για μελέτες ανισοτροπικών συστημάτων όπως οι μεμβράνες.

Στο εργαστήριό μας η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεμβρανών με άλλα μόρια, όπως πρωτεΐνες, χοληστερόλη ή βιοδραστικά μόρια. Αυτά τα πειράματα διεξάγονται με ειδική επισήμανση (π.χ. με δευτέριο) του λιπιδίου ή της προς μελέτη ουσίας. Όταν ένας τετραπολικός πυρήνας ($I>1/2$) τίθεται σε μαγνητικό πεδίο, οι κύριοι ενεργειακοί όροι που καθορίζουν τις μεταπτώσεις του είναι οι Zeeman και ο τετραπολικός. Τα ενεργειακά επίπεδα λόγω Zeeman είναι τρία γιατί το δευτέριο έχει $I=1$.

Αυτά διαταράσσονται από την τετραπολική αλληλεπίδραση όπως φαίνεται στο Σχήμα 3. Η τετραπολική ροπή του πυρήνα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τετραπολικής σχάσης στο σήμα NMR (Σχήμα 3) η οποία δίνεται από τη μαθηματική εξίσωση:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} (e^2qQ/h) (3\cos^2\theta - 1) \quad (1)$$

όπου:



Σχήμα 4: Ισομερείωση ακυλικών αλυσίδων σε λιποειδείς διπλοστοιβάδες με ανύψωση της θερμοκρασίας.

eQ: πυρηνική ηλεκτρική τετραπολική ροπή (μέτρο ελειτουργικότητας της κατανομής φορτίου του πυρήνα).

eq: ηλεκτρικό βαθμωτό πεδίο. Εξαρτάται από το περιβάλλον του προς μελέτη πυρήνα.

Ο όρος e^2qQ/h είναι η στατική τετραπολική σταθερά σύζευξης, που για τους παραφινικούς δεσμούς C-D στα φωσφολιπίδια είναι 167 KHz.

$3\cos^2\theta - 1 = S_{CD}$ είναι η παράμετρος τάξης (order parameter) η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει το μέσο όρο κινητικότητας του ανύσματος του δεσμού C-D σχετικά με τον καθορισμένο άξονα συμμετρίας.

Επομένως, ένα επισημασμένο στερεό με ένα δευτέριο δίνει δύο κορυφές συντονισμού που η τετραπολική του σχάση εξαρτάται από τον προσανατολισμό του δεσμού C-D ως προς το μαγνητικό πεδίο. Αν το δείγμα είναι ετερογενές τότε ταυτόχρονα θα ληφθούν διαφορετικά φάσματα. Σε περίπτωση που υπάρχει τυχαία κατανομή όλων των προσανατολισμών, τα λαμβανόμενα φάσματα θα υπερκαλύπτονται για να παραχθεί ένα φάσμα σαν αυτό που δείχνεται στο Σχήμα 3, όπου καθορισμένα σημεία καμπής εμφανίζονται στις γωνίες 0° και 90° μεταξύ του άξονα του δεσμού και του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα δευτερίου (φάσμα De-Pake) το έχει ληφθεί από διπλοστοιβάδα δευτεριωμένης διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC) στους 42°C .

Στα σημεία καμπής όπου η γωνία είναι $\Theta=0^\circ$ και ο δεσμός C-D είναι παράλληλος με το μαγνητικό πεδίο, η $\Delta\nu_Q$ υπολογίζεται ότι είναι $3/2 (e^2qQ/h)$.

Όταν $\theta=90^\circ$, ο δεσμός C-D είναι κάθετος με το μαγνη-

τικό πεδίο και η $\Delta\nu_Q$ υπολογίζεται ότι είναι $3/4 (e^2qQ/h)$.

Όταν $\theta=54.77^\circ$ η $\Delta\nu_Q$ υπολογίζεται ότι είναι 0. Η γωνία αυτή όπως θα δούμε παρακάτω ονομάζεται "μαγική".

Στη γωνία αυτή δεν υπάρχει τετραπολική σχάση και εμφανίζεται στο φάσμα μία κορυφή.

Η τετραπολική σχάση είναι συνάρτηση της μοριακής κίνησης του προς μελέτη δείγματος: αύξηση της μοριακής κίνησης ελαττώνει την τιμή της. Όταν η κίνηση των μορίων είναι ταχεία (όπως των μορίων που είναι διαλυμένα σε διαλύτες με μικρό ιξώδες) τότε οι διαφορές τετραπολικής διάσχισης, λόγω διαφορετικών γωνιών, εξουδετερώνονται και το φάσμα απλοποιείται σε μια ισοτροπική γραμμή^{4,5}. Το εργαστήριό μας χρησιμοποιεί εκτεταμένα $^2\text{H-NMR}$ για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων βιοδραστικών μορίων σε φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες. Για το σκοπό αυτό χρειάζεται επισημάνση φωσφολιπιδίων. Επίσης το $^2\text{H-NMR}$ χρησιμοποιείται για την εύρεση του προσανατολισμού των φαρμακευτικών μορίων στις φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες. Αυτό επιτυγχάνεται με επισημάνση φαρμακευτικών μορίων όπως θα εξηγήσουμε παρακάτω.

3. Φάσεις μετασχηματισμού στις πρότυπες διπλοστοιβάδες φωσφατιδυλοχολινών

Τα φωσφολιπίδια όπως είναι οι φωσφατιδυλοχολίνες είναι μια ομάδα λιπιδίων τα οποία είναι σε αφθονία στις μεμβράνες. Στα βιολογικά συστήματα, αυτά είναι πάντοτε σε υδατικό περιβάλλον, όπου σχηματίζουν αυθόρμητα διαλυτοποιημένες διπλοστοιβάδες.

Σε τέτοιες συνθήκες μπορούν να υπάρχουν σε δύο μεσομορφικές φάσεις γνωστές σαν L_β και L_α . Η L_β καλείται στερεή φάση, και αναφέρεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, στις οποίες τα φωσφολιπίδια διατάσσονται σε ημικρυσταλλικό πήκτωμα και είναι σχετικά ακίνητα (Σχήμα 4). Η υγρή κρυσταλλική φάση L_α προκύπτει σε υψηλότερες θερμοκρασίες όπου γίνεται ένας μετασχηματισμός κατά τον οποίο το υδρόφοβο μέρος τους αποκτά μεγαλύτερη κινητικότητα.

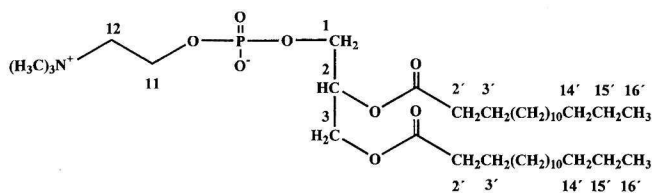
Κατά τον μετασχηματισμό αυτό ο οποίος είναι ανάλογος της διεργασίας της τήξης απορροφάται θερμότητα. Η θερμοκρασία στην οποία γίνεται ο μετασχηματισμός συμβολίζεται με T_c .

Οι περισσότερες ολοκληρωμένες δομικές αναλύσεις σε διαλυτοποιημένες μεμβράνες φωσφολιπιδίων έχουν γίνει με φωσφατιδυλοχολίνες, που είναι τα κύρια συστατικά πολλών βιολογικών μεμβρανών.

Στη φάση πηκτώματος οι λιπαρές ακυλικές αλυσίδες των φωσφατιδυλοχολινών κλίνουν από το κάθετο επίπεδο της διπλοστοιβάδας και οι μεθυλενικές τους ομάδες CH_2-CH_2 είναι όλες trans.

Ο μετασχηματισμός τους συνοδεύεται από δημιουργία περιστροφικών ισομερών από τους C-C δεσμούς όπως δείχνεται στο Σχήμα 4.

Ως πρότυπες μεμβράνες χρησιμοποιούνται κύρια διπλοστοιβάδες διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC)



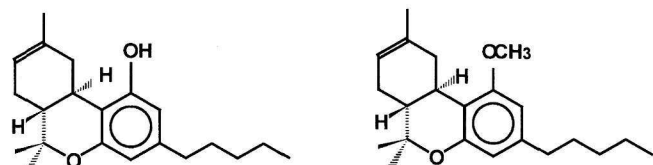
Σχήμα 5: Χημική Δομή της DPPC

(Σχήμα 5). Οι ιδιότητες των διπλοστοιβάδων αυτών έχουν μελετηθεί εκτεταμένα με διάφορες βιοφυσικές μεθόδους. Σε υδατικό περιβάλλον σχηματίζουν αυθόρμητα διαλυτοποιημένες μεμβράνες και απαντώνται στις δύο προαναφερθείσες μεσομορφικές φάσεις. Στην DPPC ο μετασχηματισμός γίνεται στους 41,2 °C. Σύμφωνα με τα δεδομένα φασματογραφίας στην περιοχή των 35 °C για τη DPPC παρουσιάζεται ένα μικρής ενθαλπίας ενδόθερμο φαινόμενο. Σε αυτό συνυπάρχουν και οι δύο φάσεις⁶.

4. Εφαρμογή του ²H-NMR των φαρμακευτικών μορίων των δυναμικών ιδιοτήτων στις μεμβράνες

Για τη μελέτη των δομικών απαιτήσεων για βιολογική δραστηριότητα, συγκρίνεται η θερμοτροπική συμπεριφορά διαφορετικών μορίων με παρόμοια χημική δομή, που έχουν όμως διαφορετική βιολογική δραστηριότητα. Τέτοιο ζεύγος αποτελεί το ψυχρότροπα δραστικό μόριο Δ⁸-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ⁸-THC) και ο μη δραστικός της Ο-μεθυλαιθέρας (Σχήμα 6). Η διαφορά στη δομή τους έγκειται στην παρουσία ενός φαινολικού υδροξυλίου στη Δ⁸-THC που είναι μοριακή απαίτηση για κανναβομιμητική δραστηριότητα και προσδίνει αμφοτερικότητα στο μόριο. Ο μεθυλαιθέρας της στερείται αυτού του φαινολικού υδροξυλίου και είναι επομένως μόριο πιο υδρόφοβο⁷.

Το Σχήμα 7 δείχνει αντιπροσωπευτικά φάσματα ²H-NMR από διπλοστοιβάδες πλήρους ενυδατωμένης DPPC που έχει δύο ισοδύναμες ²H-επισημάνσεις στην 7'-μεθυλομάδα της sn-2 αλυσίδας. Το παρασκεύασμα που περιέχει μόνο DPPC στους 27 °C παράγει φάσμα με κυκλική (rounded-top) κορυφή. Το πλάτος της κορυφής στη στερεή κατάσταση είναι 120 KHz και είναι το ήμισυ αυτού που αναμένεται για την DPPC, όταν είναι σε καθαρή, μη ενυδατωμένη κωνιοποιημένη στερεή φάση. Αυτό δείχνει ότι, ακόμη και σε αυτή την φάση, τα μόρια της DPPC υφίστανται διάχυση διαμέσου του κυρίως τους άξονα. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται προς τους 37 °C όπου η διπλο-



