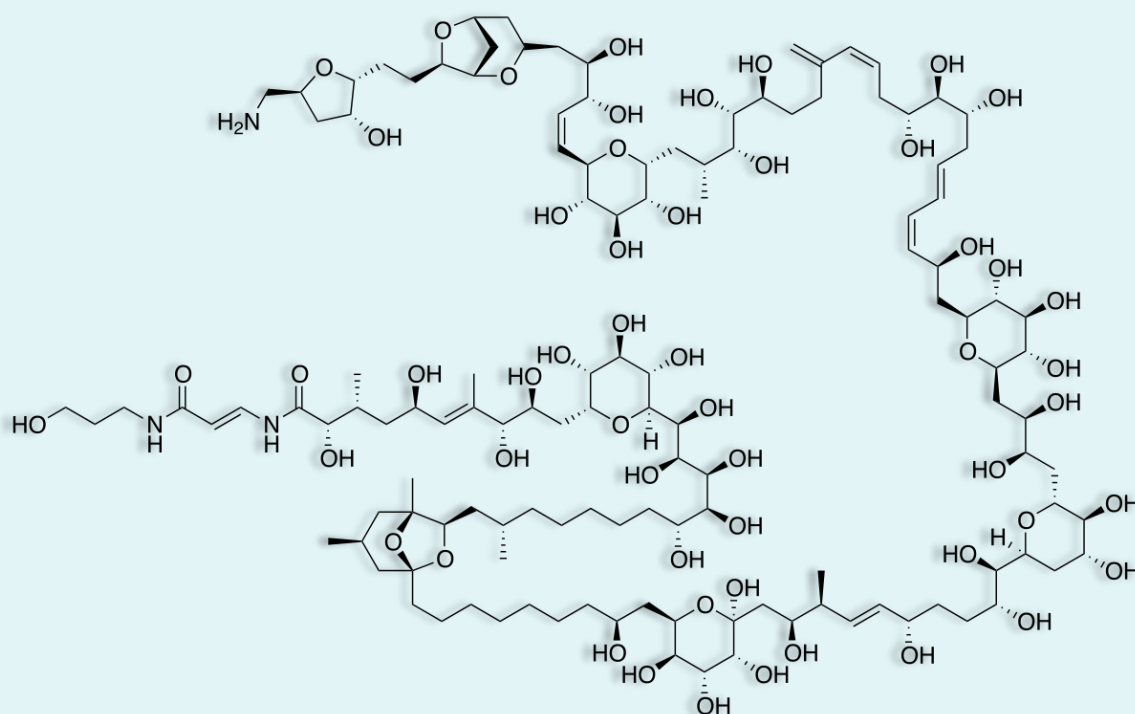


Α' Πρόδος στο μάθημα Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων και Μοριακή
Μοντελοποίηση

Γεώργιος Μπουντάς 1111201800064

Παλιτοξίνη



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

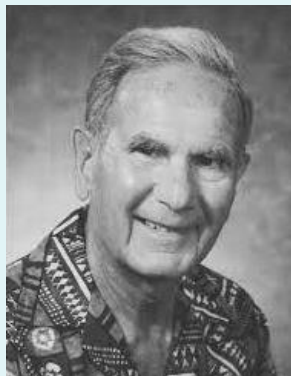
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Περιεχόμενα

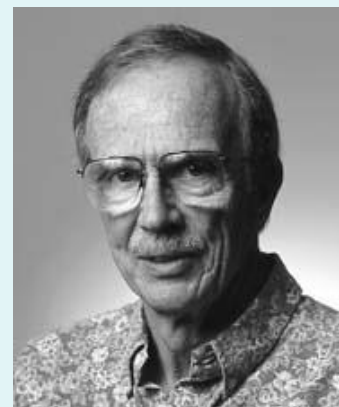
1. Ιστορική Αναδρομή.....
2. Απομόνωση Τοξίνης.....
3. Εξακρίβωση Δομής.....
4. Τοξικότητα- Μηχανισμός Δράσης.....
5. Σύνθεση.....
6. Συμπέρασμα.....
7. Βιβλιογραφία.....

