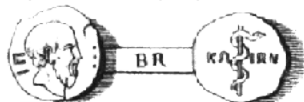




ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

"ωφελέειν, εἰ μὴ βλάπτειν"



'benefit and do not harm'

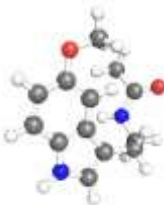
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ»

Φαρμακευτική Χημεία

**“Σχεδιασμός, σύνθεση και αποτίμηση της
μελατονινεργικής δράσης νέων C2-, C3α- και C3β-
υποκατεστημένων ινδολικών παραγώγων”**

ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ»**

Φαρμακευτική Χημεία

**“Σχεδιασμός, σύνθεση και αποτίμηση της
μελατονινεργικής δράσης νέων C2-, C3 α - και C3 β -
υποκατεστημένων ινδολικών παραγώγων”**

ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ανδρέα Τσοτίνη, τον οποίο ευχαριστώ εξαιρετικά για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ερευνητικό πεδίο το οποίο με μάγεψε από την πρώτη στιγμή. Οι συμβουλές και η καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου ήταν καθοριστικές, τόσο για την ακαδημαϊκή όσο και για την επαγγελματική μου εξέλιξη.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Παπαναστασίου, μέλος της Τριμελούς μου Επιτροπής, για τις υποδείξεις και την πολύτιμη βοήθειά του στα πρώτα μου εργαστηριακά βήματα, καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά τη διόρθωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαράκο για τις πολύτιμες συμβουλές του, τόσο κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μαθημάτων, όσο και κατά την διόρθωση της παρούσης μεταπτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ εξαιρετικά την Καθηγήτρια Margarita L. Dubocovich του Jacobs School of Medicine & Biomedical Sciences, University of Buffalo, New York, USA για τον φαρμακολογικό έλεγχο των νέων παραγώγων της μελατονίνης, ως προς την εκλεκτικότητα και το βαθμό σύνδεσής τους με τους υποδοχείς hMT_1 και hMT_2 .

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαιτέρως τα μέλη της ερευνητικής μας ομάδας, τις προπτυχιακές φοιτήτριες Αικατερίνη Σακελλαροπούλου, Μαρία Αυγεροπούλου και Μαρίνα Μπονιάκου για τη συνεργασία και τη φιλία τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Περίληψη	1
Abstract	2
1. Εισαγωγή.....	3
1.1. Γενικά στοιχεία για την ορμόνη Μελατονίνη	3
1.1.1. Μελατονίνη και Κιρκαδιανός Ρυθμός	4
1.2. Βιοσύνθεση της Μελατονίνης	6
1.3. Μεταβολισμός της Μελατονίνης	8
1.3.1. Μεταβολισμός στο ήπαρ	8
1.3.2. Μεταβολισμός στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	9
1.3.3. Μεταβολισμός στον αμφιβληστροειδή χιτώνα	10
1.4. Υποδοχείς της Μελατονίνης	10
1.4.1. Γενικά στοιχεία	10
1.4.2. Μηχανισμός επαγωγής σήματος μέσω G-πρωτεϊνών	11
1.4.3. Ταξινόμηση υποδοχέων	13
1.4.4. MT1	13
1.4.5. MT2.....	13
1.4.6. MT1/MT2 ετεροδιμερή	14
1.4.7. MT3	14
1.4.8. Mel1c	15
1.5. Θεωρητικά Μοντέλα Σύνδεσης της Μελατονίνης	15
1.5.1. Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης Σύνδεσης κατά Sugden	16
1.5.2. Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης σύνδεσης κατά Jansen και Grol	17
1.5.3. Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης σύνδεσης κατά Navajas	17
1.5.4. Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης σύνδεσης κατά Ivanov	18
1.5.5. Μοντέλα Μοριακής Προσομοίωσης Σύνδεσης στον MT2 υποδοχέα	18
1.5.6. Συγκριτικό Μοντέλο Προσομοίωσης MT1 και MT2 υποδοχέων, κατά Farce	20
1.6. Σηματοδοτικά Μονοπάτια	21
1.7. Θεραπευτικές Δράσεις και Χρήσεις της Μελατονίνης	23
1.7.1. Διαταραχές ύπνου	23
1.7.2. Αντιοξειδωτική Δράση	24
1.7.3. Αντικαρκινική Δράση	25
1.7.4. Διαβήτης	25
1.7.5. Ανοσοενισχυτική Δράση	26
1.7.6. Λοιπές Δράσεις	26
2. Σχέσεις Δομής-Δράσεις: Σχεδιασμός Νέων Μελατονινεργικών Ενώσεων	27
2.1. Χαρτογράφηση των Μελατονινεργικών Υποδοχέων	27
2.2. Αγωνιστές της Μελατονίνης	30
2.3. Ανταγωνιστές της Μελατονίνης	32
2.4. Στόχος της παρούσης Διπλωματικής Εργασίας	34
3. Χημικό Μέρος	36

3.1	Συνθετικές μελέτες για την παρασκευή των νέων αναλόγων 32- 34 της Σειράς A	36
3.1.1.	Ρετροσυνθετική ανάλυση	36
3.1.2.	Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων 32 - 34	37
3.2.	Συνθετικές μελέτες για την παρασκευή των νέων αναλόγων 37-39 της Σειράς B	39
3.2.1.	Ρετροσυνθετική ανάλυση	39
3.2.2.	Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων 37-39	40
3.3.	Συνθετικές μελέτες για την παρασκευή των νέων αναλόγων 39- 41 της Σειράς C	43
3.3.1.	Ρετροσυνθετική ανάλυση	43
3.3.2.	Συνθετική πορεία για την παρασκευή των αναλόγων 39 - 41	44
3.4.	Συνθετικές μελέτες για την παρασκευή των νέων αναλόγων 52 - 54 της Σειράς D	45
3.4.1.	Ρετροσυνθετική ανάλυση	46
3.4.2.	Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων 52 - 54	47
3.5.	Συνθετικές μελέτες για την παρασκευή των νέων αναλόγων 58 - 60 της Σειράς E	47
3.5.1.	Ρετροσυνθετική ανάλυση	48
3.5.2.	Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων 58 - 60	49
4.	Πειραματικό Μέρος	49
4.1.	Υλικά και Μέθοδοι	50
4.2.	Σειρά A: Σύνθεση των αναλόγων 32, 33 και 34	50
4.2.1.	Σύνθεση της 2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολοκαρβοξαλδεΰδης (29).....	50
4.2.2.	Σύνθεση της οξίμης της 2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολοκαρβοξαλδεΰδης (30)	51
4.2.3.	Σύνθεση της (2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)μεθαναμίνης (31)	51
4.2.4.	Σύνθεση του <i>N</i> -2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλομεθυλοβουτυραμίδιου (32)	52
4.2.5.	Σύνθεση του <i>N</i> -2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλομεθυλακεταμίδιου (33)	52
4.2.6.	Σύνθεση του <i>N</i> -2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλομεθυλοπροπαναμίδιου (34)	53
4.3.	Σειρά B: Σύνθεση των αναλόγων 37, 38 και 39	53
4.3.1.	Σύνθεση του (<i>E</i>)-3-(2-νιτροπροπ-1-εν-1-υλο)-2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολίου (35)	53
4.3.2.	Σύνθεση της 1-2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλοπροπαν-2-αμίνης (36)	53
4.3.3.	Σύνθεση του <i>N</i> -[1-(2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλ]ακεταμίδιου (37)...	54
4.3.4.	Σύνθεση του <i>N</i> -[1-(2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλο]προπαναμίδιου (38)	54
4.3.5.	Σύνθεση του <i>N</i> -[1-(2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλο]βουτυραμίδιου (39)	55
4.4.	Σειρά C: Σύνθεση των αναλόγων 44, 45 και 46	56
4.4.1.	Σύνθεση της 2-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-καρβοξαλδεΰδης (41)	56
4.4.2.	Σύνθεση του 2-μεθυλο-3-(2-νιτροπροπενυλο)- 1 <i>H</i> -ινδολίου (42)	56
4.4.3.	Σύνθεση της 1-(2-μεθυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπαν-2-αμίνης (43)	57
4.4.4.	Σύνθεση του <i>N</i> -1-(2-μεθυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλοακεταμίδιου (44) ...	57
4.4.5.	Σύνθεση του <i>N</i> -1-(2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλοπροπαναμίδιου (45).....	58
4.4.6.	Σύνθεση του <i>N</i> -1-(2-φαινυλ-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλοβουτυραμίδιου (46).....	58
4.5.	Σειρά D: Σύνθεση των αναλόγων 52, 53 και 54	59
4.5.1.	Σύνθεση του <i>tert</i> -βουτυλο-3-(κυανομεθυλο)-1 <i>H</i> -ινδολο-1-καρβοξυλικού εστέρα (48).....	59
4.5.2.	Σύνθεση του <i>tert</i> -βουτυλ-3-(1-κυανοαιθυλο)-1 <i>H</i> -ινδολο-1-καρβοξυλικού εστέρα (49)	59
4.5.3.	Σύνθεση του 2-1 <i>H</i> -ινδολο-3-υλοπροπανονιτριλίου (50)	60
4.5.4.	Σύνθεση της 2-1 <i>H</i> -ινδολο-3-υλοπροπαν-1-αμίνης (51)	60

4.5.5.	Σύνθεση του <i>N</i> -2-1 <i>H</i> -ινδολο-3-υλοπροπυλακεταμίδιου (52)	61
4.5.6.	Σύνθεση του <i>N</i> -2-1 <i>H</i> -ινδολο-3-υλοπροπυλοπροπαναμίδιου (53)	61
4.5.7.	Σύνθεση του <i>N</i> -2-1-1 <i>H</i> -ινδολο-3-υλοπροπυλοβουτυραμίδιου (54)	62
4.6	Σειρά Ε: Σύνθεση αναλόγων 58, 59 και 60	62
4.6.1.	Σύνθεση του <i>tert</i> -βουτυλο- 3-(2-κυανοπροπαν-2-υλ)-1 <i>H</i> -ινδολοκαρβοξυλικού εστέρα (55)	62
4.6.2.	Σύνθεση του 2-1 <i>H</i> -ινδολο-3-υλο-2-μεθυλοπροπανονιτριλίου (56)	63
4.6.3.	Σύνθεση της 2-(1 <i>H</i> -ινδολο-3-υλο)-2-μεθυλοπροπαν-1-αμίνης (57)	63
4.6.4.	Σύνθεση του <i>N</i> -2(1 <i>H</i> -ινδολο-3-υλο)2-μεθυλοπροπυλακεταμίδιου (58)	64
4.6.5.	Σύνθεση του <i>N</i> -2-(1 <i>H</i> -ινδολο-3-υλο)-2-μεθυλοπροπυλοπροπαναμίδιου (59).....	64
4.6.6.	Σύνθεση του <i>N</i> -2-(1 <i>H</i> -ινδολο-3-υλο)-2-μεθυλοπροπυλοβουτυραμίδιου (60)....	65
5.	Φαρμακολογική Αξιολόγηση	66
5.1.	Μελέτες πρόσδεσης έναντι της 2-[¹²⁵ I]-Ιωδομελατονίνης	66
5.2.	Ανάλυση φαρμακολογικών αποτελεσμάτων	67
6.	Βιβλιογραφία	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά στο σχεδιασμό και τη σύνθεση πέντε νέων σειρών παραγώγων του ινδολίου, τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς τη μελατονινεργική τους δράση.

Η ορμόνη μελατονίνη, χαρακτηριζόμενη ευρέως ως «η ορμόνη του ύπνου» είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση των κερκαδιανών ρυθμών στον οργανισμό και, κατ' επέκταση, τη φυσιολογική του λειτουργία. Στο εισαγωγικό πρώτο μέρος της παρούσης εργασίας, αναφέρονται εν συντομία γενικές πληροφορίες σχετικά με το ιστορικό, τη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό της ορμόνης, καθώς και σημαντικές πληροφορίες για τους μελατονινεργικούς υποδοχείς της και τα σημαντικότερα μοριακά μοντέλα πρόσδεσης που έχουν περιγραφεί. Ακολουθεί μία σύντομη αναφορά επί των θεραπευτικών ιδιοτήτων της μελατονίνης, τονίζοντας την ανάγκη περαιτέρω μελέτης, λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων της σε ποικίλες ασθένειες και παθήσεις.

Στη συνέχεια, στο δεύτερο μέρος της εργασίας, παρουσιάζονται στοιχεία από τις πολυετείς μελέτες χαρτογράφησης των μελατονινεργικών υποδοχέων καταλήγοντας στο σχεδιασμό των πέντε νέων σειρών αναλόγων της μελατονίνης. Η ρετροσυνθετική ανάλυση καθώς και η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των νέων ινδολο-C2, C3 α , C3 β - υποκατεστημένων παραγώγων της μελατονίνης περιγράφονται αναλυτικά στο τρίτο και τέταρτο μέρος της εργασίας.

Τέλος, ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από το φαρμακολογικό έλεγχο επί των νέων παραγώγων, σε κύτταρα τύπου CHO (Chinese Hamster Ovarian cells) που εκφράζουν τους υποδοχείς *hMT*₁ και *hMT*₂. Γενικώς, τα νέα ανάλογα που παρασκευάστηκαν στα πλαίσια της παρούσης εργασίας διαθέτουν ικανοποιητική δράση και ως προς τους δύο υποδοχείς (*hMT*₁ και *hMT*₂), με ορισμένα εξ' αυτών να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη εκλεκτικότητα. Με βάση την ανάλυση και τη συζήτηση των αποτελεσμάτων αυτών, ως προς την σύγκρισή τους με την εκλεκτικότητα και το βαθμό σύνδεσης της ίδιας της φυσικής ορμόνης, προτείνεται ο σχεδιασμός νέων μελατονινεργικών παραγώγων, με πιθανόν πιο βελτιωμένη μελατονινεργική δράση.

ABSTRACT

The present dissertation refers to the design and synthesis of five series of new indolic derivatives, which were tested for their melatoninergetic activity.

The hormone melatonin, widely known as the “sleeping hormone”, regulates the circadian rhythms of many organisms, bacteria and mammals, including humans. In the first part of this work, information about the history, biosynthesis and metabolism is shortly cited, as well as literature findings about the melatonin receptors and the relevant molecular models used to describe them.

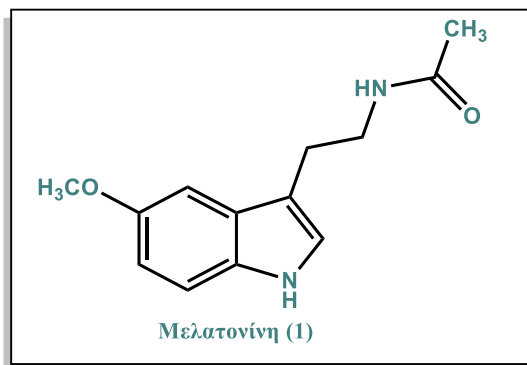
In the second chapter, information about the extensive research on melatonin receptor mapping studies are presented, subsequently resulting in the design of the five new series of melatonin analogs. The retrosynthetic route and experimental course followed for the synthesis of the new indolic- C2, C3 α , C3 β - compounds, is stated in the third and fourth chapter of this dissertation.

In the last chapter the pharmacological results on CHO (Chinese Hamster Ovarian cells) *hMT1*, *hMT2* cells, are evaluated and compared to the activity of the melatonin hormone itself. In general, all of the new indolic compounds, prepared in the context of this work, show satisfactory activity with respect to both receptor subtypes (*hMT1* and *hMT2*) and a number of them show a noteworthy selectivity. Based on the analysis of the above mentioned pharmacological results, the design of a new series of potential melatoninergetics is proposed.

1. Εισαγωγή

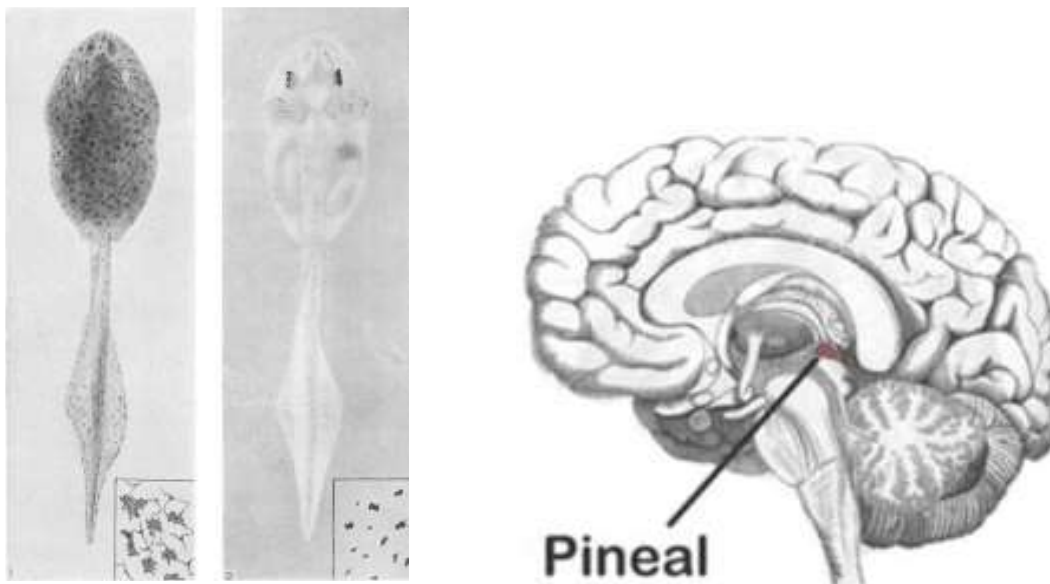
1.1. Γενικά στοιχεία για την ορμόνη Μελατονίνη

Η μελατονίνη είναι μία ορμόνη, η οποία συντίθεται στην επίφυση του εγκεφάλου. Η πρώτη βιολογική



δράση της μελατονίνης εντοπίζεται το 1917, όταν οι McCord και Allan, ανακάλυψαν ότι η εκτροφή γυρίνων με ιστούς βόειας επίφυσης, προκαλούσε, μέσα σε χρονικό διάστημα 45 λεπτών, τον αποχρωματισμό του δέρματός τους (**Εικόνα 1α**)¹. Βασισμένοι σε αυτή την έρευνα, το 1958, ο Lerner και η ερευνητική του ομάδα επανέλαβαν τα πειράματα. Παρατήρησαν ότι το εκχύλισμα από βόεια υπόφυση, προκαλούσε λεύκανση στο δέρμα βατράχων *Rana ripiens*, στο οποίο προηγουμένως είχε προκληθεί τεχνητή μελάνωση μετά από χορήγηση της ορμόνης α-

MSH (Melanocyte Stimulating Hormone)². Έναν χρόνο αργότερα η ίδια ερευνητική ομάδα ταυτοποίησε τη χημική δομή της μελατονίνης, ως την *N*-ακετυλο-5-μεθοξυθρυπταμίνη (**1**)³, το πρώτο μεθοξυ-ινδόλιο που εντοπίστηκε σε ιστούς θηλαστικών⁴.



Εικόνα 1: α) (αριστερά) αποχρωματισμός του δέρματος γυρίνων, 45 λεπτά μετά την χορήγηση μελατονίνης¹. β) (δεξιά) ο αδένας της επίφυσης στον εγκέφαλο⁷.

Η μελατονίνη απαντάται ευρέως σε πολλούς οργανισμούς στη φύση, μεταξύ των οποίων ο άνθρωπος, τα υπόλοιπα θηλαστικά, τα φυτά και κάποιοι μικροοργανισμοί^{5,6}. Στον άνθρωπο, αποτελεί την κυριότερη ορμόνη που εκκρίνει η επίφυση. Η επίφυση είναι ένας αδένας, ο οποίος βρίσκεται στο κέντρο

του εγκεφάλου, στο οπίσθιο τοίχωμα της 3ης κοιλίας, πάνω από το τετράδυμο και νευρώνεται από μεταγαγγλιακές ίνες του άνω αυχενικού γαγγλίου⁷ (**Εικόνα 1β**). Οι μέσες διαστάσεις του αδένος σε έναν ενήλικα είναι 5-9 mm μήκος, 1-5 mm πλάτος και 3-5 mm πάχος, ενώ το βάρος του κυμαίνεται από 100-180 mg⁵. Τα στοιχεία αυτά μεταβάλλονται σημαντικά ανάλογα με την ηλικία ή το φύλο.

1.1.1. Μελατονίνη και Κιρκαδιανός Ρυθμός

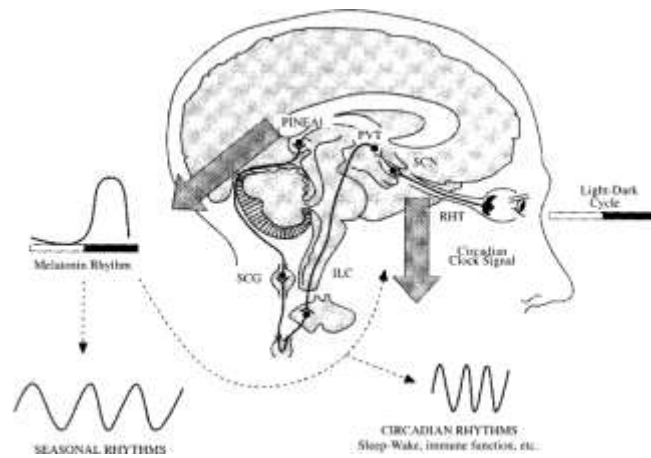


Εικόνα 2 Το «εσωτερικό ρολόι» του ανθρώπου. Οι κιρκαδιανόι ρυθμοί διαφόρων λειτουργιών⁹.

Είναι ευρέως γνωστό ότι η ζωή όλων των οργανισμών είναι προσαρμοσμένη στη περιοδική περιστροφή του πλανήτη. Έρευνες πολλών ετών έχουν δείξει πως όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα «εσωτερικό βιολογικό ρολόι», το οποίο ορίζει τους ρυθμούς λειτουργίας τους κατά την διάρκεια της ημέρας. Παρουσιάζοντας εξαιρετική ακρίβεια, το βιολογικό αυτό ρολόι προσαρμόζει, ανάλογα με τις διαφορετικές φάσεις της ημέρας, λειτουργίες της φυσιολογίας των οργανισμών, όπως τον ύπνο, τη θερμοκρασία του σώματος, το μεταβολισμό και τα επίπεδα ορμονών, αλλά ακόμα και τη συμπεριφορά. Κατά κανόνα, οι κύριες αυτές

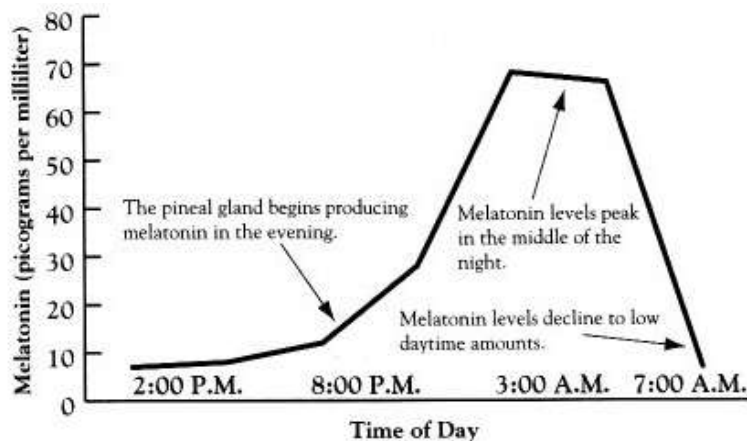
φυσιολογικές λειτουργίες ακολουθούν κυκλική διακύμανση, η οποία διαρκεί περίπου 24 ώρες^{8,9}. Το 1959, ο Franz Hallberg εισήγαγε τον όρο *κιρκαδιανό ρυθμό* (*circadian*: *circa*= γύρω, *diem*= ημέρα), ως την οποιαδήποτε βιολογική διαδικασία που παρουσιάζει ενδογενή περιοδική μεταβολή σε διάστημα 24 ωρών, όρος ο οποίος επισημοποιήθηκε το 1977 από την Διεθνή Ένωση Χρονοβιολογίας (**Εικόνα 2**). Έρευνες έχουν καταδείξει ότι χρόνιες αναντιστοιχίες του εξωτερικού περιβάλλοντος, ή των συνηθειών της καθημερινότητας με τους ρυθμούς που ορίζει το κιρκαδιανό ρολόι, πιθανώς σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων ασθενειών όπως, μεταβολικές και ορμονικές διαταραχές, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και διάφορες μορφές καρκίνου^{10,11}.

Η ρύθμιση των κιρκαδιανών ρυθμών, επιτυγχάνεται μέσω της επίδρασης του ηλιακού φωτός στους φωτοαισθητήρες που διαθέτει ο κάθε οργανισμός. Μία εκ των βασικότερων λειτουργιών των φωτοαισθητήρων αυτών, είναι η σύνθεση της μελατονίνης. Η βιοσύνθεση της μελατονίνης είναι αυστηρά περιοδική: λαμβάνει χώρα μόνο κατά τη διάρκεια της νύχτας και διακόπτεται παρουσία φωτός. Οι φωτοαισθητήρες του οφθαλμού συνδέονται μέσω της αμφιβληστροειδοϋποθαλαμικής οδού με τον υπερχιασματικό πυρήνα (*Suprachiasmatic Nuclei, SCN*). Τόσο στα ημερόβια, όσο και στα νυκτόβια ζώα, οι νευρώνες του υπερχιασματικού πυρήνα του υποθαλάμου, είναι ενεργοί κατά τη διάρκεια της ημέρας, ενώ αναστέλλονται τη νύχτα.



Εικόνα 3: Νευρωνική οδός μεταφοράς του φωτεινού ερεθίσματος από τα φωτοαισθητήρια κύτταρα του αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού στην επίφυση, μέσω του SCN και έλεγχος της βιοσύνθεσης της μελατονίνης.

Πιο συγκεκριμένα, το φως διεγείρει κυτταρικά γάγγλια στον αμφιβληστροειδή χιτώνα με αποτέλεσμα τη μεταφορά νευρικών ερεθισμάτων στον πρόσθιο υποθάλαμο και τον υπερχιασματικό πυρήνα. Ο υπερχιασματικός πυρήνας μεταβιβάζει το φωτεινό ερέθισμα στην επίφυση, μέσω μίας πολυσυναπτικής οδού, η οποία περιλαμβάνει τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, τους προγαγγλιακούς συμπαθητικούς νευρώνες στην άνω θωρακική μοίρα, τα ανώτερα αυχενικά γάγγλια και τέλος την επίφυση, όπου η αποδέσμευση της νορεπινεφρίνης αναστέλλει τη βιοσύνθεση της μελατονίνης. Με τον τρόπο αυτό η σύνθεση της μελατονίνης επάγεται μέσω του σκότους και αναστέλλεται από την πρόσπτωση φωτός στον αμφιβληστροειδή χιτώνα (**Εικόνα 3**)^{12,13}. Η παραγωγή της μελατονίνης συμβαδίζει με τον ύπνο. Η έναρξη παραγωγής της ορμόνης ξεκινά με τη δύση του ήλιου, κατά τις απογευματινές ώρες, αυξάνεται περίπου 2 ώρες πριν τη συνήθη ώρα έναρξης του ύπνου και κορυφώνεται κατά την διάρκειά του (**Εικόνα 4**)¹⁴.



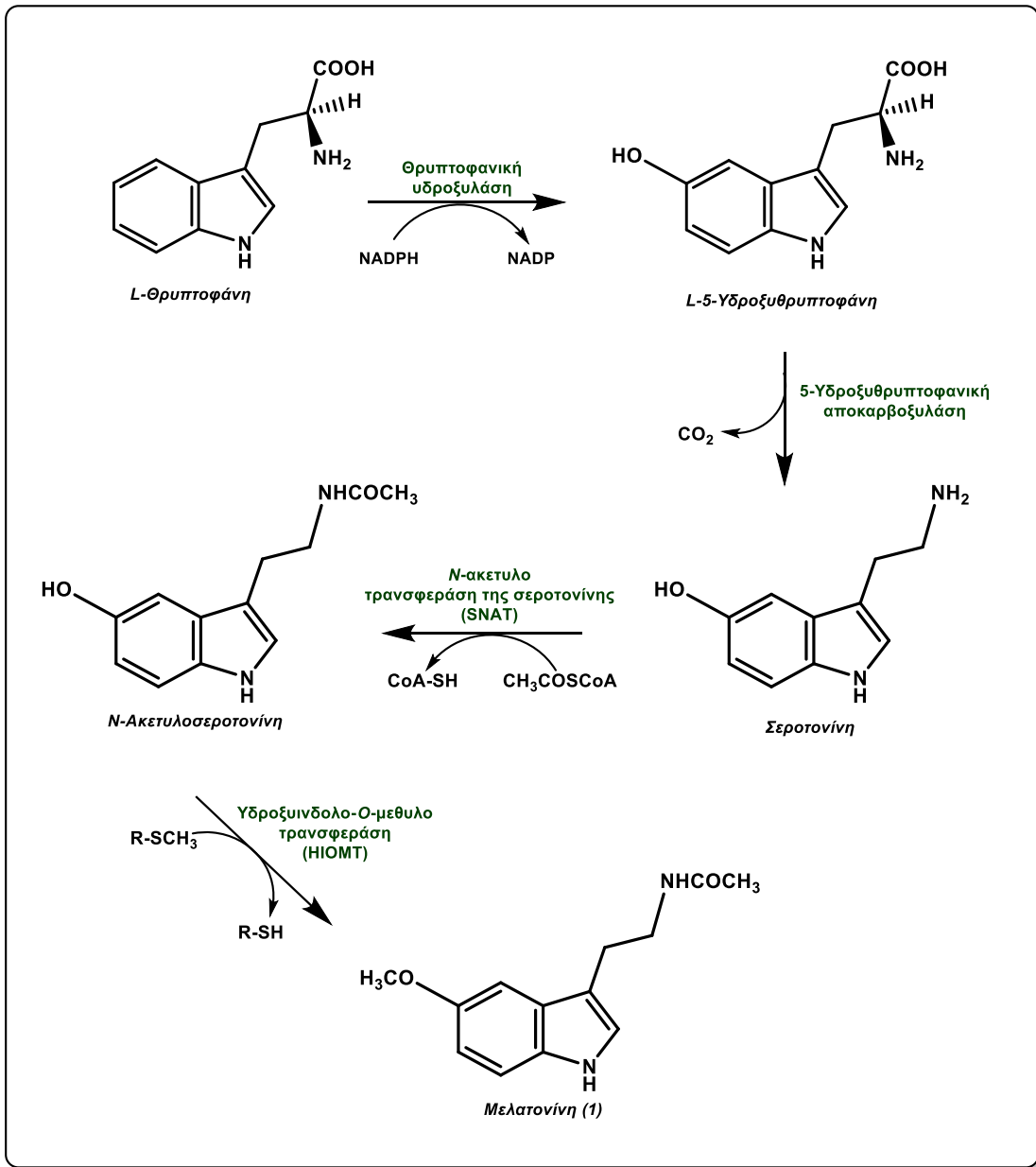
Εικόνα 4: Διακύμανση των επιπέδων μελατονίνης στον ορό του αίματος, κατά την διάρκεια 24h.

Το 2017, οι Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash και Michael W. Young βραβεύτηκαν με βραβείο Nobel Φυσιολογίας για την ανακάλυψη μοριακών μηχανισμών, υπεύθυνων για την ρύθμιση του κίρκαδιανού ρυθμού⁹.