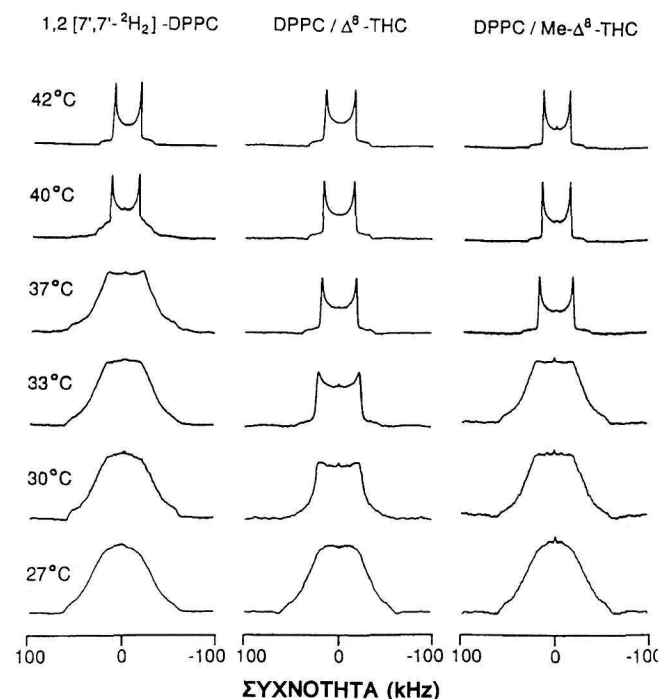
Δ⁸-τετραϋδροκανναβινόλη

Me-Δ⁸-τετραϋδροκανναβινόλη

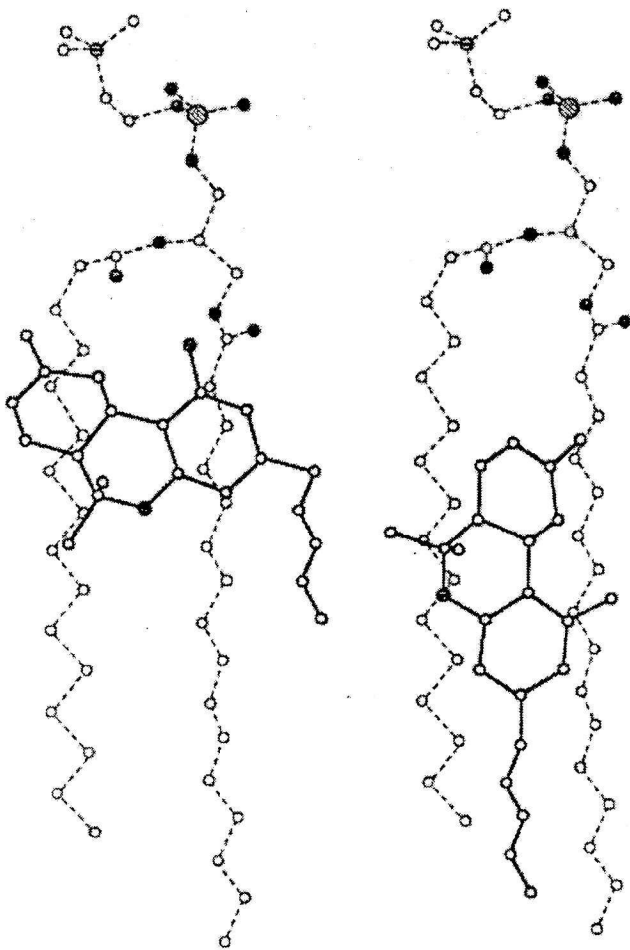
Σχήμα 6: Χημικές Δομές της Δ8-THC και Me-Δ⁸-THC.

στοιβάδα της DPPC μεταβαίνει στη P_β φάση που συναντάται μεταξύ της προ μετάβασης φάσης και της κύριας μετάβασης φάσης, τα ακρότατα των 90⁰ και 0⁰ αρχίζουν να διαφαινούνται. Στους 40 °C η μορφή του φάσματος δηλώνει τη συνύπαρξη των L_β και L_α φάσεων σε διπλοστοιβάδες της DPPC. Όταν η θερμοκρασία είναι άνω της T_c, το φάσμα της είναι ολοκληρωτικά υγρού κρυσταλλικού τύπου.

Η τετραπολική σχάση, που όπως ήδη αναφέραμε μετριέται απευθείας από την απόσταση των δύο κορυφών 90⁰, στο φάσμα της DPPC στους 42 °C είναι 28,6 KHz. Οι ισχυρότερες επιδράσεις της Δ⁸-THC στις φασματικές γραμμές παράγονται κατά το μετασχηματισμό από τη στερεή φάση στην υγρή κρυσταλλική. Στους 27 °C το παρασκεύασμα της DPPC+ Δ⁸-THC (χ=20%-mol) παράγει ένα φάσμα στερεής κατάστασης με επίπεδη κορυφή, όμοια με αυτή που παρατηρείται από τη DPPC στους 33 °C. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, το πλάτος του φάσματος ελαττώνεται. Οι γωνίες της επίπεδης κορυφής μετατρέπονται σε 90⁰ και το κέντρο του φάσματος αναπτύσσει μεγαλύτερο βάθος. Τα φασματικά σχήματα που ελήφθησαν από το παρασκεύασμα της DPPC+ Δ⁸-THC (χ=20%-mol) στους 30 και 33 °C ποτέ δεν παρατηρήθηκαν σε παρασκεύασμα διπλοστοιβάδας DPPC σε οποιαδήποτε άλλη θερμοκρασία και είναι χαρακτηριστικό ότι υπάρχουν στο δείγμα οι δύο φάσεις της στερεής και της υγρής κρυσταλλικής. Όταν η θερμοκρασία είναι μεγαλύτερη ή ίση των 37 °C το φάσμα δείχνει χαρακτηριστικά υγρού κρυσταλλικού τύπου. Ο μετασχηματισμός από τη στερεή στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, όπως εκδηλώνεται από τη μεταβολή του φάσματος, γίνεται μεταξύ 27 °C -37 °C.

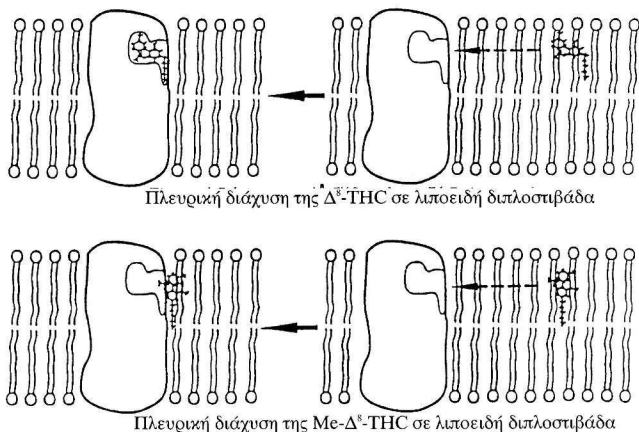


Σχήμα 7: Σύγκριση ²H φασμάτων (A) 2[7,7²H]-DPPC (B) 2[7,7²H]-DPPC+20%-mol Δ⁸-THC και 2[7,7²H]-DPPC+20%-mol Me-Δ⁸-THC.



Σχήμα 8: Προσανατολισμός Δ^8 -THC (A) και $Me\text{-}\Delta^8$ -THC (B) στις λιποειδείς διπλοστοιβάδες.

Αντίθετα, καμία επίδραση όσον αφορά το σχήμα των φασμάτων δεν παρατηρήθηκε στις διπλοστοιβάδες της DPPC που περιείχαν $Me\text{-}\Delta^8$ -THC. Η μόνη διαφορά μεταξύ των παρασκευασμάτων της DPPC και DPPC+ $Me\text{-}\Delta^8$ -THC είναι ότι τα φάσματα εμφανίζονται μετατοπισμένα



Σχήμα 9: Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των κανναβινοειδών. Η διαφορετική τοπογραφία των δύο κανναβινοειδών έχει ως αποτέλεσμα τη διαφορετική ικανότητα πρόσδεσής τους στον υποδοχέα μέσω πλευρικής διάχυσης.

σε θερμοκρασίες χαμηλότερες κατά 4 K. Για παράδειγμα, το φάσμα της DPPC+ $Me\text{-}\Delta^8$ -THC στους 33 °C εμφανίζεται το ίδιο με αυτό της καθαρής DPPC στους 37 °C.

Δευτερίωση της DPPC μπορεί να γίνει και σε άλλες θέσεις. Σε δημοσίευσή μας μελετήσαμε τις αλληλεπιδράσεις δευτεριωμένης DPPC στην πολική ομάδα, μεσόφαση, στο μέσο της υδροφοβικής αλύσου και στην τελική μεθυλομάδα της υδροφοβικής αλύσου με τα δύο προαναφερθέντα μόρια⁸. Με αυτό τον τρόπο μπορεί κανείς να λάβει πληροφορίες για το πώς συμπεριφέρεται δυναμικά ένα μόριο σε όλη την περιοχή της διπλοστοιβάδας.

5. Μπορεί να βοηθήσει η Φασματογραφία $^2\text{H-NMR}$ σε στερεή κατάσταση στη λήψη πληροφοριών για τον προσανατολισμό φαρμακευτικών μορίων στις μεμβράνες;

Η μέθοδος της δευτερίωσης χρησιμοποιείται για την εύρεση προσανατολισμού μορίων στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Η εύρεση του προσανατολισμού ενός μορίου στις μεμβράνες απαιτεί δευτερίωση του προς μελέτη μορίου σε άκαμπτο μέρος. Πέντε δευτερίώσεις θεωρούνται απαραίτητες για να μπορέσει κανείς να εξάγει τελικά συμπεράσματα. Λεπτομέρειες για το πώς επιτυγχάνεται η εύρεση του προσανατολισμού ενός μορίου στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες υπάρχουν στην βιβλιογραφία⁹. Η εύρεση τέτοιου προσανατολισμού εμπλέκει σύνθετη μαθηματική διεργασία και εκφεύγει του σκοπού της ανασκόπησης.

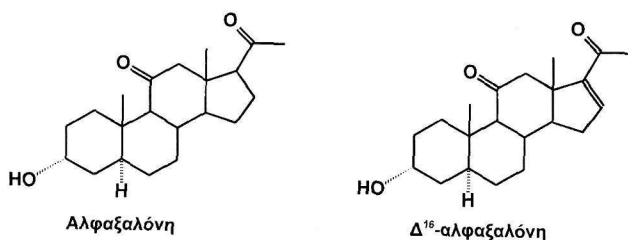
Τα δύο προς μελέτη μόρια επισημάνθησαν με δευτέριο στις θέσεις 2, 4, 8, 10a, 10β, και 10α. Οι υπολογισμοί έδειξαν ότι η Δ^8 -THC προσανατολιζόταν με τον κυρίως άξονά της κάθετο στη διπλοστοιβάδα (Σχήμα 8).

Πιθανώς αυτός ο προσανατολισμός να βελτιστοποιεί την αλληλεπίδραση του φαινολικού υδροξυλίου με τις πολικές ομάδες των μεμβρανών μέσω υδρογονικών δεσμών. Η $Me\text{-}\Delta^8$ -THC προσανατολιζόταν με τον κυρίως άξονα παράλληλο προς τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Από γεωμετρική και μηχανική άποψη το γεγονός ότι ο φυσικός άξονας και ο άξονας περιστροφής συμπίπτουν, δηλώνει την απουσία υδρογονικού δεσμού μεταξύ $Me\text{-}\Delta^8$ -THC και της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Αυτό εξηγεί και την αδυναμία του μορίου να αλληλεπιδρά με τις μεμβράνες στη μεσόφαση όπως δείχνουν και τα αποτελέσματα της διάθλασης ακτίνων-X^{10,11}. Έτσι προκύπτει ο ακόλουθος πιθανός μηχανισμός δράσης των δύο κανναβινοειδών. Τα δύο ανάλογα τοποθετούνται και προσανατολιζονται σε διαφορετικό μέρος στις μεμβράνες. Αυτό έχει ως επακόλουθο τη διαφορετική ικανότητα πρόσδεσής τους στον υποδοχέα μέσω πλευρικής διάχυσης (Σχήμα 9).

6. Κρίσιμη συγκέντρωση στην οποία ένα φαρμακευτικό μόριο ενσωματώνεται στις βιολογικές μεμβράνες

Μια σημαντική ερώτηση στην οποία η μέθοδος του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του δευτερίου σε στερεή κατάσταση μπορεί ν' απαντήσει είναι το ποσοστό στο οποίο εισχωρεί ένα φαρμακευτικό μόριο στις μεμβράνες.

Το παρακάτω παράδειγμα με τα αναισθητικά στεροει-



Σχήμα 10: Χημικές Δομές της αλφαξαλόνης και Δ¹⁶-αλφαξαλόνης.