1. Ιστορική Αναδρομή



Εικόνα 1 Paul J. Scheuer, Balazs Hargittai & Istvan Hargittai, (2005), *Candid Science V Conversations with Famous Scientists*, Imperial College Press

Το 1961 μια ερευνητική ομάδα του Πανεπιστημίου της Χαβάης στη Χονολουλού (ΗΠΑ), με ιθύνοντες τους Paul J. Scheuer (Εικ.1) και Richard E. Moore (Εικ.2), αποφάσισε να διερευνήσει έναν θρύλο του νησιού Μάουι, του δεύτερου μεγαλύτερου σε έκταση νησιού της Χαβάης, ο οποίος αφηγείται την ιστορία ενός μυστηριώδους αγρότη, ο οποίος κατοικούσε στον τροπικό παράδεισο της Χάνα, η οποία βρίσκεται στην νοτιοανατολική πλευρά της νήσου. Εκεί, καλλιεργούσε στο χωράφι του κολοκάσι (ή *taro*, ένα τροπικό φυτό), το οποίο



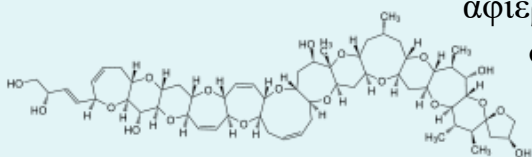
Εικόνα 2 Richard E. Moore, "Image of Richard E. Moore", Malamala, 28th August 2008

φρόντιζε κάθε μέρα από το βράδυ έως το πρωί. Στην τοπική κοινότητα κινήθηκαν υποψίες σχετικά με την αινιγματική του δραστηριότητα. Τραγωδία ξέσπασε στο χωριό του, όταν οι ψαράδες επέστρεφαν όλο και λιγότεροι μετά από κάθε νύχτα ψαρέματος, χωρίς να είναι γνωστή η αιτία εξαφάνισής τους. Οι κάτοικοι ύστερα από εκτενείς αναζητήσεις των χαμένων γειτόνων τους και συζητήσεις για την εύρεση λύσεων, κατέληξαν πως ο υπαίτιος των καταστροφών ήταν ο μυστηριώδης αγρότης. Αμέσως, οι κάτοικοι του νησιού επιτέθηκαν στον άντρα και ύστερα από την αποτέφρωση του σώματός του, έσπειραν τις στάχτες στη θάλασσα με την ελπίδα ότι θα απομακρυνθούν και δεν θα μολύνουν περαιτέρω την περιοχή. Ωστόσο, αυτές κατακάθισαν σε μια από τις λιμνούλες οι οποίες σχηματίζονται με την παλίρροια. Τα φύκια (*limu*) στη λιμνούλα γρήγορα κατέστησαν δηλητηριώδη και το μέρος ανακηρύχθηκε απαγορευμένο (*karu*). Οι ντόπιοι σφράγισαν τη λιμνούλα με βράχους, γνωρίζοντας ότι όποιος συνέλεγε τα θανατηφόρα φύκια θα έπεφτε θύμα κακοτυχίας.

Οι ερευνητές μη αποθαρρημένοι από τον θρύλο του τοξικού φύκου(*limu*), επισκέφτηκαν την περιοχή για την εύρεση του υποτιθέμενου θαλάσσιου φυτού. Οι συγκεκριμένοι χημικοί είχαν αφιερώσει μεγάλο μέρος της έρευνάς τους στο παρελθόν

στη μελέτη ποικίλων άλλων τοξινών προερχόμενες από θαλάσσια είδη. Παράδειγμα αποτελεί η έρευνά τους με αντικείμενο τη βιολογική προέλευση των τοξινών τύπου *ciguatera* (Εικ.3), οι οποίες συσσωρεύονται σε ψάρια και προκαλούν

περιστατικά σοβαρής τροφικής δηλητηρίασης σε ανθρώπους.



Εικόνα 3 Τοξίνη τύπου *Ciguatera* προερχόμενη από ψάρια, Created by Minutemen using BKchem 0.11.4 & Inkscape 0.44 - Own work

2. Απομόνωση Τοξίνης

Όταν οι ερευνητές έφτασαν στη Χάνα, το χωριό στο οποίο κατοικούσε ο άντρας του θρύλου, αντιμετώπιστηκαν με εχθρότητα και καχυποψία από τους ντόπιους κατοίκους, οι οποίοι υπενθύμιζαν συνεχώς στους επιστήμονες ότι θα ακολουθήσει μεγάλη κακοτυχία εάν επέμεναν να συλλέξουν το φύκος. Παρά τις προειδοποιήσεις τους, οι χημικοί κατάφεραν να προσεγγίσουν μια λιμνούλα (Εικ.4) στο τέλος μιας ροής λάβας, χάρη στη καθοδήγηση ορισμένων ψαράδων. Εκεί πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία του φύκους και το παραληφθέν δείγμα στάλθηκε στο εργαστήριο για ανάλυση.