1.2. Βιοσύνθεση της Μελατονίνης

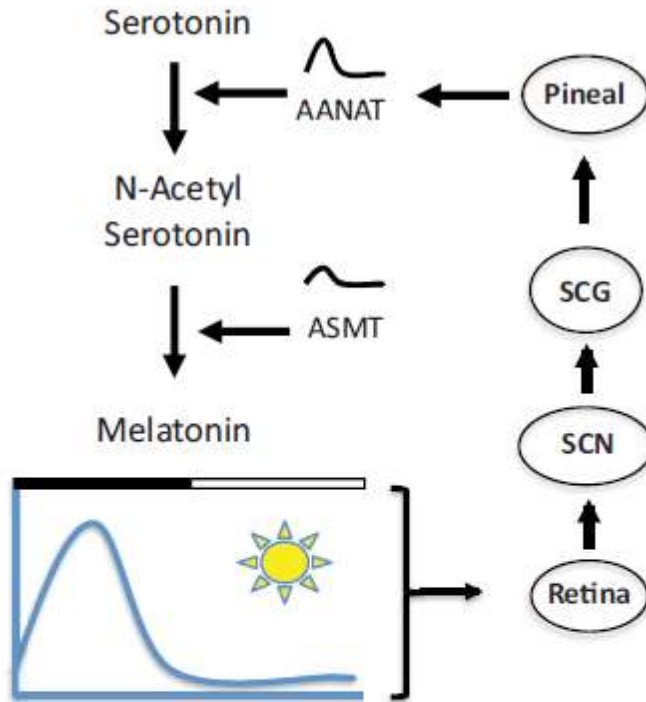
Η βιοσύνθεση της μελατονίνης στα θηλαστικά, λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο σε δύο όργανα: στην επίφυση και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Τα δύο αυτά όργανα είναι μέρη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και αποτελούν τα δύο βασικότερα φωτοαισθητήρια όργανα στα θηλαστικά και, ανάλογα με το είδος του οργανισμού που απαντώνται, είναι ικανά να ελέγχουν του κίρκαδιανούς ρυθμούς. Παρ' όλες τις ομοιότητές τους, η βιοσύνθεση της μελατονίνης στα δύο αυτά όργανα αποβλέπει σε διαφορετικούς σκοπούς. Η μελατονίνη που συντίθεται στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, παράγεται κατά την διάρκεια ενδογενούς σηματοδότησης και υπό φυσιολογικές καταστάσεις δεν εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Αντιθέτως, η ορμόνη που συντίθεται στην επίφυση αποδεσμεύεται στα αιμοφόρα αγγεία και αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό μελατονίνης στον οργανισμό¹⁵.

Η βιοσύνθεσή της, απεικονίζεται στην **εικόνα 5**. Πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση της μελατονίνης αποτελεί η σεροτονίνη, η οποία με τη σειρά της παράγεται από την *L*-θρυπτοφάνη¹⁶. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα της επίφυσης προσλαμβάνουν *L*-θρυπτοφάνη από το αίμα και τη μετατρέπουν αρχικά, μέσω υδροξυλίωσης, προς την *L*-5-υδροξυθρυπτοφάνη, με δράση του ενζύμου *θρυπτοφανική υδροξυλάση*. Το ένζυμο *θρυπτοφανική αποκαρβοξυλάση*, ακολούθως, αποκαρβοξυλιώνει την *L*-5-υδροξυθρυπτοφάνη προς τη βιογενή αμίνη σεροτονίνη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται προς μελατονίνη με μία διαδικασία δύο σταδίων. Στο πρώτο στάδιο η σεροτονίνη ακετυλιώνεται από το *ακετυλοσυνένζυμο Α (CoA)* προς την *N*-ακετυλοσεροτονίνη με τη βοήθεια μίας *N*-ακετυλοτρανσφεράσης (NAT). Στο δεύτερο στάδιο η *N*-ακετυλοσεροτονίνη μετατρέπεται προς τη μελατονίνη παρουσία του ενζύμου *υδροξυϊνδολο-Ο-μεθυλοτρανσφεράση (HIOMT)*, σε μία αντίδραση, όπου δότης μεθυλίου είναι η *S*-αδενοσυλομεθειονίνη⁷.



Εικόνα 5: Βιοσυνθετική πορεία της ορμόνης μελατονίνης¹⁶.

Οι πρώτες έρευνες επί της ρύθμισης της έκφρασης της μελατονίνης επικεντρώθηκαν στο τελευταίο ένζυμο της πορείας, την *υδροξυϊνδολο-Ο-μεθυλοτρανσφεράση (HIOMT)*: η δράση του ενζύμου αυτού, εμφάνιζε σημαντική μείωση στους ιστούς ποντικών, μετά από διαρκή έκθεση σε φως. Παρόλα αυτά, το ενδιαφέρον των ερευνητών επικεντρώθηκε στη διαδικασία ακετυλίωσης της σεροτονίνης και τις διαφοροποιήσεις που αυτή παρουσίαζε, παρουσία ή απουσία φωτός. Τελικά, οι Pierre Voisin, M.A.A Namboodiri και D.C. Klein ανακάλυψαν πως το ένζυμο ελέγχου της σύνθεσης της μελατονίνης είναι η *αρυλοαλκυλαμινο-N-ακετυλοτρανσφεράση (AANAT)* ή αλλιώς *N-ακετυλοτρανσφεράση της σεροτονίνης (SNAT)*^{17,18}.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της βιοσύνθεσης της μελατονίνης απουσία/παρουσία φωτός. Κατά τη διάρκεια της ημέρας ο υπερχιασματικός πυρήνας (SCN) αναστέλλει την βιοσύνθεση της ορμόνης, ενώ αντιθέτως κατά τη διάρκεια της νύχτας, προάγει την έκφραση του γονιδίου της αρυλοαλκυλαμινο-N-ακετυλοτρανσφεράσης, η οποία μετατρέπει τη σεροτονίνη σε N-ακετυλοσεροτονίνη, βήμα καθοριστικό για τη βιοσυνθετική πορεία της μελατονίνης.¹⁸

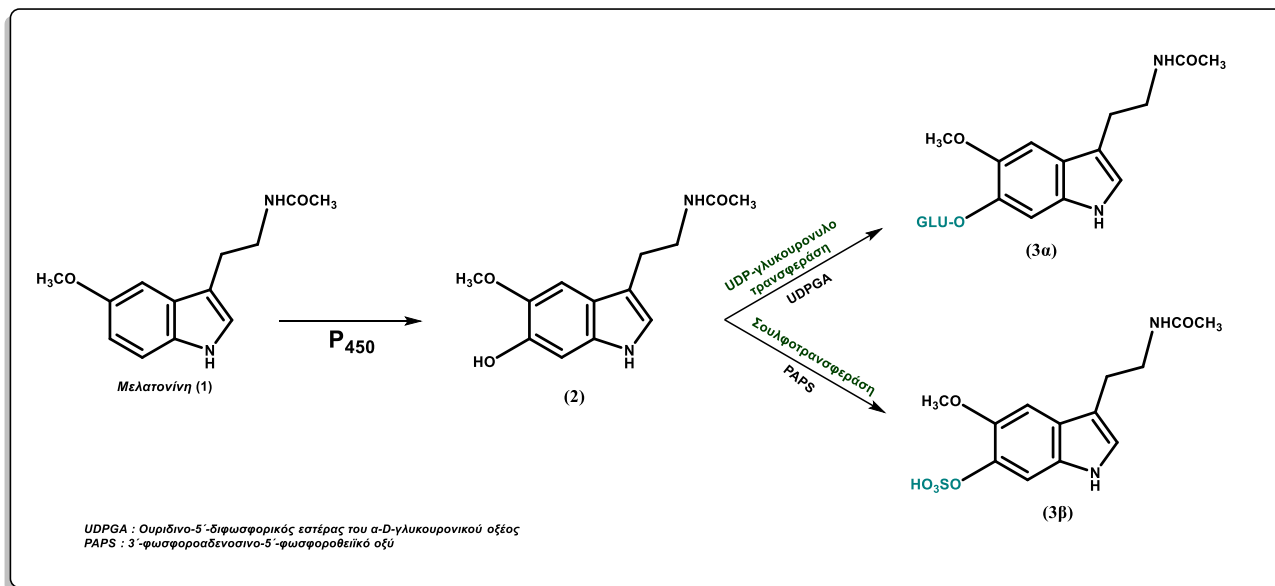
1.3. Μεταβολισμός της Μελατονίνης

Η μελατονίνη, λόγω της ισχυρής παρουσίας της στην κυκλοφορία του αίματος και του μεγάλου όγκου κατανομής της, μεταβολίζεται ταχέως. Ο χρόνος ημιζωής της είναι ταχύς (περίπου 40 λεπτά) και ο μεταβολισμός της λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, το ΚΝΣ και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα¹⁹. Οι μεταβολικές πορείες αναλύονται στις ακόλουθες ενότητες.

1.3.1. Μεταβολισμός στο ήπαρ ²⁰⁻²²

Η μελατονίνη μεταβολίζεται στο ήπαρ σε ποσοστό 90%. Αρχικά, η μελατονίνη μεταβολίζεται από το *κυτόχρωμα P-450*, οπότε και υδροξυλιώνεται στη θέση 6 του ινδολικού πυρήνα. Στη συνέχεια, η 6-υδροξυμελατονίνη (**2**) είτε συζευγνύεται με γλυκουρονικό οξύ, οπότε προκύπτει το παράγωγο **3α**, είτε μετατρέπεται προς τον όξινο θειικό εστέρα **3β**, με την επίδραση της σουλφοτρανσφεράσης. Ο εστέρας

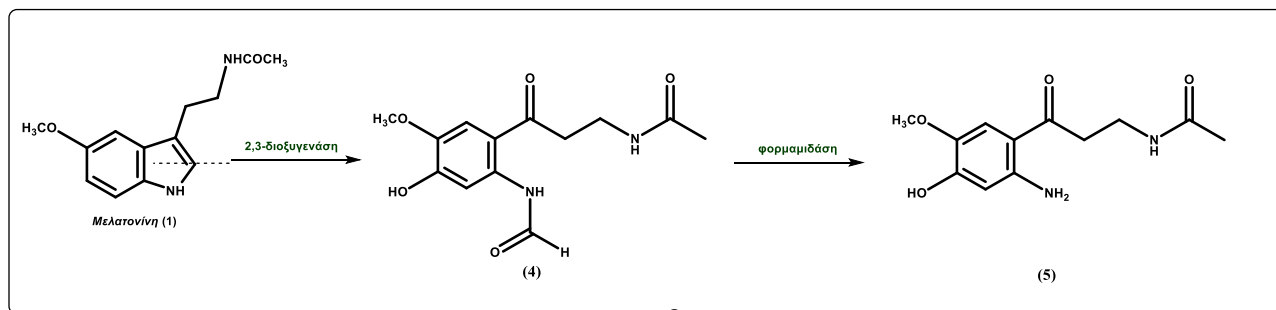
3β, αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη που αποβάλλεται από τον οργανισμό διαμέσου της νεφρικής οδού (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7: Μεταβολισμός της μελατονίνης στο ήπαρ

1.3.2. Μεταβολισμός στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) η μελατονίνη μεταβολίζεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα η αποικοδόμηση του πυρρολικού τμήματος του μορίου μεταξύ των ατόμων άνθρακα C2-C3, παρουσία της 2,3-διοξυγενάσης, οπότε σχηματίζεται η κυνουρεναμίνη (**4**). Στο δεύτερο στάδιο το διαμίδιο **4** μετατρέπεται προς το αμινοπαράγωγο (**5**) με τη δράση του ενζύμου *φορμαμίδση*²³ (**Εικόνα 8**).

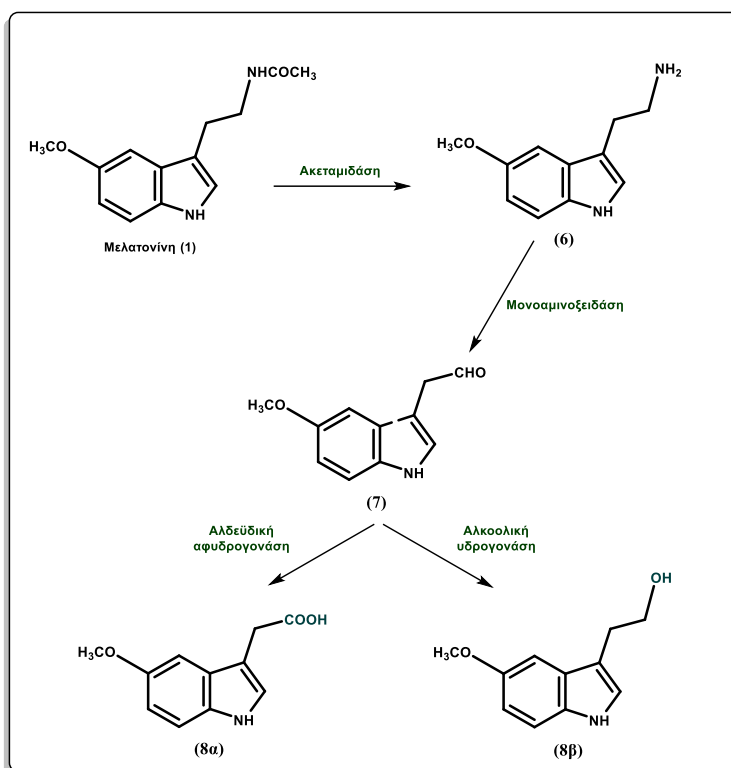


Εικόνα 8: Μεταβολισμός της μελατονίνης στο ΚΝΣ.

1.3.3. Μεταβολισμός στον αμφιβληστροειδή χιτώνα

Στην παρακάτω εικόνα, απεικονίζεται ο μεταβολισμός της μελατονίνης στον αμφιβληστροειδή χιτώνα.

Στον αμφιβληστροειδή χιτώνα ο μεταβολισμός της μελατονίνης περιλαμβάνει αρχικά την απακετυλίωσή της, προς τη 5-μεθοξυθρυπταμίνη (6), μετά από την επίδραση μιας *ακεταμιδάσης*. Η 5-μεθοξυθρυπταμίνη, στη συνέχεια, υφίσταται απαμίνωση παρουσία της *μονοαμινοξειδάσης*, οπότε προκύπτει η (5-μεθοξυ-ινδολ-3-υλ)ακεταλδεΐδη (7). Ακολούθως, η αλδεΐδη 7 είτε οξειδώνεται προς το (5-μεθοξυ-ινδολ-3-υλ)οξικό οξύ (8α), παρουσία της *αλδεϋδικής αφυδρογονάσης*, είτε ανάγεται προς την 5-μεθοξυθρυπτοφόλη (8β) με την επίδραση της *αλκοολικής υδρογονάσης*^{17,18} (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9: Μεταβολισμός της μελατονίνης στον αμφιβληστροειδή χιτώνα.

1.4. Υποδοχείς της Μελατονίνης

1.4.1. Γενικά στοιχεία

Οι πρώτοι υποδοχείς της μελατονίνης, εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού λαγού, όπου λάμβανε χώρα αναστολή της ντοπαμίνης. Οι νευρωνικοί υποδοχείς της μελατονίνης στον αμφιβληστροειδή χιτώνα και στο άνω διδύμιο του εγκεφάλου είναι υπεύθυνοι για την

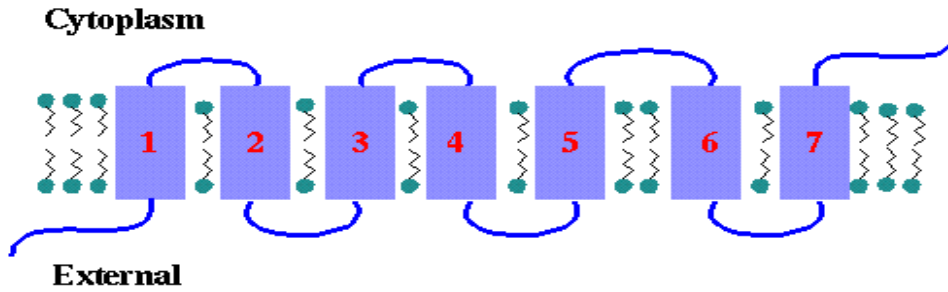
λειτουργία του οφθαλμού και της όρασης, ενώ οι υποδοχείς στον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου είναι υπεύθυνοι για τη δράση της μελατονίνης στους διάφορους κερκαδιανούς ρυθμούς του οργανισμού. Οι μη-νευρωνικοί υποδοχείς, στις εγκεφαλικές και ουρικές αρτηρίες, πιθανώς, να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καρδιαγγειακή λειτουργία και στη ρύθμιση της θερμοκρασίας. Συνεπώς, εκρίθη σημαντικό να καθοριστούν και να χαρακτηριστούν οι διάφοροι υπότυποι υποδοχέων, καθώς αποτελούν πιθανούς στόχους για την θεραπεία πολλών ασθενειών²⁴.

Οι βιολογικές δράσεις της μελατονίνης συντελούνται είτε μέσω της πρόσδεσής της σε υποδοχείς, είτε ανεξάρτητα από υποδοχείς. Ο μηχανισμός δράσης της ορμόνης, κατά τον οποίον δεν περιλαμβάνεται αλληλεπίδραση με κάποιον υποδοχέα, βασίζεται στη δυνατότητά της να διέρχεται με ευκολία στους ιστούς και στα κύτταρα του οργανισμού²⁵.

Η μελατονίνη, λόγω της σχετικά υψηλής της λιποφιλίας, έχει την ιδιότητα να διαχέεται από τα κύτταρα της επίφυσης, σχεδόν αμέσως μετά την σύνθεσή της, να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και να εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων, σε επαρκή ποσότητα για την εκδήλωση της απαιτούμενης φαρμακολογικής δράσης²⁶. Επιπλέον, η μελατονίνη μπορεί να συνδέεται απευθείας με ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος ή του πυρήνα, ενεργοποιώντας κατάλληλους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος^{27,28}. Ωστόσο, ο επικρατέστερος μηχανισμός δράσης της μελατονίνης περιλαμβάνει τη σύνδεση της ορμόνης με τους αντίστοιχους υποδοχείς της. Ο εντοπισμός των υποδοχέων αυτών κατέστη δυνατός κατόπιν διεξαγωγής σειράς πειραμάτων με ραδιοεπισημασμένους συνδέτες. Αρχικά, για την ταυτοποίηση των υποδοχέων στους ιστούς χρησιμοποιήθηκε η τριτιωμένη μελατονίνη²⁹⁻³¹, ενώ η 2-[¹²⁵I]-ιωδομελατονίνη αποτελεί σήμερα την πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη επισημασμένη ένωση³². Οι υποδοχείς της μελατονίνης εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του εγκεφάλου (υποθάλαμος και υπόφυση), στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, ενώ φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορετική πυκνότητα και διαφορετικό βαθμό συγγένειας ως προς τη μελατονίνη.

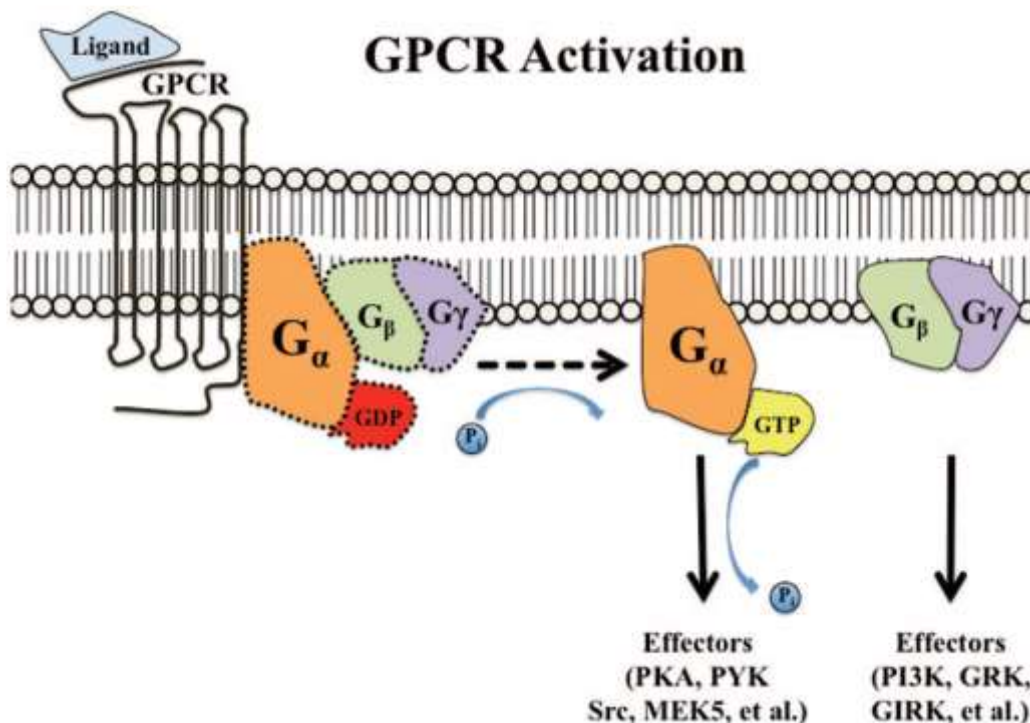
1.4.2. Μηχανισμός επαγωγής σήματος μέσω G-πρωτεϊνών

Οι βιολογικές δράσεις της μελατονίνης, όπως αναφέρθηκε, συντελούνται κυρίως μέσω της πρόσδεσής της σε υποδοχείς κυτταρικών μεμβρανών. Οι μεμβρανικοί αυτοί υποδοχείς δρουν μέσω G-πρωτεϊνών^{32,33}. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται με τα γουανινονουκλεοτίδια GDP και GTP. Πρόκειται για ρυθμιστικές πρωτεΐνες των οποίων βασική λειτουργία αποτελεί η μεταφορά σημάτων από το εξωτερικό του κυττάρου προς το εσωτερικό του. Στην **εικόνα 10** απεικονίζεται ένα τυπικό παράδειγμα G-πρωτεΐνης. Η G-πρωτεΐνη αποτελείται από ένα υδρόφοβο τμήμα που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη με 7 α -έλικες και δύο υδρόφιλα μέρη εκατέρωθεν της μεμβράνης. Το εξωκυτταρικό τμήμα της πρωτεΐνης σχετίζεται με την αρχική σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα, ενώ το ενδοκυτταρικό συνδέεται με τα νουκλεοτίδια GDP και GTP και προάγει τη μεταφορά του σήματος. Η εσωτερική πλευρά αποτελείται από τρεις υπομονάδες (G α , G β , G γ) από τις οποίες η G α είναι αυτή που συνδέεται με τα γουανινονουκλεοτίδια.



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση G-πρωτεΐνης

Όταν ο υποδοχέας βρίσκεται στη βασική του κατάσταση, δηλαδή δεν συνδέεται με την ορμόνη, η υπομονάδα G_{α} είναι συνδεδεμένη με το GDP. Όταν, όμως, το μόριο του συνδέτη συνδεθεί με την εξωτερική πλευρά του υποδοχέα τότε δημιουργείται μία μετατροπή στην τεταρτοταγή δομή της G-πρωτεΐνης που μεταφέρεται αλλοστερικά στο ενδοκυτταρικό της τμήμα. Αυτή η αλλαγή έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της G_{α} από το GDP και τη σύνδεσή της με το GTP. Ακολούθως, η σύνδεση του GTP προκαλεί μία άλλη μεταβολή στη διαμόρφωση της G-πρωτεΐνης που εξασθενεί τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνικών υπομονάδων, έτσι ώστε η G_{α} να αποχωρεί από τις άλλες δύο υπομονάδες, ενώ παράλληλα η G_{α} και το G_{β} , G_{γ} διμερές απομακρύνονται από τον υποδοχέα, ενεργοποιώντας ένα γειτονικό μόριο στην κυτταρική μεμβράνη για να ολοκληρωθεί έτσι η μεταφορά του σήματος (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών. Ένας προσδέτης (Ligand) δεσμεύεται στον υποδοχέα του (GPCR) και τον ενεργοποιεί. Στη συνέχεια διεγείρεται η α υπομονάδα της G πρωτεΐνης (G_{α}) μέσω αντικατάστασης του GDP από το GTP. Οι α και $\beta\gamma$ (G_{β} και G_{γ}) υπομονάδες διασπώνται, ενεργοποιώντας τον αντίστοιχο διάλο σηματοδότησης, που οδηγεί σε βιολογικό αποτέλεσμα.³⁴

1.4.3. Ταξινόμηση υποδοχέων

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Φαρμακολογίας (1998), οι υποδοχείς της μελατονίνης αναγράφονται με τα γράμματα MT (*MelaTonin*). Με μικρά γράμματα “mt”, ακολουθούμενα από την αντίστοιχη αρίθμηση, περιγράφονται οι υποδοχείς για τους οποίους είναι γνωστή μόνο η μοριακή τους δομή. Υποδοχείς με γνωστή μοριακή δομή και επιπλέον σαφώς προσδιορισμένο φαρμακολογικό προφίλ στους ιστούς, αναγράφονται με τα κεφαλαία γράμματα MT. Επίσης, με κεφαλαία γράμματα, αλλά με πλάγια γραφή (MT) αναφέρονται οι υποδοχείς της μελατονίνης με γνωστή φαρμακολογική συμπεριφορά, αλλά άγνωστη μοριακή δομή.³⁵

Η πρώτη κατηγοριοποίηση των υποδοχέων σε ML₁ και ML₂ βασίστηκε στη διαφορετική συγγένεια και κινητική σύνδεσης της ένωσης 2-[¹²⁵I]-ιωδομελατονίνη και στη διαφορετική φαρμακολογική τους συμπεριφορά έναντι μίας σειράς συνδετών. Το φαρμακολογικό προφίλ του ML₁ περιγράφηκε το 1995, με βάση την πρόσδεση της 2-[¹²⁵I]ιωδομελατονίνης σε κύτταρα αμφιβληστροειδή χιτώνα θηλαστικών και *pars tuberalis* (2-ιωδομελατονίνη>μελατονίνη>>N-ακετυλοσεροτονίνη). Αντιθέτως, πειράματα πρόσδεσης της ραδιοεπισημασμένης 2-ιωδομελατονίνης στον ML₂ υποδοχέα εγκεφαλικών κυτταρικών μεμβρανών κρικίτων (hamsters), έδειξαν πως η N-ακετυλοσεροτονίνη παρουσιάζει ίδια χημική συγγένεια με την μελατονίνη (2-ιωδομελατονίνη > μελατονίνη = N-ακετυλοσεροτονίνη).

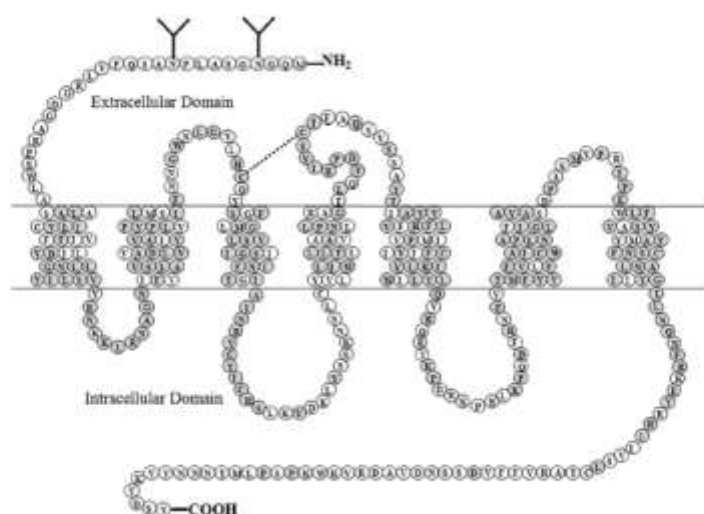
Σε επόμενο στάδιο, η κλωνοποίηση δύο υποτύπων του ML₁ υποδοχέα, συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνες (GPCR's), ήταν καθοριστική για την σύγχρονη κατηγοριοποίηση των υποδοχέων της μελατονίνης. Οι δύο υποδοχείς Mel_{1a}, Mel_{1b}, εμφανίζουν παρόμοιο φαρμακολογικό προφίλ με τον ML₁ υποδοχέα, όμως παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη δομή και τη γονιδιακή τους ακολουθία, οπότε και ονομάστηκαν MT₁ και MT₂, αντίστοιχα. Ο ML₂, μετονομάστηκε σε MT₃ και έχει πλήρως χαρακτηριστεί σε φαρμακολογικό επίπεδο, παρουσιάζοντας διαφορές από τους δύο προαναφερθέντες GPCR-υποδοχείς³⁶.

1.4.4. MT₁

Ο MT₁ υποδοχέας απαντάται στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Εντοπίζεται κυρίως στον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου, στον εγκέφαλο και τους νεφρούς και θεωρείται υπεύθυνος, τόσο για την αναπαραγωγική δράση της μελατονίνης όσο και για τη ρύθμιση των κερκαδιανών ρυθμών³⁷. Αποτελείται από 350 αμινοξέα, έχει βάρος 39 kDa και σχηματίζει 7 διαμεμβρανικές α-έλικες³⁸. Έχει σταθερά συγγένειας για τη μελατονίνη της τάξεως των 20-40 pM. Η προαγωγή του σήματος μέσω αυτού του υποδοχέα γίνεται κυρίως με την ελάττωση των συγκεντρώσεων του cAMP, της διακυλογλυκερόλης, της τριφωσφορικής ινοσιτόλης, του αραχιδονικού οξέος, καθώς και με τη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου ([Ca²⁺])³².

1.4.5. MT₂

Ο υποδοχέας MT₂ αποτελείται από 362 αμινοξέα και παρουσιάζει ομοιότητα κατά 60% περίπου με τον υποδοχέα MT₁, ως προς την ακολουθία των αμινοξέων του. Εντοπίζεται κυρίως στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού και λιγότερο στον εγκέφαλο, οπότε εκτιμάται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οφθαλμολογική δράση της ορμόνης και στη ρύθμιση των καρδιακών ρυθμών. Έχει σταθερά χημικής συγγένειας για την ορμόνη της τάξεως των 160 pM και σε αντίθεση με τον MT₁ παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια ως προς τους ανταγωνιστές της μελατονίνης, όπως τη 2-βενζυλοθρυπταμίνη (luzindole). Ο MT₂, παράλληλα με τον MT₁, εμποδίζει τη δημιουργία του cAMP και προάγει την υδρόλυση της φωσφατιδυλινοσιτόλης³⁹.



Εικόνα 12: Διαμεμβρανική τοπολογία του hMT₁ υποδοχέα, συγκριτικά με τον hMT₂. Οι κύκλοι γκρίζου χρώματος απεικονίζουν τα σημεία εκείνα, όπου τα αμινοξέα των δύο υποδοχέων ταυτίζονται. Με (Y) απεικονίζονται οι δύο θέσεις γλυκοζυλίωσης του hMT₂ υποδοχέα⁴⁰.

1.4.6. MT₁/MT₂ ετεροδιμερή

Αποτελέσματα ερευνών απέδειξαν ότι οι υποδοχείς της μελατονίνης έχουν τη δυνατότητα δημιουργίας διμερών και πολυμερών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η ύπαρξη MT₁/MT₂ ετεροδιμερούς, που απαντάται στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού ποντικών, η έκφραση του οποίου φαίνεται να ευθύνεται για την αυξημένη φωτοευαισθησία κατά τη διάρκεια της νύχτας. Τα αποτελέσματα αυτά, μελετώνται και στον άνθρωπο, όπου η συν-έκφραση αυτών των δύο υποδοχέων λαμβάνει χώρα σε πολλούς ιστούς και ίσως να συνδέεται με λειτουργίες δράσης της μελατονίνης, όχι ακόμα γνωστές⁴¹.