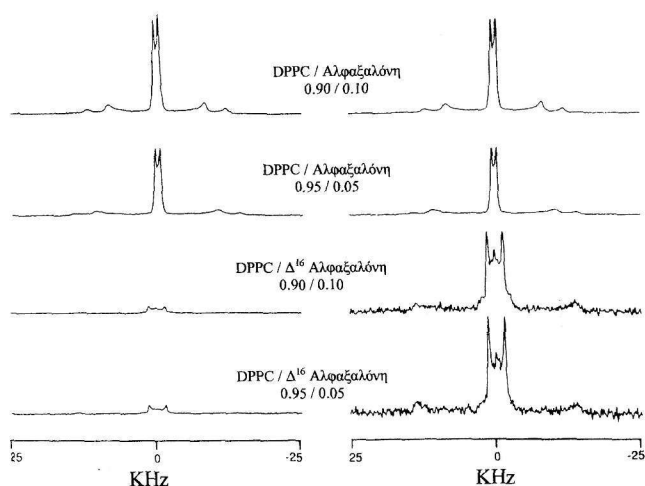
δή αλφαξαλόνη και Δ¹⁶-αλφαξαλόνη (Σχήμα 10) καταδειχνει τη χρήση του. Η αλφαξαλόνη είναι βιολογικά ενεργή ένωση, ενώ η Δ¹⁶-αλφαξαλόνη στερείται βιολογικής δραστηριότητας πιθανώς γιατί ο πενταμελής δακτύλιος της αλφαξαλόνης είναι ελαφρώς έξω από το επίπεδο των άλλων τριών, ενώ της Δ¹⁶-αλφαξαλόνης, που έχει ένα διπλό δεσμό στην 16 θέση, είναι συνεπίπεδος με τους υπολοίπους τρεις^{12,13}.

Από προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι η διαφορά τους αυτή στη βιολογική δραστηριότητα μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική τους δράση στις μεμβράνες. Ένα ερώτημα που τίθεται είναι εάν η διαφορετική τους δράση είναι αποτέλεσμα του διαφορετικού βαθμού διαταραχής που προκαλούν στις μεμβράνες ή της διαφορετικής τους ικανότητας να διεισδύσουν εντός των μεμβρανών. Υπάρχει φυσικά και η περίπτωση που η διαφορετική τους βιολογική δράση, είναι αποτέλεσμα στην συνεισφορά και των δύο παραγόντων.

Τα δευτεριωμένα στεροειδή 9,12a,12b,17,21,21,21-d₇ αλφαξαλόνη και 9,12a,12b, 21,21,21-d₆-Δ¹⁶-αλφαξαλόνη ενσωματώθηκαν σε λιποειδείς διπλοστοιβάδες διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης σε συγκεντρώσεις 1%, 5% και 10%-mol.

Τα φάσματα δευτερίου των έξι παρασκευασμάτων παραθέτονται στο Σχήμα 11. Στα αριστερά του σχήματος εμφανίζονται τα πειραματικά αποτελέσματα. Οι εντάσεις των φασμάτων είναι σε απόλυτη κλίμακα (κανονικοποιημένες). Τα φάσματα στη δεξιά πλευρά αποτελούν προσομοιώματα των πειραματικών.

Όπως φαίνεται στο (Σχήμα 11) τα φάσματα του δευτερίου των λιποειδών διπλοστοιβάδων στα οποία υπάρχει ενσωματωμένη Δ¹⁶-αλφαξαλόνη είναι χαμηλότερης έντασης συγκριτικά με τα φάσματα δευτερίου λιποειδών διπλοστοιβάδων στα οποία δεν υπάρχει ενσωματωμένη αλφαξαλόνη. Το εμβαδόν κάτω από την κεντρική τετραπολική διάσχιση χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης της έκτασης εισδοχής των φαρμακευτικών μορίων στη μεμβράνη. Τα φάσματα με τη δευτεριωμένη Δ¹⁶-αλφαξαλόνη δείχνουν ότι επέρχεται κορεσμός ήδη από το 5%-mol γιατί και τα τρία φάσματα έχουν ίδιο εμβαδόν. Αντίθετα, στην περίπτωση της αλφαξαλόνης υπάρχει γραμμική αύξηση ενσωμάτωσης του στεροειδούς στη μεμβράνη μέχρι 10%-mol γιατί οι εντάσεις των κορυφών στα φάσματα αυξάνονται αντίστοιχα γραμμικά. Αυτό αποδεικνύει ότι το δραστικό στεροειδές εισχωρεί κατά μεγαλύτερο ποσοστό



Σχήμα 11: Φάσματα δευτερίου δευτεριωμένης αλφαξαλόνης και Δ¹⁶-αλφαξαλόνης σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 20 %-mol. Στα αριστερά του σχήματος είναι τα πειραματικά αποτελέσματα. Οι εντάσεις των φασμάτων είναι σε απόλυτη κλίμακα (κανονικοποιημένες). Τα δεξιά φάσματα αποτελούν προσομοιώματα των πειραματικών.

στις μεμβράνες, από ότι το μη δραστικό.

Συμπερασματικά, οι διαφορετικές αλληλεπιδράσεις που έχουν τα φαρμακευτικά μόρια στις μεμβράνες μπορεί να οφείλονται:

- (α) στο διαφορετικό τρόπο δράσης τους, αλλά και
- (β) στο διαφορετικό ποσοστό εισδοχής τους ή και σε συνδυασμό των δύο παραπάνω λόγων¹⁴.

7. Μελέτη δυναμικών αλληλεπιδράσεων φαρμακευτικών μορίων με την πολική κεφαλή των λιποειδών διπλοστοιβάδων χρησιμοποιώντας NMR φωσφόρου-31 σε στατική κατάσταση

Ένα χαρακτηριστικό των πολικών κεφαλών είναι ότι περιέχουν φώσφορο. Ο φώσφορος είναι σχετικά ευαίσθητος πυρήνας (6,6% της ευαισθησίας του υδρογόνου) με αυτοστροφορμή 1/2. Γι' αυτό ο πυρήνας αυτός είναι κατάλληλος για τη λήψη πληροφοριών που αφορούν την αλληλεπίδραση φαρμακευτικών μορίων με την πολική κεφαλή.

Τα φάσματα ³¹P-NMR σε πρότυπες φωσφολιπιδικές και βιολογικές μεμβράνες καλύπτουν ένα εύρος χημικών μετατόπισεων της τάξης των 50 ppm (broad line spectra).

Η μορφή του φάσματος οφείλεται:

- α) στη χημική ανισοτροπία των πυρήνων του φωσφόρου, και
- β) στις διπολικές αλληλεπιδράσεις πρωτονίου-φωσφόρου.

Χημική ανισοτροπία είναι η εξάρτηση της χημικής μετατόπισης (δηλαδή της θέσης του ³¹P-NMR σήματος) σε σχέση με τον προσανατολισμό του μορίου στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Η χημική μετατόπιση εκφράζεται σαν ένας τανυστής:

Η ιστροπική χημική μετατόπιση που παρατηρείται για ένα ταχέως περιστρεφόμενο μόριο σε διάλυμα είναι το έ-

$$\sigma_0 = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix} \quad (2)$$

να τρίτο του ίχνους του τανυστή. Ίχνος ενός τανυστή καλείται το άθροισμα των στοιχείων της διαγωνίου του. Για παράδειγμα για τον τανυστή (2) το ίχνος δίνεται από την εξίσωση (3).

$$\sigma_i = \sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33} \quad (3)$$

Σε περίπτωση αξονικής συμμετρίας ισχύει $\sigma_{22} = \sigma_{33}$ και αναφέρονται σαν σ_i , ενώ το στοιχείο σ_{11} της διαγωνίου σαν σ_{\perp} . Οι τιμές σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} συνήθως εκφράζονται σε ppm και μετρούνται απευθείας από το φάσμα, γιατί αντιπροσωπεύουν τα ακρότατά του. Ένα τέτοιο φάσμα με τα τρία στοιχεία της διαγωνίου εμφανίζεται στο Σχήμα 12.

Η θέση σ_{11} στα αξονικά συμμετρικά φάσματα αντιπροσωπεύει την παρατηρούμενη χημική μετατόπιση, όταν ο προσανατολισμός του κυρίου άξονα είναι παράλληλος με τη διεύθυνση του πεδίου, ενώ σ_i αντιπροσωπεύει την παρατηρούμενη χημική μετατόπιση, όταν ο προσανατολισμός του κυρίου άξονα είναι κάθετος με τη διεύθυνση του πεδίου (Σχήμα 12).

Σε ισχυρά μαγνητικά πεδία, όπου η ανισοτροπία της χημικής μετατόπισης του φωσφορου υπερτερεί των διπολι-

κών αλληλεπιδράσεων με γειτονικά πρωτόνια, η θέση του $^{31}\text{P-NMR}$ σήματος δίνεται από τη σχέση:

$$\nu = \nu_0 = 2/3 \Delta\nu_0 (3\cos^2\theta - 1/2) \quad (4)$$

όπου ν_0 είναι η μέση θέση του σήματος, $\Delta\nu_0$ η χημική ανισοτροπία και θ η γωνία μεταξύ του άξονα συμμετρίας του τανυστή της χημικής μετατόπισης και του μαγνητικού πεδίου. Η εξίσωση 3 θεωρεί ότι ο τανυστής χημικής μετατόπισης είναι αξονικά συμμετρικός.

Σε περίπτωση που τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης υφίστανται ταχεία ιστροπική κίνηση, τότε ο δεύτερος όρος της εξίσωσης 3 μηδενίζεται. Αυτή είναι η περίπτωση των μεμβρανών που κατεργάζονται με υπερήχους (vesicles). Στα λιποσώματα, όμως και στις βιολογικές μεμβράνες ο ιστροπικός ρυθμός είναι αρκετά αργός για να μηδενισθεί αυτός ο όρος. Γενικά όταν ένα φωσφολιπίδιο έχει περιορισμένες αλλά ταχείες κινήσεις στη μεμβράνη, η χημική ανισοτροπία αίρεται μόνο μερικώς. Η εξίσωση 4 αντικαθίσταται σε αυτή την περίπτωση από την εξίσωση 5:

$$\nu = \nu_0 + 2/3 <\Delta\nu_{\text{EFF}}> (3\cos^2\theta - 1/2) \quad (5)$$

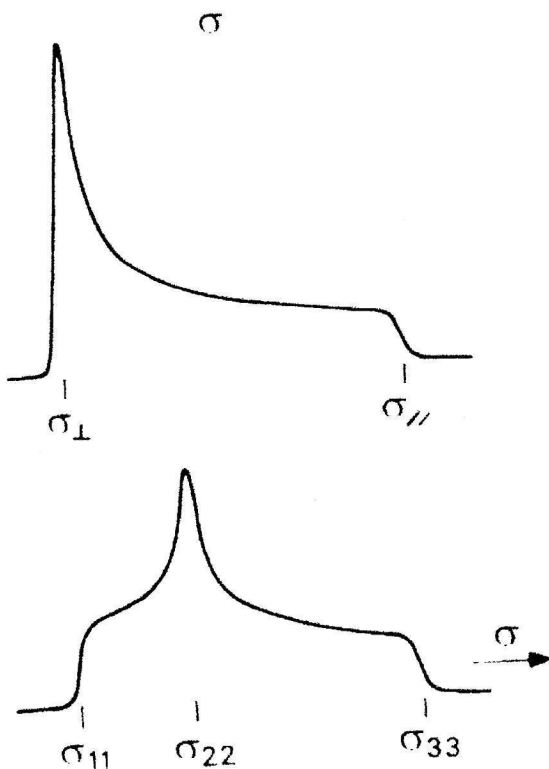
όπου $<\Delta\nu_{\text{EFF}}> = \Delta\nu_0 <3\cos^2\Delta(t) - 1/2>$,

θ η γωνία μεταξύ της μέσης τιμής της διεύθυνσης του άξονα του τανυστή της χημικής μετατόπισης και του μαγνητικού πεδίου και $\Delta(t)$ η γωνία μεταξύ της στιγμιαίας διεύθυνσης αυτού του άξονα και της μέσης διεύθυνσής της. Ένα μη προσανατολισμένο φάσμα μεμβράνης συμπεριλαμβάνει το άθροισμα όλων των δυνατών προσανατολισμών (θ μεταξύ 0 και π).