Εικόνα 4 Λιμνούλες οι οποίες σχηματίζονται κατά την παλίρροια, Alvesgaspar - Own work, CC BY-SA 3.0

Τα εκχυλίσματα τα οποία προέκυψαν από το δείγμα του θαλάσσιου οργανισμού αποδείχθηκαν εξαιρετικά τοξικά, καθώς ακόμα και ύστερα από σημαντική αραιώση, τα τελικά διαλύματα ήταν αρκετά ισχυρά ώστε να σκοτώσουν ποντίκια στα οποία είχαν προηγηθεί ενέσεις με μικρές ποσότητες αυτών. Παράλληλα με τις μελέτες σχετικά με την ικανότητα θανάτωσης των εκχυλισμάτων, οι επιστήμονες ενδιαφερόντουσαν και στην ταξινόμηση του οργανισμού που παρήγαγε την απομονωμένη τοξίνη.



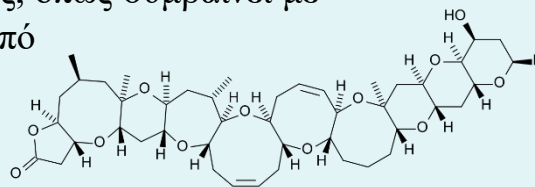
Εικόνα 5 Πολύποδες του γένους Palythoa, Nhobgood Nick Hobgood-Own work, CC BY-SA 3.0

Βρέθηκε ότι ο οργανισμός δεν αποτελούσε θαλάσσιο φύκος, όπως είχε θεωρηθεί στην αρχή, αλλά ζώο, το οποίο ανήκει στη συνομοταξία Κοιλεντερωτά (Κνιδόζωα πιο συγκεκριμένα), τάξη Ζωανθάρια και γένους Palythoa, εξ ου και η ονομασία παλιτοξίνη (palytoxin). Οι συγκεκριμένοι οργανισμοί ζουν σε αποικίες και αποτελούν πολύποδες (Εικ.5), όπως οι θαλάσσιες ανεμώνες και τα κοράλλια. Έκτοτε, έχει ανακαλυφθεί ότι η παλιτοξίνη, όπως και ανάλογά της, παράγεται από πλήθος οργανισμών της τάξεως των Ζωανθαρίων, η οποία βρίσκεται στη βλέννα που εκκρίνουν. Αυτή, εξυπηρετεί ως μηχανισμός άμυνας έναντι τυχόντων θηρευτών, με στόχο την προστασία του μαλακού ακινητοποιημένου σώματος των πολυπόδων. Ωστόσο, εικάζεται ότι ο πραγματικός 'παρασκευαστής' της τοξίνης είναι οι μικροοργανισμοί (δινομαστιγωτά, Εικ.6) οι οποίοι έχουν αναπτύξει συμβιωτική σχέση με τα



Εικόνα 6 Δινομαστιγωτό όπως φαίνεται σε μικροσκόπιο, Keisotyo - Own work, CC BY-SA 3.0

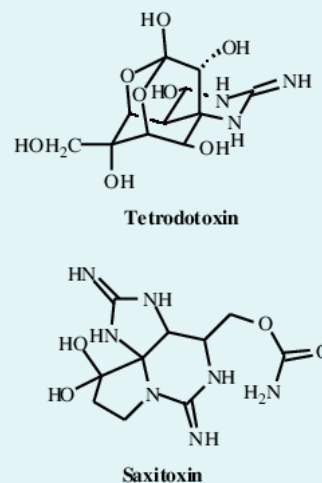
ζωανθάρια και κατοικούν στο σώμα τους, όπως συμβαίνει με διάφορες άλλες τοξίνες προερχόμενες από το θαλάσσιο περιβάλλον (Εικ.7).