1.4.7. MT₃

Ο MT_3 υποδοχέας εντοπίζεται στο ήπαρ, τους νεφρούς, το ΚΝΣ, το μυοκάρδιο, στους σκελετικούς μύες και το σπλήνα των θηλαστικών. Απομονώθηκε αρχικά από το νεφρό ποντικού *Syrian hamster*. Ο υποδοχέας αυτός παρουσιάζει μικρότερη χημική συγγένεια για τη μελατονίνη, από ότι οι υποδοχείς MT_1 και MT_2 . Ο MT_3 υποδοχέας παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με το ένζυμο αναγωγή της κινόνης 2, το οποίο συμμετέχει στη διαδικασία της αποτοξίνωσης. Ένας σημαντικός εκλεκτικός αγωνιστής του MT_3 είναι η ένωση 5-μεθοξυκαρβονυλαμινο-*N*-ακετυλοθρυπταμίνη (MCA-NAT), η οποία βρέθηκε ότι μπορεί να μειώσει την ενδοφθalmική πίεση σε οφθαλμούς πιθήκων που πάσχουν από γλαύκωμα⁴².

1.4.8. Mel_{1c}

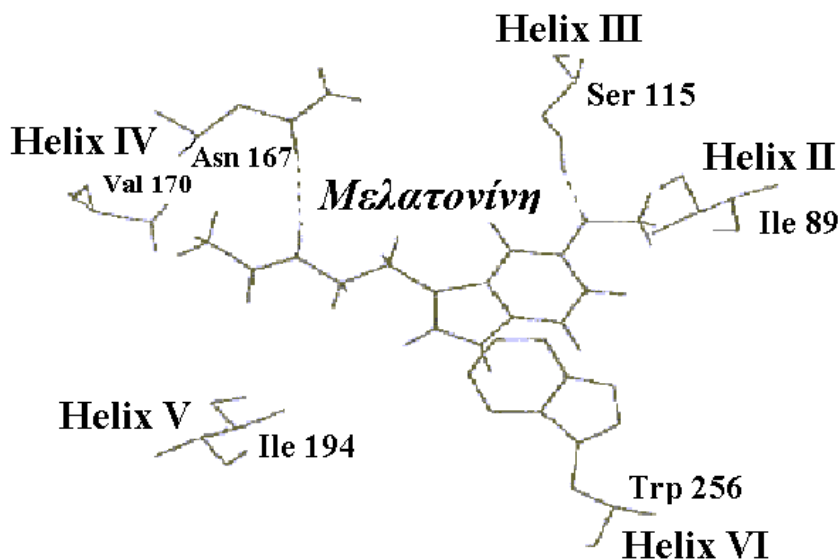
Ο υποδοχέας αυτός εντοπίζεται στο ΚΝΣ και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα των θηλαστικών και των αμφιβίων, όπως στο βάτραχο *Xenopus laevis* δεν εντοπίζεται, όμως, σε ανθρώπινους ιστούς. Έχει ανάλογη χημική συγγένεια ($K_d = 20-40$ pM) και φαρμακολογική συμπεριφορά με τον MT_1 .²⁴

1.5. Θεωρητικά Μοντέλα Σύνδεσης της Μελατονίνης

Οι πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές της μελατονίνης, αλλά, και των πιο δραστικών αναλόγων της, έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των ερευνητών στη μελέτη των υποδοχέων της, που είναι οι πιθανοί στόχοι των μελατονινεργικών ενώσεων. Μέχρι σήμερα δεν έχει καταστεί δυνατή η κρυσταλλογραφική μελέτη των υποδοχέων αυτών, έτσι όλες οι μελέτες αφορούν θεωρητικούς υπολογισμούς και μοριακές προσομοιώσεις με στόχο τον προσδιορισμό της τεταρτοταγούς δομής, τη θέση σύνδεσης της ορμόνης, δηλαδή το ενεργό κέντρο του υποδοχέα και τον αριθμό και τη θέση των αμινοξέων που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με την ορμόνη.

1.5.1. Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης Σύνδεσης κατά Sugden⁴³

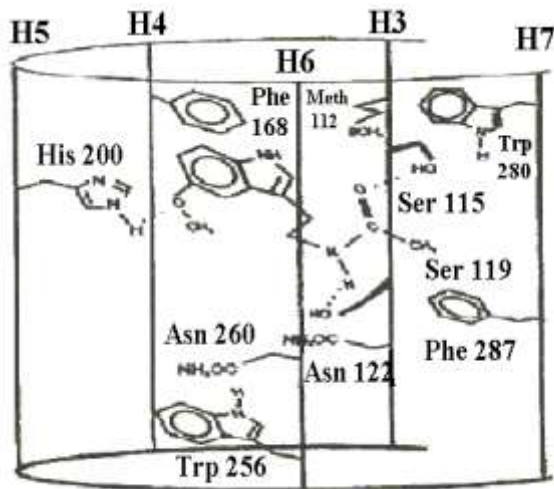
Το μοντέλο που προτείνεται από το Sugden και τους συνεργάτες του βασίζεται στην κρυσταλλογραφική δομή της βακτηριοροδοψίνης και στηρίζεται στην αμινοξική ακολουθία του κλωνοποιημένου υποδοχέα της μελατονίνης από το βάτραχο *Xenopus laevis*. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, κατά τη σύνδεση της μελατονίνης με τον υποδοχέα της, σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του 5-μεθοξυλίου και του αλκοολικού υδροξυλίου του αμινοξέος Ser₁₁₅, το οποίο εντοπίζεται στην τρίτη διαμεμβρανική έλικα του υποδοχέα, καθώς και μεταξύ του υδρογόνου της αμιδομάδας NH και του οξυγόνου της πρωτοταγούς αμιδομάδας της Asn₁₆₇, η οποία βρίσκεται στην τέταρτη διαμεμβρανική έλικα. Το αμινοξύ Trp₂₅₆ αλληλεπιδρά με τον ινδολικό πυρήνα μέσω σχηματισμού συμπλόκου μεταφοράς φορτίου. Επίσης, αναπτύσσονται και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μεθυλίου της 5-μεθοξυομάδας, των μεθυλενίων της πλευρικής αλυσίδας και του μεθυλίου της αμιδομάδας με τα υδρόφοβα αμινοξέα Ile₈₉, Val₁₇₀ και Ile₁₉₄. Το μοντέλο επιτρέπει επιμήκυνση της πλευρικής αλυσίδας και υποκατάσταση στις θέσεις C₂ και C₆ του ινδολικού πυρήνα. Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται σχηματικά στην **εικόνα 13**.



Εικόνα 13: Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης σύνδεσης κατά Sugden

1.5.2. Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης σύνδεσης κατά Jansen και Grol⁴⁴

Το μοντέλο που προτείνεται από τους Jansen και Grol βασίζεται στην ακολουθία των αμινοξέων του



κλωνοποιημένου υποδοχέα της μελατονίνης από το βάτραχο *Xenopus laevis*, ενώ χρησιμοποιείται και πάλι η κρυσταλλογραφική δομή της βακτηριοροδοψίνης. Σ' αυτό το μοντέλο προτείνονται τρεις δεσμοί υδρογόνου. Το αμιδικό οξυγόνο της μελατονίνης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το υδρογόνο του υδροξυλίου της Ser₁₁₅ στην τρίτη διαμεμβρανική έλικα του υποδοχέα, ενώ το αμιδικό υδρογόνο σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο του υδροξυλίου της Ser₁₁₉ στην τρίτη έλικα. Το οξυγόνο του 5-μεθοξυλίου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το ιμιδαζολικό **H-4** της His₂₀₀ της

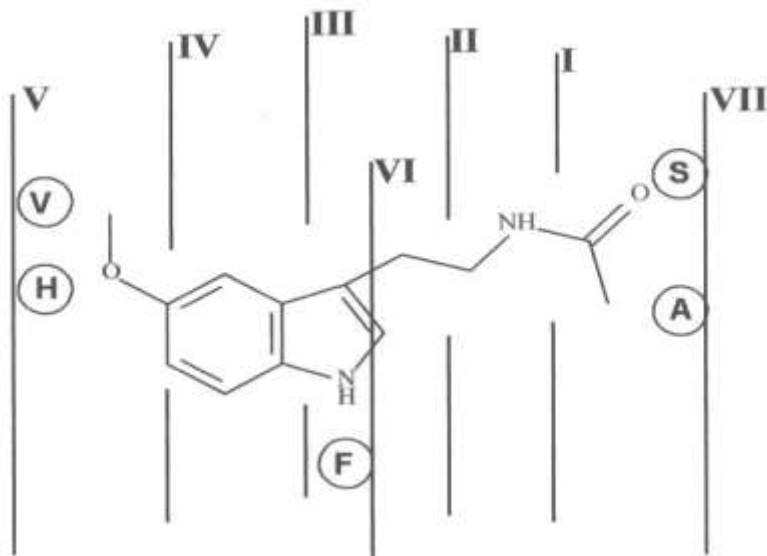
Εικόνα 14: Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης σύνδεσης κατά Jansen και Grol

πέμπτης έλικας. Επίσης, σχηματίζονται σύμπλοκα μεταφοράς φορτίου μεταξύ του

ινδολικού πυρήνα και της Phe₁₆₈ της τέταρτης έλικας, της Phe₂₈₇ της 7^{ης} διαμεμβρανικής έλικας, καθώς και της Trp₂₅₆ της έκτης έλικας. Το συμπληρωματικό αμινοξύ Trp₂₅₆ οριοθετεί την περιοχή του υποδοχέα, στην οποία δρα τόσο η μελατονίνη, όσο και οι αγωνιστές της. Σχηματικά οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στην **εικόνα 14**.

1.5.3. Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης σύνδεσης κατά Navajas⁴⁵

Στο μοντέλο που προτείνεται από τον Navajas και τους συνεργάτες του, χρησιμοποιείται η δομή της ροδοψίνης για τον προσδιορισμό της διαμόρφωσης του υποδοχέα της μελατονίνης στο χώρο. Ο Navajas πρότεινε το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου της αμιδομάδας της μελατονίνης και του υδροξυλίου της Ser₆ της έβδομης έλικας. Προτείνονται επίσης π-π αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρωματικών πυρήνων του ινδολίου της ορμόνης και της Phe₉ της έκτης έλικας, καθώς και μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μεθυλίου της 5-μεθοξυομάδας και της Val₇ της πέμπτης έλικας, αλλά και του μεθυλίου της ακεταμιδομάδας με την αλανίνη Ala₁₀. Η His₁₀, καθώς και η Val₁₀ της πέμπτης έλικας φαίνεται να εμποδίζουν την αντικατάσταση της 5-μεθοξυομάδας με περισσότερο ογκώδεις υποκαταστάτες, ενώ η Ser₆ και η Ala₁₀ της έβδομης έλικας δεν επιτρέπουν την υποκατάσταση στην ακεταμιδομάδα με αλκύλια που φέρουν περισσότερα από 4 άτομα άνθρακα. Ο Navajas πρότεινε ότι η μεθοξυομάδα και η *N*-ακετυλομάδα βρίσκονται εκτός του επιπέδου του ινδολικού πυρήνα, ενώ η γωνία που σχηματίζουν ο ινδολικός πυρήνας με την πλευρική αλυσίδα πρέπει να είναι 90°.



Εικόνα 15: Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης σύνδεσης κατά Navajas

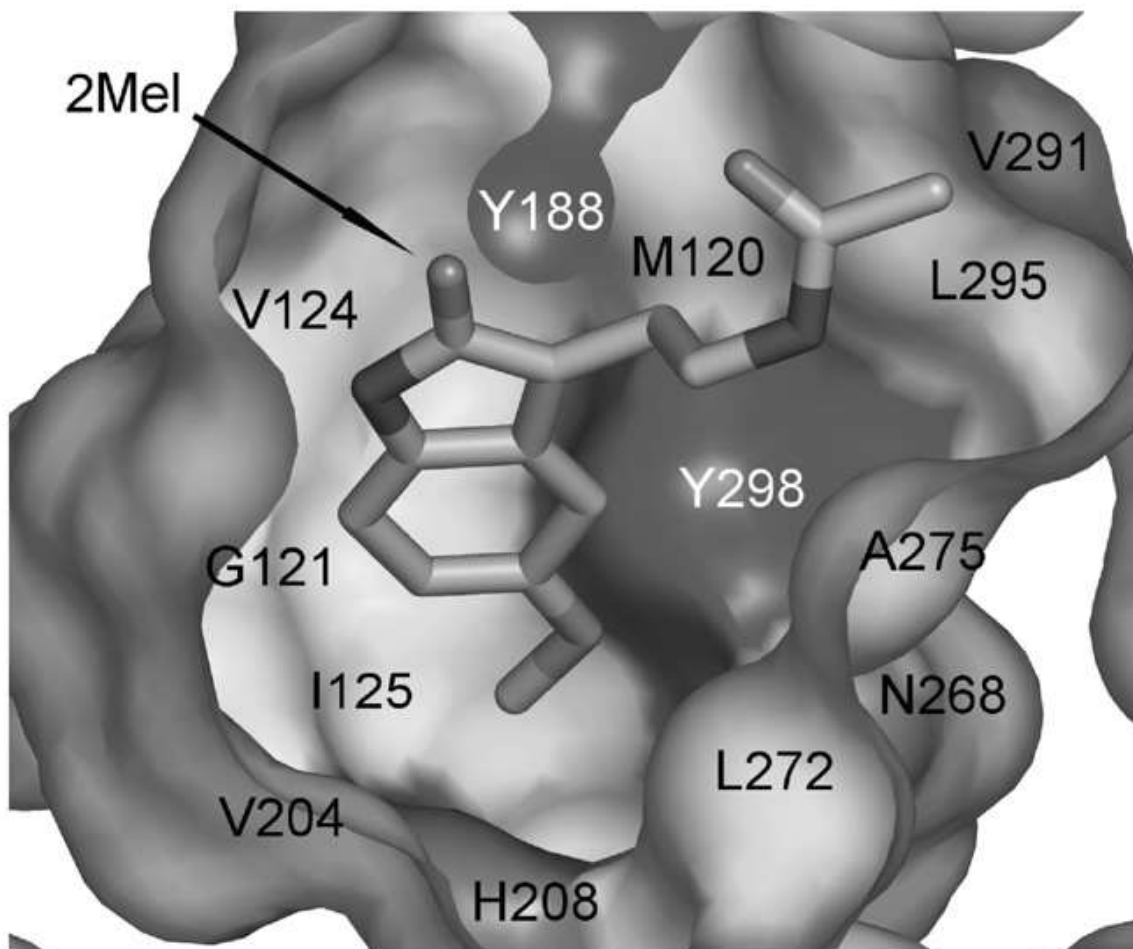
1.5.4. Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης σύνδεσης κατά Ivanov ⁴⁶

Ο Ivanov και η ομάδα του είχαν ως στόχο τη μελέτη και τον τρόπο σύνδεσης των αγωνιστών της μελατονίνης στον υποδοχέα της. Από τις μελέτες τους προέκυψε ότι η σύνδεση γίνεται μέσω του σχηματισμού τριών δεσμών υδρογόνου. Το οξυγόνο της μεθοξυομάδας αλληλεπιδρά με το ιμιδαζολικό υδρογόνο της His₁₉₅ και το οξυγόνο της ακεταμιδομάδας με το υδροξύλιο των σερινών Ser₁₁₀ και Ser₁₁₄. Επιπλέον, το μεθύλιο της μεθοξυομάδας τοποθετείται εντός της υδρόφοβης κοιλότητας που σχηματίζουν η Ile₁₁₅, η Phe₁₉₆ και η προλίνη 199. Τέλος, σχηματίζεται και μία δεύτερη υδρόφοβη κοιλότητα μεταξύ της Trp₂₅₁ και της λευκίνης 254, που επιτρέπει την εισαγωγή στη θέση 2 του ινδολικού πυρήνα λιπόφιλων υποκαταστατών.

1.5.5. Μοντέλα Μοριακής Προσομοίωσης Σύνδεσης στον MT₂ υποδοχέα ⁴⁷⁻⁴⁹

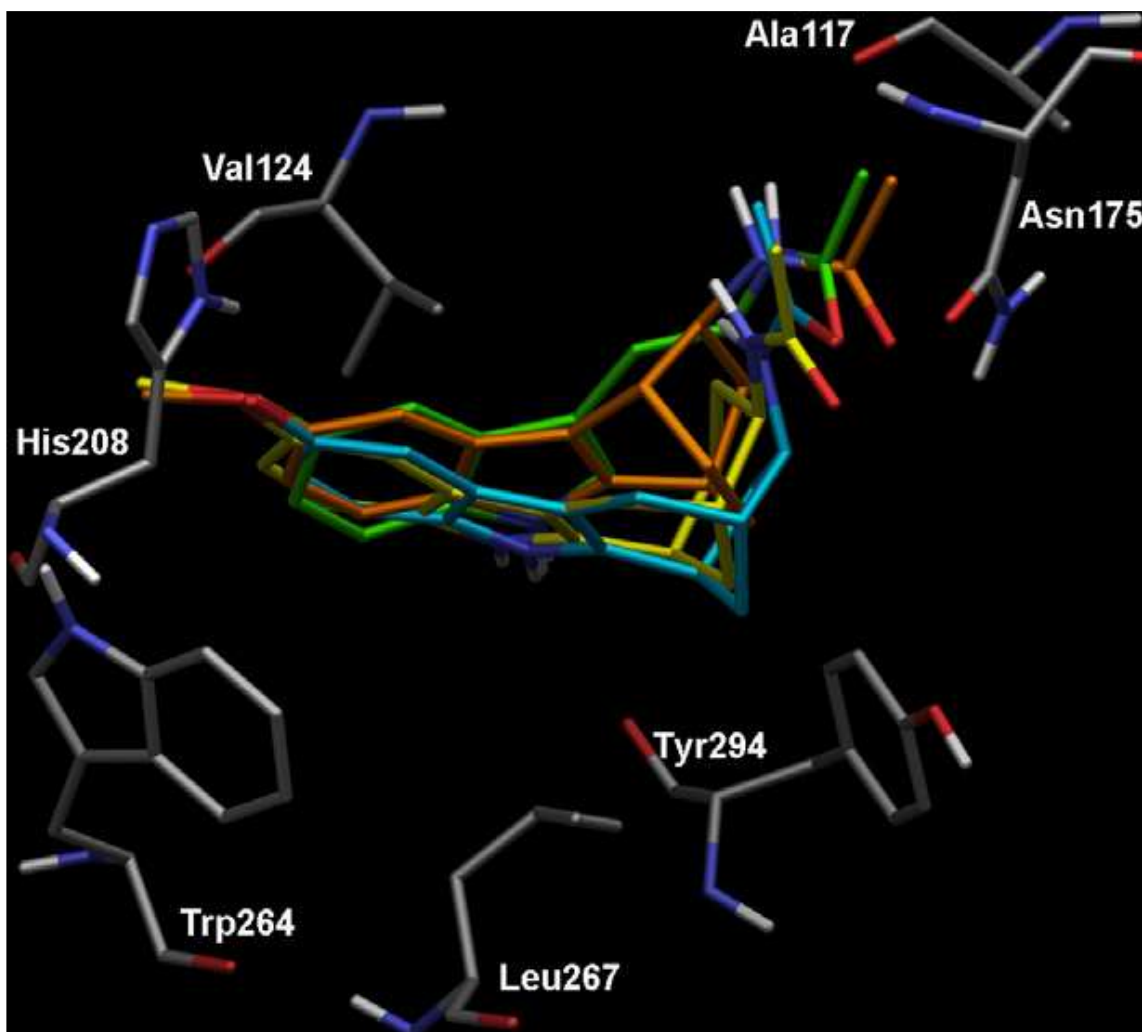
Το πρώτο μοντέλο προσομοίωσης για τον MT₂ υποδοχέα, περιεγράφηκε το 2004 από τον Petr Mazna και την ερευνητική του ομάδα. Βασισμένοι στο πρότυπο της ροδοψίνης, κατέληξαν στο ότι κατά την σύνδεση της μελατονίνης στον υποδοχέα σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του 5-μεθοξυλίου και του υδροξυλίου της Tyr₂₉₈^{7,43}. Ο ινδολικός πυρήνας συμμετέχει σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Val₂₀₄^{5,42} και Leu₂₇₂^{6,56}, οι οποίες φαίνεται να είναι σημαντικές για τη σύνδεση της ορμόνης στον υποδοχέα. Τέλος, η ακετυλομάδα σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Tyr₁₈₈ του εξωκυττάριου βρόγχου ECL2 προς το εξωκυττάριο τμήμα της 7^{ης} διαμεμβανικής έλικας. Περαιτέρω έρευνες σε ενώσεις που εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση, δεν έδειξαν να συμφωνούν με το

προαναφερθέν σύστημα πρόσδεσης, και να συνδέονται με τον υποδοχέα κυρίως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 16 Μοντέλο Μοριακής Πρόσδεσης κατά Mazna ⁴⁷

Μερικά χρόνια αργότερα, το 2011, η ερευνητική ομάδα της Olga Zefirova αξιοποίησε τη βιοδραστική διαμόρφωση της ροδοψίνης για να προσομοιάσει την αγωνιστική σύνδεση ενώσεων στον MT₂ υποδοχέα, περιορίζοντας το μοντέλο μόνο στα διαμεμβρανικά τμήματα. Τα πειράματα έδειξαν ότι, το οξυγόνο του μεθοξυλίου της μελατονίνης αλληλεπιδρά με την His₂₀₈^{5,46}, ενώ του αμιδίου με την Asn₁₇₅^{4,60}. Το αμιδικό υδρογόνο αλληλεπιδρά με το καρβονύλιο της Ala₁₁₇^{3,29} και ο δακτύλιος του ινδολίου σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Val₁₂₄^{3,36}, Trp₂₆₄^{6,48} και Leu₂₆₇^{6,51}.

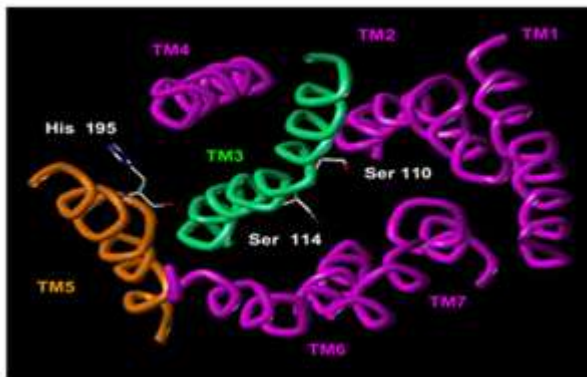


Εικόνα 17: Μοντέλο Μοριακής Προσομοίωσης κατά Zefirova. Η μελατονίνη εμφανίζεται με πράσινο χρώμα.⁴⁹

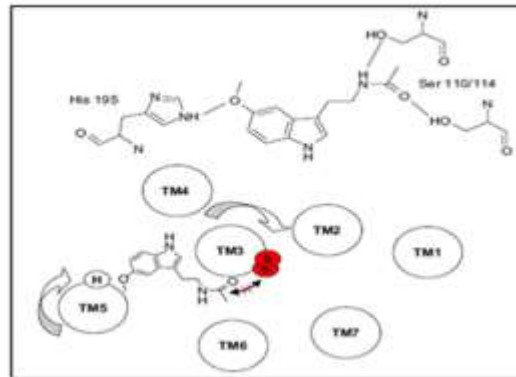
1.5.6. Συγκριτικό Μοντέλο Προσομοίωσης MT₁ και MT₂ υποδοχέων, κατά Farce⁵⁰

Το 2008, ο Farce και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν το μοντέλο της ροδοψίνης, για να περιγράψουν την περιοχή πρόσδεσης της μελατονίνης στους δύο υποδοχείς της, MT₁ και MT₂. Τα αποτελέσματα αναφέρουν ότι η θέση πρόσδεσης της ορμόνης στον MT₁ υποδοχέα είναι εμφανώς μικρότερη, σε σχέση με τον MT₂. Η ιστοιδίνη της 5^{ης} διαμεμβρανικής έλικας (His₁₉₅ για τον MT₁, His₂₀₈ για τον MT₂), προσδέεται με την μεθοξυ- ομάδα της μελατονίνης. Το αμιδικό τμήμα του μορίου αλληλεπιδρά με δεσμούς υδρογόνου με την Asn₁₇₅ της 4^{ης} διαμεμβρανικής έλικας, όταν αυτό συνδέεται στον MT₂ υποδοχέα. Αντιθέτως, η ορμόνη προσδέεται στον MT₁ υποδοχέα μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ του αμιδικού αζώτου, καθώς και του καρβονυλίου της, με τις σερίνες Ser₁₁₀ και Ser₁₁₄ της 3^{ης} διαμεμβρανικής έλικας, όπως φαίνεται στην **εικόνα 18**.

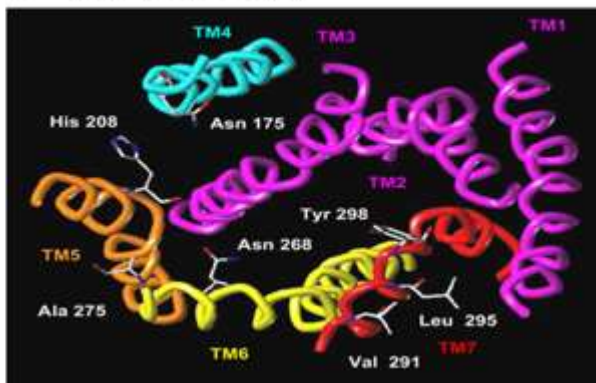
A MT₁ Model



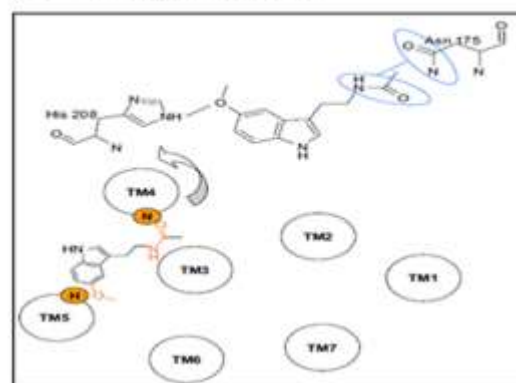
C MT₁ Model



B MT₂ Model



D MT₂ Model



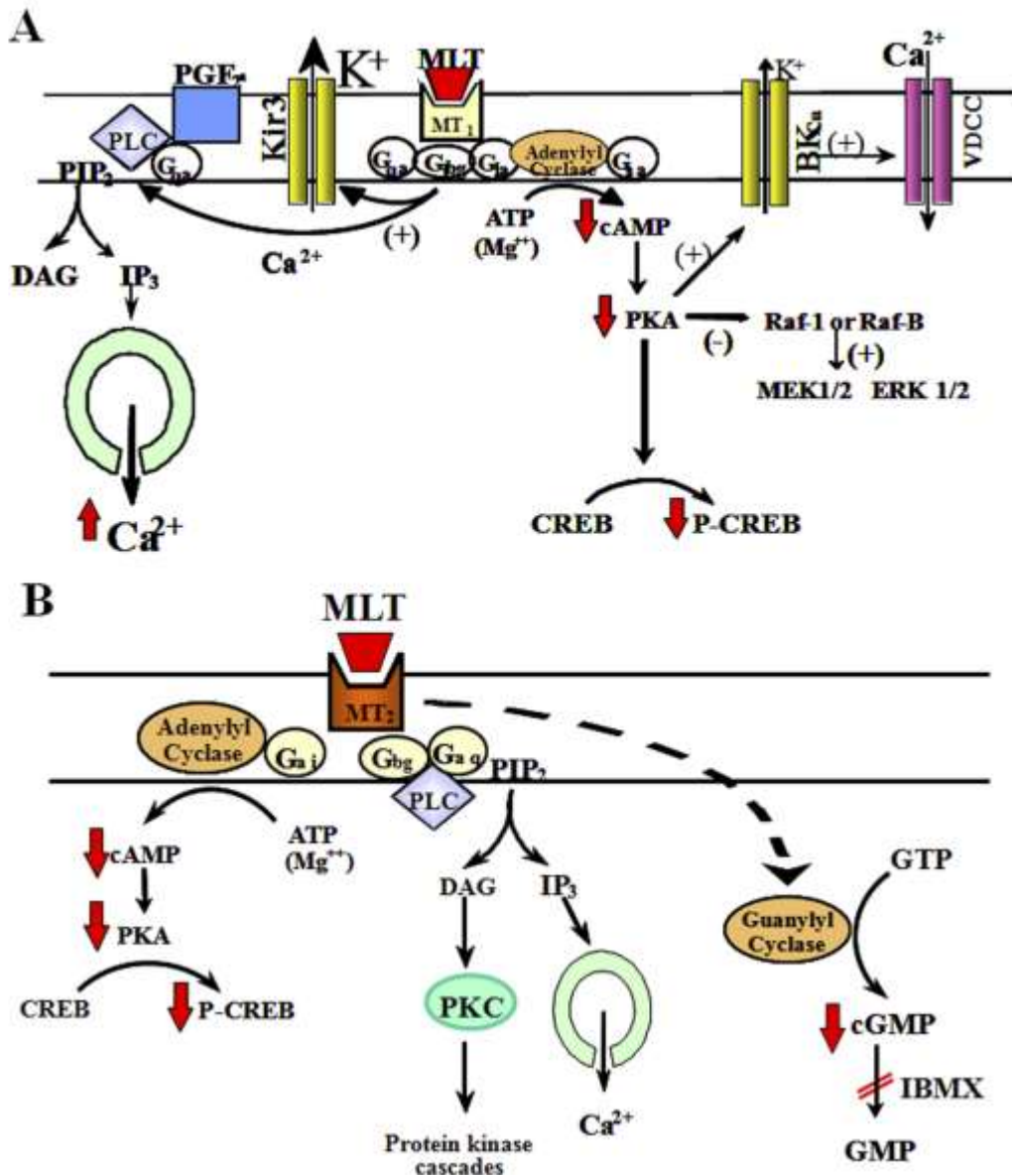
Εικόνα 18: Μοντέλα πρόσδεσης της μελατονίνης στους υποδοχείς MT₁ και MT₂⁵⁰.

1.6. Σηματοδοτικά Μονοπάτια

Ένα από τα πιο σημαντικά και επαρκώς μελετημένα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπου εμπλέκονται οι μελατονινεργικοί υποδοχείς, είναι αυτό της αναστολής σχηματισμού του cAMP, από G-πρωτεΐνες. Από τις πρώτες μελέτες του White και των συνεργατών του, σε μελανοκύτταρα βατράχου το 1987, μέχρι και σήμερα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της αδενυλικής κυκλάσης μετά από χορήγηση μελατονίνης, σε διάφορους ιστούς, όπως τον υπερχιασματικό πυρήνα, τις αρτηρίες του εγκεφάλου και την υπόφυση. Οι εμπλεκόμενες G-πρωτεΐνες μεταγωγείς του σήματος στους ιστούς ανήκουν στην G_i/G_o οικογένεια (παρουσιάζουν ευαισθησία στην τοξίνη *pertussis*), αλλά η ακριβής δομή τους δεν είναι γνωστή.

Η αναστολή σχηματισμού cAMP επιβεβαιώθηκε μέσω πειραμάτων σε ανασυνδυασμένους MT₁ και MT₂ υποδοχείς, όμως, σύγχρονες έρευνες υποδεικνύουν πως η ορμόνη μπορεί να δρα και σε άλλους υποδοχείς προκαλώντας ένα πλήθος διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών στους οργανισμούς.

MELATONIN RECEPTOR SIGNALING



Εικόνα 19: Περιληπτική περιγραφή σηματοδοτικών μονοπατιών, μετά από πρόσδεση της μελατονίνης (MLT) στους υποδοχείς της, MT_1 και MT_2 ⁵¹.