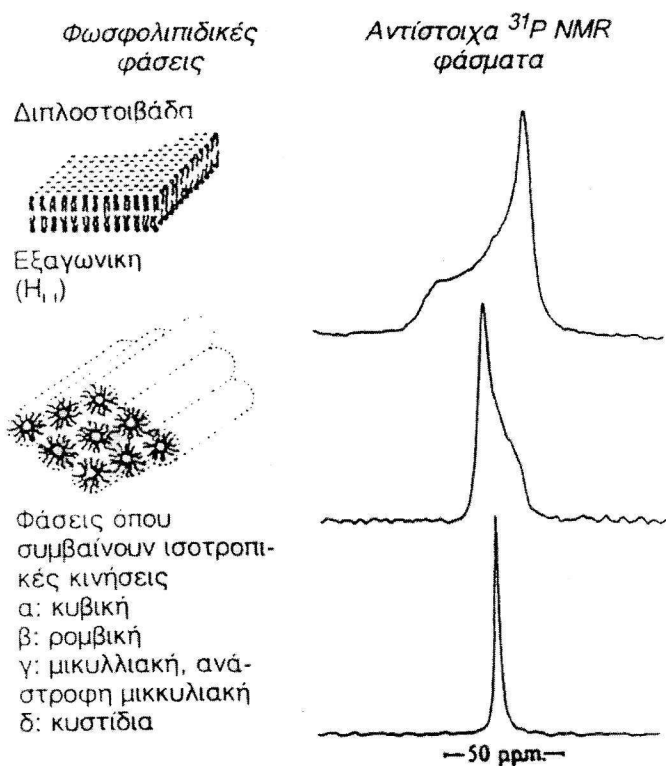
Μια πολύ πρακτική μέθοδος για την απαλλαγή της διπολικής διεύθυνσης λόγω $^{31}\text{P-H}$ αλληλεπιδράσεων είναι η χρήση ισχυρού πεδίου για αποσύζευξη των πρωτονίων (διπολική αποσύζευξη). Η διπολική αποσύζευξη είναι γνωστή πρακτική, όχι μόνο στα στερεά δείγματα, αλλά και στα υγρά. Για παράδειγμα ένα φάσμα ^{13}C , που λαμβάνεται από ένα χημικό, είναι συνήθως αποσυζευγμένο από $^{13}\text{C-H}$ συζεύξεις (scalar coupling). Στην περίπτωση των υγρών χρησιμοποιείται πεδίο αποσύζευξης περίπου 1 gauss (10^{-4} Tesla), ενώ για τα στερεά απαιτείται μεγαλύτερη ισχύς, της τάξης των 10 gauss (10^{-3} Tesla).

Η ικανότητα των ενυδατωμένων λιπιδίων να υφίστανται σε διαφορετικές φάσεις έχει πλέον εξακριβωθεί στη βιβλιογραφία με χρήση διαφόρων φυσικοχημικών μεθόδων. Τα αποτελέσματα αυτών των μεθόδων είναι χρησιμότερα, γιατί η αποτίμηση φασμάτων $^{31}\text{P-NMR}$ βασίζεται σ' αυτά. Τα χαρακτηριστικά φάσματα του φωσφορου του σχήματος 13 δείχνουν τις διάφορες πιθανές φάσεις που μπορεί να ευρισκονται τα ενυδατωμένα φωσφολιπίδια στις μεμβράνες (Σχήμα 13)^{15,16}.

Τα φάσματα φωσφορου-31 των τριών παρασκευασμάτων (α) DPPC, (β) DPPC/ Δ^8 -THC, και (γ) DPPC/Me- Δ^8 -THC εμφανίζονται στο Σχήμα 14.



Σχήμα 12: $^{31}\text{P-NMR}$ φάσματα (άνω) με αξονική συμμετρία και (κάτω) χωρίς αξονική συμμετρία.

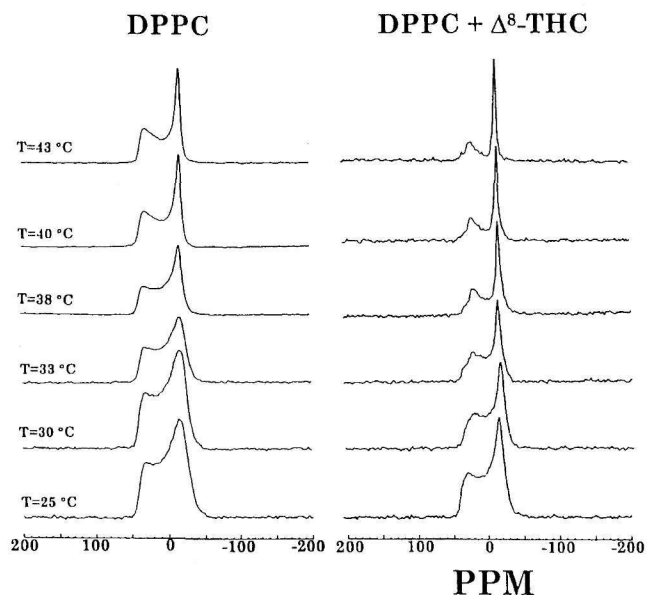


Σχήμα 13: Φωσφολιπιδικές φάσεις και τα αντίστοιχα φάσματα ^{31}P .

Τα φάσματα ^{31}P αποτελούνται από μια πλατιά κορυφή χαμηλής έντασης και μια στενή κορυφή υψηλής έντασης. Η φάση μετασχηματισμού από τη στερεή στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση η οποία παρατηρείται στους 40 °C έχει ως αποτέλεσμα το περαιτέρω στένεμα της υψηλής έντασης κορυφής. Η λιποειδής διπλοστοιβάδα της DPPC στους 33°C είναι στη φάση προ μετασχηματισμού γιατί η ένταση του φάσματος είναι χαμηλή. Η φάση προ μετασχηματισμού είναι γνωστό επίσης ότι συνοδεύεται από αλλαγές στις εντάσεις της πολικής κεφαλής.

Η ενσωμάτωση της Me- Δ^8 -THC προκαλεί: (α) χαμήλωμα των φασματικών εντάσεων κατά 3 °C συγκριτικά με τη λιποειδή διπλοστοιβάδα της DPPC που δεν περιέχει φαρμακευτικό μόριο. Επιπρόσθετα, το στένεμα της υψηλής εντάσεως κορυφής ξεκινά από χαμηλότερες θερμοκρασίες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η παρουσία της Me- Δ^8 -THC προκαλεί μετατόπιση της προφάσης και φάσης μετασχηματισμού της DPPC σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Η παρουσία της Δ^8 -THC προκαλεί σημαντικότερες μεταβολές. Στους 25 °C η διπλοστοιβάδα της DPPC/ Δ^8 -THC είναι σε περισσότερο ρευστή κατάσταση συγκριτικά με τα άλλα δύο παρασκευάσματα όπως φαίνεται από το στένεμα της υψηλής κορυφής. Στους 30 °C οι εντάσεις των κορυφών ελαττώνονται και η υψηλότερης έντασης κορυφή στενεύει. Αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης της στενής κορυφής σε σχέση με αυτή της χαμηλότερης έντασης. Σύγκριση των φασμάτων στους 41°C δείχνει ότι οι κορυφές στο παρασκεύασμα το



Σχήμα 14: Τα φάσματα φώσφορον-31 (^{31}P) των τριών παρασκευασμάτων: (α) DPPC, (β) DPPC/ Δ^8 -THC και (γ) DPPC/Me- Δ^8 -THC στις θερμοκρασίες 25-43 °C.

οποίο περιέχει το δραστικό ανάλογο εμφανίζονται με υψηλότερη ένταση.

Συμπερασματικά, η παρουσία του δραστικού κανναβινοειδούς αναλόγου προκαλεί μεγαλύτερη ρευστοποίηση.

Ο λόγος των εντάσεων ελαχίστου και μεγίστου της φασματικής γραμμής παριστάνεται ως συνάρτηση θερμοκρασίας για τα παρασκευάσματα DPPC και DPPC/Me- Δ^8 -THC (Σχήμα 15).

Από το σχήμα 15 αυτό είναι εμφανές ότι η φάση μετασχηματισμού της DPPC είναι στους 35 °C, ενώ του παρασκευάσματος με Me- Δ^8 -THC στους 30°C^{17,18}.

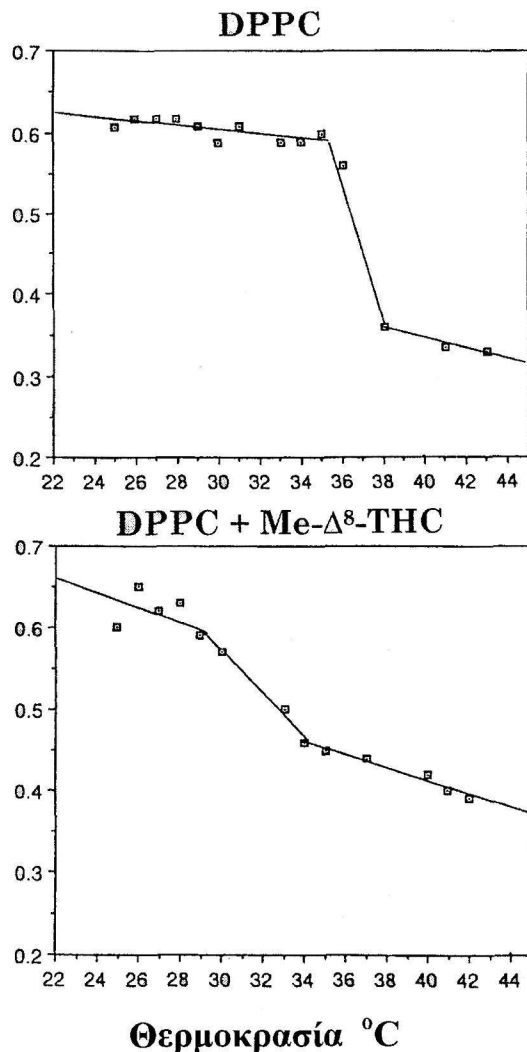
8. Μπορούν να ληφθούν φάσματα υψηλής διαχωριστικότητας σε στερεή κατάσταση;

Ιστορικά, η λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) υψηλής διαχωριστικότητας ήταν εφικτή μόνο σε διαλύματα και αέρια. Τα στερεά έδιναν απορροφήσεις μεγάλου εύρους, χωρίς λεπτή υφή όπως εξετάσαμε προηγούμενα. Έτσι, η φασματογραφία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού περιοριζόταν σημαντικά αφού πολλές ενώσεις είναι αδιάλυτες ή μερικώς διαλυτές στο νερό ή σε οργανικούς διαλύτες. Επιπρόσθετα, η διάλυση πολλών στερεών επιφέρει αλλαγές στη μοριακή δομή τους και επομένως δομικά χαρακτηριστικά της στερεάς φάσης δεν μπορούσαν να μελετηθούν.

Οι παράγοντες που προκαλούν αύξηση του εύρους των παρατηρούμενων κορυφών σε δείγματα που βρίσκονται σε στερεή κατάσταση είναι:

- α) η ανισοτροπία της χημικής μετατόπισης
- β) η αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου, και
- γ) οι μεγάλοι χρόνοι αποδιέγερσης των στερεών δειγμάτων.

Ακολούθως θα πραγματοποιηθεί περιληπτική ανάλυση



Σχήμα 15: Λόγος έντασης ελαχίστου/μεγίστου σε συνάρτηση θερμοκρασίας για τα παρασκευάσματα DPPC και DPPC/Me-Δ⁸-THC.