Εικόνα 7 Μπρεβετοξίνη Α προερχόμενη από δινωμαστιγοτά, Created by Minutemen using BKchem 0.11.4 & Inkscape 0.44 - Own work

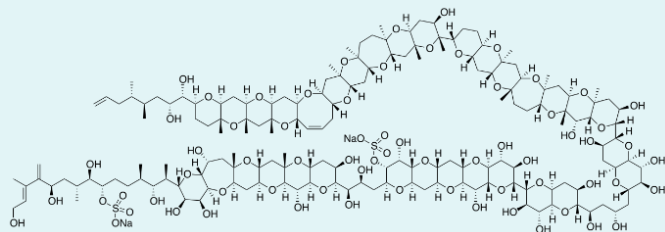
3. Εξακρίβωση Δομής

Οι επιστήμονες δεν είχαν στη διάθεσή τους τα κατάλληλα τεχνολογικά μέσα για να μελετήσουν λεπτομερώς τη δομή της τοξίνης, ωστόσο κατάφεραν να εκτιμήσουν ότι το μοριακό της βάρος ήταν περίπου 3.300. Ο αριθμός αυτός ήταν ασυνήθιστος, λαμβάνοντας υπόψιν τις οικείες προς τους ερευνητές τοξίνες, όπως η τετροδοτοξίνη και η σαξιτοξίνη (Εικ.8), οι οποίες έχουν σημαντικά μικρότερα μοριακά βάρη, μικρότερα από 500. Το μοριακό βάρος της παλιτοξίνης είναι από μόνο του αξιοσημείωτο, ωστόσο γίνεται ακόμα πιο ενδιαφέρον, καθώς οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι δεν εντοπίζονται τμήματα βιοπολυμερών, δηλαδή η τοξίνη δεν αποτελείται από επαναλαμβανόμενες πεπτιδικές



Εικόνα 8 Δομή της Τετροδοτοξίνης και της Σαξιτοξίνης, Prof. Imran Ali, Hassan Y. Aboul-Enein, Ashraf Ghanem, 2005

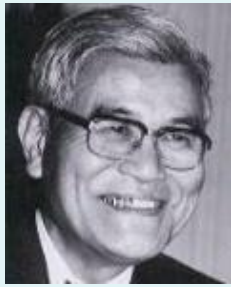
αλυσίδες ή μονάδες σακχάρων, οι οποίες χρησιμοποιούνται εκτενώς σε βιολογικά συστήματα για τη σύνθεση μακρομοριακών ενώσεων. Αντ'αυτού, η παλιτοξίνη ήταν ένας ιδιαίτερα μεγάλος σε μέγεθος και περίπλοκος σε δομή δευτερογενής μεταβολίτης, δηλαδή



Εικόνα 9 Μαϊτοτοξίνη προερχόμενη από φυτοπλαγκτόν, Charlesy - Own work, CC0

μία οργανική ένωση που παράγεται από τον μεταβολισμό ορισμένων οργανισμών (φυτά, μύκητες, βακτήρια) και δεν είναι απαραίτητη την ανάπτυξή τους. Μέχρι σήμερα, ο μοναδικός μεγαλύτερος δευτερογενής μεταβολίτης είναι η μαϊτοτοξίνη, μια άλλη, θαλάσσιας προέλευσης, τοξίνη (Εικ.9).

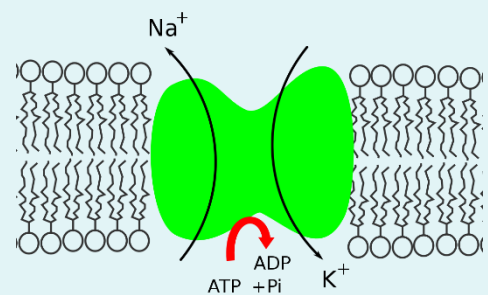
Η παλιτοξίνη συλλέχθηκε τον Δεκέμβριο του 1961 και η απομόνωσή της δημοσιεύθηκε στο περιοδικό *Science* το 1971. Ύστερα από εκτενή έρευνα, η οποία διεξήχθη από τον Richard E. Moore στο Πανεπιστήμιο της Χαβάης, η δομή της αποσαφηνίστηκε το 1981. Μια δεύτερη ερευνητική ομάδα, με ιθύνοντα τον Yoshimasa Hirata (Πανεπιστήμιο Ναγκόγια, Ιαπωνία, Εικ.10), επίσης δημοσίευσε την ολοκληρωμένη δομή της συγκεκριμένης τοξίνης το 1981. Η υδατοδιαλυτή αυτή ένωση αποτελείται από μια μακριά ευθύγραμμη αλυσίδα, στην οποία παρεμβάλλονται ομάδες δακτυλίων πυρανίου, η οποία δύναται να αποτυπωθεί σε διδιάστατη μορφή μόνο αν το μόριο τυλιχθεί γύρω από τον ευατό του αρκετές φορές.