Στην **εικόνα 19** ⁵¹ απεικονίζονται περιληπτικά τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ακολουθούνται μετά από την πρόσδεση της μελατονίνης στους υποδοχείς MT_1 και MT_2 . Η ενεργοποίηση του MT_1 μειώνει τη σύνθεση του cAMP, προερχόμενη από τη διέγερση της φορσκολίνης. Επίσης, παρατηρείται μείωση της φωσφορυλιωμένης CREB πρωτεΐνης, λόγω αναστολής του cAMP και κατά συνέπεια της αναστολής της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Μείωση στις συγκεντρώσεις του PKA έχουν ως αποτέλεσμα τη διέγερση του σήματος στο μονοπάτι MEK1/2 - ERK1/2 σε μη-νευρωνικά κύτταρα. Επιπροσθέτως, η ενεργοποίηση του MT_1 σε ιστούς φαίνεται ότι ελέγχει τους διαύλους ασβεστίου και την εισροή ή εκροή του από τα κύτταρα, ανάλογα με το είδος της G-πρωτεΐνης που συνδέεται σε αυτόν, μετά την πρόσδεση της μελατονίνης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η μελατονίνη μπορεί μέσω του MT_1 υποδοχέα να ελέγχει

την αγγειοσυστολή, καθώς η διεργασία αυτή φαίνεται να ελέγχεται κατά την μείωση της φωσφορυλίωσης από cAMP, διαύλων καλίου- ενεργοποιημένους από ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}).

Αντίστοιχα, μελέτες επί ανασυνδυασμένων MT_2 υποδοχέων υποδεικνύουν την αναστολή σύνθεσης του cAMP, αλλά και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP). Στον υπερχιασματικό πυρήνα η μελατονίνη, μέσω ενεργοποίησης του MT_2 , αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), ενώ στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, η ενεργοποίηση του υποδοχέα αναστέλλει την αποδέσμευση νευροδιαβιβαστών, μέσω μηχανισμών ελέγχου των ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο³⁵.

1.7. Θεραπευτικές Δράσεις και Χρήσεις της Μελατονίνης

Όπως έχει περιγραφεί στις προηγούμενες ενότητες, η μελατονίνη εμφανίζει ποικίλες δράσεις στον οργανισμό. Η σύνθεση και έκκρισή της, είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με τους κερκαδιανούς ρυθμούς, διαταραχές των οποίων έχουν αντίκτυπο σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού. Οι υποδοχείς της μελατονίνης εκφράζονται σε πολλούς και διαφορετικούς ιστούς και, μέχρι και σήμερα, δεν έχουν πλήρως μελετηθεί όλα τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται. Η ορμόνη, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως³⁵, μπορεί να προσδέεται και σε διαφορετικούς υποδοχείς, χωρίς να έχει αποκρυπτογραφηθεί πλήρως ο τρόπος. Συνεπώς, σημαντική κρίνεται μία εκτεταμένη έρευνα επί της επίδρασης της ορμόνης στο βιολογικό υπόστρωμα και τις πιθανές θεραπευτικές δράσεις της μελατονίνης αυτής καθαυτής, αλλά και των συνθετικών της παραγώγων. Η μελατονίνη διατίθεται, μετά από έγκριση από τον FDA, το 1994, ως συμπλήρωμα διατροφής στα φαρμακεία⁴.

Μέχρι στιγμής υπάρχουν αρκετές έρευνες που υποδεικνύουν τις προτεινόμενες ενδείξεις για την χορήγηση της ορμόνης ή των αναλόγων της. Ωστόσο απαιτούνται εκτενέστερες μελέτες, ώστε να προσδιοριστεί η ακριβής δοσολογία για την εκάστοτε πάθηση, η χρονική στιγμή χορήγησης, καθώς και οι ενδεχόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες.

1.7.1 Διαταραχές ύπνου

Η μελατονίνη ξεκίνησε να χορηγείται ως συμπλήρωμα διατροφής, για την αντιμετώπιση της αϋπνίας. Όπως αναφέρθηκε, τα επίπεδα της μελατονίνης στον οργανισμό βρίσκονται στις μέγιστες τιμές τους κατά τις βραδινές ώρες, ενώ παράλληλα, ο ρυθμός αποβολής του κύριου μεταβολίτη της, του όξινου θειϊκού εστέρα της 6-υδροξυμελατονίνης, σχετίζεται με την αύξηση της νυχτερινής διάθεσης για ύπνο. Έτσι η επιστημονική κοινότητα ξεκίνησε να μελετά την ορμόνη ως προς τις υπνωτικές της ιδιότητες και να προτείνει τη χορήγησή της ως θεραπεία διαταραχών του ύπνου.

Ο σύγχρονος τρόπος ζωής, το άγχος και η χρήση ηλεκτρονικών συσκευών, τις νυχτερινές ώρες, είναι μερικοί από τους παράγοντες εμφάνισης διαταραχών στο πρόγραμμα του ύπνου, στην πλειοψηφία του πληθυσμού. Έρευνες έχουν δείξει πως η έκθεση σε πηγές φωτός μικρού μήκους κύματος, ειδικότερα τις νυχτερινές ώρες, προκαλεί άμεση εγρήγορση, υπερένταση και αποσυντονισμό του βιολογικού ρολογιού, με εμφάνιση αϋπνιών, άρα και διαταραχές στη φυσιολογική έκκριση της μελατονίνης στον

οργανισμό. Το επονομαζόμενο *blue light effect*, προκαλείται από έκθεση σε οθόνες τηλεόρασης, ηλεκτρονικού υπολογιστή, κινητών ή οποιασδήποτε φωτεινής πηγής με LED φωτισμό και, σύμφωνα με μελέτες, η χρήση τέτοιων συσκευών πρέπει να διακόπτεται τουλάχιστον 3 ώρες πριν το βραδινό ύπνο^{52,53}.

Η αϋπνία αποτελεί επίσης ένα συνηθισμένο πρόβλημα στα άτομα της τρίτης ηλικίας και πιθανώς να οφείλεται σε ενδογενείς βιοχημικούς και φυσιολογικούς παράγοντες, είτε σε άλλες ασθένειες, καθώς και στην λήψη φαρμάκων. Εκτεταμένες έρευνες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της μελατονίνης στον οργανισμό μειώνονται, όσο αυξάνεται η ηλικία, με αποτέλεσμα στα άτομα ηλικίας 60 ετών και άνω, να παράγεται σχεδόν η μισή ποσότητα μελατονίνης απ' ότι σε άτομα ηλικίας 10 ετών¹⁹.

Η ευεργετική δράση της μελατονίνης, αφορά στη ταχύτητα μετάβασης σε κατάσταση ύπνου, στη διάρκεια και την ποιότητά του. Η υπνωτική της δράση είναι ήπια, με κύρια πλεονεκτήματά της, σε σχέση με άλλα χορηγούμενα υπνωτικά φάρμακα, την έλλειψη υπολειπόμενης επίδρασής της το επόμενο πρωί (hangover) και την απουσία πρόκλησης εθισμού, καθώς πρόκειται για μία ορμόνη η οποία παράγεται φυσιολογικά στον οργανισμό^{54,55}. Η χορήγησή της σε άτομα που εμφανίζουν διάφορους τύπους αϋπνίας, όπως το DSPS (Delayed Sleep Phase Syndrome), το CRSD (Circadian Rhythm Sleep Disorder) και το 24h sleep-wake syndrome, έχει θετικά αποτελέσματα.

Ωστόσο, η ορμόνη έχει μικρό χρόνο ημιζωής και ήπια δράση. Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκαν παράγωγα της, όπως το ramelteon και η agomelatine^{56,57}. Το ramelteon, που χρησιμοποιείται πλέον επιτυχώς για την αντιμετώπιση της αϋπνίας, εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τους υποδοχείς MT₁ και MT₂ στον υπερχιασματικό πυρήνα και εμφανίζει σημαντικά αυξημένο χρόνο ημιζωής. Η αγομελατίνη εμφανίζει εξίσου υψηλή συγγένεια για τους υποδοχείς αυτούς, αλλά δρα ταυτόχρονα ως ανταγωνιστής της σεροτονίνης, εμφανίζοντας τόσο υπνωτική, όσο και μία ήπιας μορφής αντικαταθλιπτική δράση.

Το φαινόμενο του jet-lag αποτελεί άλλη μία δυσλειτουργία και απορρύθμιση του εσωτερικού βιολογικού ρολογιού και εμφανίζεται μετά από υπερατλαντικά αεροπορικά ταξίδια, λόγω της απότομης αλλαγής στη ζώνη ώρας. Οι βιορυθμοί διαταράσσονται και κατά συνέπεια προκαλείται εμφάνιση συμπτωμάτων, όπως αδιαθεσία, κόπωση και ανορεξία. Εμφανίζεται σε άτομα που ταξιδεύουν διαρκώς και κυρίως στους πιλότους. Εξωγενώς χορηγούμενη μελατονίνη κατά την άφιξη στον προορισμό, περιορίζει σημαντικά το πρόβλημα⁵⁸.

1.7.2 Αντιοξειδωτική Δράση

Ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα του υπεροξειδικού ανιόντος (O₂^{·-}), η ρίζα του υδροξυλίου (HO[·]), η ρίζα μονοξειδίου του αζώτου (NO[·]) και άλλες οξυγονούχες ρίζες όπως ONOO[·], είναι παράγωγα του αναερόβιου μεταβολισμού και σχηματίζονται κατά το τελικό στάδιο της καύσης σακχάρων και άλλων οργανικών μορίων υψηλής ενέργειας. Εξαιτίας των μονήρων ηλεκτρονίων τους, μπορούν και προσβάλλουν βιολογικά μόρια, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και γενετικό υλικό, προκαλώντας καταστροφές στη δομή τους. Εδώ και αρκετά χρόνια η δράση τους έχει συσχετιστεί με αρκετές ασθένειες, όπως η νόσος του Parkinson, η νόσος του Alzheimer, η μυϊκή δυστροφία, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το εμφύσημα, η αθηροσκλήρωση⁴⁰. Επίσης, λόγω των πιθανών μεταλλάξεων που μπορούν

να προκαλέσουν, η παρουσία των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό έχει συσχετιστεί και με την καρκινογένεση⁵⁹.

Μετά από πολύχρονες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση της μελατονίνης συμβάλλει στην εξουδετέρωση των διαφόρων ελευθέρων ριζών στον οργανισμό χωρίς την παρέμβαση κάποιου υποδοχέα. Λόγω της μεγάλης της λιποφιλίας, η μελατονίνη διαπερνά όλους τους βιολογικούς φραγμούς και εύκολα εισέρχεται στα κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό η αντιοξειδωτική της δράση εκδηλώνεται σε όλο τον οργανισμό. Η μελατονίνη δρα ως εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών, λόγω του πλούσιου σε ηλεκτρόνια ινδολικού της δακτυλίου που δρα ως ηλεκτρονιοδότης, αδρανοποιώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις ηλεκτρονιόφιλες ρίζες. Μετά τη διαδικασία αυτή η μελατονίνη οξειδώνεται μη αναστρέψιμα.

Τέλος, η μελατονίνη εμφανίζει συνεργιστική δράση με μερικές από τις πλέον γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως οι βιταμίνες C και E. Έτσι, η συγχορήγησή της με βιταμίνες αποφέρει ένα ισχυρότερο φαρμακολογικό αποτέλεσμα. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε συγκριτικές μελέτες μεταξύ της μελατονίνης και των βιταμινών C και E, ως προς την αντιοξειδωτική προστασία που παρέχουν, η μελατονίνη αποδείχθηκε πιο δραστική^{37,60}.

1.7.3 Αντικαρκινική Δράση

Μακροχρόνιες μελέτες υποδεικνύουν ότι η μελατονίνη μπορεί να παρουσιάσει ογκοστατική δράση συμμετέχοντας έτσι στην αντικαρκινική προστασία του οργανισμού. Καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων *in vitro* έδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, με τη μελατονίνη να προκαλεί αναστολή και κυτταρικό θάνατο⁶¹. Ο μηχανισμός της αντικαρκινικής δράσης της ορμόνης δεν έχει διευκρινισθεί ακόμα. Μία εκδοχή αποτελούν οι αντιμιτωτικές της ιδιότητες. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί αναφέρονται στην παρεμβολή της στην έκφραση ογκογονιδίων, ή στην αλληλεπίδρασή της με τους υποδοχείς στα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, η δράση της μελατονίνης ως αντιοξειδωτικό μέσο, όπως προαναφέρθηκε, συμβάλλει και στην αντικαρκινική της δράση, με δεδομένο ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις στο DNA των κυττάρων και ενδεχομένως στη μετατροπή τους σε καρκινικά κύτταρα. Γενικότερα, η μελατονίνη μπορεί να χορηγηθεί παράλληλα και με άλλους θεραπευτικούς παράγοντες (πχ. tamoxifen) για την αντιμετώπιση μορφών μεταστατικού καρκίνου^{62,63}.

1.7.4 Διαβήτης

Νέες έρευνες υποδεικνύουν συσχέτιση της έκκρισης της μελατονίνης με την έκκριση της ινσουλίνης στον οργανισμό. Ενώ, όπως έχει αναφερθεί, τα επίπεδα της μελατονίνης είναι σε μέγιστα επίπεδα κατά τη διάρκεια της νύχτας, η ινσουλίνη βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια της ημέρας. Οι Persche και Mulder υποδεικνύουν πως η μείωση της ινσουλίνης τις νυχτερινές ώρες, πιθανώς προέρχεται από μία ενδογενή αναστολή της σύνθεσής της στα παγκρεατικά κύτταρα, μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων MT₁ και MT₂ σε αυτά. Μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση των συμπτωμάτων μεγάλης έλλειψης γλυκόζης στο πλάσμα και διαταραχών στην έκκριση ινσουλίνης με

τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 σε άτομα με γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο MTNR1B, που εκφράζει τον MT₂ υποδοχέα. Βέβαια, οι έρευνες είναι ακόμα σε πρώιμα στάδια^{35,64,65}.

1.7.5 Ανοσοενισχυτική Δράση

Η μελατονίνη συμμετέχει και ενισχύει τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω των περιοχών δέσμευσής της, που υπάρχουν στα T-λεμφοκύτταρα του μυελού των οστών. Ένα από τα κύρια όργανα-στόχους της αποτελεί ο θύμος αδένας, ο οποίος είναι το κύριο όργανο του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της ορμόνης παρατηρούνται, καθώς η ενεργοποίηση αυτών των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων οδηγεί στην παραγωγή οπιοειδών πεπτιδίων, τα οποία συνεργιστικά με την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και τη σύνθεση της ιντερλευκίνης-6 ενισχύουν σημαντικά την άμυνα του οργανισμού⁶⁶.

1.7.6 Λοιπές Δράσεις

Από την ανακάλυψη της μελατονίνης έως και σήμερα, έχουν βρεθεί πολυάριθμες ευεργετικές δράσεις της μελατονίνης και των αναλόγων της. Μία από αυτές είναι και η αντιγηραντική της δράση, με μηχανισμούς που δεν έχουν διευκρινιστεί επαρκώς, μέχρι στιγμής²³. Επίσης, η χορήγηση μελατονίνης σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer και τη νόσο του Parkinson, οδήγησε σε σημαντική βελτίωση του τρόπου ζωής τους και αύξηση της μνημονικής τους ικανότητας⁶⁷.

Τα επίπεδα της μελατονίνης εμφανίζονται μειωμένα σε ασθενείς που πάσχουν από κατάθλιψη και άλλες ψυχιατρικές διαταραχές. Αντίστοιχη μείωση παρατηρείται και σε ασθενείς που δεν εμφανίζουν τέτοιου είδους ανωμαλία, αλλά διακατέχονται από έντονη εναλλαγή συναισθημάτων. Η εναλλαγή αυτή παρατηρείται κατά τη διάρκεια της χειμερινής περιόδου (κατάθλιψη του χειμώνα). Τα φαινόμενα αυτά σχετίζονται με τον αποσυντονισμό των κιρκαδιανών κύκλων από τις εποχιακές μεταβολές της ημέρας. Οι εποχιακές αδιαθεσίες, (SAD: Seasonal Affective Disorders), επηρεάζουν κυρίως το γυναικείο πληθυσμό, ιδιαίτερα μάλιστα των βορείων χωρών, όπου η διάρκεια της ημέρας τους χειμερινούς μήνες είναι πολύ μικρή. Μειωμένα επίπεδα μελατονίνης έχουν επίσης εντοπισθεί και σε ασθενείς που πάσχουν από σχιζοφρένεια, ενώ αντίθετα, είναι αυξημένα τα επίπεδα της ορμόνης σε μανιακούς ασθενείς. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας των περιπτώσεων αυτών, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περισσότερων και πιο ολοκληρωμένων πειραμάτων για να εξακριβωθεί ο ρόλος της μελατονίνης στη θεραπεία των SAD και παρόμοιων διαταραχών⁶⁸⁻⁷⁰.

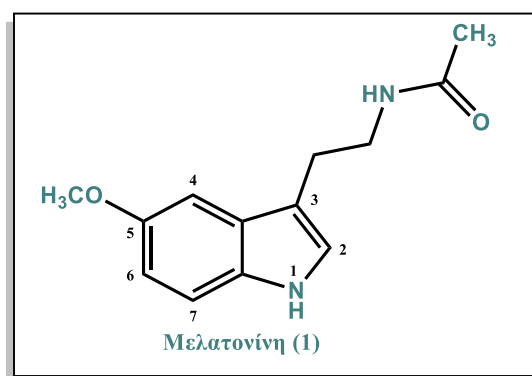
Συνεχώς έρχονται στο προσκήνιο νέες μελέτες, μερικές εξαιρετικά καινοτόμες, οι οποίες προτείνουν νέες δράσεις και νέους μηχανισμούς μέσω των οποίων η μελατονίνη και τα ανάλογά της μπορούν να δράσουν θεραπευτικά σε ασθένειες. Το μόνο σίγουρο είναι πως η ετερογένεια της δράσης της προσφέρεται για μελλοντικές μελέτες, από ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο.

2 Σχέσεις Δομής-Δράσης: Σχεδιασμός Νέων Μελατονινεργικών Ενώσεων

2.1. Χαρτογράφηση των Μελατονινεργικών Υποδοχέων

Η ανακάλυψη νέων αναλόγων της ορμόνης, με εκλεκτικότητα έναντι των δύο υποδοχέων της, παρουσιάζει δυσκολίες λόγω της περιορισμένης συχνότητας και ετερογένειας των υποδοχέων στους φυσικούς ιστούς και του σχετικά μικρού αριθμού μοντέλων μοριακής προσομοίωσης. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχει συντεθεί ένα πλήθος ενώσεων, με αποτέλεσμα να έχουν εξαχθεί πολλά χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά στις σχέσεις δομής-δράσης. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ως ένωση-οδηγός η ίδια η ορμόνη και οι πρώτες βασικές σχέσεις δομής-δράσης προέκυψαν από χημικές τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο μόριο της.

Το μόριο της μελατονίνης δεν διαθέτει ιοντικές ομάδες, σε φυσιολογικό pH, και η σχετικά υψηλή του λιποφιλία του επιτρέπει να κινείται εντός των κυτταρικών μεμβρανών. Πολύχρονες μελέτες έδειξαν ότι οι *N*-ακετυλο και 5-μεθοξυ ομάδες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην πρόσδεση, όσο και στην ενεργοποίηση των υποδοχέων.

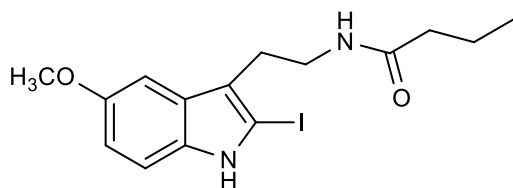


Η αντικατάσταση της 5-μεθοξυομάδας με υδρογόνο, υδροξύλιο, μεθύλιο ή κάποια αλκοξυομάδα φαίνεται να προκαλεί μείωση της χημικής συγγένειας ως προς όλους τους υποδοχείς της μελατονίνης⁷¹. Αντιθέτως, αλογονωμένα παράγωγα στη 5 θέση διατηρούν την υψηλή τους χημική συγγένεια για τον υποδοχέα. Τέλος, μία μετακίνηση της 5-μεθοξυομάδας στις θέσεις 4 ή 6 οδηγεί σε σημαντική μείωση της συγγένειας του εκάστοτε αναλόγου, ως προς τους υποδοχείς⁷².

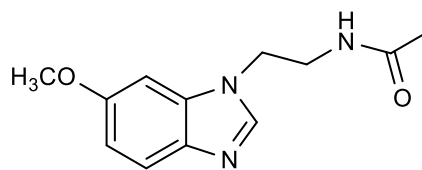
Όσον αφορά στην αλκυλαμιδομάδα της θέσης 3, η αύξηση του μήκους της ομάδας *R* (NHCO*R*_{*n*}) μέχρι *n*=3 άνθρακες οδηγεί σε βελτίωση του βαθμού σύνδεσης, ενώ, περαιτέρω αύξηση του μεγέθους της

αλυσίδας ή εισαγωγή διακλάδωσης στην ομάδα **R** έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της χημικής συγγένειας.

Συνθετικά ανάλογα, που φέρουν ως υποκατάσταση μία λιπόφιλη ομάδα στη 2 θέση, όπως αλογόνο, μεθύλιο, φαινύλιο ή βενζύλιο παρουσιάζουν γενικώς μεγαλύτερη χημική συγγένεια ως προς τους υποδοχείς. Αντίθετα, υποκατάσταση σε όλες τις άλλες θέσεις του ινδολικού πυρήνα, συμπεριλαμβανομένης και της θέσης 1, προκαλεί μείωση στο βαθμό συγγένειας, με εξαίρεση της περιπτώσεως όπου ο N_1 -υποκαταστάτης είναι μεθυλομάδα ή μεθυξύλιο⁷³. Γενικά, συνδυασμοί μεταξύ κατάλληλων *N*-ακυλομάδων και υποκατάστασης στη 2 θέση μπορούν να δώσουν εξαιρετικά αποτελέσματα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την 2-ιωδο-*N*-βουτανουόλο-5-μεθοξυθρυπταμίνη (**9**), με $pK_i = 10.8$ ⁷⁴. Διάφορες θεωρίες υποδεικνύουν πως, ο υποκαταστάτης στον C2 ωθεί την *N*-ακετυλαμινοαιθυλική πλευρική αλυσίδα στην κατάλληλη θέση για αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ή ότι ο ίδιος C2 υποκαταστάτης αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα, προσδίδοντας στις προκύπτουσες ενώσεις αυξημένη χημική συγγένεια⁷⁵.



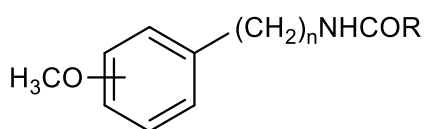
(9)



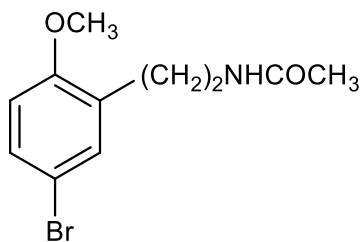
(10)

Επιπρόσθετα, πειράματα πρόσδεσης και χημικής συγγένειας αποδεικνύουν ότι ο ινδολικός πυρήνας διαδραματίζει το ρόλο του «φορέα» των απαραίτητων ομάδων, όπως η 5-μεθοξυομάδα και η C3*N*-ακετυλομάδα, τις οποίες διατηρεί στην απαιτούμενη απόσταση και συμβάλλει, ώστε να λαμβάνουν συγκεκριμένη διεύθυνση και προσανατολισμό στο χώρο. Παρόλα αυτά δεν είναι απαραίτητος για την εκδήλωση πρόσδεσης του εκάστοτε αναλόγου και μπορεί να αντικατασταθεί με διάφορους αρωματικούς πυρήνες, όπως ναφθαλίνιο, βενζοφουράνιο, βενζοθειοφαίνιο, κ.α. ^{76,77}. Αντίθετα, μειωμένη χημική συγγένεια παρατηρήθηκε με αντικατάσταση του C3 του ινδολίου με το άτομο του αζώτου, στο ίδιο το μόριο της μελατονίνης (βενζιμιδαζολικό παράγωγο **10**)⁷⁸.

Το 1996, οι Garratt και Τσοτίνης απέδειξαν ότι τα φαινυλαλκυλαμίδια με γενικό τύπο **11** διαθέτουν τα ελάχιστα δομικά χαρακτηριστικά, που απαιτούνται για μελατονινεργική δράση, με το πλέον δραστικό να είναι το βρωμο-παράγωγο **12** ⁷⁹. Επιπροσθέτως, η αυξημένη δράση των μορίων αυτών, φαίνεται να αποδίδεται στην ευκινησία της πλευρικής αλκαναναμιδοαλκυλο-αλυσίδας, η οποία περιστρέφεται ελεύθερα και μπορεί να λαμβάνει την ιδανική διαμόρφωση για σύνδεση στον υποδοχέα.

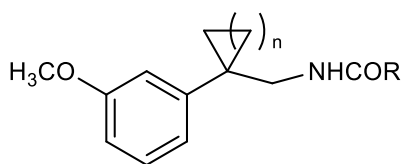


(11)

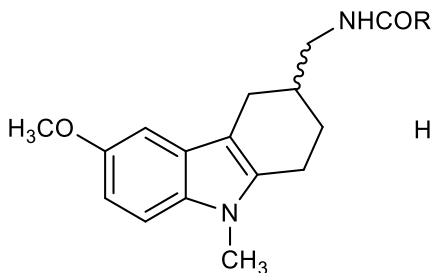


(12)

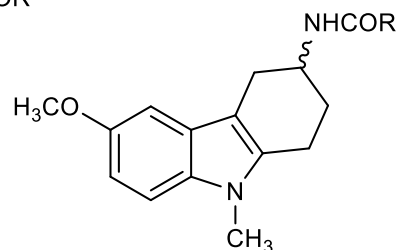
Μερικά χρόνια αργότερα, ο Τσοτίνης και οι συνεργάτες του, συνέθεσαν τα παράγωγα του γενικού τύπου **13**, τα οποία, σε αντίθεση με τα παραπάνω, διαθέτουν μερικώς άκαμπτη πλευρική αλυσίδα, και η σύνθεσή τους αποσκοπούσε στην εύρεση της πλέον κατάλληλης διαμόρφωσης για την επίτευξη ισχυρότερης σύνδεσης με τους υποδοχείς⁸⁰. Οι ενώσεις του τύπου **14** και **15**, παρασκευάστηκαν από την ερευνητική ομάδα του Garratt και αποτελούν πρότυπα μελατονινεργικών αναλόγων με άκαμπτη πλευρική αλυσίδα. Τα ανάλογα του τύπου **14** διαθέτουν πλευρική αλυσίδα, η οποία λαμβάνει μία αναδιπλωμένη (folded) διαμόρφωση σε σχέση με τον ινδολικό πυρήνα, ενώ, αντιθέτως, στα παράγωγα **15** η πλευρική αλυσίδα έχει μη-αναδιπλωμένη διαμόρφωση. Τα φαρμακολογικά αποτελέσματα, έναντι κυττάρων *Xenopus laevis*, κατέδειξαν πως ισχυρότερη σύνδεση και μεγαλύτερη δράση έχουν τα παράγωγα με folded διαμόρφωση⁸¹.



(13)



(14)

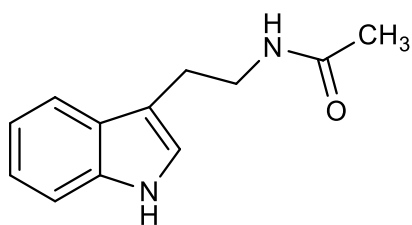


(15)

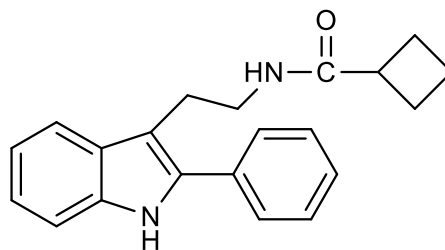
2.2. Αγωνιστές της Μελατονίνης

Αγωνιστική δράση παρουσιάζουν οι ενώσεις εκείνες οι οποίες μετά από αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα προκαλούν φαρμακολογική δράση, παρόμοια με εκείνη της φυσικής ορμόνης.

Τα 5-μεθοξυ-*N*-ακυλοθρυπταμινικά παράγωγα αποτελούν μία σημαντική κατηγορία αγωνιστών της μελατονίνης, με τα αντίστοιχα μη 5-μεθοξυλιωμένα ανάλογά τους να εμφανίζουν δράση μερικώς αγωνιστική ή ανταγωνιστική. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η *N*-ακετυλοθρυπταμίνη **(16)** και η 2-φαινυλο-*N*-κυκλοβουτανοκαρβονυλοθρυπταμίνη **(17)**.

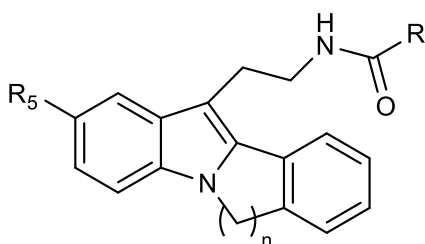


(16)



(17)

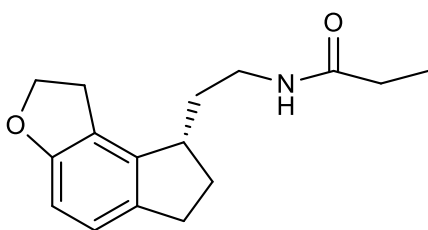
Η ερευνητική ομάδα του Τσοτίνη, έχει συνθέσει τα τελευταία χρόνια, διάφορα τετρακυκλικά μελατονινεργικά ανάλογα, που απεικονίζονται παρακάτω με το γενικό τύπο **18**, τα οποία παρουσιάζουν αγωνιστική (n=1) ή μερικώς αγωνιστική δράση (n=2) έναντι του φαρμακολογικού μοντέλου *Xenopus laevis*⁸¹.



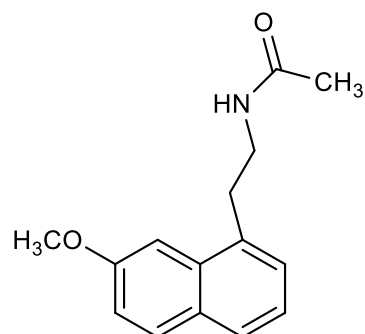
(18)

R: CH₃, CH₂CH₃, *n*-CH₂CH₂CH₃
R₅: H, OCH₃
n= 1, 2

Το 2002 συντέθηκε ένα νέο ανάλογο της μελατονίνης το (*S*)-*N*-[2-(1,6,7,8-τετραϋδρο-2*H*-ινδανο-([5,4-*b*]φουραν-8-υλ)αιθυλοπροπιοναμίδιο (**19**) με την εμπορική ονομασία *Ramelteon*. Το *Ramelteon*, είναι ο πρώτος εγκεκριμένος εκλεκτικός αγωνιστής της μελατονίνης, από τη US Food and Drug Administration (FDA) και χορηγείται για την καταπολέμηση της αϋπνίας, η οποία προκαλείται από τη δυσκολία έναρξης του ύπνου. Η εκλεκτικότητα του *Ramelteon* για τον MT₁ έναντι του MT₂ υποδοχέα είναι 1000 φορές μεγαλύτερη από αυτή της μελατονίνης⁸²⁻⁸⁴. Ένας ακόμα σημαντικός αγωνιστής της μελατονίνης, είναι η αγομελατίνη (**20**) (*Valdoxan*), η οποία χορηγείται ως αναγνωρισμένο φάρμακο, από το 2009 στην Ευρώπη, για την αντιμετώπιση της μείζονος κατάθλιψης. Η αντικαταθλιπτική της δράση οφείλεται στο συνδυασμό της αγωνιστικής της συμπεριφοράς έναντι των υποδοχέων MT₁ και MT₂ και της ανταγωνιστικής της δράσης έναντι των 5-HT_{2C} υποδοχέων της σεροτονίνης^{70,85,86}.