των παραγόντων που αναφέρθηκαν:

α) Ανισοτροπία της χημικής μετατόπισης (chemical shift anisotropy). Ο παράγοντας αυτός έχει ήδη αναφερθεί κατά τη μελέτη φασμάτων φωσφόρου. Παρακάτω παραθέτονται επιπρόσθετα στοιχεία.

Η χημική μετατόπιση είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης ενός πυρήνα με το ηλεκτρονιακό περιβάλλον του και με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 .

Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα εξαρτάται και από τον προσανατολισμό του σε σχέση με το μαγνητικό πεδίο. Σε ένα στερεό δείγμα οι δεσμοί των μορίων του μπορούν να προσανατολισθούν σε διάφορες διευθύνσεις σχηματίζοντας έτσι διαφορετικές γωνίες με τη διεύθυνση του μαγνητικού πεδίου.

Αυτό προκαλεί μεταβολή στη χημική μετατόπιση του παρατηρήσιμου πυρήνα. Το φαινόμενο αυτό καλείται χημική ανισοτροπία.

Στα υγρά δείγματα ο παράγοντας αυτός μηδενίζεται λόγω των ραγδαίων μεταβολών των προσανατολισμών που λαμβάνουν οι δεσμοί των παρατηρήσιμων πυρήνων.

β) Αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου. Ο παράγοντας αυτός επίσης αναφέρθηκε προηγουμένα. Πιο κάτω θα εξηγηθεί λεπτομερέστερα.

Στα στερεά δείγματα τα μόρια δε μπορούν να κινηθούν ισότροπα με συνέπεια στατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διπόλων να δημιουργούν τόσο μεγάλη διεύρυνση, ώστε τα φάσματα να στερούνται λεπτομερών πληροφοριών. Το μεγάλο εύρος των φασμάτων ¹³C οργανικών στερεών οφείλεται κυρίως στη διπολική διεύρυνση (dipolar broadening) από τα γειτονικά πρωτόνια.

Ένα πρότυπο για την αλληλεπίδραση μεταξύ των μαγνητικών διπόλων ενός πυρήνα ¹³C με έναν πυρήνα ¹H φαίνεται στο Σχήμα 16. Στο Σχήμα 16, η μαγνητική διπολική ροπή του ¹H είναι παράλληλη προς το εξωτερικό πεδίο B_0 και δημιουργεί στον πυρήνα ¹³C ένα στατικό μαγνητικό πεδίο B^H . Η ροπή του ¹³C αλληλεπιδρά με το πεδίο αυτό μέσω της z-συνιστώσας B_z^H , η οποία στην περίπτωση αυτή είναι αντιπαράλληλη του B_0 .

Ανάλογα με τον τρόπο της ιδιοπεριστροφής του πρωτονίου και τον προσανατολισμό του μ_z^H ως προς το B_0 , η συνιστώσα B_z^H που αισθάνεται ο πυρήνας ¹³C προστίθεται ή αφαιρείται από το εξωτερικό πεδίο. Προκαλείται έτσι μετατόπιση της κορυφής του ¹³C προς υψηλότερα πεδία (upfield shift) ή προς χαμηλότερα πεδία (downfield shift). Το φάσμα ενός δείγματος μαγνητικά απομονωμένων ζευγών ¹³C-¹H όμοια προσανατολισμένων, θα αποτελείται από δύο κορυφές με κέντρο την συχνότητα Larmor ¹³C και διαχωρισμό (splitting) σε Hz που δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta\nu_{CH} = \gamma_C/\pi B_z^H \quad (6)$$

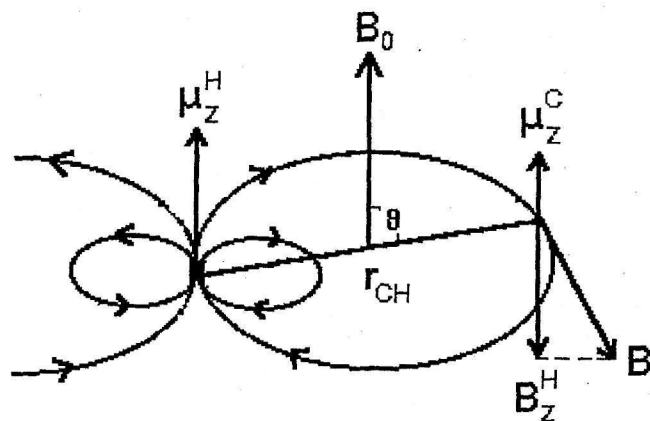
όπου

$$B_z^H = \mu_z^H/\gamma_{CH}^3(1-3\cos^2\theta) \quad (7)$$

γ_C ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα ¹³C που σχετίζεται με τη μαγνητική ροπή μέσω της σχέσης:

$$\mu_C = \gamma_C h/2 \quad (8)$$

Οι γεωμετρικοί παράγοντες γ_{CH} και θ δείχνονται στο Σχήμα 16. Ο όρος B_z^H αναφέρεται στη "μέση τιμή" του πεδίου στον πυρήνα ¹³C εξαιτίας της ανισοτροπίας της μοριακής κίνησης των μελετούμενων πυρήνων. Οι διπολικές



Σχήμα 16: Αλληλεπίδραση μαγνητικών διπόλων πυρήνων ¹³C και ¹H.

συζεύξεις των ζευγών $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ μπορεί να είναι πολύ μεγάλες. Για παράδειγμα για ένα δεσμό C-H παράλληλο ως προς το B_0 , ο διαχωρισμός είναι 40 kHz και μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση 5.

γ) **Μεγάλοι χρόνοι αποδιέγερσης των πυρήνων σε στερεά δείγματα.** Οι διεγερμένοι πυρήνες επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση (αποδιεγείρονται) ανταλλάσσοντας ενέργεια με το περιβάλλον (spin-lattice). Στα ευκίνητα υγρά ο μηχανισμός αυτός είναι πολύ αποδοτικός λόγω της τυχαίας κίνησης των μορίων. Στα στερεά δείγματα όμως, οι μοριακές κινήσεις είναι περιορισμένες με αποτέλεσμα η αποδιέγερση να γίνεται με πολύ αργό ρυθμό και να υφίσταται δυσκολότερα η ανταλλαγή ενέργειας με το περιβάλλον.

Στη συνέχεια θα αναλυθούν σύντομα οι τεχνικές που εφαρμόζονται για την επίλυση των προβλημάτων που επιφέρουν οι παραπάνω παράγοντες.

1) **Περιστροφή του δείγματος υπό μαγική γωνία (MAS-Magic Angle Spinning).** Η περιστροφή του δείγματος υπό μαγική γωνία ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο είναι η μόνη γνωστή τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε στερεά δείγματα, προκειμένου να εξαλειφθεί η ανισοτροπία της χημικής μετατόπισης και να επιτευχθεί η ισοτροπική μετατόπιση που παρατηρείται στον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό υγρής φάσης. Το δείγμα περιστρέφεται σε υψηλές συχνότητες (2-15 KHz), γύρω από άξονα που σχηματίζει 54.7° με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 . Για τα στερεά δείγματα ισχύει:

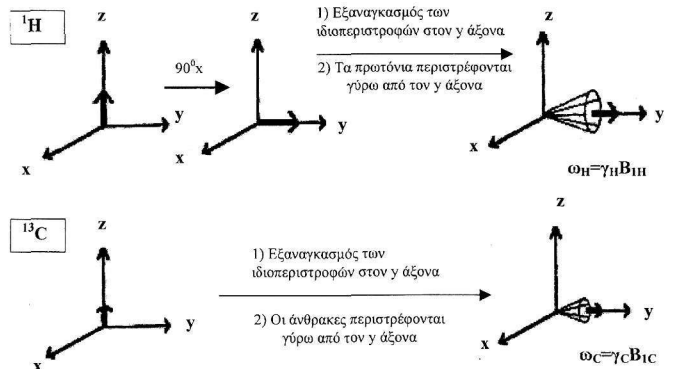
$$\sigma = 1/2\eta^2\beta(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}) + 1/2(3\cos^2\beta - 1) \times \quad (9)$$

ενώ για τα υγρά:

$$\sigma = 1/3(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}) \quad (10)$$

Όταν η γωνία που σχηματίζει ο άξονας με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο είναι $54,7^\circ$, τότε ο όρος $(3\cos^2\beta - 1)$ μηδενίζεται. Επίσης ισχύει ότι $\eta^2 54,7 = 0,66$ και ο πρώτος όρος της εξίσωσης γίνεται $1/3(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})$, ίσος δηλαδή με την ισοτροπική χημική μετατόπιση που ισχύει για τα υγρά δείγματα. Για το λόγο αυτό η γωνία $54,7^\circ$ ονομάζεται “μαγική” μιας και επιτυγχάνει συμπεριφορά του στερεού δείγματος όμοια με αυτή του υγρού και συνεπώς φάσμα υψηλής διαχωριστικότητας. Η τιμή είναι ίση με το ήμισυ της γωνίας του κανονικού τετραέδρου (109.4°).

2) **Μεταφορά πόλωσης (CP-Cross Polarization).** Η διπολική σύζευξη άνθρακα-13 /πρωτονίου η οποία μειώνει τη διαχωριστικότητα των φασμάτων του άνθρακα-13 σε στερεή κατάσταση, παρέχει συγχρόνως τη δυνατότητα αύξησης της ευαισθησίας μέσω της τεχνικής διασταυρωμένης πόλωσης. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί τη μεγάλη μαγνήτιση του πρωτονίου για να πολώσει τους πυρήνες άνθρακα-13. Συγχρόνως με τον τρόπο αυτό επιλύεται το πρόβλημα των μεγάλων χρόνων αποδιέγερσης των πυρήνων άνθρακα-13 γιατί οι χρόνοι αποδιέγερσής τους καθορίζονται από τους μικρούς χρόνους αποδιέγερσης των πρωτονίων. Αποτέλεσμα ο πειραματικός χρόνος λήψης



Σχήμα 17: Μεταφορά πόλωσης μέσω ανυσματικών διαγραμμάτων. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα τελικά τα πρωτόνια περιστρέφονται γύρω από τον y-άξονα όπως η μαγνήτιση του άνθρακα-13. Όταν οι δύο συχνότητες $\omega_H = \omega_C$ (συνθήκη Hartmann-Hahn) τότε μεταφέρεται πόλωση από το πρωτόνιο στον άνθρακα.

μειώνεται.

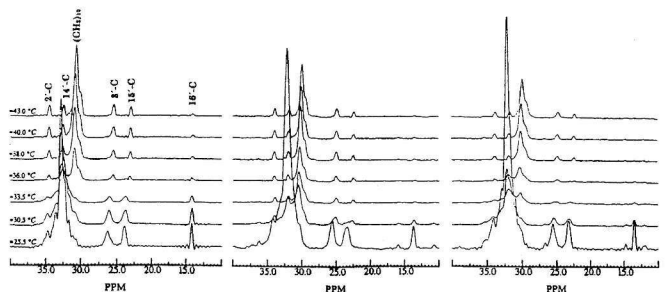
Ένας τρόπος περιγραφής της μεταφοράς πόλωσης είναι μέσω των ανυσματικών διαγραμμάτων (vector diagrams) όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 17¹⁹.