Εικόνα 10 Ο Yoshimasa Hirata, Chemistry Tree - Yoshimasa Hirata

4. Τοξικότητα- Μηχανισμός Δράσης

Η παλιτοξίνη είναι μια από τις πιο θανατηφόρες τοξικές ουσίες που απαντώνται στη φύση. Μονάχα ορισμένες πρωτεΐνες, όπως η ρικίνη(προερχόμενη από φυτά), οι τοξίνες του βακτηρίου του τετάνου και μερικές θαλάσσιας προελεύσεως τοξίνες επιφέρουν θανατηφόρες συνέπειες σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Συγκεντρώσεις της τάξεως των νανογραμμομορίων είναι ικανές να αυξήσουν τη διαπερατότητα των μεμβρανών των αγγειακών μυϊκών κυττάρων για τα κατιόντα νατρίου και καλίου. Υψηλότερες συγκεντρώσεις επιτρέπουν τη διάχυση μεγαλύτερων μορίων, όπως η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Πιο συγκεκριμένα, η τοξίνη επιδρά στην αντλία νατρίου-καλίου (Na^+/K^+ -ATPάσης, Εικ.11), μετατρέποντάς τη σε μη εκλεκτικό κανάλι, αυξάνοντας, έσι, τη διαπερατότητα και οδηγώντας σε αποπόλωση των κυττάρων και πρόκληση μυϊκών σπασμών σε κάθε ευάλωτο όργανο. Συνεπώς, η παλιτοξίνη προκαλεί καρδιαγγειακή συστολή σε υψηλότερο βαθμό από κάθε άλλη γνωστή ένωση, ενώ συγχρόνως έχει επίδραση και στα νευρικά κύτταρα. Αρχικά, η παλιτοξίνη εξετάστηκε για πιθανή αντικαρκινική και αναισθησιακή δράση, ωστόσο, ακόμα κι αν παρουσίαζε τις επιθυμητές δράσεις, θα ήταν ριζοκίνδυνο να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο, εξαιτίας της υψηλής τοξικότητάς της.



Εικόνα 11 Απεικόνιση της αντλίας νατρίου-καλίου, Phi-Gastreïn fr.wikipediaderivative work: sonia - NaKpompe2.jpg, CC BY-SA 3.0

5. Σύνθεση

Ένας εξέχων συνθετικός χημικός, ο Yoshito Kishi (Εικ.12), ψάχνοντας για ενώσεις, με σκοπό να δοκιμάσει και βελτιώσει τις συνθετικές του ικανότητες, στράφηκε προς τις φυσικά παραγόμενες τοξίνες. Το έντονο ενδιαφέρον του για τα περίπλοκα και επικίνδυνα αυτά



Εικόνα 12 Ο Yoshito Kishi, Jū
- Own work, CC BY-SA 4.0

μόρια ξεκίνησε με την τοξίνη των ψαριών της οικογένειας *Tetraodontidae*, την τετροδοτοξίνη. Έπειτα από την ολοκλήρωση της σύνθεσής της, ο Kishi συνέχισε με τη σύνθεση τοξινών από ποικίλες προελεύσεις, από αυτές οι οποίες παράγονται από οστρακοειδή, έως αυτές οι οποίες εκκρίνονται από το δέρμα του δενδροβάτη (δηλητηριώδης δενδρόβιος βάτραχος Κεντρικής και Νότιας Αμερικής, Εικ.13). Το κορυφαίο επίτευγμα σε αυτό το ερευνητικό πεδίο ήταν η μνημειώδης σύνθεση της ολοκληρωμένης δομής της παλιτοξίνης από την ερευνητική ομάδα του Kishi το 1994.