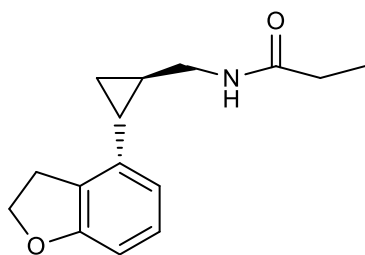


(19)
Ramelteon

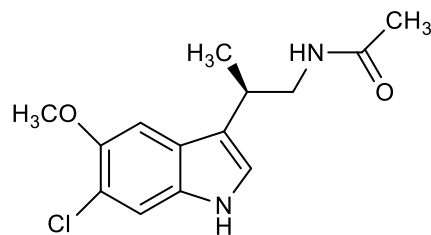


(20)
Valdoxan

Οι ενώσεις TIK-301 και Tasimelteon (**21**), αποτελούν μη εκλεκτικούς αγωνιστές. Το Tasimelteon με την εμπορική ονομασία HETLIOZ, διατίθεται μετά από έγκριση του FDA (2014) και της Ε.Ε. (2015) ως φάρμακο ρύθμισης του κύκλου του ύπνου σε τυφλά άτομα (non-24-hour sleep-wake rhythm disorder) με επιπλέον δράση κατά της κατάθλιψης. Το TIK-301 (**22**) παρασκευάστηκε το 2002 από την Eli-Lilly, και βρίσκεται επί του παρόντος στην 3^η φάση κλινικών δοκιμών κατά της αϋπνίας, ενώ αναφέρεται ότι εκδηλώνει παράλληλα και αντικαταθλιπτική δράση, λόγω της ανταγωνιστικής του δράσης στους υποδοχείς 5-HT_{2C} και 5-HT_{2B} της σεροτονίνης^{87,88}.



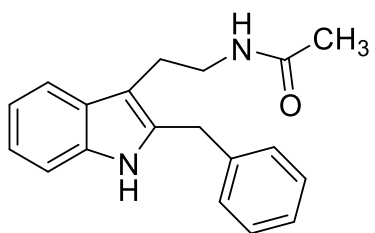
(21)
Tasimelteon



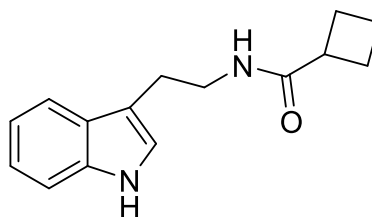
(22)
TIK-301

2.3. Ανταγωνιστές της Μελατονίνης

Ανταγωνιστική δράση παρουσιάζουν οι ενώσεις που αναστέλλουν τη δράση της μελατονίνης, και κατά κανόνα προέρχονται μετά από χημικές τροποποιήσεις επί γνωστών αγωνιστών. Μία από τις πρώτες τροποποιήσεις ήταν η απομάκρυνση της 5-μεθοξυ-ομάδας. Το *Luzindole* (**23**) θεωρείται ίσως ο σημαντικότερος εμπορικά διαθέσιμος ανταγωνιστής της μελατονίνης, εμφανίζοντας παράλληλα εκλεκτικότητα για τον MT₂ υποδοχέα, έναντι του MT₁ κατά 11 με 25 φορές. Προέκυψε από το αντίστοιχο 5-μεθοξυ παράγωγο το οποίο δρα ως μερικός ανταγωνιστής^{89,90}.

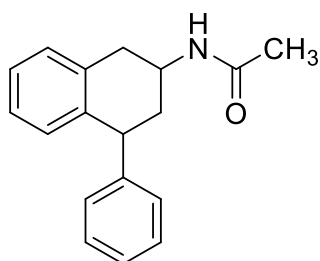


(23)
luzindole

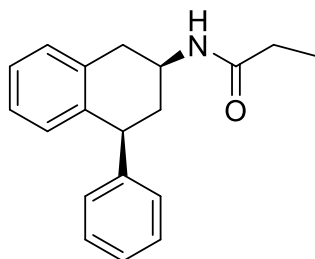


(24)
CBCPT

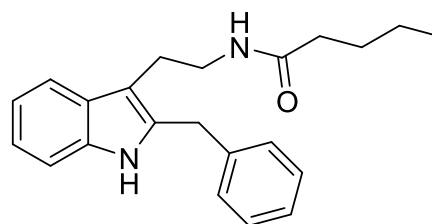
Η αντικατάσταση του μεθυλίου της *N*-ακετυλομάδας από κυκλοπροπύλιο ή κυκλοβουτύλιο μπορεί να μετατρέψει ένα παράγωγο από αγωνιστή σε ανταγωνιστή, όπως συνέβη στην περίπτωση του CBCPT (24). Σύμφωνα με τη Dubocovich, η εισαγωγή μίας φαινυλο ή βενζυλο- ομάδας σε μία από τις θέσεις 2 ή 4 σε ναφθαλινικά ή τετραλινικά ανάλογα, μετατρέπει την ένωση σε ανταγωνιστή, με πιο γνωστά παραδείγματα τις ενώσεις 2-ακεταμιδο-4-φαινυλοτετραλίνη (4P-ADOT) (25) και τη 2-προπιοναμιδο-4-φαινυλοτετραλίνη (4P-PDOT) (26)³⁵.



(25)
4P-ADOT



(26)
4P-PDOT



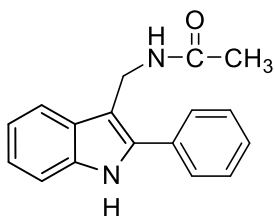
(27)
DH 97

Άλλος ένας εκλεκτικός ανταγωνιστής του μελατονινεργικού υποδοχέα MT_2 είναι η *N*-πεντανουόλο-2-βενζυλοθρυπαμίνη (DH-97) (27), ένωση η οποία εξετάστηκε από τον Sugden και τους συνεργάτες του για τη φαρμακολογική του δράση σε κύτταρα *Xenopus laevis*, όπου παρουσίασε 89 φορές ισχυρότερη πρόσδεση στον MT_2 υποδοχέα, έναντι του MT_1 ($pK_i=8,03$)⁹¹.

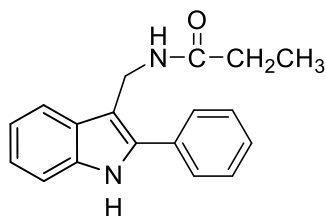
2.4. Στόχος της παρούσης Διπλωματικής Εργασίας

Βασιζόμενοι στα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα και κυρίως στα δομικά χαρακτηριστικά των παραγώγων της μελατονίνης που έχουν παρασκευαστεί από την ερευνητική μας ομάδα, τα τελευταία είκοσι χρόνια, σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της παρούσης εργασίας 5 διαφορετικές σειρές αναλόγων της μελατονίνης.

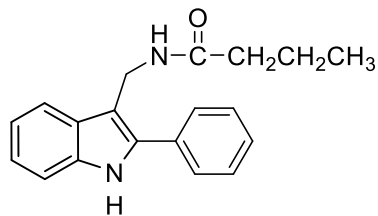
Στην πρώτη σειρά ενώσεων (**Σειρά A: 32, 33, 34**) έχει εισαχθεί μία φαινυλομάδα στη θέση 2 του ινδολικού πυρήνα και ταυτόχρονα ο αριθμός των μεθυλενίων μεταξύ του C3 και του NH της αμιδομάδας έχει μειωθεί κατά ένα μεθυλένιο σε σχέση με τα αντίστοιχα, στο μόριο της μελατονίνης. Οι δομικές αυτές τροποποιήσεις είχαν ως στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης στη μελατονινεργική δράση, με δεδομένο ότι η δίεδρη γωνία C5-H/N1-H/C3-πλευρική αλυσίδα μεταβάλλεται σε σχέση με την αντίστοιχη γωνία στο σκελετό της μελατονίνης. Επιπλέον, αφαιρέθηκε το C5 μεθοξύλιο, ούτως ώστε να διερευνηθεί κατά πόσο η παρουσία του είναι αναγκαία για εκδήλωση μελατονινεργικής δράσης, σε αυτή την περίπτωση.



(33)

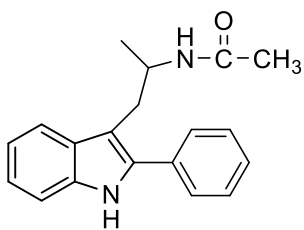


(34)

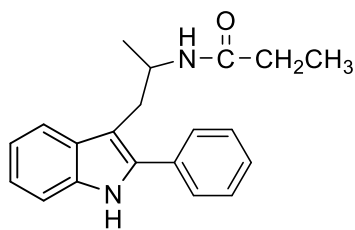


(32)

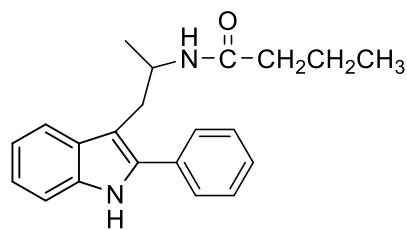
Με βάση αυτό το σκεπτικό σχεδιάστηκαν και οι επόμενες σειρές ενώσεων. Συγκεκριμένα, στη δεύτερη σειρά αναλόγων (**Σειρά B: 37, 38, 39**) διατηρήθηκε η C2-φαινυλοϋποκατάσταση, αλλά εισήχθη C3-πλευρική αλυσίδα με περιορισμένους βαθμούς ελευθερίας περιστροφής, λόγω της παρουσίας του C α -μεθυλίου.



(37)

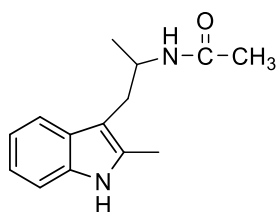


(38)

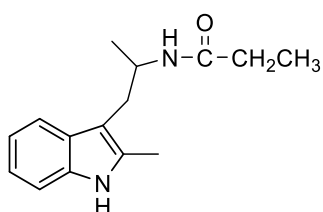


(39)

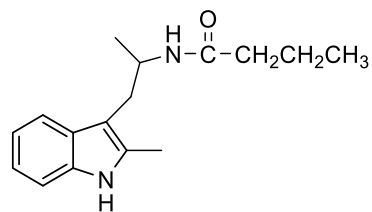
Στην τρίτη σειρά ενώσεων (**Σειρά C: 44, 45, 46**), ο C2-φαινυλοϋποκαταστάτης στην παραπάνω σειρά αναλόγων, αντικαταστάθηκε από το μεθύλιο, ενώ η πλευρική αλυσίδα παρέμεινε η ίδια (C α -μεθύλιο).



(44)

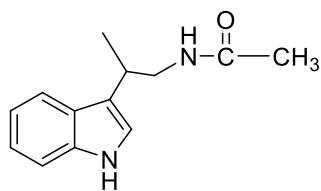


(45)

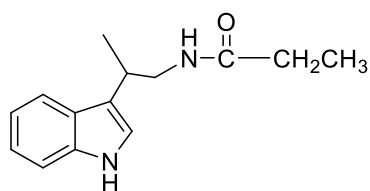


(46)

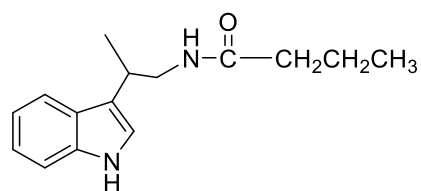
Στην τέταρτη σειρά των αναλόγων μελατονίνης (**Σειρά D: 52, 53, 54**) αφαιρέθηκαν οι C2-υποκαταστάτες που υπήρχαν σε όλες τις παραπάνω σειρές ενώσεων, αλλά εισήχθη ένα C β -μεθύλιο με στόχο την επίδραση, της επιφερόμενης από αυτή την υποκατάσταση ακαμψίας, στη φαρμακολογική δράση.



(52)

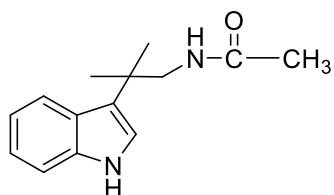


(53)

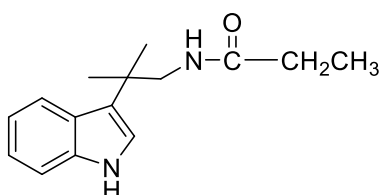


(54)

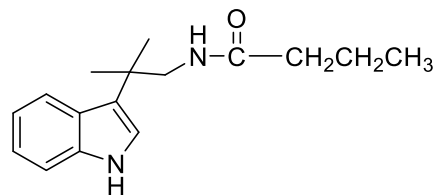
Τέλος, στην πέμπτη σειρά ενώσεων (**Σειρά E: 58, 59, 60**) η ακαμψία της πλευρικής αλυσίδας των αναλόγων της τέταρτης σειράς ενισχύθηκε έτι περαιτέρω, μέσω μίας *gem*-διμεθυλο C β -υποκατάστασης.



(58)



(59)

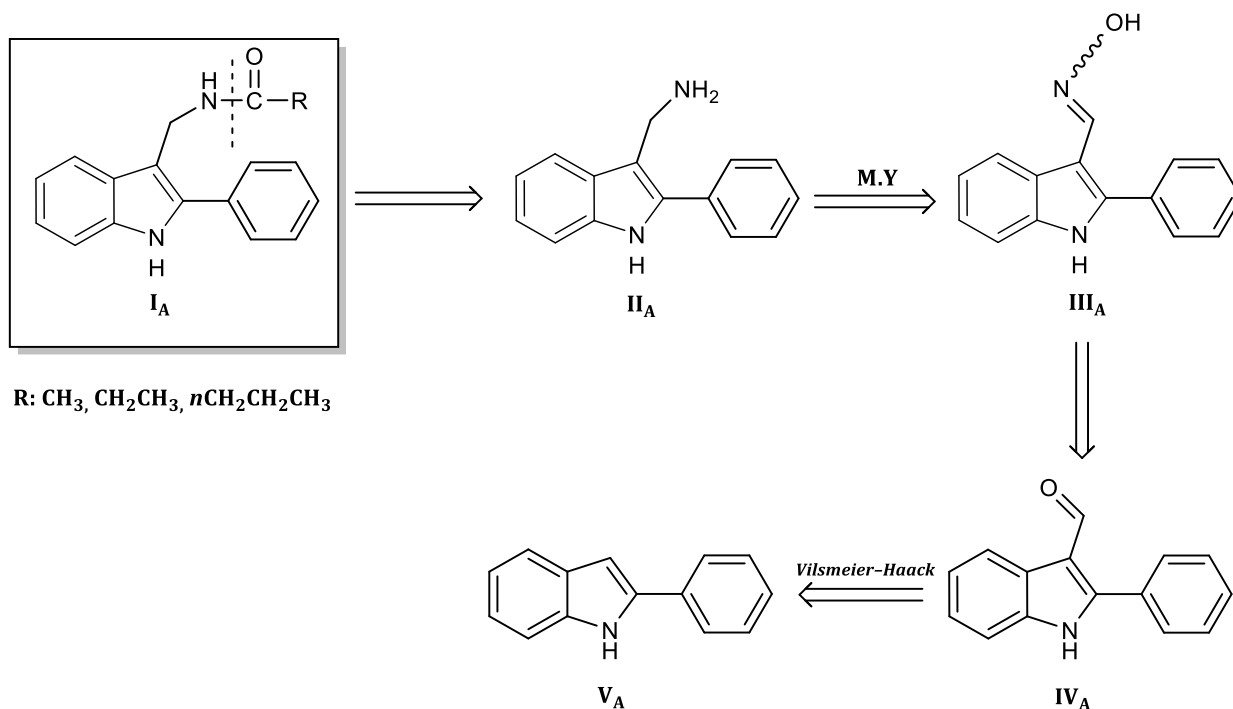


(60)

3. Χημικό Μέρος

3.1.1. Συνθετικές μελέτες για την παρασκευή των νέων αναλόγων, 32-34, της Σειράς A

3.1.1 Ρετροσυνθετική ανάλυση

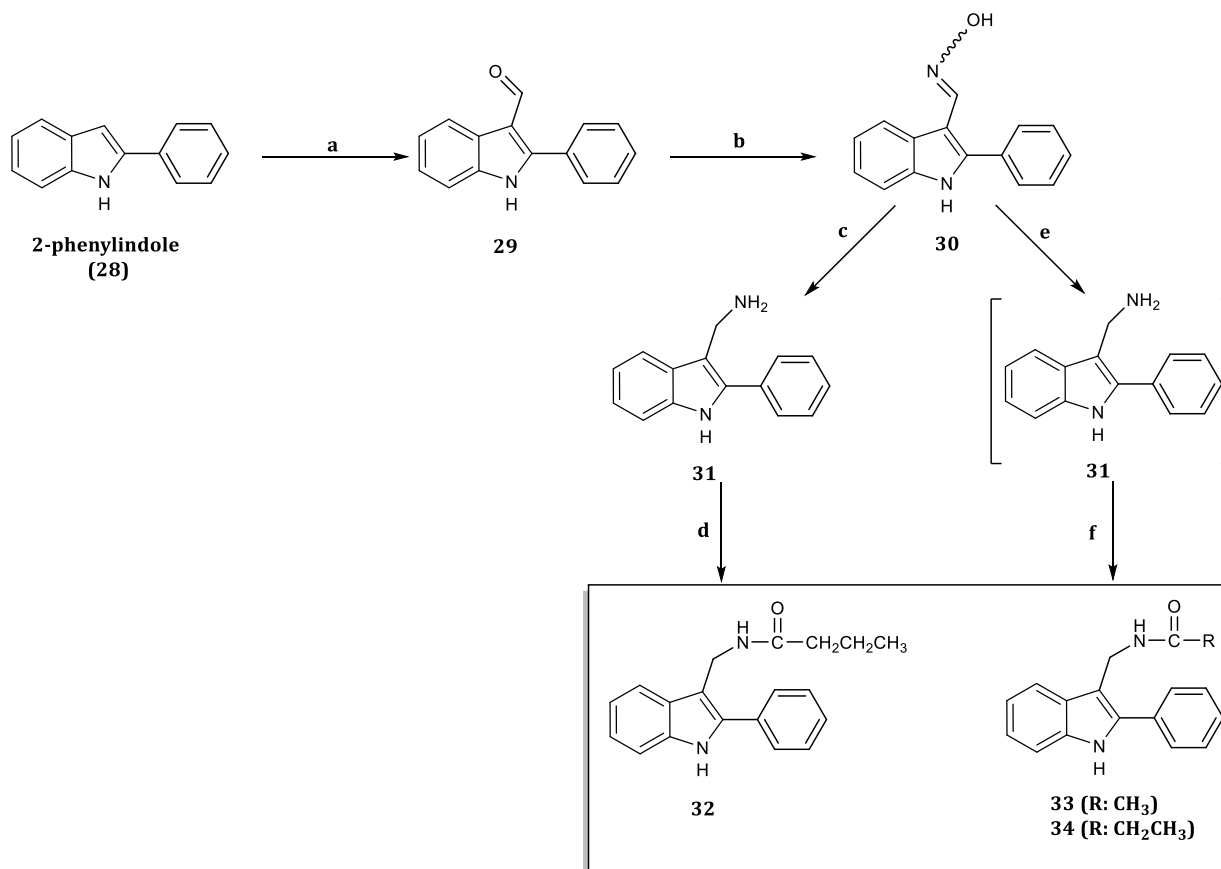


Σχήμα 1: Ρετροσυνθετική ανάλυση των ενώσεων της Σειράς A.

Στο **Σχήμα 1**, παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική οδός παρασκευής των αμιδίων του γενικού τύπου **I_A**. Συγκεκριμένα, τα αμίδια **I_A** προκύπτουν από την αμίνη **II_A**, πρόδρομη ένωση της οποίας είναι η αλδοξίμη **III_A**. Αυτή, συντίθεται από την αντίστοιχη αλδεΰδη **IV_A**, η οποία παραλαμβάνεται από το εμπορικά διαθέσιμο 2-φαινυλοϊνδόλιο (**V_A**).

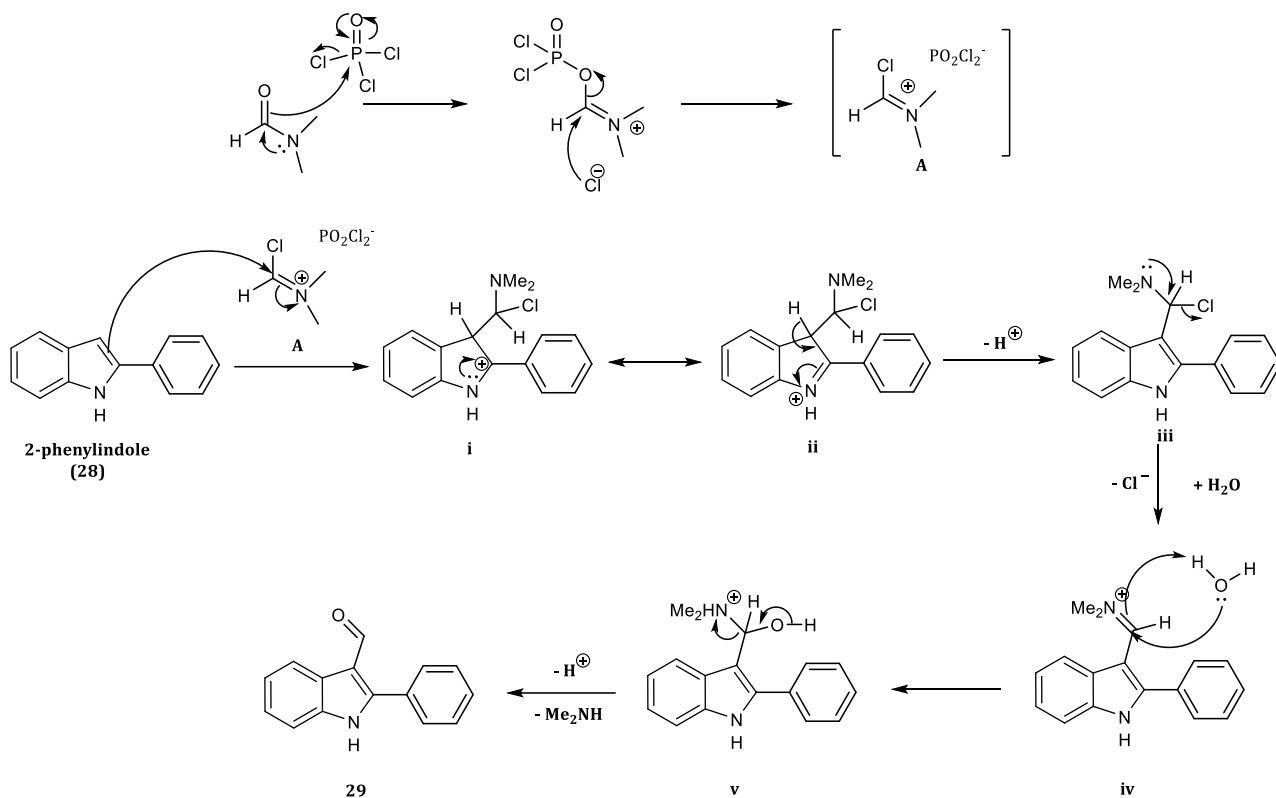
3.1.2 Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων **32** - **34**

Η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των αναλόγων της Σειράς **A**, απεικονίζεται στο **Σχήμα 2**.



Σχήμα 2: Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων της Σειράς **A**: **a)** 1,2eq POCl₃, DMF, 50°C, 2h, NaOH, H₂O, 60°C, 1h. **b)** 2eq NH₂OH·HCl, EtOH/H₂O 4:1, NaOAc, 65°C, 1h. **c)** Pd/C, H₂, 4atm, 6h. **d)** (CH₃CH₂CH₂CO)₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C - θ.δ., 25min. **e)** Raney-Ni (55% mol), NaBH₄ in NaOH 5,0 M, 55-60°C, **f)** 2,13eq (RCO)₂O, θ.δ., 3h.

Αναλυτικά, για τη σύνθεση των νέων ινδολικών παραγώγων **32-34**, χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το εμπορικά διαθέσιμο 2-φαινυλοϊνδόλιο (**28**), από το οποίο, μέσω φορμυλίωσης κατά Vilsmeier-Haack⁹² προκύπτει η 2-φαινυλ-1*H*-ινδολοκαρβοξαλδεΐδη (**29**). Ο μηχανισμός της συγκεκριμένης αντίδρασης περιλαμβάνει αρχικά το σχηματισμό του ιμινικού ιόντος **A**, από την επίδραση του διμεθυλοφορμαμίδιου επί του οξυχλωριούχου φωσφόρου, το οποίο στη συνέχεια με ηλεκτρονιόφιλη προσβολή στον C3 του 2-φαινυλοϊνδολίου, οδηγεί στο ενδιάμεσο (**i**) με δομή συντονισμού τη (**ii**) **Σχήμα 3**. Το ενδιάμεσο (**ii**) σταθεροποιούμενο, μέσω της ευνοϊκότερης δομής (**iii**)⁹³, υδρολύεται προς την επιθυμητή αλδεΐδη (**29**)⁹⁴.



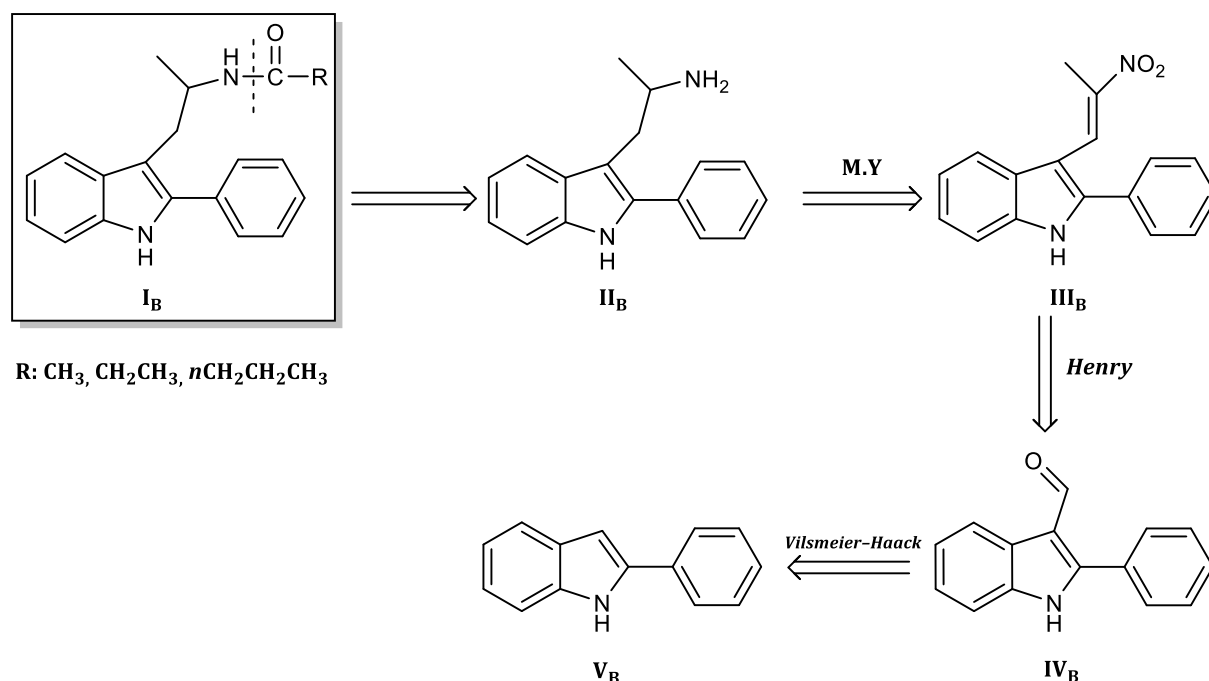
Σχήμα 3: Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού της 2-φαινυλ-1H-ινδολοκαρβοξυαλδεΐδης, μέσω της αντίδρασης Vilsmeier-Haack.

Ακολουθεί η σύνθεση της αντίστοιχης αλδοξίμης **30**, μέσω επίδρασης της υδροξυλαμίνης και του οξικού νατρίου επί της αλδεΐδης **29**. Αρχικά, επιχειρήθηκε η αναγωγή της οξίμης **30** προς την αμίνη **31**, μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης με Pd/C. Η αντίδραση αυτή είχε χαμηλή απόδοση, καθώς και τη δημιουργία πολλών παραπροϊόντων. Το *N*-[(2-φαινυλ-1H-ινδολο-3-υλο)μεθυλο]βουτυραμίδιο (**32**), παραλήφθηκε μετά από αντίδραση της αμίνης (**31**) με 1,16 eq τριαιθυλαμίνης και 1,33 eq βουτυρικού ανυδρίτη. Η μέθοδος που προτιμήθηκε για τη σύνθεση των αμιδίων **33** και **34**, ήταν μέσω αναγωγής της οξίμης **30** και αμίδωσης σε ένα στάδιο. Ο καταλύτης Raney-Nikel ενεργοποιείται με την προσθήκη του NaOH, το δε NaBH₄ δρα ως το αναγωγικό μέσο για τον *in situ* σχηματισμό της αμίνης. Με απευθείας προσθήκη του αντίστοιχου ανυδρίτη, παρασκευάζονται τα ακετυλο- και προπανο-αμίδια **33** και **34**⁹⁵.

3.2. Συνθετικές μελέτες για την παρασκευή των νέων αναλόγων 37-39 της Σειράς Β.

3.2.1. Ρετροσυνθετική ανάλυση

Η ρετροσυνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των νέων αμιδίων, 37-39, απεικονίζεται αναλυτικά στο **Σχήμα 4**.

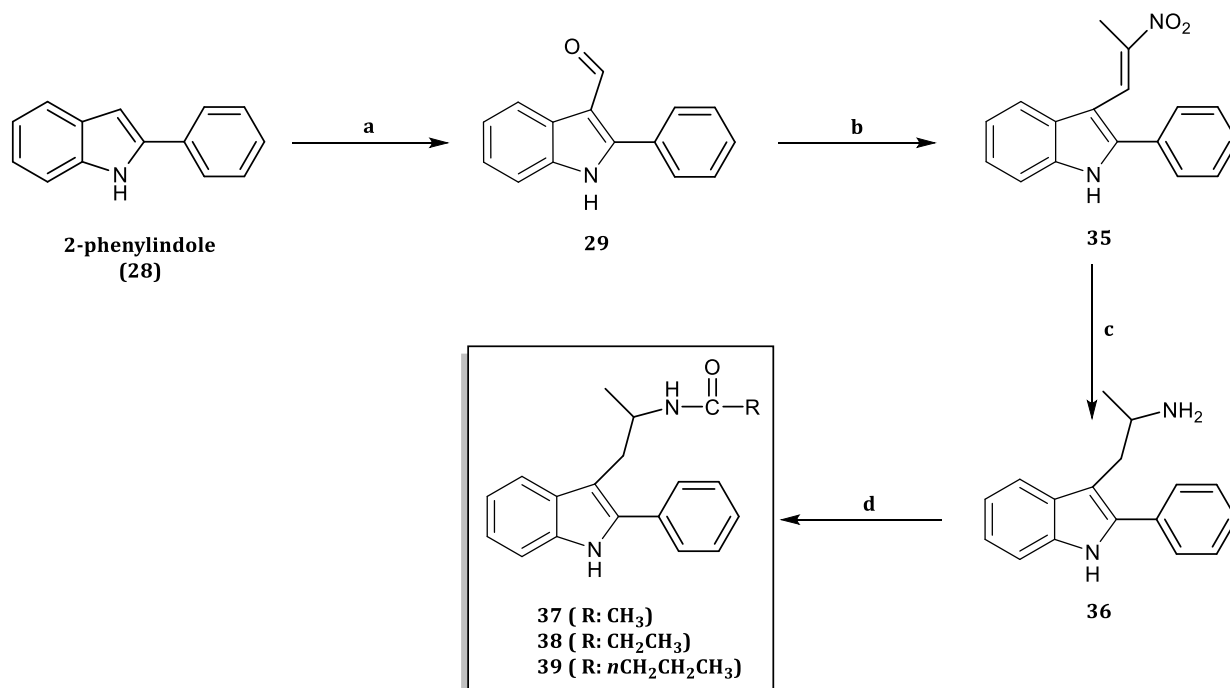


Σχήμα 4: Ρετροσυνθετική ανάλυση των ενώσεων της Σειράς Β.