9. Πληροφορίες που μπορεί να ληφθούν για τις αλληλεπιδράσεις φαρμακευτικών μορίων στις μεμβράνες από τη χρήση φασματογραφίας άνθρακα-13 υψηλής διαχωριστικότητας σε στερεή κατάσταση

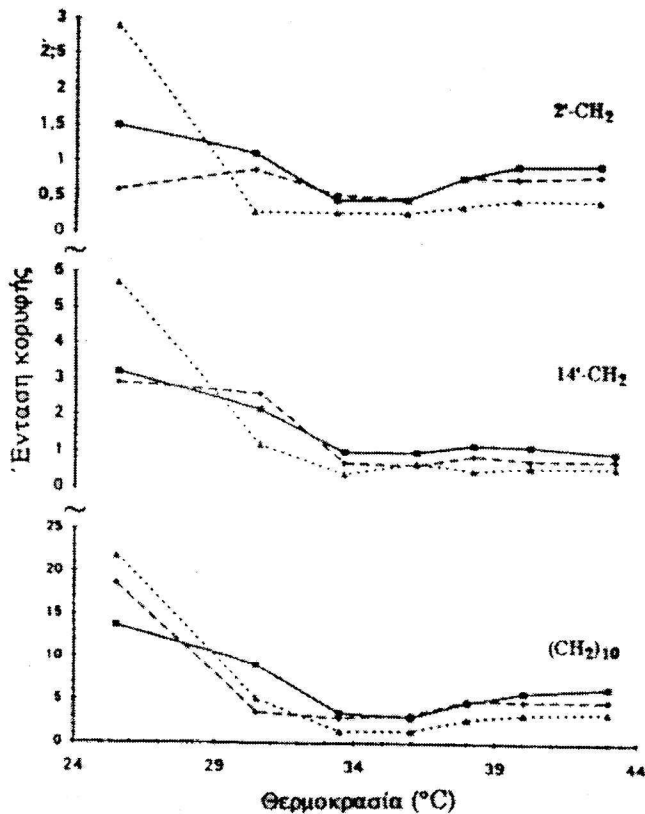
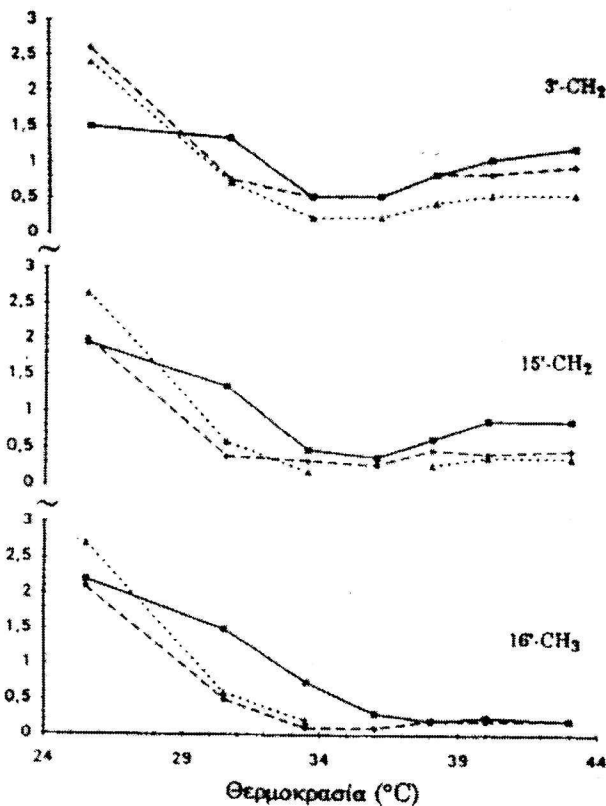
Η παρουσία κάποιου φαρμακευτικού μορίου στις μεμβράνες οδηγεί σε φάσματα που έχουν διαφορές συγκριτικά με τα φάσματα των αμιγρών μεμβρανών. Οι διαφορές αυτές συνίστανται: (α) σε αλλαγή των εντάσεων κορυφών, (β) σε αλλαγή χημικών μετατοπίσεων, (γ) σε αλλαγή του πλάτους των φασματικών γραμμών και (δ) σε εμφάνιση νέων κορυφών.

Τέτοιες μεταβολές στις φασματικές γραμμές πληροφορούν για τις αλλαγές στις δυναμικές ιδιότητες των μεμβρανών λόγω της παρουσίας των φαρμακευτικών μορίων. Αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί η φασματογραφία υψηλής διαχωριστικότητας αποτελεί τη μοναδική μέθοδο όπου μπορούν να παρατηρηθούν μεταβολές στις δυναμικές ιδιότητες χωρίς να χρειάζεται να επισημανθεί το φωσφολιπίδιο ή η λιπιδική διπλοστοιβάδα.

Στο Σχήμα 18 εμφανίζονται φάσματα ^{13}C -CP/MAS υ-



Σχήμα 18: Σύγκριση ^{13}C -CP/MAS φασμάτων των DPPC, DPPC/($\chi=0.20$) αλφαξάλονη, DPPC/($\chi=0.20$) Δ¹⁶-αλφαξάλονη, της υδρόφοβης περιοχής σε περιοχή θερμοκρασιών 25,5-43 °C.



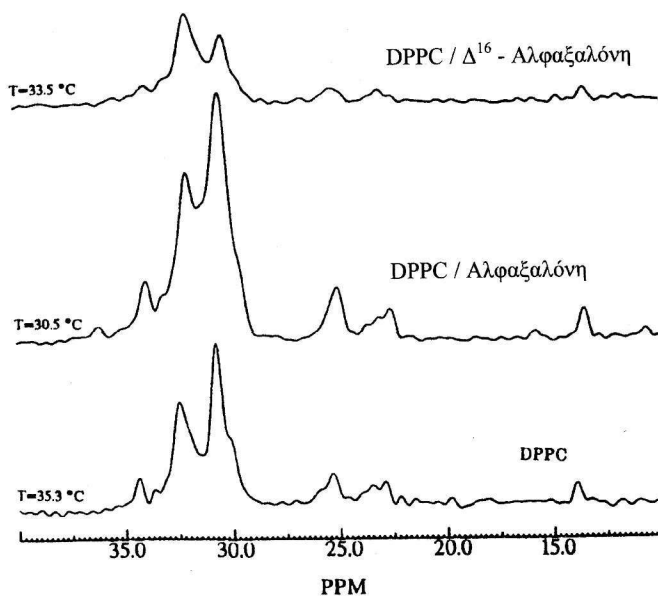
Σχήμα 19: Σύγκριση εντάσεων των κορυφών των φασμάτων DPPC (■), DPPC/(20%-mol αλφαξαλόνη (♦) και DPPC/(20%-mol) Δ¹⁶-αλφαξαλόνη (▲), των ανθράκων της υδροφοβής περιοχής του φωσφολιπιδίου σε περιοχή θερμοκρασιών 25,5 °C-43 °C

δροφοβικής περιοχής των παρασκευασμάτων DPPC, DPPC+αλφαξαλόνης σε μοριακή αναλογία 20%-mol και DPPC+Δ¹⁶-αλφαξαλόνης σε μοριακή αναλογία 20%-mol στην περιοχή θερμοκρασιών 25-43 °C.

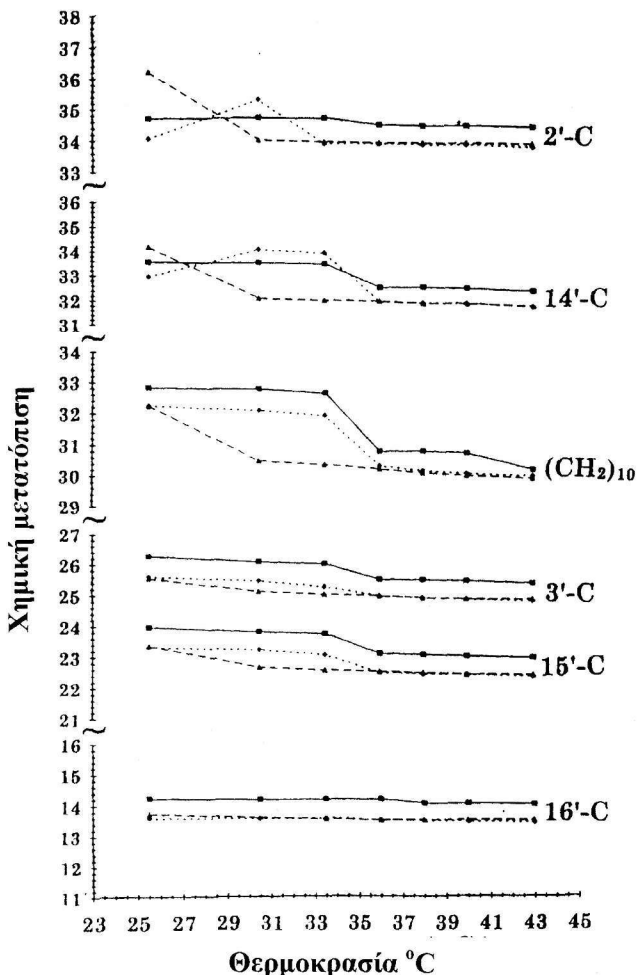
(α) Μεταβολές στις εντάσεις των κορυφών. Οι εντάσεις των κορυφών της αμιγούς DPPC να ελαττώνονται αισθητά στους 33,5 °C και επανακτούν την έντασή τους μερικώς σε θερμοκρασίες άνω των 38 °C. Η παρουσία στεροειδούς μέσα στις μεμβράνες προκαλεί σημαντικές μεταβολές στις εντάσεις των κορυφών. Συγκεκριμένα, η παρουσία στεροειδούς επιδρά έτσι, ώστε οι εντάσεις της DPPC να ελαττώνονται στη χαμηλότερη θερμοκρασία των 30,5 °C. Η μερική ανάκτηση γίνεται στην ίδια θερμοκρασία και για τα τρία παρασκευάσματα. Το παραπάνω αποτέλεσμα ισχύει για όλη την υδροφοβική περιοχή όπως φαίνεται από τα διαγράμματα του Σχήματος 19. Στο ίδιο σχήμα φαίνεται ότι η παρουσία στεροειδούς προκαλεί χαμήλωμα στη θερμοκρασία μετασηματισμού T_c. Το γεγονός ότι σε περιοχή θερμοκρασιών 30-35 °C υπάρχουν τουλάχιστον δύο φάσεις φαίνεται από την παρουσία αντίστοιχων κορυφών, που αλληλεπικαλύπτονται μερικώς (DPPC στους 35,3 °C, DPPC+αλφαξαλόνη στους 30,5 °C και DPPC+Δ¹⁶-αλφαξαλόνη στους 33,5 °C) (Σχήμα 20).

Διάφοροι συσχετισμοί υπάρχουν και μεταξύ των εντάσεων των κορυφών (Σχήμα 18). Μεταξύ 22-27 ppm στους 25,5 °C τόσο στην διπλοστοιβάδα DPPC όσο και σε αυτήν που περιέχει Δ¹⁶-αλφαξαλόνη, η κορυφή στα 22 ppm είναι

μεγαλύτερης εντάσεως από αυτήν στα 27 ppm. Όμως στο παρασκεύασμα που περιέχει αλφαξαλόνη η αναλογία αντιστρέφεται και η κορυφή που συντονίζεται στα 23 ppm έχει μικρότερη ένταση σχετικά με αυτή που συντονίζεται στα 27 ppm και εμφανίζει επίσης στενότερο φασματικό εύρος. Οι αλλαγές αυτές στις εντάσεις των κορυφών με-



Σχήμα 20: Φάση προσχηματισμού των λιπιδικών διπλοστοιβάδων DPPC, DPPC/(20%-mol αλφαξαλόνη) και DPPC/(20%-mol Δ¹⁶-αλφαξαλόνη).



Σχήμα 21: Σύγκριση χημικών μετατοπίσεων των φασμάτων DPPC (●), DPPC/(20%-mol αλφαξαλόνη) (▲) και DPPC/(20%-mol) Δ¹⁶-αλφαξαλόνη (▲), των διαφόρων ανθράκων της υδροφοβής περιοχής του φωσφολιπιδίου σε περιοχή θερμοκρασιών 25,5 °C-43 °C.

ταξύ των δύο παρασκευασμάτων δείχνουν τη διαφορετική ρευστότητα και κινητικότητα των δύο ατόμων που αντιστοιχούν στις πιο πάνω κορυφές.