Ο Kishi γνώρισε πρώτη φορά τη δαιδαλώδη δομή της παλιτοξίνης χάρη στον επόπτη του διδακτορικού του, τον Yoshimasa Hirata, στη Ναγκόγια. Ο Kishi συνέχισε την εργασία του στη μνήμη του μεταδιδακτορικού συμβούλου του, του περίφημου χημικού Robert B. Woodland. Εντούτοις, πριν ξεκινήσει ένα πρόγραμμα με στόχο τη σύνθεση της τοξίνης, έπρεπε πρώτα να αποδοθούν κάποιες ασάφειες σχετικά με την τριδιάστατη δομή του μορίου. Στην παλιτοξίνη εντοπίζονται εβδομήντα ένα στερεοχημικά στοιχεία, εκ των οποίων εξήντα τέσσερα ασύμμετρα άτομα άνθρακα και επτά γεωμετρικά ισομερή, εξαιτίας των διπλών δεσμών. Στις βιβλιογραφικές αναφορές του 1981, αναφερόταν μονάχα η σύσταση της ένωσης σε άτομα και οι μεταξύ τους δεσμοί, δηλαδή δεν υπήρχαν πληροφορίες σχετικά με την ακριβή διευθέτησή τους στον χώρο (στερεοχημεία). Ως αποτέλεσμα, η αναφερόμενη δομή περιλάμβανε 2^{71} πιθανούς στερεοχημικούς συνδυασμούς, άρα και ισομερή, εκ των οποίων μόνο ένα αντιπροσώπευε την πραγματική δομή της παλιτοξίνης. Ακόμα κι αν υπήρχαν ορισμένα γνωστά σημεία στο μόριο, το μεγαλύτερο εμπόδιο στη σύνθεσή του αποτελούσε το γεγονός ότι η διευθέτηση των είκοσι επτά από τα εξήντα τέσσερα ασύμμετρα άτομα άνθρακα ήταν άγνωστη. Επομένως, η

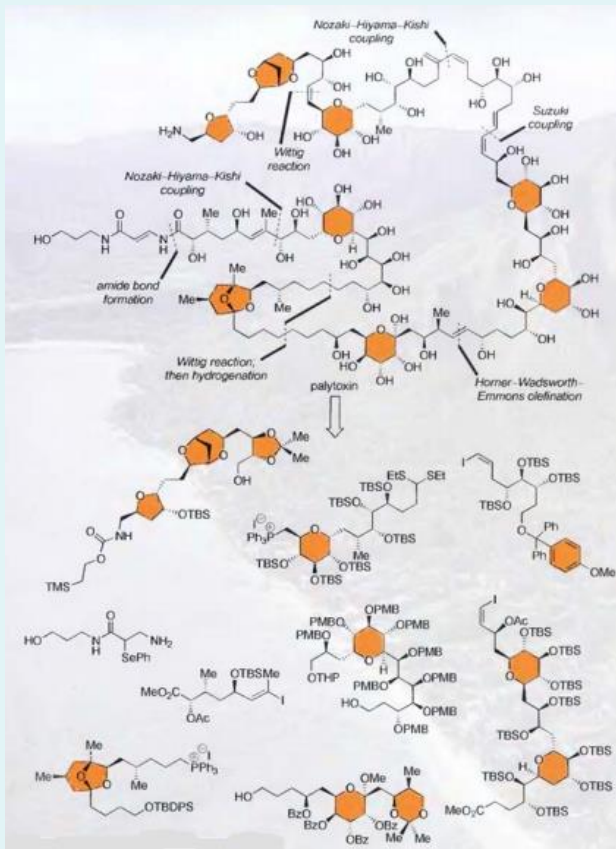


Εικόνα 13 Δηλητηριώδης βάτραχος του είδους *Oophaga histrionica*, Mauricio Rivera Correa.edu, CC BY-SA 2.5,

ερευνητική ομάδα του Kishi, σε διάστημα δύο ετών, κατέβαλε μια υπερπροσπάθεια για να ανακαλύψουν την πραγματική δομή της. Αξιοποιώντας