Αναλυτικά, τα αμίδια του γενικού τύπου **I_B** προέρχονται από την αμίνη **II_B**, της οποίας πρόδρομη ένωση αποτελεί το 3-(2-νιτροπροπ-1-εν-1-υλο)-2-φαινυλ-1H-ινδόλιο (**III_B**). Η νιτρο-ολεφίνη **III_B** προκύπτει, μετά από αντίδραση Henry, από την 2-φαινυλ-1H-ινδολο-καρβοξαλδεΐδη **IV_B**, η οποία αποτελεί το προϊόν φορμυλίωσης, κατά Vilsmeier-Haack, του εμπορικά διαθέσιμου 2-φαινυλοϊνδολίου (**V_B**).

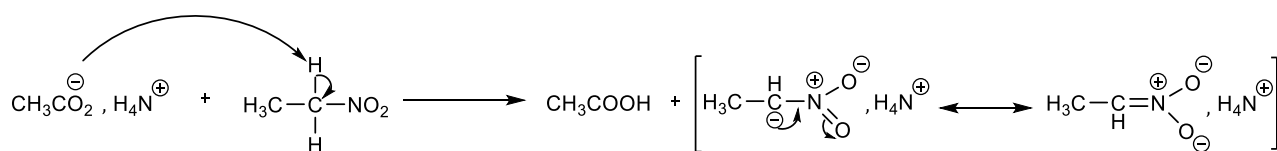
3.2.2. Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων 37-39.

Η πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των ινδολικών παραγώγων 37-39 απεικονίζεται στο Σχήμα 5.



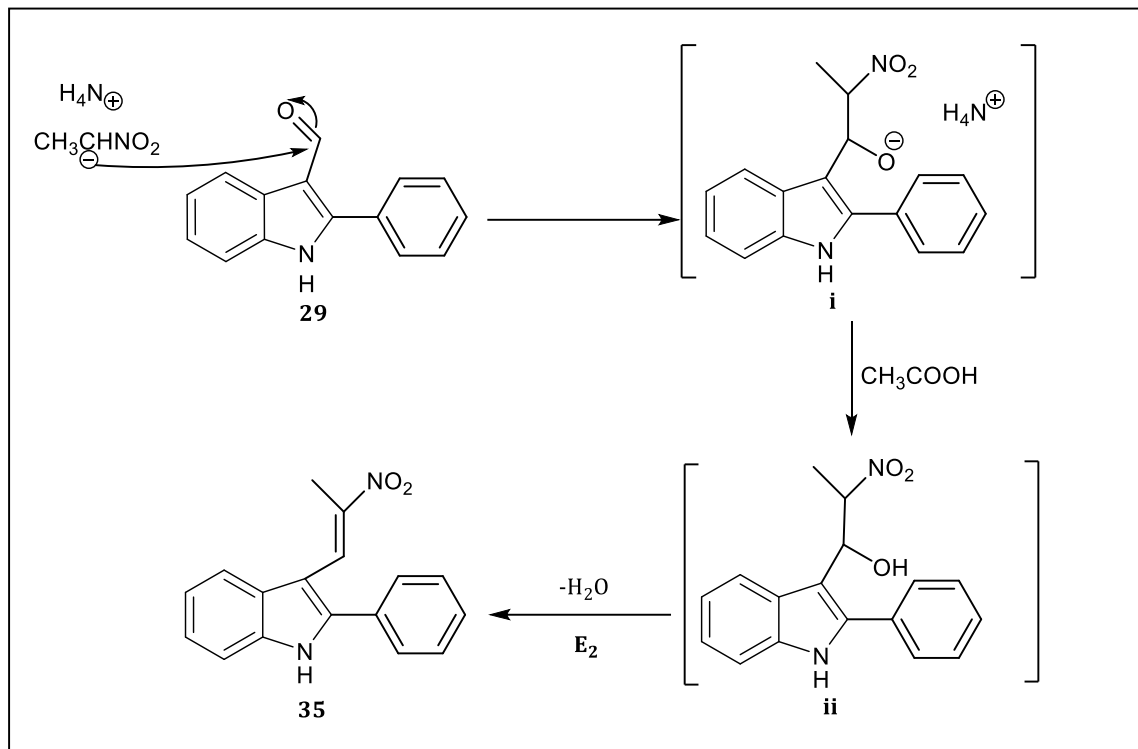
Σχήμα 5: Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων της Σειράς Β :**a)** POCl₃ (1.2 eq), DMF, 50 °C, 2h, NaOH, H₂O, 60 °C, 1h **b)** C₂H₅NO₂, AcONH₄ (3.2 eq), Δ (επαναρροή), 6h, **c)** LiAlH₄, THF, 0 °C-θ.δ., 15 min, **d)** (RCO)₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C-θ.δ.

Αναλυτικά, για τη σύνθεση των νέων ινδολικών παραγώγων 37-39, χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το εμπορικά διαθέσιμο 2-φαινυλοϊνδόλιο (28), από το οποίο, μέσω φορμυλίωσης κατά Vilsmeier-Haack⁹⁴ προκύπτει η 2-φαινυλ-1H-ινδολοκαρβοξαλδεΰδη (29), ο μηχανισμός της οποίας έχει περιγραφεί αναλυτικά στην ενότητα 3.1.2. Ακολουθεί η αντίδραση της καρβοξαλδεΰδης (29) με νιτροαιθάνιο, παρουσία οξικού αμμωνίου, ώστε να παραληφθεί το νιτροπαραγώγο (35), μέσω της αντίδρασης Henry, η οποία αρχικά περιλαμβάνει το σχηματισμό του καρβανιόντος του νιτροαιθανίου με την επίδραση του οξικού αμμωνίου, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.



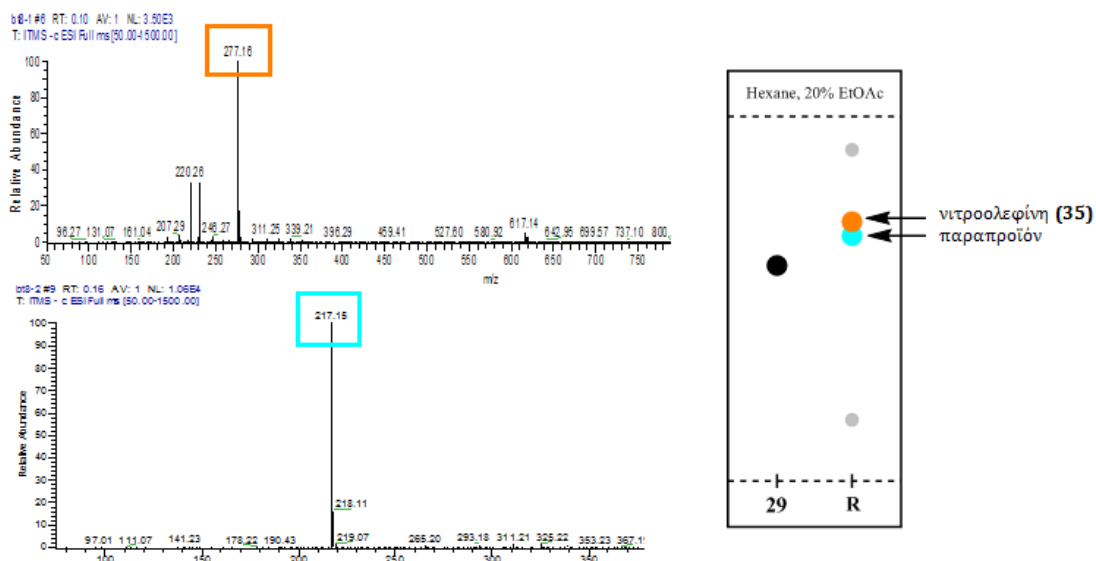
Σχήμα 6: Σχηματισμός καρβανιόντος νιτροαιθανίου - 1^ο στάδιο αντίδρασης Henry.

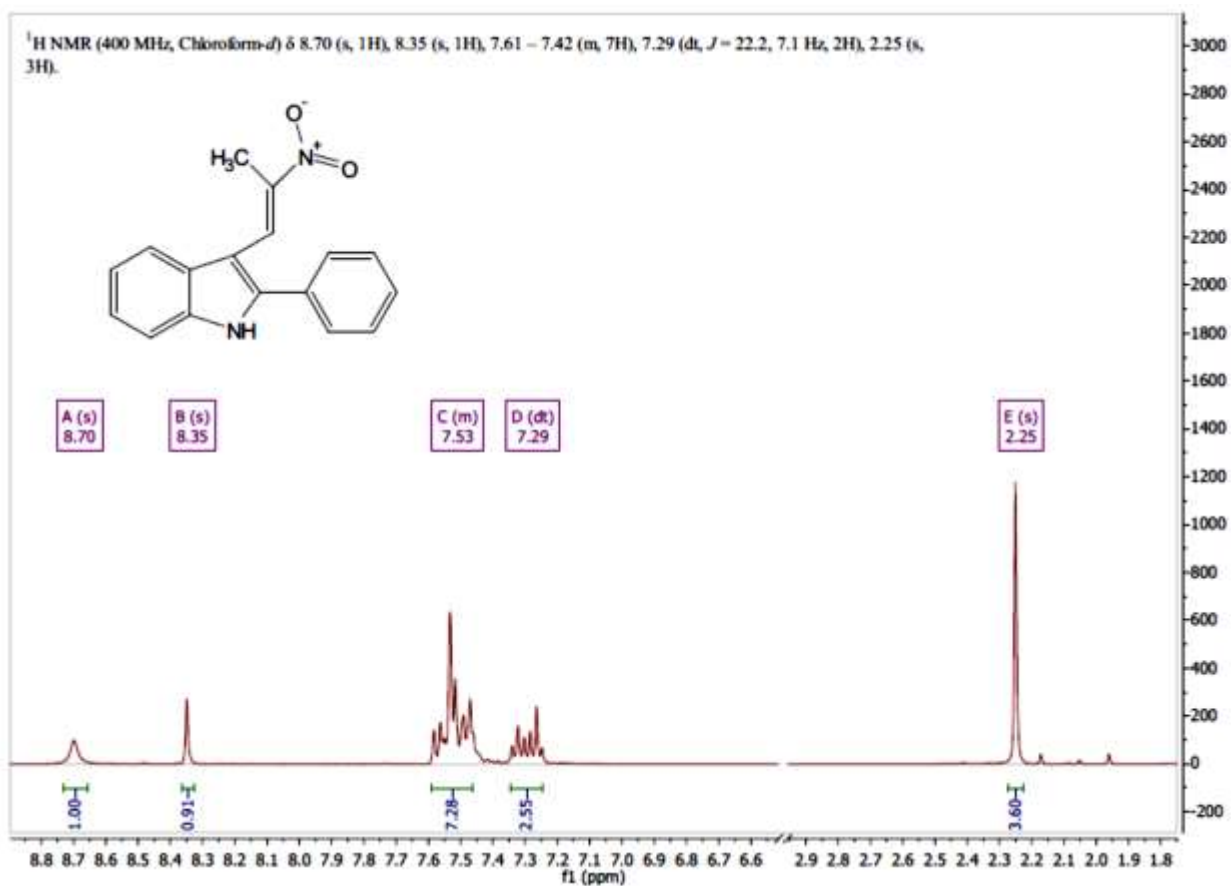
Το καρβανιόν αυτό, σταθεροποιείται προς ευνοϊκότερη δομή συντονισμού, λόγω του ισχυρού -R φαινομένου που ασκεί η νιτρομάδα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πυρηνόφιλη προσβολή επί του άνθρακα του καρβονυλίου της αλδεΐδης **29**, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ενδιάμεσου (**i**), το οποίο κατόπιν οξίνισης οδηγεί στη λήψη της νιτρολεφίνης **35**, όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 7**.



Σχήμα 7: Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού του (*E*)-3-(2-νιτροπροπ-1-εν-1-υλο)-2-φαινυλ-1*H*-ινδόλιου

Η λήψη της νιτρολεφίνης **35** ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας (MS, *vide infra*) και NMR. Σύμφωνα, με τη βιβλιογραφία⁹⁶, η αντίδραση Henry επί C2-υποκατεστημένων ινδολίων, αποφέρει το *E*-ισομερές, γεγονός το οποίο επαληθεύτηκε από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (*vide infra*).





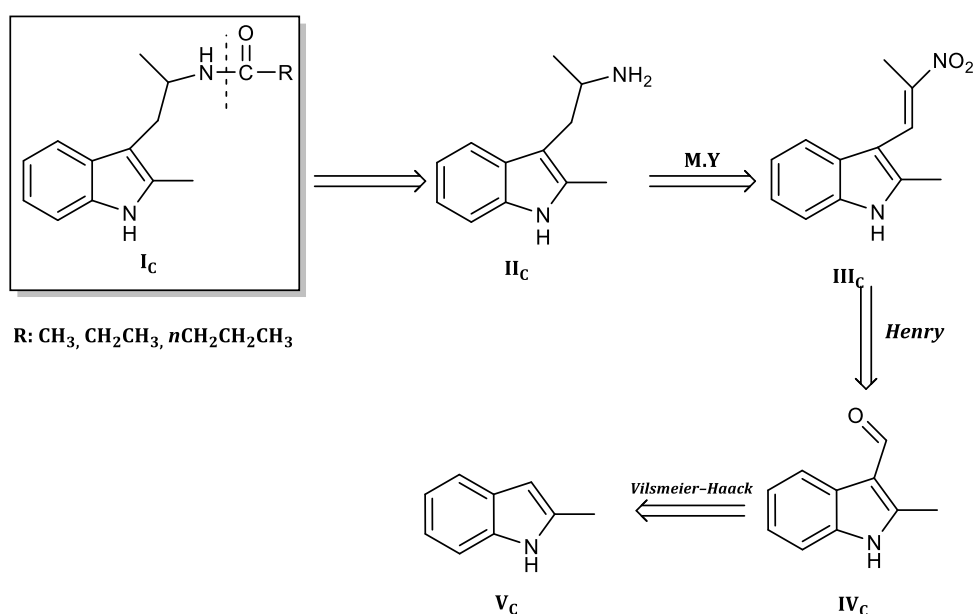
Σχήμα 9: Τα δεδομένα του φάσματος ¹H NMR συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας.⁹⁶

Στη συνέχεια, μετά από αναγωγή του (*E*)-3-(2-νιτροπροπ-1-εν-1-υλο)-2-φαινυλ-1*H*-ινδολίου (**35**), με λιθιοαργιλιούδριδιο σε άνυδρο THF, προκύπτει η 1-(2-φαινυλ-1*H*-ινδολο-3-υλο)προπαν-2-αμίνη (**36**). Η αμίνη **36** χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο της αμίδωσης, χωρίς περαιτέρω καθαρισμό, όπου με επίδραση 1,33eq του κατάλληλου ανυδρίτη οξέος, παρουσία 1,16 eq τριαιθυλαμίνης, παραλαμβάνονται τα αμίδια **37-39**.

3.3. Συνθετικές μελέτες για την παρασκευή των νέων αναλόγων 39-41 της Σειράς C.

3.3.1. Ρετροσυνθετική ανάλυση

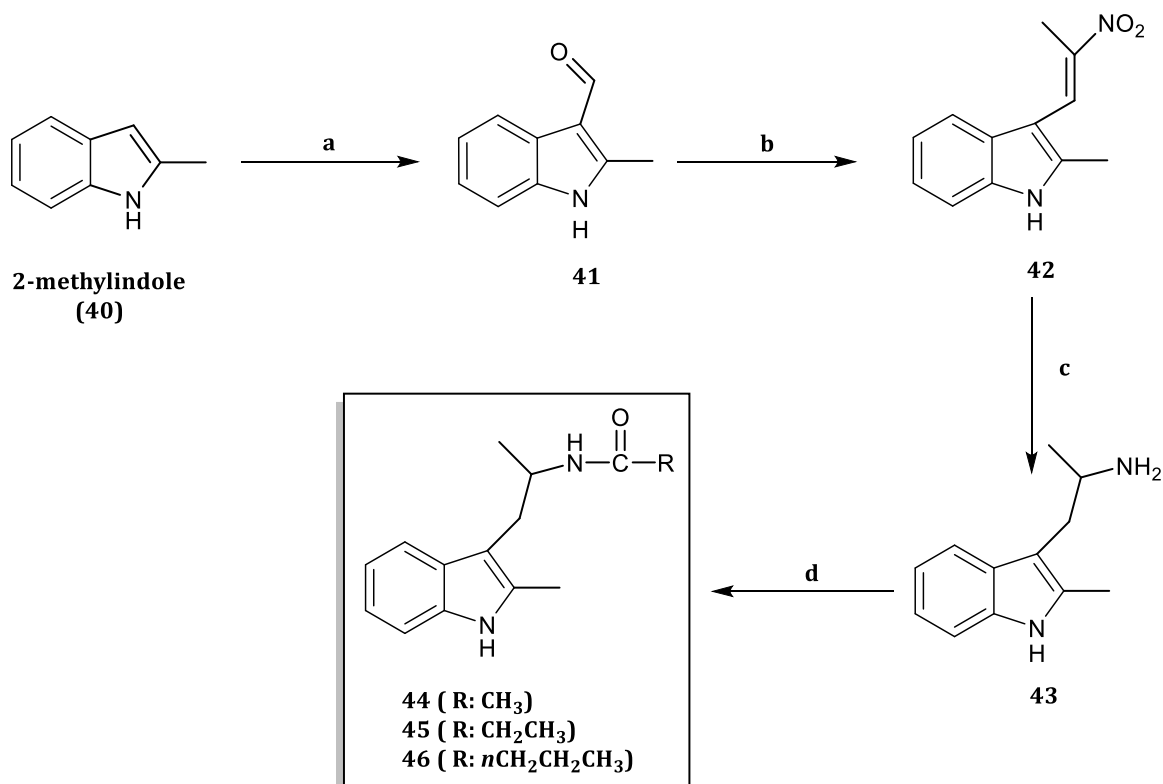
Η ρετροσυνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των νέων αμιδίων **39-41** απεικονίζεται αναλυτικά στο **Σχήμα 10**.



Σχήμα 10: Ρετροσυνθετική ανάλυση των ενώσεων της Σειράς C.

Κατά αντιστοιχία με τα παράγωγα της σειράς C, τα αμιδία του γενικού τύπου **I_C**, παραλαμβάνονται από την πρόδρομη αμίνη **II_C**, η οποία προκύπτει από το νιτροπαράγωγο **III_C**. Αυτό παρασκευάζεται από την αλδεΰδη **IV_C**, η οποία αποτελεί προϊόν φορμυλίωσης του εμπορικής διαθέσιμου 2-μεθυλοϊνδολίου (**V_C**).

3.3.2. Συνθετική πορεία για την παρασκευή των αναλόγων 39-41.



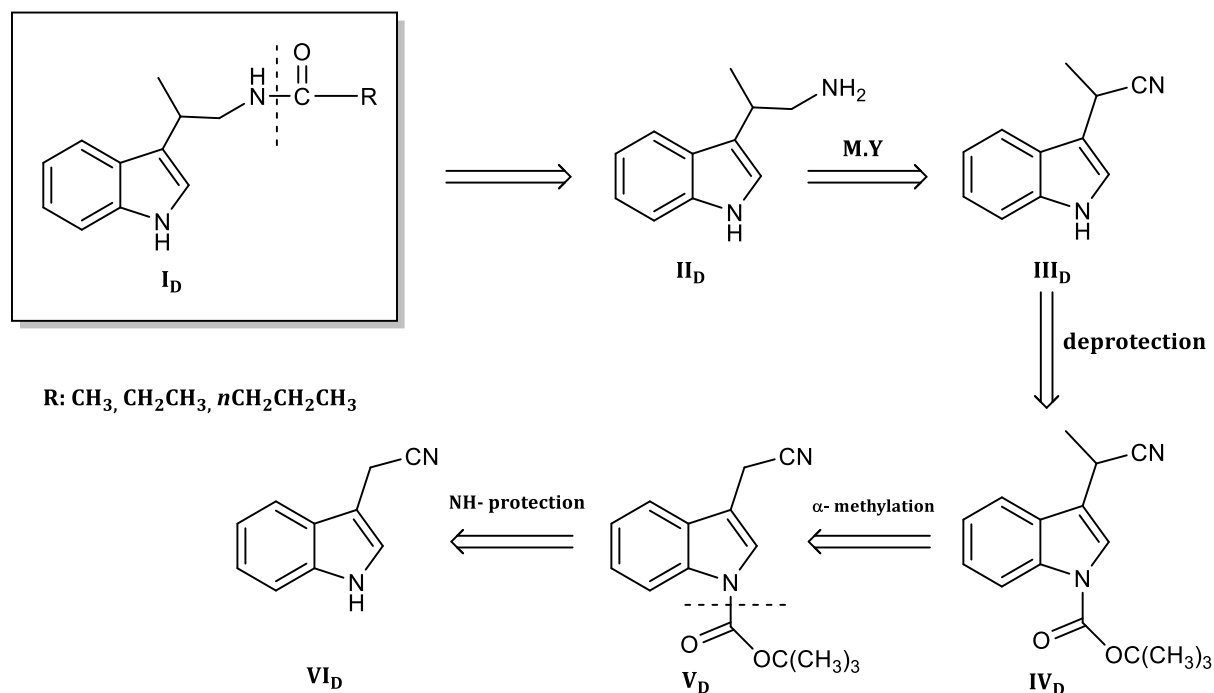
Σχήμα 11: Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων της Σειράς C : **a)** 1.2eq POCl₃, DMF, 50 °C, 2h, NaOH, H₂O, 60 °C, 1h. **b)** C₂H₅NO₂, 0.6eq AcONH₄, Δ (επαναρροή), 6h. **c)** LiAlH₄, THF, 0 °C-θ.δ., 15min. **d)** (RCO)₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C-θ.δ., RT, 25min

Αντικαθιστώντας την πρώτη ύλη, για τη σύνθεση των παραγώγων της Σειράς B, με το 2-μεθυλοϊνδόλιο (40), παραλαμβάνεται, μέσω φορμυλίωσης Vilsmeier-Haack, η 2-μεθυλο-1*H*-ινδολοκαρβοξαλδεΰδη (41). Στη συνέχεια, και μετά από επίδραση νιτροαιθανίου και οξικού αμμωνίου, προκύπτει το 2-μεθυλο-3-(2-νιτροπροπενυλο)-1*H*-ινδόλιο (42). Μετά από αναγωγή με λιθιοαργιλιοϋδρίδιο, η σχηματιζόμενη αμίνη 43 αντιδρά με τους κατάλληλους ανυδρίτες οξέων, ώστε να παραληφθούν τα αμίδια 44, 45 και 46.

3.4. Συνθετικές μελέτες για την παρασκευή των νέων αναλόγων 52-54 της Σειράς E

3.4.1. Ρετροσυνθετική ανάλυση

Στο ακόλουθο σχήμα, παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική πορεία σύνθεσης των αμιδίων του γενικού τύπου **I_D**

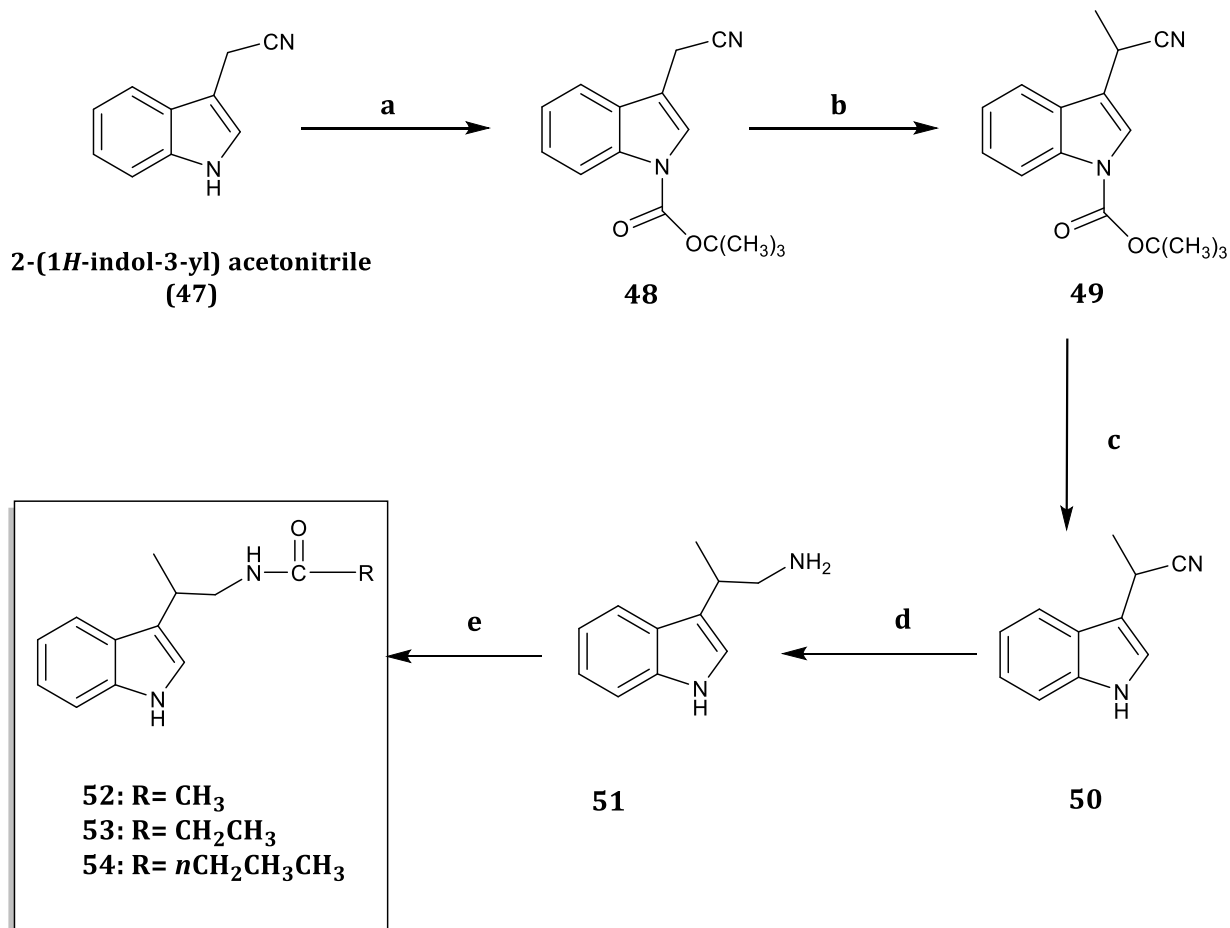


Σχήμα 12 Ρετροσυνθετική ανάλυση των ενώσεων της Σειράς D.

Όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 12**, πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση των αμιδίων της Σειράς D, είναι η αμίνη **II_D**, η οποία προέρχεται από το αντίστοιχο νιτρίλιο **III_D**. Το νιτρίλιο **III_D**, παραλαμβάνεται μετά από την αποπροστασία του *N*-BOC προστατευμένου νιτρίλιου **IV_D**. Η μεθυλίωση στην α -θέση του ακετονιτρίλιου **V_D**, έλαβε χώρα μετά από την προστασία του ινδολικού αζώτου του 3-ινδολοακετονιτρίλιου, το οποίο είναι εμπορικά διαθέσιμο.

3.4.2. Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων 52-54

Στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζεται αναλυτικά η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τα ανάλογα της Σειράς D.



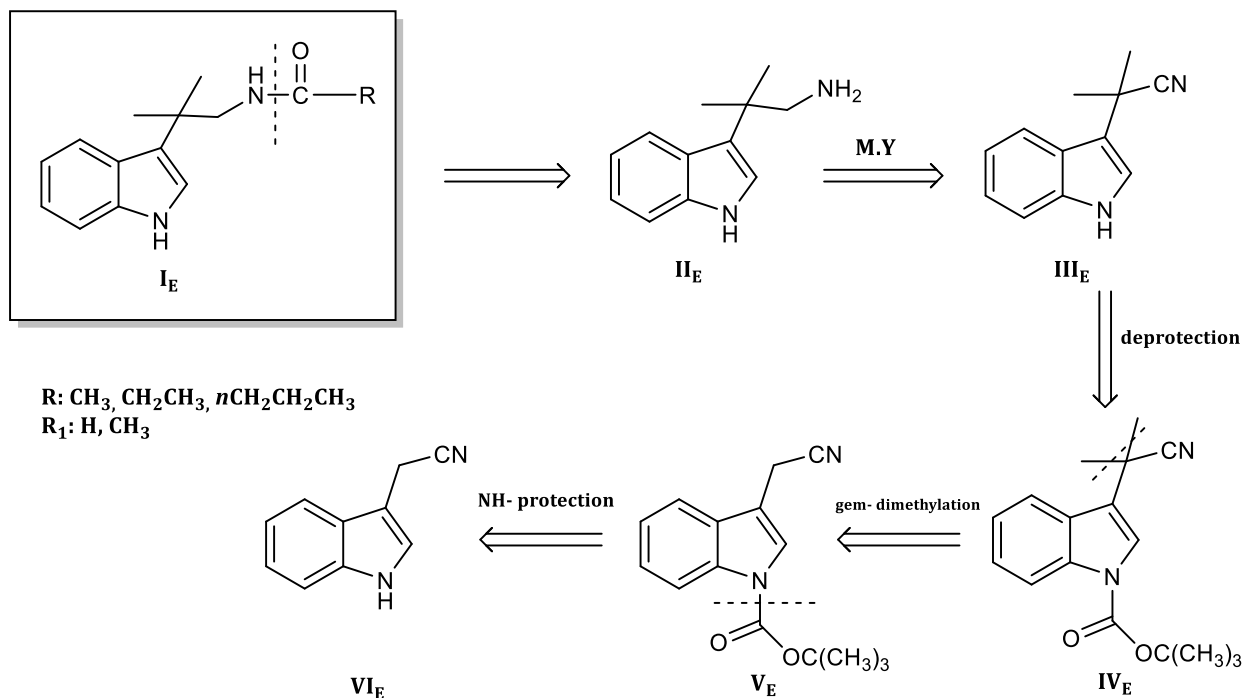
Σχήμα 13: Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων της Σειράς D: **a)** DMAP, BOC₂O, CH₂Cl₂, RT, 1h. **b)** LiHMDS 1,0M σε THF -78°C 40min., 1,03 eq CH₃I, θ.δ., 15h. **c)** 3eq K₂CO₃, MeOH-H₂O 3:1, Δ υπό επαναρροή, 1h. **d)** LiAlH₄, Et₂O/βενζόλιο, 0°C έως θ.δ., 15min. **e)** (RCO)₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C-θ.δ., 25min.