(β) Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των κορυφών. Η μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων των κορυφών της υδροφοβικής περιοχής σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία δείχνεται στα διαγράμματα του Σχήματος 21. Τέτοιες βαθμιαίες αλλαγές της χημικής μετατόπισης δίνουν πληροφορίες για τη μετάβαση φάσης του φωσφολιπιδίου παρουσία ή απουσία στεροειδούς. Η μετάβαση φάσης γίνεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες παρουσία του δραστικού στεροειδούς της αλφαξαλόνης συγκριτικά με τα άλλα δύο παρασκευάσματα. Η μετάβαση φάσης συμβαίνει βαθμιαία και κατά συνέπεια γίνεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών στην περίπτωση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας που περιέχει το αναισθητικό στεροειδές αλφαξαλόνη. Στην DPPC διπλοστοιβάδα ή σ' εκείνη που περιέχει το μη δραστικό στεροειδές Δ¹⁶-αλφαξαλόνη η μετάβαση φάσεως γίνεται με όμοιο τρόπο και σε μικρό εύ-

ρος θερμοκρασιών. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες η μεμβράνη που περιέχει την αλφαξαλόνη είναι περισσότερο ρευστή.

(γ) Εμφάνιση νέων κορυφών. Η παρουσία του φαρμακευτικού μορίου στις μεμβράνες μπορεί να παρατηρηθεί από τις νέες κορυφές που εμφανίζονται στα φάσματα λόγω της εισδοχής του. Στην περιοχή της πολικής κεφαλής (40-80 ppm) εμφανίζονται νέες κορυφές οφειλόμενες στα στεροειδή. Δεν παρατηρούνται όλες οι αναμενόμενες κορυφές. Δεν υπάρχει ακόμη πλήρης γι' αυτό. Ένας πιθανός λόγος είναι ότι ο δραστικός χρόνος εγκάρσιας αποδιέγερσης (effective transverse relaxation time) T_2 είναι μικρός για ορισμένα άτομα. Ο χρόνος αυτός είναι αντιστρόφως ανάλογος του μισού φασματικού εύρους σύμφωνα με την εξίσωση:

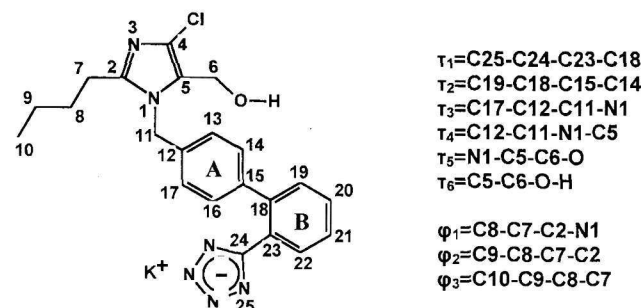
$$T_2 = 1/(\pi\nu_{1/2}) \quad (11)$$

Πολύ μικροί χρόνοι T_2 προκαλούν μεγάλη φασματική διεύρυνση των κορυφών με αποτέλεσμα να μην είναι παρατηρήσιμες.

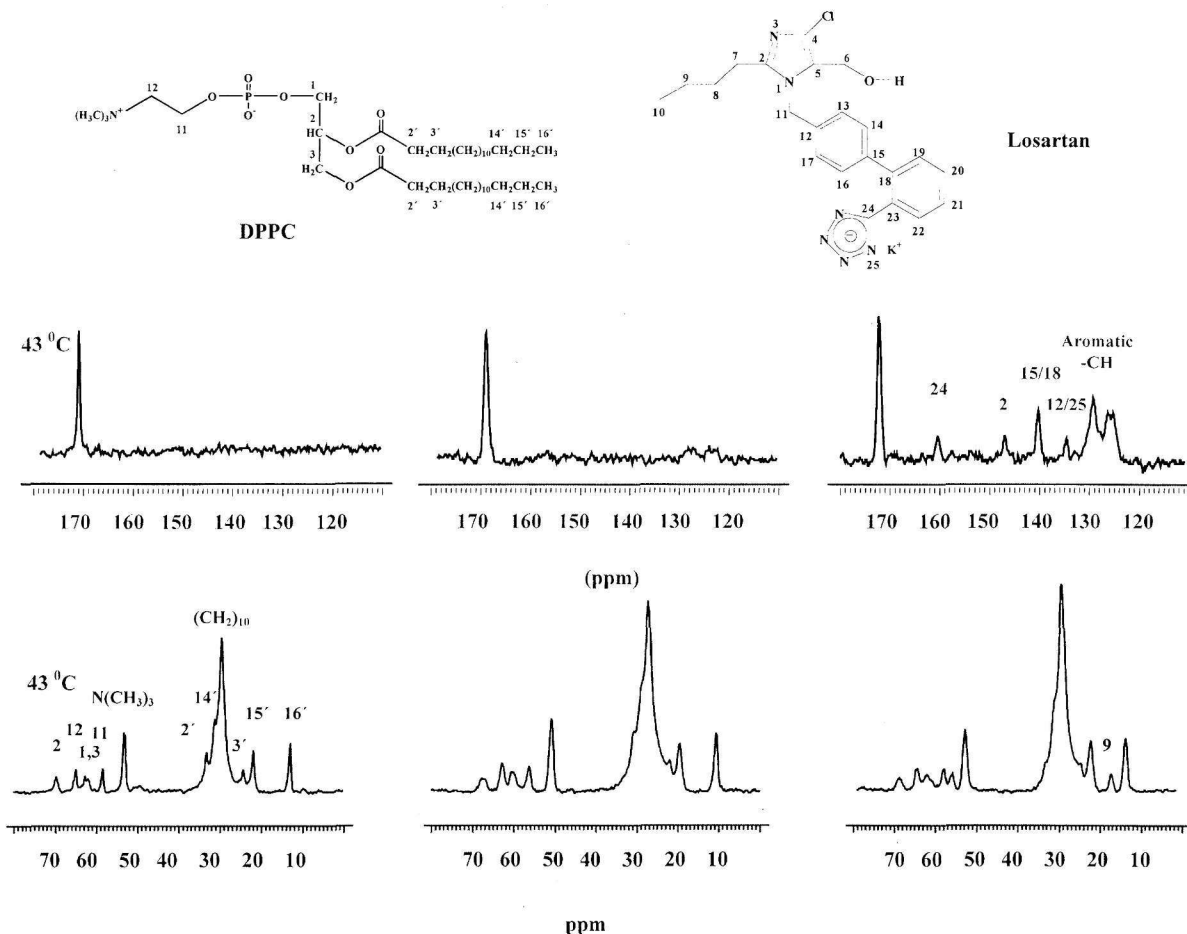
Πρέπει να ληφθεί ότι διεξοδική ανάλυση μπορεί να γίνει και σ' αυτή την περιοχή όπως κάναμε για την υδροφοβή. Επίσης και για οποιαδήποτε άλλη περιοχή της λιπιδικής διπλοστοιβάδας παρουσία ή απουσία βιοδραστικού μορίου. Επομένως η τεχνική CP/MAS μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος παρατήρησης της θερμοκρασίας μετάβασης για όλους τους άνθρακες²⁰.

Αλληλεπιδράσεις λοσαρτάνης με τις βιολογικές μεμβράνες. Η μέθοδος της διασταυρούμενης πόλωσης σε συνδυασμό με τη μέθοδο MAS αυξάνει την ευαισθησία του φάσματος σε άνθρακες οι οποίοι φέρουν υδρογόνα. Για τους άνθρακες οι οποίοι δεν φέρουν υδρογόνα (π.χ. καρβονύλια) αυτό δεν συμβαίνει. Στην περίπτωση αυτή τα φάσματα MAS δίνουν υψηλότερης εντάσεως κορυφές. Γι' αυτό η φασματογραφία MAS είναι συμπληρωματική της CP/MAS.

Θα δειχθεί η χρησιμότητα της μεθόδου με τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του φαρμακευτικού μορίου λοσαρτάνης με τις μεμβράνες. Το φάρμακο λοσαρτάνη είναι ανταγωνιστής της Αγγειοτασίνης II στους υποδοχείς AT1 και αποτελεί τον οδηγό της νέας γενιάς πεπτιδομμητικών αντιυπερτασικών φαρμάκων^{21,22} (Σχήμα 22).



Σχήμα 22: Χημική δομή λοσαρτάνης.



Σχήμα 23: ^{13}C -MAS φάσματα των DPPC (αριστερά), DPPC/λοσαρτάνη 5%-mol (μέσο) και DPPC/λοσαρτάνη 20%-mol (δεξιά) στις θερμοκρασίες 25-43 $^{\circ}\text{C}$.

Τα φάσματα ^{13}C MAS λιποειδών διπλοστοιβάδων DPPC στη φάση στερεής κατάστασης δείχνουν κορυφή η οποία συντονίζεται στα 30 ppm και οφείλεται στο συντονισμό των $(\text{CH}_2)_{10}$ των ακυλικών αλυσίδων. Αυτή χαρακτηρίζει τη μεσομορφική κατάσταση της λιποειδούς διπλοστοιβάδας. Με αύξηση της θερμοκρασίας στους 43 $^{\circ}\text{C}$ η κορυφή αυτή στενεύει και εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν στους άνθρακες 2' και 14' οι οποίες χαρακτηρίζουν τη φάση μετασηματισμού της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας από τη φάση στερεής κατάστασης στην υγρή κρυσταλλική φάση (Σχήμα 23). Κατά τη φάση μετασηματισμού όπως έχει προαναφερθεί οι αλκυλικές αλυσίδες υφίστανται διαμορφωτικές ισομερειώσεις. Αυτή η ισομερείωση που δηλώνει αύξηση της ευελιξίας των αλκυλικών αλυσίδων έχει ως συνέπεια το στένεμα των παρατηρούμενων κορυφών.

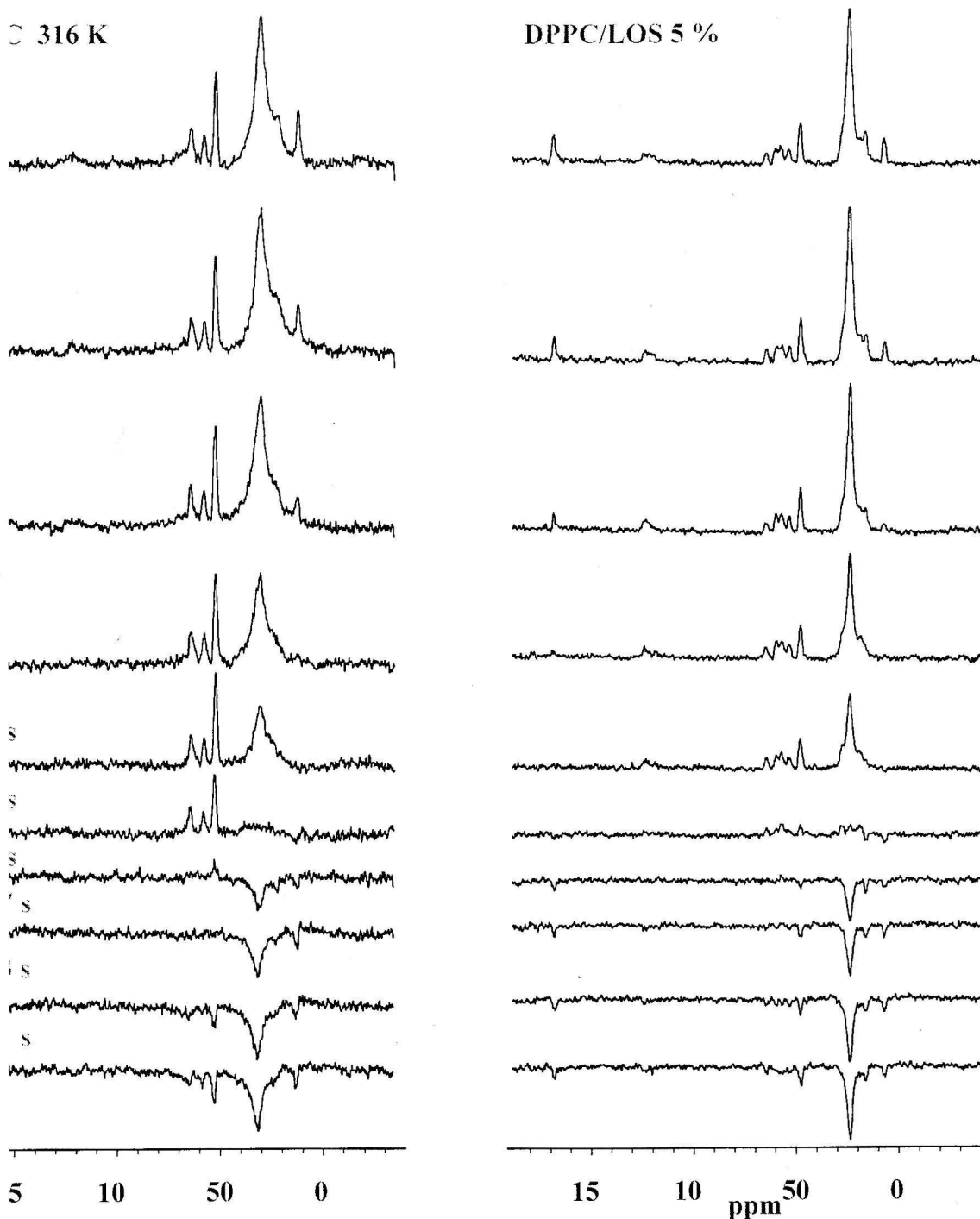
Η παρουσία 5%-mol λοσαρτάνης δεν επηρέασε τη φάση μετασηματισμού. Οι κορυφές εμφανίζονται πλατύτερες και καταδείχνουν ότι η παρουσία του φαρμακευτικού μορίου περιορίζει την κινητικότητα των αλκυλικών αλυσίδων, του σκελετού της γλυκερόλης και της πολικής κεφαλής.