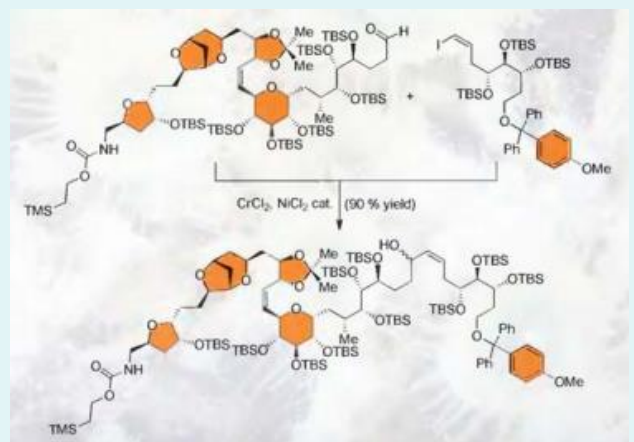
μια πληθώρα αναλυτικών τεχνικών, οι επιστήμονες επιτέλους κατάφεραν να την ταυτοποιήσουν, έτσι ώστε να κηρυχθεί η έναρξη μιας 'εκστρατείας' εξαιρετικής σημασίας, για τη σύνθεση αυτού του μορίου.

Για να επιτευχθεί αυτό, αρχικά έπρεπε το μεγάλο αυτό μόριο να διαιρεθεί σε μικρότερα διαχειρίσιμα δομικά τμήματα, και ύστερα από τη σύνθεση κάθε μέρους ξεχωριστά, να ενωθούν με σκοπό τον σχηματισμό της τοξίνης. Τμήμα της ρετροσυνθετικής διεργασίας δείχνεται στην Εικόνα 14. Στην πρόοδο της συνθετικής πορείας η οποία ακολούθησε, οι ερευνητές παρουσίασαν αρκετές καινοτόμες μεθόδους και αντιδράσεις, οι οποίες αποδείχθηκαν εξαιρετικά χρήσιμες στην οργανική συνθετική χημεία

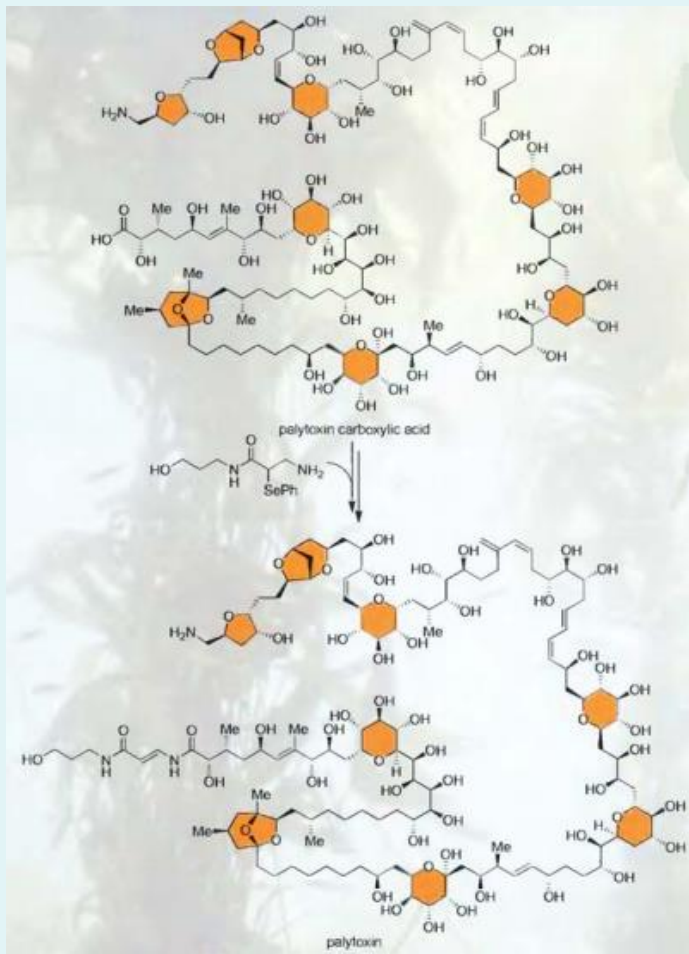


Εικόνα 14 Τμηματοποίηση της παλιτοξίνης σε μικρότερα, ευκολότερα στη σύνθεση, μόρια