Κατά το πρώτο στάδιο της συνθετικής πορείας, το ινδολικό άζωτο του 3-ινδολοακετονιτριλίου, προστατεύεται με di-*tert*-butyl dicarbonate (BOC). Το προστατευμένο πλέον ινδολο-ακετονιτρίλιο **48**, με επίδραση ισομοριακής ποσότητας ιωδομεθανίου μεθυλιώνεται στην α-θέση ως προς την κυανομάδα του παραγώγου **49**. Η αποπροστασία του *N*-BOC παραγώγου **50** πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, υπό ήπιες αλκαλικές συνθήκες⁹⁷, ώστε να αποφευχθεί πιθανή υδρόλυση του νιτριλίου σε καρβοξυλικό οξύ. Τέλος, το παράγωγο **50** ανάγεται με λιθιοαργιλοϋδρίδιο σε διάλυμα διαιθυλαιθέρα/βενζολίου, προς την αντίστοιχη αμίνη **51**, η οποία χωρίς περαιτέρω κατεργασία αντιδρά με τους κατάλληλους ανυδρίτες, προς τα επιθυμητά αμίδια **52 - 54**.

3.5. Συνθετικές μελέτες για την παρασκευή των νέων αναλόγων 58-60 της Σειράς E.

3.5.1. Ρετροσυνθετική ανάλυση

Στο ακόλουθο σχήμα, παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική πορεία σύνθεσης των αμιδίων του γενικού τύπου **I_E**.

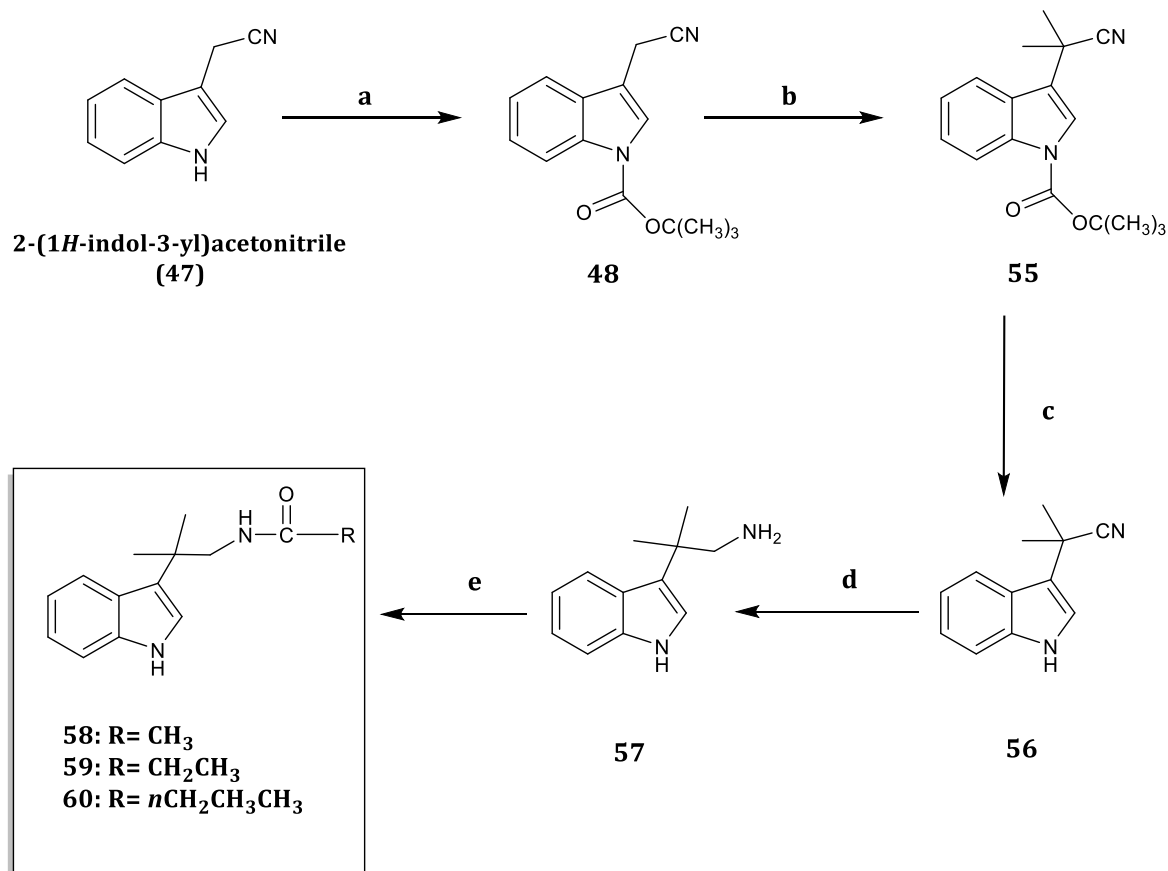


Σχήμα 14: Ρετροσυνθετική ανάλυση των ενώσεων της Σειράς E.

Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 14, πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση των αμιδίων της Σειράς E, είναι η αμίνη **II_E**, η οποία προέρχεται από το αντίστοιχο νιτρίλιο **III_E**. Το νιτρίλιο **III_E**, παραλαμβάνεται μετά από την αποπροστασία του *N*-BOC προστατευμένου νιτρίλιου **IV_E**. Η διμεθυλίωση στην α -θέση του ακετονιτρίλιου **V_E**, έλαβε χώρα μετά από την προστασία του ινδολικού αζώτου του 3-ινδολοακετο-νιτρίλιου, το οποίο είναι εμπορικά διαθέσιμο και χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη.

3.5.2. Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων 58 - 60

Στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζεται αναλυτικά η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τα ανάλογα της Σειράς E.



Σχήμα 15: Συνθετική πορεία παρασκευής των αναλόγων της Σειράς E: **a)** DMAP, BOC₂O, CH₂Cl₂, RT, 1h. **b)** NaH (60%), 2,55eq CH₃I, DMF, 0°C to RT, 2h. **c)** 3eq K₂CO₃, MeOH-H₂O 3:1, Δ υπό επαναροή, 1h. **d)** LiAlH₄, Et₂O/βενζόλιο, 0°C -θ.δ., 15min. **e)** (RCO)₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C-θ.δ., 25min.

Κατ' ανάλογο τρόπο με την Σειρά D, στο πρώτο στάδιο αυτής της συνθετικής πορείας, λαμβάνει χώρα η προστασία του ινδολικού αζώτου του 3-ινδολοακετονιτριλίου με *di-tert-butyl dicarbonate* (BOC). Το προστατευμένο ινδολο-ακετονιτρίλιο **48**, διμεθυλιώνεται σε α -θέση ως προς την κυανομάδα του παραγώγου **55**, με επίδραση περίσσειας ιωδομεθανίου. Η αποπροστασία του *N*-BOC παραγώγου **56** πραγματοποιήθηκε, υπό αλκαλικές συνθήκες, όπως και στην Σειρά D. Τέλος, το παράγωγο **56** ανάγεται με λιθιοαργιλοϋδρίδιο σε διάλυμα διαιθυλαιθέρα/βενζολίου, προς την αμίνη **57**, η οποία χωρίς περαιτέρω κατεργασία αντιδρά με τους κατάλληλους ανυδρίτες, προς τα επιθυμητά αμίδια **58-60**.

4. Πειραματικό Μέρος

4.1. Υλικά και Μέθοδοι

Τα φάσματα πρωτονίου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H NMR) ελήφθησαν σε φασματογράφο Bruker DRX 400 (400 MHz). Τα φάσματα ^{13}C Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^{13}C NMR) ελήφθησαν σε φασματογράφο Bruker AC 200 (200 MHz). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων (δ) μετρήθηκαν με βάση το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS), ως εσωτερικό πρότυπο. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), ή δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο. Τα φάσματα μάζης ελήφθησαν σε φασματόμετρο μαζών Thermoquest Finnigan AQA με γραμμικό τετραπολικό αναλυτή και ο ιονισμός έγινε με την τεχνική της ηλεκτροδιάχυσης (ESI).

Τα σημεία τήξης των ενώσεων ελήφθησαν σε συσκευή Gallenkamp Sanyo και δεν είναι διορθωμένα.

Η ξήρανση του διαιθυλαιθέρα και του τετραϋδροφουρανίου (THF) έγινε με λιθιοαργιλιούδριδιο.

Το υδρίδιο του νατρίου (NaH), 60% διασπαρμένο σε παραφινέλαιο, χρησιμοποιήθηκε μετά από έκπλυση με κυκλοεξάνιο (2 x 1ml).

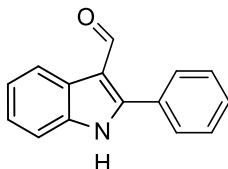
Για τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες Merck F₂₅₄ (Art. 5554), ενώ για τη χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιήθηκε silica gel (200-400 mesh).

Συντομογραφίες ξένων όρων

Φασματοσκοπία ^1H NMR: **s**: singlet, **bs**: broadsinglet, **d**: doublet, **dd**: doublet of doublet, **t**: triplet, **q**: quartet, **m**: multiplet, **H_{αρωμ.}**: αρωματικό πρωτόνιο, **J**: σταθερά σύζευξης.

4.2. Σειρά A: Σύνθεση των αναλόγων 32, 33 και 34

4.2.1. Σύνθεση της 2-φαινυλ-1H-ινδολοκαρβοξαλδεΐδης (29)

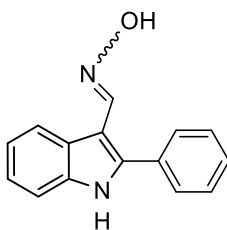


Διάλυμα του 2-φαινυλοϊνδολίου 95% (10mmol, 2,03g) σε DMF (6,5mmol, 5mL) μεταφέρεται σε flame-dried σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα Ar. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη POCl₃ (12mmol, 1,12mL), στους 0°C, και το μίγμα θερμαίνεται για 2h στους 50°C. Αφού το μίγμα φθάσει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται H₂O στους 0°C. Το μίγμα στη συνέχεια, μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως, όπου και αλκαλοποιείται σε pH= 8 έως 9 με NaOH (10%) και θερμαίνεται στους 65°C, για 1h, ώστε να ολοκληρωθεί η υδρόλυση. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό, μετά από διήθηση υπό κενό και πλύσεις με νερό και κυκλοεξάνιο, ως λευκό στερεό.

Απόδοση: 2,12g, 96%

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H NMR συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας ⁹⁴

4.2.2. Σύνθεση της οξίμης της 2-φαινυλ-1H-ινδολοκαρβοξαλδεΐδης (30)

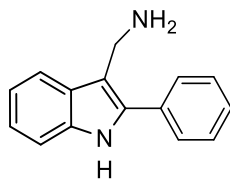


Σε μίγμα της 2-φαινυλ-1H-ινδολο-3-καρβοξαλδεΐδης (**29**) (1mmol, 0,221g) και υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (2mmol, 0,134g) σε αιθανόλη και νερό (4mL, 1:1), προστίθεται οξικό νάτριο (2,8mmol, 0,23g). Η αντίδραση θερμαίνεται επί 1h στους 65 °C, υπό κάθετο ψυκτήρα. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη, εκχυλίσεις με Et₂O/νερό και ξήρανση υπεράνω Na₂SO₄. Ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, οπότε παραλαμβάνεται το καθαρό προϊόν, ως λευκό στερεό.

Απόδοση: 215mg, 91%

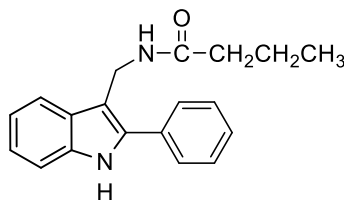
¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.74 (s, NH, 1H), 10.70 (s, NOH, 1H), 8.24 (s, CHNOH, 1H), 8.06 (d, J = 7.9 Hz, H₄, 1H), 7.61 – 7.52 (m, H_{αρωμ.}, 4H), 7.49 – 7.39 (m, H_{αρωμ.}, 2H), 7.22 – 7.08 (m, H_{αρωμ.}, 2H).

4.2.3. Σύνθεση της (2-φαινυλ-1H-ινδολ-3-υλο)μεθαναμίνης (31)



Σε διάλυμα της οξίμης της 2-φαινυλ-1H-ινδολο-3-καρβοξαλδεύδης (**30**) (0,93mmol, 0,20g) σε μεθανόλη και οξικό αιθυλεστέρα (6mL, 1:1) προστίθεται καταλύτης Pd/C, 10% (0,096g) . Το σύστημα ανακινείται υπό ατμόσφαιρα H₂ και υπό πίεση 4 atm για 6h. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και διηθείται από γη διατόμων υπό κενό. Ο διαλύτης εξατμίζεται και η προκύπτουσα αμίνη χρησιμοποιείται απευθείας στο επόμενο στάδιο, χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

4.2.4. Σύνθεση του N-2-φαινυλ-1H-ινδολ-3-υλομεθυλοβουτυραμίδιου (32)



Σε διάλυμα της αμίνης **31** (0,64 mmol, 0,143g) σε 3,5mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0,75mmol, 0,10mL), στους 0°C. Το μίγμα αναδεύεται σε αυτή τη θερμοκρασία για 10 min και διατηρώντας την ίδια θερμοκρασία πραγματοποιείται, στάγδην, προσθήκη του βουτυρικού ανυδρίτη (0,86mmol, 0,14mL). Η αντίδραση αναδεύεται για 25min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως προστίθεται νερό και το μίγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στοιβάδα πλένεται με υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό, μετά από καθαρισμό από στήλη διαχωρισμού με βαθμιδωτή έκλυση CH₂Cl₂, 20% EtOAc και κρυστάλλωση με EtOAc/Et₂O.

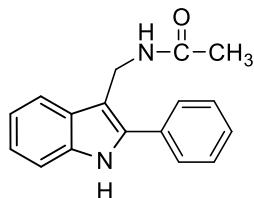
Απόδοση (2 σταδίων): 64mg, 34%

¹H NMR(400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.30 (bs, NH, 1H), 7.68 – 7.62 (m, H₄, 1H), 7.57 – 7.46 (m, H_{αρωμ.} 4H), 7.42 (ddd, *J* = 7.5, 2.2, 1.0 Hz, H_{αρωμ.} 1H), 7.29 – 7.15 (m, H_{αρωμ.}, 3H), 5.54 (s, NHCO, 1H), 4.74 (d, *J* = 4.6 Hz, CH₂NHCO, 2H), 2.14 (t, *J* = 7.5 Hz, COCH₂CH₂CH₃ 2H), 1.66 (dt, *J* = 15.1, 7.5 Hz, COCH₂CH₂CH₃, 2H), 0.93 (t, *J* = 7.3 Hz, COCH₂CH₂CH₃, 3H).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 172.78, 136.39, 135.79, 131.98, 129.09, 128.42, 128.31, 128.05, 122.87, 120.36, 119.00, 111.00, 108.73, 38.67, 34.60, 19.20, 13.76.

Σ.Τ.: 155 – 156°C

4.2.5. Σύνθεση του N-2-φαινυλ-1H-ινδολ-3-υλομεθυλακεταμιδίου (33)



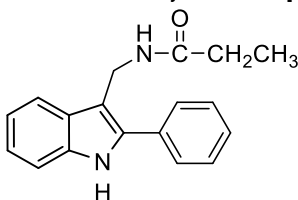
Διάλυμα της οξίμης της 2-φαινυλ-1H-ινδολοκαρβοξαλδεϋδης (**30**) (1,69mmol, 0,40g) σε μεθανόλη (1,4mL) αναδέυεται σε θερμοκρασία δωματίου με Raney-Nikel (55% του υποστρώματος). Το μίγμα θερμαίνεται στους 55- 60 °C και ακολουθεί στάγδην προσθήκη διαλύματος NaBH₄ (5,73mmol, 0,217g) σε 4mL NaOH 5.0M υπό πολύ έντονη ανάδευση. Μετά την προσθήκη, το μίγμα αφήνεται να φθάσει σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί προσθήκη του οξικού ανυδρίτη (3,6mmol, 0,33mL). Η αντίδραση αναδεύεται σε θ.δ για 3h. Το μίγμα διηθείται μέσω γης διατόμων ώστε να απομακρυνθεί ο καταλύτης, συμπυκνώνεται στο μισό όγκο, υπό κενό, και ακολουθώς οξινίζεται με HCl 1M, έως pH=2. Το διάλυμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα, οι συνενωμένες οργανικές στοιβάδες πλένονται με νερό και υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό ως λευκό στερεό, μετά από trituration με αιθέρα, στήλη χρωματογραφίας DCM 8% EtOAc, και κρυστάλλωση με κυκλοεξάνιο/EtOAc.

Απόδοση: 220mg, 47%

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.45 (bs, NH, 1H), 7.65 (d, *J* = 7.9 Hz, H₄, 1H), 7.56 – 7.45 (m, H_{αρωμ.}, 3H), 7.42 (dd, *J* = 7.7, 2.6 Hz, H_{αρωμ.}, 2H), 7.29 – 7.15 (m, H_{αρωμ.}, 2H), 5.62 (s, NHCO, 1H), 4.72 (d, *J* = 4.7 Hz, CH₂NHCO, 2H), 1.97 (s, NHCOCH₃, 3H).

Σ.Τ.: 167-168 °C

4.2.6. Σύνθεση του N-2-φαινυλ-1H-ινδολ-3-υλομεθυλοπροπαναμιδίου (34)



Το προπαναμίδιο **34** παρασκευάσθηκε μέσω της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την σύνθεση του ακεταμιδίου **33**.

Απόδοση: 248mg, 56%

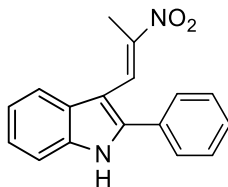
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.34 (bs, NH, 1H), 7.65 (d, *J* = 7.9 Hz, H₄, 1H), 7.57 – 7.47 (m, H_{αρωμ.}, 4H), 7.44 – 7.39 (m, H_{αρωμ.}, 2H), 7.29 – 7.16 (m, H_{αρωμ.}, 2H), 5.54 (s, NHCO, 1H), 4.74 (d, *J* = 4.7 Hz, CH₂NHCO, 2H), 2.20 (q, *J* = 7.6 Hz, NHCOCH₂CH₃, 2H), 1.15 (t, *J* = 7.6 Hz, NHCOCH₂CH₃, 3H).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 173.60, 136.41, 135.82, 132.02, 129.06, 128.41, 128.28, 128.08, 122.83, 120.32, 118.98, 111.05, 108.66, 34.67, 29.68, 9.91.

Σ.Τ.: 212 °C

4.3. Σειρά Β: Σύνθεση των αναλόγων 37, 38 και 39

4.3.1. Σύνθεση του (E)-3-(2-νιτροπροπ-1-εν-1-υλο)-2-φαινυλ-1H-ινδολίου (35)

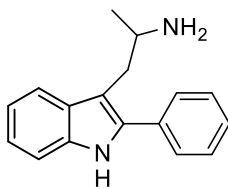


Μίγμα αποτελούμενο από 2-φαινυλ-1H-ινδολοκαρβοξαλδεΰδη (6,8mmol, 1,5g) και οξικό αμμώνιο (22mmol, 1,7g) σε νιτροαιθάνιο (32,3mmol, 2,3mL), θερμαίνεται υπό επαναροή για 6,5h. Αφού φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το υπόλειμμα διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο και πλένεται με νερό. Η υδατική φάση εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο, οι οργανικές φάσεις συγκεντρώνονται, πλένονται με υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα κατεργάζεται με μία μικρή ποσότητα *n*-πεντανίου (trituration). Ακολουθεί στήλη διαχωρισμού, βαθμιδωτής έκλουσης *n*-εξανίου/18% EtOAc/4% PhCH₃, και κρυστάλλωση με Et₂O. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται ως πορτοκαλί στερεό .

Απόδοση: 0,88g, 47%

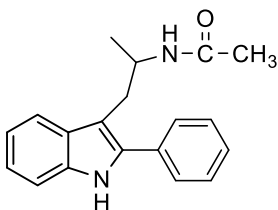
¹H NMR: (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.70 (bs, NH, 1H), 8.35 (s, H₄, 1H), 7.61 – 7.42 (m, H_{αρωμ.}, 7H), 7.29 (dt, J = 22.2, 7.1 Hz, H_{αρωμ.}, 2H), 2.25 (s, CH₃, 3H).

4.3.2. Σύνθεση της 1(2-φαινυλ-1H-ινδολ-3-υλο)προπαν-2-αμίνης (36)



Σε αναδευόμενο εναιώρημα λιθιοαργιλοϋδριδίου (14mmol, 0,532g), σε άνυδρο THF (15mL), προστίθεται στάγδην διάλυμα του νιτροπαραγώγου **35** (2,7mmol, 0,750g) σε THF (15mL), σε θερμοκρασία 0°C. Το μίγμα αφήνεται να φθάσει σε θερμοκρασία δωματίου, όπου και αναδεύεται για 15min. Ακολουθεί ψύξη στους 0°C και προσεκτική προσθήκη H₂O. Το μίγμα, στη συνέχεια, αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα, διηθείται από γη διατόμων (Celite) και ξηραίνεται με Na₂SO₄. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό, οπότε προκύπτει η επιθυμητή αμίνη, η οποία χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

4.3.3. Σύνθεση του N-[1-(2-φαινυλ-1H-ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλ]ακεταμίδιου (37)



Το ακεταμίδιο **37** παρασκευάστηκε μέσω της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του βουτυραμίδιου **32**, χρησιμοποιώντας οξικό ανυδρίτη.

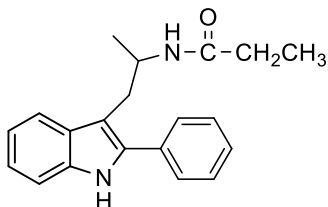
Απόδοση (2 σταδίων): 270mg, 34%

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.17 (bs, *NH*, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.9 Hz, *H*₄, 1H), 7.62 – 7.58 (m, *H*_{αρωμ.}, 2H), 7.49 (dd, *J* = 8.4, 6.8 Hz, *H*_{αρωμ.}, 2H), 7.39 (dddd, *J* = 8.7, 3.9, 2.8, 1.3 Hz, *H*_{αρωμ.}, 2H), 7.19 (dddd, *J* = 23.8, 8.2, 7.1, 1.2 Hz, *H*_{αρωμ.}, 2H), 5.22 (d, *J* = 8.1 Hz, *NHCO*, 1H), 4.37 – 4.27 (m, *CHCH*₃, 1H), 3.14 (qd, *J* = 14.4, 6.1 Hz, *C*_{3α}*H*₂, 2H), 1.70 (s, *C*_{3β}*CH*₃, 3H), 0.99 (d, *J* = 6.6 Hz, *COCH*₂, 3H).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 169.40, 135.87, 135.67, 133.49, 129.64, 128.99, 128.34, 127.83, 122.30, 119.79, 119.39, 110.91, 109.01, 46.43, 30.61, 23.28, 20.18.

Σ.Τ. : 118 – 120°C

4.3.4. Σύνθεση του N-[1-(2-φαινυλ-1H-ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλο]προπαναμίδιου (38)



Για την παρασκευή του προπαναμίδιου **38**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση του ακεταμίδιου **37** και του βουτυραμίδιου **32**.

Απόδοση (2 σταδίων): 430mg, 52%

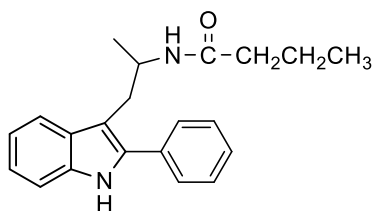
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.12 (bs, *NH*, 1H), 7.73 (d, *J* = 7.8 Hz, *H*₄, 1H), 7.62 – 7.57 (m, *H*_{αρωμ.}, 2H), 7.49 (dd, *J* = 8.4, 6.8 Hz, *H*_{αρωμ.}, 2H), 7.42 – 7.36 (m, *H*_{αρωμ.}, 2H), 7.25 – 7.13 (m, *H*_{αρωμ.}, 2H), 5.21 (d, *J* =

8.0 Hz, *NHCO*, 1H), 4.40 – 4.29 (m, *CHCH*₃, 1H), 3.23 – 3.03 (m, *CH*₂*CHCH*₃, 2H), 1.93 (qd, *J* = 7.6, 5.6 Hz, *COCH*₂*CH*₃, 2H), 1.01 – 0.96 (m, *COCH*₂*CH*₃, *CHCH*₃, 6H).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 172.89, 135.81, 135.58, 133.42, 129.62, 129.00, 128.30, 127.86, 122.37, 119.87, 119.55, 110.78, 109.30, 46.20, 30.79, 29.69, 20.27, 9.62.

Σ.Τ.: 128 – 130 °C

4.3.5 Σύνθεση του *N*-[1-(2-φαινυλ-1*H*-ινδολ-3-υλ)προπαν-2-υλο]βουτυραμίδιου (39)



Για την παρασκευή του βουτυραμίδιου **39**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση του βουτυραμίδιου (**32**).

Απόδοση (2 σταδίων): 487mg, 56%

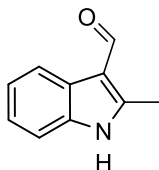
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.30 (bs, *NH*, 1H), 7.74 – 7.70 (m, *H*₄, 1H), 7.61 – 7.56 (m, *H*_{αρωμ.}, 2H), 7.47 (t, *J* = 7.7 Hz, *H*_{αρωμ.}, 2H), 7.40 – 7.35 (m, *H*_{αρωμ.}, 2H), 7.18 (dddd, *J* = 24.4, 8.1, 7.1, 1.2 Hz, *H*_{αρωμ.}, 2H), 5.27 (d, *J* = 8.2 Hz, *NHCO*, 1H), 4.39 – 4.30 (m, *CHCH*₃, 1H), 3.21 – 3.02 (m, *CH*₂*CHCH*₃, 2H), 1.87 (dd, *J* = 8.2, 6.8 Hz, *NHCOCH*₂*CH*₂, 2H), 1.48 (h, *J* = 7.4 Hz, *CH*₂*CH*₂*CH*₃, 2H), 0.99 (d, *J* = 6.6 Hz, *CHCH*₃, 3H), 0.82 (t, *J* = 7.4 Hz, *CH*₂*CH*₂*CH*₃, 3H).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 172.30, 135.95, 135.67, 133.48, 129.58, 128.92, 128.36, 127.75, 122.25, 119.73, 119.44, 110.95, 109.05, 46.28, 38.71, 30.84, 20.32, 18.98, 13.63.

Σ.Τ.: 140 - 141 °C

4.4. Σειρά C: Σύνθεση των αναλόγων 44, 45 και 46

4.4.1. Σύνθεση της 2-μεθυλο-1H-ινδολ-3-καρβοξαλδεΐδης (41)

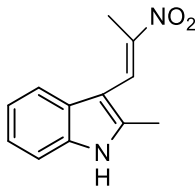


Διάλυμα 2-μεθυλοϊνδολίου (7,62mmol, 1,05g) σε DMF (50mmol, 4mL) μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα Ar. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη POCl₃ (8,46mmol, 0,80mL), στους 0°C, και το μίγμα θερμαίνεται για 2h στους 50°C. Αφού φθάσει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται H₂O στους 0°C, μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως, όπου και αλκαλοποιείται σε pH= 8 έως 9 με NaOH (10%) και το μίγμα θερμαίνεται στους 65°C, για 1h, ώστε να ολοκληρωθεί η υδρόλυση. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό, μετά από διήθηση υπό κενό και πλύσεις με νερό και κυκλοεξάνιο.

Απόδοση: 1,19g, 98%

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας⁹⁸

4.4.2. Σύνθεση του 2-μεθυλο-3-(2-νιτροπροπενυλο)-1H-ινδολίου (42)

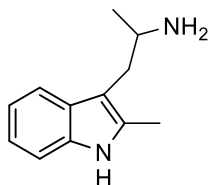


Σε εναιώρημα της 2-μεθυλο-1H-ινδολ-3-καρβοξαλδεΐδης (**41**) (6,3mmol, 1,01g) σε νιτροαιθάνιο (38mmol, 2,7mL) προστίθεται οξικό αμμώνιο (3,8mmol, 0,3g). Το μίγμα βράζεται υπό κάθετο ψυκτήρα για 4 ώρες στους 120-130 °C. Αφού ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ψύχεται περαιτέρω στους 0 °C. Το σχηματιζόμενο ίζημα διηθείται υπό κενό και κρυσταλλώνεται με μεθανόλη, ώστε να προκύψει το επιθυμητό προϊόν ως πορτοκαλί-καφέ στερεό.

Απόδοση: 0,83g, 60%

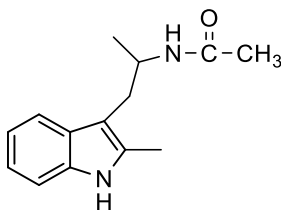
¹H NMR(400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.60 (s, bs, NH, 1H), 8.36 (s, C_{3α}H 1H), 7.49 (d, J = 7.5 Hz, H₄, 1H), 7.37 (d, J = 7.6 Hz, H₇, 1H), 7.25 – 7.18 (m, H_{5,6}2H), 2.50 (s, C_{3β}CH₃, 3H), 2.40 (s, CH₃, 3H).

4.4.3 Σύνθεση της 1-(2-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλο)προπαν-2-αμίνης (43)



Για την παρασκευή της αμίνης **43**, ακολουθήθηκε η πορεία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση της αμίνης **36**.

4.4.4 Σύνθεση του N-1-(2-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλακεταμίδιου (44)



Για την παρασκευή του ακεταμίδιου **44**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση του ακεταμίδιου **37**.

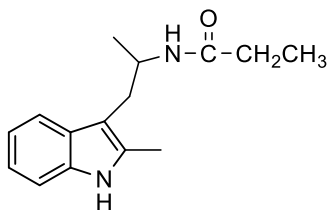
Απόδοση (2 σταδίων): 177mg, 48 %

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.41 (bs, NH, 1H), 7.56 – 7.52 (m, H₄, 1H), 7.25 (dd, $J = 7.3, 1.6$ Hz, H₇, 1H), 7.14 – 7.05 (m, H_{5,6}, 2H), 5.64 (d, $J = 8.3$ Hz, NHCO, 1H), 4.32 (qd, $J = 7.0, 4.3$ Hz, C_{3 β} H₁H), 2.97 – 2.79 (m, C_{3 α} H₂, 2H), 2.36 (s, CH₃, 3H), 1.91 (s, C_{3 α} CH₃, 3H), 1.10 (d, $J = 6.6$ Hz, NHCOCH₃, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (200 MHz, CDCl₃) δ 169.28, 135.24, 132.41, 129.36, 121.07, 119.42, 118.25, 110.19, 107.77, 46.46, 30.53, 23.63, 20.06, 11.96.

Σ.Τ.: 105 - 106°C

4.4.5 Σύνθεση του N-1-(2-φαινυλ-1H-ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλοπροπαναμίδιου (45)



Για την παρασκευή του προπαναμίδιου **45**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση του προπαναμίδιου **38**,

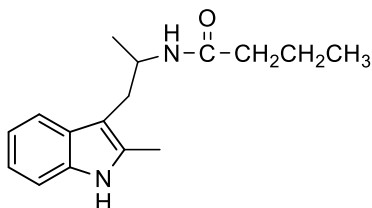
Απόδοση (2 σταδίων): 234mg, 48%

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.18 (bs, *NH*, 1H), 7.59 – 7.51 (m, *H*₄, 1H), 7.27 (dd, *J* = 6.7, 2.1 Hz, *H*₇, 1H), 7.16 – 7.04 (m, *H*_{5,6}, 2H), 5.47 (d, *J* = 8.2 Hz, *NHCO*, 1H), 4.33 (qd, *J* = 7.1, 4.3 Hz, *C*_{3β}*H*, 1H), 3.00 – 2.77 (m, *C*_{3α}*H*₂, 2H), 2.39 (s, *CH*₃, 3H), 2.14 (q, *J* = 7.6 Hz, *NHCOCH*₂*CH*₃, 2H), 1.17 – 1.08 (m, *C*_{3α}*CH*₃, *NHCOCH*₂*CH*₃, 6H).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 173.10, 135.31, 132.52, 129.33, 120.94, 119.28, 118.22, 110.28, 107.69, 46.38, 30.65, 29.93, 20.12, 11.92, 9.74.