Η κορυφή συντονισμού στα 19 ppm παρατηρείται σε ό-

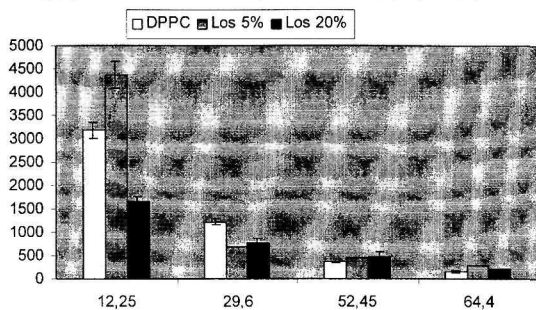
λες τις θερμοκρασίες στο παρασκεύασμα DPPC/λοσαρτάνη-20%-mol. Η επιπρόσθετη αυτή κορυφή οφείλεται στον C-9 της βουτυλικής αλυσίδας της λοσαρτάνης. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η λοσαρτάνη εισχωρεί στις φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες.

Οι κορυφές της αρωματικής περιοχής οι οποίες δεν είναι πολύ ορατές όταν η συγκέντρωση του φαρμακευτικού μορίου είναι 5%-mol είναι εμφανείς όταν η συγκέντρωσή του είναι υψηλότερη (20%-mol). Τα αποτελέσματα αυτά όταν συζητηθούν με αυτά που παρατηρούνται στην υδρόφοβη περιοχή δείχνουν την πλήρη είσοδο του φαρμακευτικού μορίου στη λιποειδή διπλοστοιβάδα. Η χρήση υψηλής συγκέντρωσης λοσαρτάνης διατηρεί την ακεραιότητα και αυξάνει σημαντικά τη ρευστότητα της μεμβράνης.

Τα φάσματα και οι υπολογιζόμενες τιμές των T_1 (Σχήμα 24 και 25) των εξεταζόμενων παρασκευασμάτων στην υγρή κρυσταλλική φάση που είναι πιο κοντά στην βιολογική μεμβράνη έδειξαν ότι η ενσωμάτωση των φαρμακευτικών μορίων στις διπλοστοιβάδες DPPC προκαλεί αύξηση της φωσφολιπιδικής κινητικότητας των μεθυλίων της πολικής κεφαλής (αύξηση T_1 στις κορυφές οι οποίες συντονίζονται μεταξύ 52-65 ppm παρουσία λοσαρτάνης), ελάττωση στις μεθυλενικές ομάδες των ακυλικών αλυσίδων.



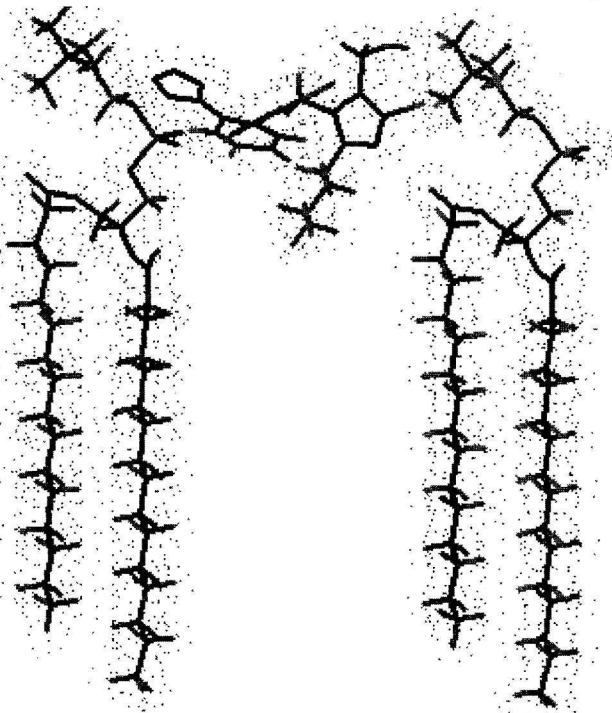
Σχήμα 24: Φάσματα ^{13}C των παρασκευασμάτων DPPC, DPPC/λοσαρτάνη 5%-mol και DPPC/λοσαρτάνη 20%-mol στη θερμοκρασία 43°C χρησιμοποιώντας 10 χρόνους μέτρησης (τ) για τον υπολογισμό των T1 τιμών των διαφόρων ανθράκων που τα συνιστούν.



Σχήμα 25: Σύγκριση T1 τιμών των διάφορων ανθράκων στους 43°C των παρασκευασμάτων DPPC, DPPC/λοσαρτάνη 5%-mol και DPPC/λοσαρτάνη 20%-mol

δων (T1 ελαττώνεται στην κορυφή η οποία συντονίζεται στα (-30 ppm παρουσία λοσαρτάνης). Η τελική μεθυλομάδα αυξάνει σε ρευστότητα παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης λοσαρτάνης και ελαττώνεται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η λοσαρτάνη “αγκυροβολεί” στη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα με τα φαρμακοφόρα τμήματα διφαινυλοτετραζόλιο και ιμιδαζόλιο να εντοπίζονται προς την πολική κεφαλή και τη βουτυλομάδα να επεκτείνεται στην υδρόφοβη περιοχή. Διά-



Σχήμα 26: “Αγκυροβόληση” λοσαρτάνης στις λιποειδείς διπλοστοιβάδες της διπάλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης.

γραμμά στο οποίο φαίνεται η “αγκυροβόληση” της λοσαρτάνης στις μεμβράνες απεικονίζεται στο Σχήμα 26.

Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης από τα παραπάνω δεδομένα της λοσαρτάνης είναι ο ακόλουθος: Η λοσαρτάνη αφού εισχωρήσει στην λιποειδή διπλοστοιβάδα διαχέεται προς τον υποδοχέα.

Είναι σημαντικό το εύρημα ότι η λοσαρτάνη δρα στο μεμβρανικό τμήμα του υποδοχέα^{23,34}.

Επομένως είναι πιθανό με τη μελέτη της αλληλεπίδρασης άλλων ανταγωνιστών στις μεμβράνες να εξαχθούν γενικά συμπεράσματα για το μοριακό μηχανισμό δράσης των AT1 ανταγωνιστών.

Solid state Nuclear Magnetic Resonance. A Valuable Tool in Pharmaceutical Chemistry.

T. Mavromoustakos, I. Daliani,
P. Zouboulakis, A. Kolocouris

Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Vas. Constantinou 48, Athens 11635

Summary □ This publication is a review article that contains examples from our research activities in the Laboratory of Molecular Analysis of Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry. In this article, the use of

solid state NMR spectroscopy to obtain valuable information on drug:membrane interactions is signified. The gained knowledge using this technique may lead to the rational design of drug molecules with better biological profile.

Βιβλιογραφία

- Seydel, J.K., Velasco, M. A., Coats, E.A., Coats, H.P., Cordes, H.P., Kunz, B., Wiese, M. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 11, 205, 1992.
- Mason, R.P. Rhodes, D.G., Herbette, L.G. *J. Med. Chem.* 34, 869, 1991.
- Seydel, J.K. (1998) *In NMR Spectroscopy in Drug Development and Analysis.* (Wiley-VCH, Weinheim) p.p 175-230.
- Davis, J.H., Jeffrey, K.R., Bloom, M., Valic, M.I., Higgs, T.P. *Chem. Phys. Lett.* 42, 390 1976.
- Davis, J.H. *Biochim. Biophys. Acta* 737, 117, 1983.
- Ford, J.L., Timmins, P. (1986) *In Pharmaceutical Thermal Analysis. The use of thermal analysis in the study of liposomes* (Ellis Horwood Ltd and Halsted Press). p.p 259-278.
- Razdan, R.K. *Pharmacol. Rev.* 38, 75-149, 1986.
- Yang, D.P., Mavromoustakos, T., Beshah, K., Makriyannis A. *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 25, 1992.
- Makriyannis, A., Yang, D.P., Banijamali, A., Jarrell, H.C., *Biochim. Biophys. Acta* 986, 141-145, 1989.
- Yang, D.P., Mavromoustakos, T., Makriyannis, A. *Life Sci* 53, 117, 1993.
- Martel, P., Makriyannis, A., Mavromoustakos, T., Kelly K., Jeffrey, K.R. *Biochim. Biophys. Acta* 1151, 51, 1993.
- Atkinson, R.M., Davis, B., Pratt, M.A., Sharpe, H.M., Tomich, E.G. *J. Med. Chem.* 8, 426-432, 1965.
- Phillips, G.H. *J. Steroid Biochem.* 6, 607, 1975.
- Makriyannis, A., Yang, D.P. Mavromoustakos, T (1990) *In “Steroids and Neuronal Activity” Ciba Foundation Symp. No. 153.* (J. Wiley London) p.p.172-189.
- Yeagle, P.L. (1990) *In Phosphorous NMR of Membranes. Biological Magnetic Resonance vol.9, (ed. Lawrence J. Berliner and Jacques Reuben).*
- McLaughlin, A.C., Cullis, P.R., Hemminga, M.A., Hoult, D.I., Radda, G.K., Ritchie, G.A., Seeley, P.J., Richards, R.E. *FEBS Lett.* 57,2, 1975.
- Mavromoustakos, T. Theodoropoulou, E. *Chem. Phys. Lipids* 92, 37-52, 1998.
- Mavromoustakos, T. Daliani. I. *Biochim. Biophys. Acta.* 1420, 252, 1999.
- Stejskal, J., Memory D. (1994) *In High Resolution NMR in the Solid State: Fundamentals of CP/MAS.* (E.O. Oxford University Press).
- Mavromoustakos, T. Theodoropoulou, E. De-Ping Yang. *Biochim. Biophys. Acta* 1328, 65, 1997.
- Mavromoustakos, T. Kolocouris, A., Zervou, M., Roumelioti, P., Matsoukas, J., Weisemann, R. *J. Med. Chem.* 42(10) 1714, 1999.
- Wexler, R.R., Greenlee, W.J., Irvin, J.D., Goldberg, M.R., Prendergast, K., Smith, R.D., Timmermans, P.B.M.W.M. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 625.
- Yamano Y., Ohyama K., Kikyo M., Sao T., Nakagomi Y., Inone Y., Nakamura, N., Morishima, I., Guo, D., Hamakubo, T., Inagami, T. *J. Biol. Chem.* 23,9 14024, 1995.
- Monnot, C., Bihoreau, C., Conchon, S., Curnow, K.M. *J. Biol. Chem.* 271(3), 1507-1513 (1996).