γενικότερα. Ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζει η εκλεκτική προσθήκη ενός βινυλο-αλογονιδίου σε μια αλδεΐδη υπό ήπιες συνθήκες, για την παραλαβή της αντίστοιχης αλλυλικής αλκοόλης. Στην αντίδραση, η οποία αναπτύχθηκε σε πρώτη μορφή από τον Hitosi Nozaki (Πανεπιστήμιο Κιότο, Ιαπωνία) και τους συνεργάτες τους το 1983, πρωταρχικό ρόλο έχει η κατάλυση από ένα οργανικό παράγωγο χρωμίου με νικέλιο (Εικ.15). Το πλεονέκτημα της παρουσίας του νικελίου βρέθηκε τυχαία, διότι το νικέλιο αποτελεί επιμόλυνση στο εμπορικά διαθέσιμο χλωρίδιο του χρωμίου (II). Η σύνθεση του Kishi για την παλιτοξίνη παρουσίαζε την καταλύσιμη από παλλάδιο και βοηθούμενη από υδροξείδιο του θαλλίου κατασκευή ενός *cis trans* συζυγούς διενίου από βινυλο-ιωδίδιο και βινυλο-



Εικόνα 15 Η αντίδραση σχηματισμού της αλλυλικής αλκοόλης



Εικόνα 16 Η τελική αντίδραση για την παρασκευή της παλιτοξίνης

Η ερευνητική ομάδα του Kishi είχε σχεδόν ολοκληρώσει τη σύνθεση της ένωσης μέχρι το 1989, επιτυγχάνοντας ένα προηγμένο συνθετικό στάδιο, στο οποίο ως τελικό προϊόν προέκυπτε το καρβοξυλικό οξύ της παλιτοξίνης. Ωστόσο, η σύνθεση της επιθυμητής τοξίνης θα πραγματοποιούνταν πέντε χρόνια αργότερα. Το προαναφερθέν οξύ είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε βασικές και όξινες συνθήκες, με άλλα λόγια, ο σχηματισμός του απαιτούμενου αμιδικού δεσμού για την παραλαβή της τελικής ένωσης. Επίσης, τα απαραίτητα αντιδραστήρια για το τελικό στάδιο της σύνθεσης σχημάτιζαν διπλό δεσμό με *cis* ισομέρεια (μη επιθυμητή). Λύση στο πρόβλημα έδωσε ένα παράγωγο φαινυλο-σεληνιδίου (Εικ.16) με ταυτόχρονη φωτοχημική ισομερείωση του διπλού δεσμού για τον σχηματισμό της επιθυμητής *trans* γεωμετρίας. Έτσι, η παλιτοξίνη, το

μεγαλύτερο φυσικό προϊόν που είχε συντεθεί μέχρι τότε, κατασκευάστηκε το 1994, δεκαπέντε χρόνια μετά την πρώτη φορά που ασχολήθηκε ο Kishi με το περίπλοκο αυτό μόριο.

6. Συμπέρασμα

Η σύνθεση της παλιτοξίνης αντιπροσωπεύει έναν από τους κύριους θριάμβους της συνθετικής χημείας, μιας ολοένα αναπτυσσόμενης επιστήμης, οι δυνατότητες της οποίας είναι τεράστιες. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμα αρκετά περίπλοκα μόρια τα οποία περιμένουν να ανακαλυφθούν και να παρασκευαστούν με πιο αποδοτικές και αποτελεσματικές μεθόδους, αξιοποιώντας τις διαθέσιμες και τις νέες τεχνολογίες και στρατηγικές σύνθεσης. Παρόμοια επιτεύγματα αποτελούν κίνητρο να συνεχίσει η αναζήτηση ανακαλύψεων και εφευρέσεων, οι οποίες θα επωφελήσουν την ανθρωπότητα με ποικίλους τρόπους.

7. Βιβλιογραφία

- Sanchez S.; Demain A. L. **2011**, 1.10 Secondary Metabolites, *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*, Volume 1, 131- 143
- Καγιαβά Α. (2011). *Αξιολόγηση της επίδρασης παραγόντων καταπόνησης στη φυσιολογική λειτουργία του ισχιακού νεύρου των σπονδυλωτών* (Διδακτορική Διατριβή)
http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwi3j_HQj_nvAhVJNOwKHXw_Du8QFjAAegQIAhAD&url=http%3A%2F%2Fikee.lib.auth.gr%2Frecord%2F127216%2Ffiles%2FPhD%2520Kagiava%2520locked.pdf&usg=AOvVaw11DQ_C3r-U1fCfYKXJVzAR
- Nikolaou K.C.; Montagnon T. *Molecules that changed the world*, Wiley-VCH, 2008, p 199-206