Σ.Τ.: 114 - 115°C

4.4.6 Σύνθεση του N-1-(2-φαινυλ-1H-ινδολ-3-υλο)προπαν-2-υλοβουτυραμίδιου (46)



Για την παρασκευή του βουτυραμίδιου **46**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση των βουτυραμίδιων **32** και **39**.

Απόδοση (2 σταδίων): 267mg, 52%

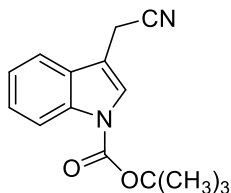
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.13 (bs, *NH*, 1H), 7.56 (dd, *J* = 7.2, 1.6 Hz, *H*₄, 1H), 7.27 (dd, *J* = 6.9, 1.9 Hz, *H*₇, 1H), 7.16 – 7.03 (m, *H*_{5,6}, 2H), 5.46 (d, *J* = 8.2 Hz, *NHCO*, 1H), 4.33 (qd, *J* = 7.2, 4.3 Hz, *C*_{3β}*H*, 1H), 3.00 – 2.77 (m, *C*_{3α}*H*₂, 2H), 2.39 (s, *CH*₃, 3H), 2.08 (td, *J* = 7.4, 3.0 Hz, *CH*₂*CH*₂*CH*₃, 2H), 1.63 (h, *J* = 7.4 Hz, *CH*₂*CH*₂*CH*₃, 2H), 1.11 (d, *J* = 6.7 Hz, *C*_{3α}*CH*₃, 3H), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, *CH*₂*CH*₂*CH*₃, 3H).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 173.00, 135.27, 132.42, 129.33, 120.99, 119.33, 118.25, 110.22, 107.80, 46.33, 38.95, 30.73, 29.93, 20.18, 13.70, 9.72.

Σ.Τ.: 108 - 109°C

4.5 Σειρά D: Σύνθεση των αναλόγων 52, 53 και 54

4.5.1 Σύνθεση του *tert*-βουτυλο-3-(κυανομεθυλο)-1*H*-ινδολο-1-καρβοξυλικού εστέρα (48)

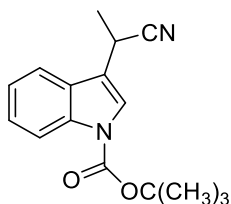


Σε αναδευόμενο διάλυμα του 2-(1*H*-ινδολ-3-υλο)ακετονιτριλίου (6,4mmol, 1g) σε 12mL CH₂Cl₂ προστίθεται DMAP (8,35mmol, 1,02g) και BOC₂O (10,4mmol, 2,27g). Η αντίδραση αναδεύεται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη, αραίωση με EtOAc και πλύσεις με οξικό οξύ και υδατικό διάλυμα NaHCO₃. Οι συνενωμένες οργανικές στοιβάδες ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης *n*-εξανίου/Et₂O 1:1, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό το προϊόν.

Απόδοση: 1g, 78%

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.18 (bd, *J* = 8.2 Hz, *H*₂, 1H), 7.65 (s, *H*₄, 1H), 7.53 (dt, *J* = 7.7, 1.0 Hz, *H*₇, 1H), 7.39 (ddd, *J* = 8.4, 7.2, 1.3 Hz, *H*₅, 1H), 7.30 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, *H*₆, 1H), 3.78 (d, *J* = 1.3 Hz, CH₂CN, 2H), 1.68 (d, *J* = 1.9 Hz, C(CH₃)₃, 9H).

4.5.2 Σύνθεση του *tert*-βουτυλ-3-(1-κυανοαιθυλο)-1*H*-ινδολο-1-καρβοξυλικού εστέρα (49)

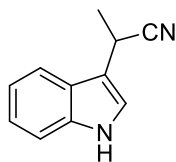


Σε αναδευόμενο διάλυμα του *tert*-βουτυλο-3-(1-κυανοαιθυλο)-1*H*-ινδολο-1-καρβοξυλικού εστέρα (48) (3,9mmol, 1g) σε 4mL άνυδρου THF, στους -78°C, προστίθεται στάγδην διάλυμα LiHMDS 1.0M σε THF (3,07mmol, 3,07mL). Η αντίδραση αναδεύεται για 40min στους -78°C. Ακολουθως προστίθεται απευθείας όλη η ποσότητα του CH₃I (4,02mmol, 0,25mL). Το μίγμα αναδεύεται σε θ.δ. για 15 ώρες, υδρολύεται με HCl (0,2N) και εκχυλίζεται με Et₂O. Η οργανική στοιβάδα πλένεται με υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης 5-8% EtOAc σε *n*-εξάνιο οπότε λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως κίτρινο έλαιο.

Απόδοση: 0,55g, 52%

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.18 (bd, $J = 8.3$ Hz, H_2 , 1H), 7.61 (d, $J = 8.6$ Hz, $H_{4,7}$, 2H), 7.41 – 7.24 (m, $H_{5,6}$, 2H), 4.15 – 4.07 (m, CH_2CN , 1H), 1.76 (d, $J = 7.2$ Hz, $\text{C}_{3\alpha}\text{CH}_3$ 3H), 1.69 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 9H).

4.5.3 Σύνθεση του 2-1H-ινδολ-3-υλοπροπανονιτριλίου (50)

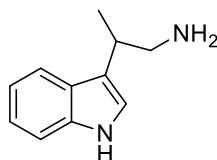


Μίγμα K_2CO_3 (5,88mmol, 0,813g), *N*-BOC-νιτριλίου (1,96mmol, 0,530g), σε MeOH- H_2O (3:1, 52mL), θερμαίνεται υπό επαναρροή, για 1h. Στη συνέχεια, η μεθανόλη εξατμίζεται υπό κενό και το εναπομείναν διάλυμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, πλένονται με υδατικό διάλυμα NaCl έως pH=7, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται μετά από καθαρισμό με χρωματογραφική στήλη, βαθμιδωτής έκλουσης 25-50% Et_2O σε *n*-εξάνιο ⁹⁷.

Απόδοση: 0,267g, 80%

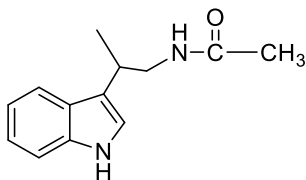
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.27 (bs, *NH*, 1H), 7.68 (dq, $J = 7.9, 1.0$ Hz, H_4 , 1H), 7.41 (dt, $J = 8.1, 1.0$ Hz, H_7 , 1H), 7.27 (ddd, $J = 8.2, 6.2, 1.3$ Hz, $H_{\text{αρωμ.}}$, 1H), 7.23 – 7.16 (m, $H_{\text{αρωμ.}}$, 2H), 4.18 (qt, $J = 7.1, 1.5$ Hz, CH_2CN , 1H), 1.76 (d, $\text{C}_{3\alpha}\text{CH}_3$ 3H).

4.5.4 Σύνθεση της 2-1H-ινδολ-3-υλοπροπαν-1-αμίνης (51)



Σε εναιώρημα LAH (4,69mmol, 0,178g) σε 7mL άνυδρου διαιθυλαιθέρα, προστίθεται στάγδην διάλυμα 2-(1H-ινδολο-3-υλο)προπανενιτριλίου (**50**) (1,57mmol, 0,267g) σε 3mL άνυδρου βενζολίου, στους 0 °C. Το μίγμα αφήνεται να φθάσει σε θερμοκρασία δωματίου, όπου και αναδεύεται για 15min. Ακολουθεί ψύξη στους 0°C και προσεκτική προσθήκη H_2O . Το μίγμα, στη συνέχεια, αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα, διηθείται από γη διατόμων (Celite) και ξηραίνεται υπεράνω Na_2SO_4 . Ακολουθεί η εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό, οπότε προκύπτει η επιθυμητή αμίνη, η οποία χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

4.5.5 Σύνθεση του N-2-1H-ινδολ-3-υλοπροπυλακεταμιδίου (52)



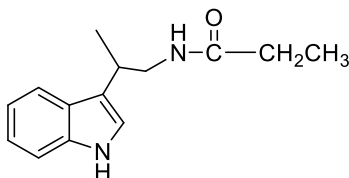
Για την παρασκευή του ακεταμιδίου **52**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση των ακεταμιδίων **37** και **44**.

Απόδοση (2 σταδίων): 59mg, 55%

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.40 (bs, *NH*, 1H), 7.66 (d, $J = 7.9$ Hz, H_4 , 1H), 7.39 (d, $J = 8.1$ Hz, H_7 , 1H), 7.25 – 7.10 (m, $H_{5,6}$, 2H), 7.03 (s, H_2 , 1H), 5.51 (s, *NHCO*, 1H), 3.74 – 3.26 (m, $C_{3\alpha}\text{H}$, $C_{3\beta}\text{H}_2$, 3H), 1.89 (s, *NHCOCH}_3*, 3H), 1.38 (d, $J = 7.0$ Hz, $C_{3\alpha}\text{CH}_3$, 3H).

Σ.Τ.: 25°C

4.5.6 Σύνθεση του N-2-1H-ινδολ-3-υλοπροπυλοπροπαναμιδίου (53)



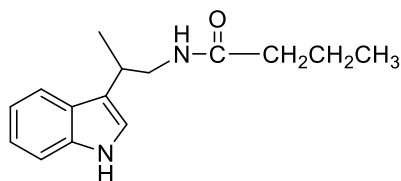
Για την παρασκευή του προπαναμιδίου **53**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση του προπαναμιδίου **38** και **45**.

Απόδοση (2 σταδίων): 67mg, 59%

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.14 (bs, *NH*, 1H), 7.67 (dt, $J = 8.0, 1.0$ Hz, H_4 , 1H), 7.40 (dt, $J = 8.1, 1.0$ Hz, H_7 , 1H), 7.22 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.2$ Hz, H_5 , 1H), 7.13 (ddd, $J = 8.1, 7.0, 1.1$ Hz, H_6 , 1H), 7.04 (d, $J = 2.4$ Hz, H_2 , 1H), 5.41 (s, *NHCO*, 1H), 3.66 (ddd, $J = 12.6, 6.7, 5.8$ Hz, $C_{3\beta}\text{H}_2$, 1H), 3.47 (ddd, $J = 13.2, 8.1, 5.2$ Hz, $C_{3\beta}\text{H}_2$, 1H), 3.33 – 3.27 (m, $C_{3\alpha}\text{H}$, 1H), 2.10 (q, $J = 7.6$ Hz, *NHCOCH}_2\text{CH}_3*, 2H), 1.38 (d, $J = 7.0$ Hz, $C_{3\alpha}\text{CH}_3$, 3H), 1.08 (t, $J = 7.6$ Hz, *NHCOCH}_2\text{CH}_3*, 3H).

Σ.Τ.: 102 – 103 °C

4.5.7 Σύνθεση του N-2-1-1H-ινδολο-3-υλοπροπυλοβουτυραμιδίου (54)



Για την παρασκευή του βουτυραμιδίου **54**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση των αντίστοιχων βουτυραμιδίων **32**, **39** και **46**.

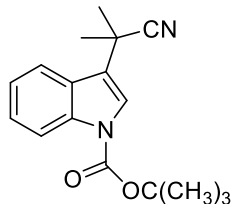
Απόδοση (2 σταδίων): 68mg, 56%

¹H NMR(400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.18 (bs, NH, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.9 Hz, *H*₄, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.1 Hz, *H*₇, 1H), 7.25 – 7.20 (m, *H*₅, 1H), 7.16 – 7.11 (m, *H*₆, 1H), 7.04 (d, *J* = 2.4 Hz, *H*₂, 1H), 5.42 (s, NHCO, 1H), 3.70 – 3.62 (m, *C*_{3β}*H*₂, 1H), 3.53 – 3.45 (m, *C*_{3β}*H*₂, 1H), 3.30 (q, *J* = 6.97, 6.97, 6.95 Hz, *C*_{3α}*H*, 1H), 2.05 (t, NHCOCH₂CH₂CH₃, 2H), 1.59 (h, *J* = 7.4 Hz, NHCOCH₂CH₂CH₃, 2H), 1.38 (d, *J* = 7.0 Hz, *C*_{3α}CH₃, 3H), 0.89 (t, *J* = 7.4 Hz, NHCOCH₂CH₂CH₃, 3H).

Σ.Τ.: 114°C

4.6 Σειρά E: Σύνθεση αναλόγων 58, 59 και 60

4.6.1. Σύνθεση του tert-βουτυλο-3-(2-κυανοπροπαν-2-υλ)-1H-ινδολοκαρβοξυλικού εστέρα (55)

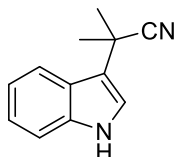


Σε εναιώρημα υδριδίου του νατρίου (60%) (7,68mmol, 0,310g) σε 5mL άνυδρου DMF, στους 0°C προστίθεται στάγδην, διάλυμα του tert-βουτυλο-3-(κυανομεθυλο)-1H-ινδολο-1-καρβοξυλικού εστέρα (2,3mmol, 0,6g) και μεθυλοϊωδίδιο (5,87 mmol, 0,37mL) σε 7mL DMF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες. Ακολουθεί προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου μέχρι να μην παρατηρείται αφρισμός και εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης βαθμιδωτής έκλουσης 10-20% Et₂O σε *n*-εξάνιο, οπότε παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο έλαιο.

Απόδοση: 0,375g, 56%

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.18 (d, $J = 8.2$ Hz, H_4 , 1H), 7.85 – 7.80 (m, H_7 , 1H), 7.53 (s, H_2 , 1H), 7.40 – 7.28 (m, $H_{5,6}$, 2H), 1.85 (s, $C_{3\alpha}(\text{CH}_3)_2$, 6H), 1.69 (s, $C(\text{CH}_3)_3$, 9H).

4.6.2. Σύνθεση του 2-(1H-ινδολ-3-υλο)-2-μεθυλοπροπανονιτριλίου (56)

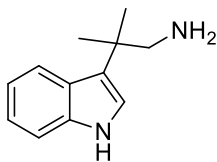


Για την αποπροστασία του νιτριλίου **56**, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την αποπροστασία του νιτριλίου **50**.

Απόδοση: 0,235g, 94%

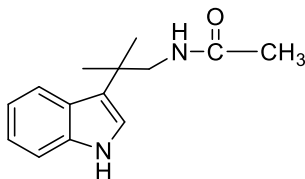
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.13 (bs, NH , 1H), 7.87 – 7.83 (m, H_4 , 1H), 7.41 (dt, $J = 8.2, 1.0$ Hz, H_7 , 1H), 7.28 – 7.23 (m, H_5 , 1H), 7.23 – 7.17 (m, H_6 , 1H), 7.15 (d, $J = 2.6$ Hz, H_2 , 1H), 1.87 (s, $C_{3\alpha}(\text{CH}_3)_2$, 6H).

4.6.3. Σύνθεση της 2-(1H-ινδολ-3-υλο)-2-μεθυλοπροπαν-1-αμίνης (57)



Για την παρασκευή της αμίνης **57**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση της αμίνης **51**.

4.6.4. Σύνθεση του N-2-(1H-ινδολ-3-υλο)-2-μεθυλοπροπυλακεταμιδίου (58)



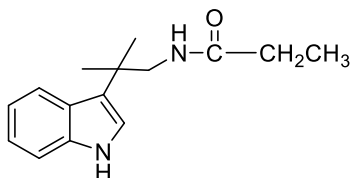
Για την παρασκευή του ακεταμιδίου **58**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση του αντίστοιχου ακεταμιδίου **52**.

Απόδοση (2 σταδίων): 55mg, 63%

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.43 (bs, *NH*, 1H), 7.78 (d, $J = 8.1$ Hz, H_4 , 1H), 7.44 – 7.38 (m, H_7 , 1H), 7.22 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.1$ Hz, H_5 , 1H), 7.12 (ddd, $J = 8.1, 7.0, 1.7$ Hz, H_6 , 1H), 7.02 (d, $J = 2.4$ Hz, H_2 , 1H), 5.22 (s, *NHCO*, 1H), 3.67 (dd, $J = 6.0, 2.1$ Hz, $C_{3\beta}H_2$ 2H), 1.86 (s, *NHCOCH*₃, 3H), 1.45 (s, $C_{3\alpha}(CH_3)_2$, 6H).

Σ.Τ.: 152°C

4.6.5. Σύνθεση του N-2-(1H-ινδολ-3-υλο)-2-μεθυλοπροπυλοπροπαναμιδίου (59)



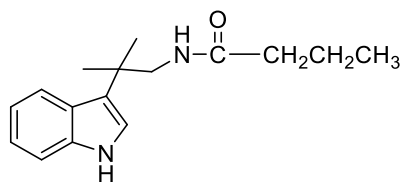
Για την παρασκευή του προπαναμιδίου **59**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση του αντίστοιχου προπαναμιδίου **53**.

Απόδοση (2 σταδίων): 71mg, 55%

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.10 (bs, *NH*, 1H), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, H_4 , 1H), 7.44 – 7.39 (m, H_7 , 1H), 7.22 (dd, $J = 8.2, 7.0$ Hz, H_5 , 1H), 7.16 – 7.09 (m, H_6 , 1H), 7.02 (dd, $J = 2.5, 1.0$ Hz, H_2 , 1H), 5.14 (s, *NHCO*, 1H), 3.70 – 3.62 (m, $C_{3\beta}H_2$, 2H), 2.11 – 2.03 (q, *NHCOCH*₂*CH*₃, 2H), 1.44 (s, $C_{3\alpha}(CH_3)_2$, 6H), 1.06 (t, $J = 7.6$ Hz, *NHCOCH*₂*CH*₃, 3H).

Σ.Τ.: 159°C

4.6.6. Σύνθεση του N-2-(1H-ινδολ-3-υλο)-2-μεθυλοπροπυλοβουτυραμιδίου (60)



Για την παρασκευή του βουτυραμιδίου **60**, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε για τη σύνθεση του αντίστοιχου βουτυραμιδίου **54**.

Απόδοση (2 σταδίων): 87mg, 64%

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.22 (bs, *NH*, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.1Hz, *H*₄, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.1Hz, *H*₇, 1H), 7.22 (t, *J* = 7.6 Hz, *H*₅, 1H), 7.12 (t, *J* = 7.5 Hz, *H*₆, 1H), 7.02 (d, *J* = 2.5 Hz, *H*₂, 1H), 5.16 (s, *NHCO*, 1H), 3.67 (d, *J* = 6.0 Hz, *C*_{3β}*H*₂, 2H), 2.02 (t, *J* = 7.5 Hz, *NHCOCH*₂*CH*₂*CH*₃, 2H), 1.56 (h, *J* = 7.4 Hz, *NHCOCH*₂*CH*₂*CH*₃, 2H), 1.44 (s, *C*_{3α}(*CH*₃)₂, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, *NHCOCH*₂*CH*₂*CH*₃, 3H).

Σ.Τ.: 162°C

5. Φαρμακολογική Αξιολόγηση

5.1. Μελέτες πρόσδεσης έναντι της 2-[¹²⁵I]-Ιωδομελατονίνης

Οι μελέτες πρόσδεσης, όπως και τα πειράματα μέτρησης του GTP (GTP Shift assay) πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο, που περιγράφεται αναλυτικά από την Poronska-Gorenski¹⁰⁰. Περιληπτικά, τα κύτταρα τύπου CHO (Chinese Hamster Ovarian cells) που εκφράζουν τους ανθρώπινους υποδοχείς MT₁ και MT₂, αναπτύχθηκαν ως μονοστοιβάδες σε θρεπτικό μέσο Hem's F12 που περιείχε 10% ορό εμβρυικού μόσχου, 1% πενικιλίνη (10,000 IU/mL)/στρεπτομυκίνη (10,000 µg/mL) σε 5% CO₂ στους 37 °C, όπου επώαστηκαν για 4 ημέρες, μέχρι συγκεντρώσεως 90-95%. Στη συνέχεια οι κυτταρικές σειρές CHO-hMT₁ και CHO-hMT₂ εκπλύθηκαν με PBS υπό ψύξη και μεταφέρθηκαν σε buffer φωσφορικού καλίου (10 mM pH 7,4) που περιείχε σουκρόζη, 0,25 M και EDTA, 1 mM. Τέλος, έλαβε χώρα φυγοκέντριση (4000 rpm, 5 min), όπου τα διαμορφωθέντα κύτταρα απομονώθηκαν ως εναιώρημα και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Τα κύτταρα αυτά, επαναδιαλύθηκαν σε 50mM Tris-HCl (pH 7.4; 10mM MgCl₂), ομογενοποιήθηκαν και εκπλύθηκαν με φυγοκέντριση (20,000–30,000g). Οι αντιδράσεις πρόσδεσης της 2-[¹²⁵I]-ιωδομελατονίνης εκκινούν με την προσθήκη των κυτταρικών μεμβρανών (5-15 µg protein/assay) σε σωληνάρια που περιέχουν το buffer πρόσδεσης (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM MgCl₂), μαζί με 2-[¹²⁵I]-ιωδομελατονίνη (~100 pM). Ακολουθεί επώαση των κυττάρων (25°C για 1h) απουσία (controls) και παρουσία των προς έλεγχο ενώσεων (20 µL, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 10 pM έως 100 µM). Οι αντιδράσεις τερματίζονται με διήθηση υπό κενό, μέσω φίλτρων από μικροΐνες υάλου, προεμποτισμένες με 0,5% πολυαιθυλαμίνη. Τα φίλτρα εκπλένονται εις διπλούν και μετράται η γ-ακτινοβολία, μέσω γ-counter.

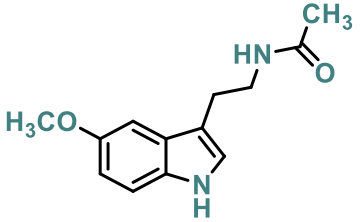
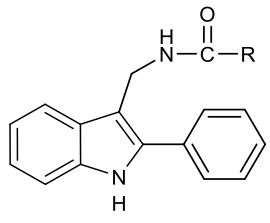
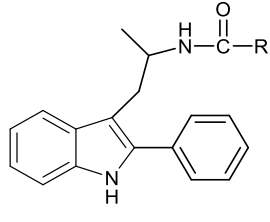
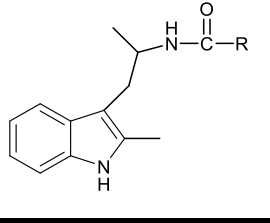
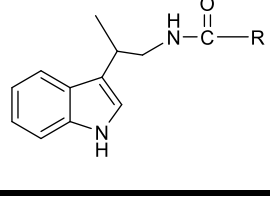
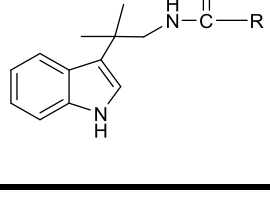
Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν με χρήση του λογισμικού Graph Pad Prism 7™ σύμφωνα με την εξίσωση Cheng-Prusoff. Τα παρακάτω αποτελέσματα εκφράζονται μέσω της εξίσωσης:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}}$$

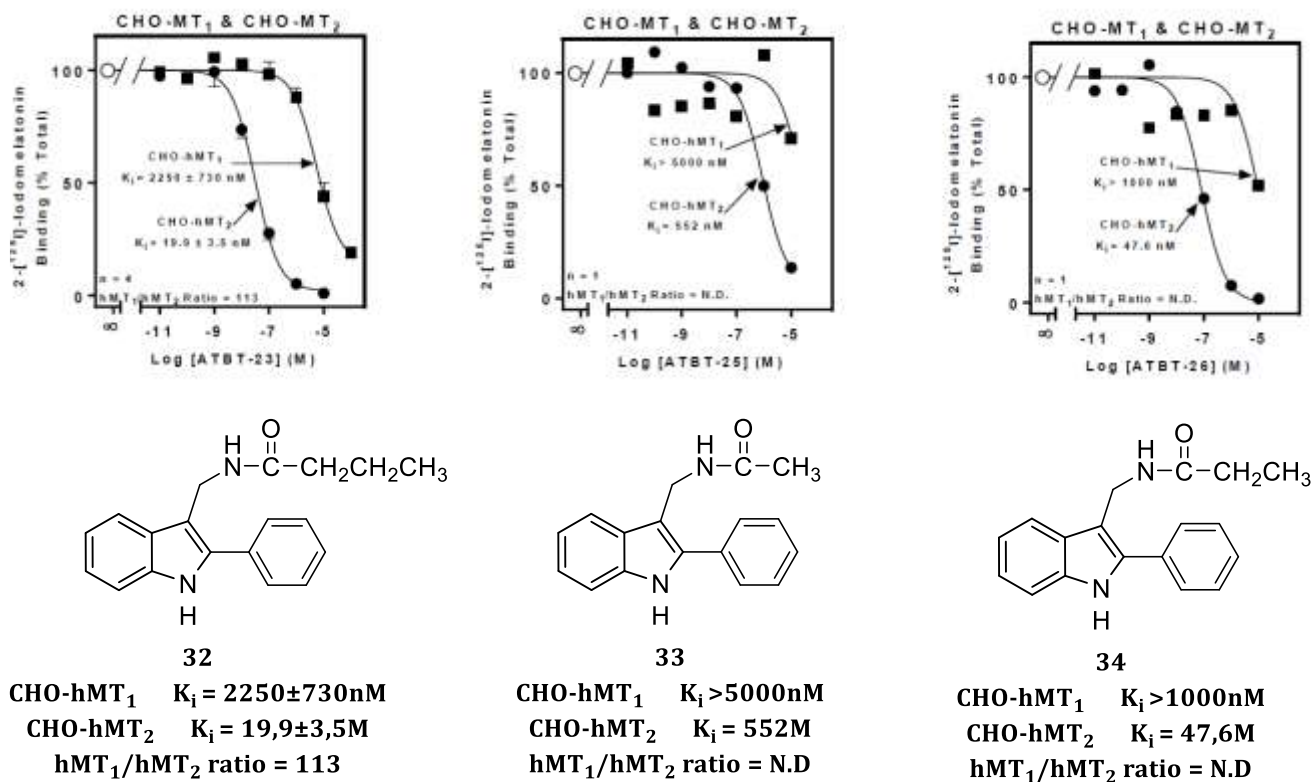
όπου, [L] εκφράζει τη συγκέντρωση της 2-[¹²⁵I]-ιωδομελατονίνης που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα και K_D τη σταθερά διάστασης (dissociation constant) της 2-[¹²⁵I]-ιωδομελατονίνης, όπως προσδιορίστηκε κατά το χαρακτηρισμό των κυτταρικών μεμβρανών.

5.2. Ανάλυση φαρμακολογικών αποτελεσμάτων

Συγκριτικός- Περιληπτικός Πίνακας Φαρμακολογικών Αποτελεσμάτων.

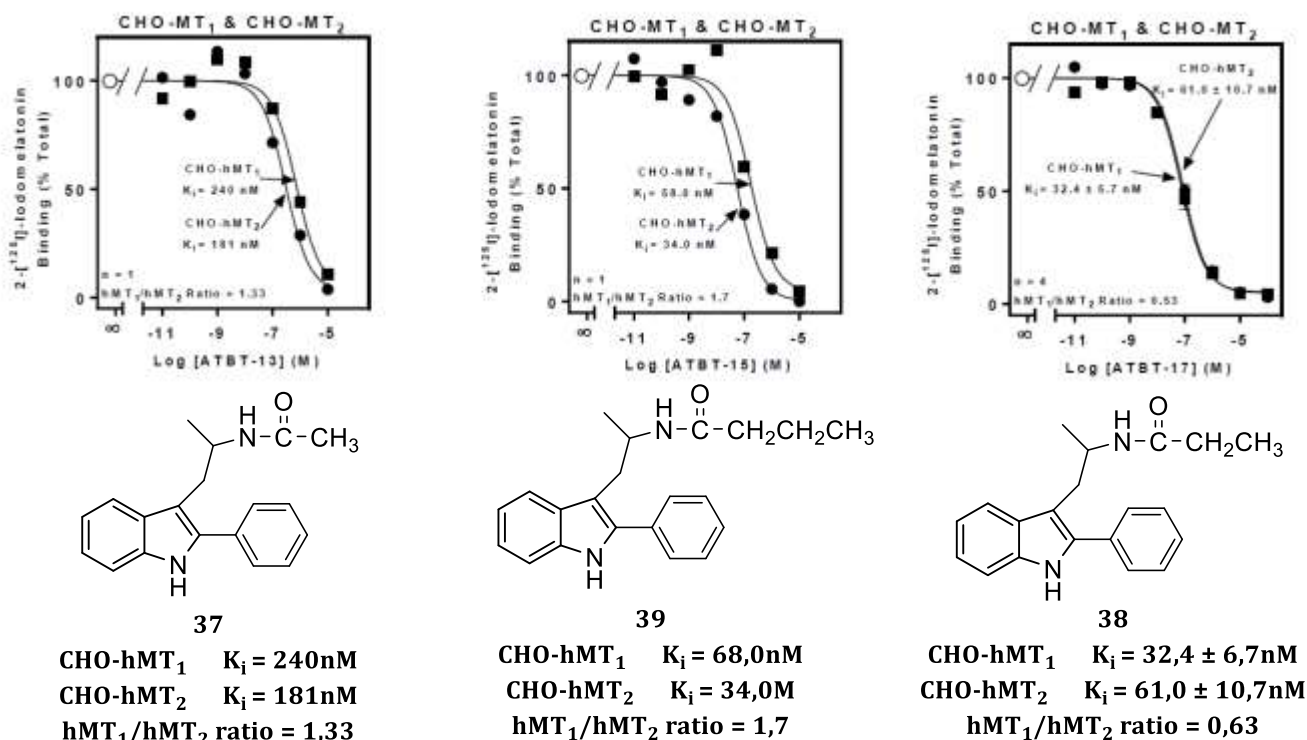
Σειρά	Γενικός Τύπος	Υποκατάσταση	hMT ₁ K _i (nM)	hMT ₂ K _i (nM)	Ratio K _i MT ₁ /K _i MT ₂
			0,214	0,258	0,83
A		33: R= CH ₃	>10.000	793 ± 160	-
		34: R=CH ₂ CH ₃	>10.000	208 ± 84	-
		32: R=nCH ₂ CH ₂ CH ₃	2.250 ± 730	19,9 ± 3,5	113
B		37: R= CH ₃	410 ± 110	189 ± 48	2,2
		38: R=CH ₂ CH ₃	32,4 ± 5,7	61,0 ± 11	0,53
		39: R=nCH ₂ CH ₂ CH ₃	72,5 ± 14	45,2 ± 8,1	1,6
C		44: R= CH ₃	2.700 ± 1.200	1.030 ± 440	2,6
		45: R=CH ₂ CH ₃	2.290 ± 890	971 ± 110	2,4
		46: R=nCH ₂ CH ₂ CH ₃	377 ± 150	245 ± 31	1,5
D		52: R= CH ₃	82,9 ± 71	2,01 ± 0,34	41
		53: R=CH ₂ CH ₃	5,20 ± 7,60	0,558 ± 2,29	9,3
		54: R=nCH ₂ CH ₂ CH ₃	3,60 ± 2,1	0,953 ± 0,39	3,8
E		58: R= CH ₃	49,7 ± 8,2	6,65 ± 2,5	7,5
		59: R=CH ₂ CH ₃	24,6 ± 0,98	0,725 ± 1,0	34
		60: R=nCH ₂ CH ₂ CH ₃	27,5 ± 5,2	2,0 ± 1,2	14

Στα σχήματα 16, 17 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα γραφήματα της φαρμακολογικής δράσης των ενώσεων της Σειράς A και της Σειράς B.



Σχήμα 16: Φαρμακολογικά αποτελέσματα των ενώσεων 32-34 της Σειράς A σε κυτταρικές σειρές CHO-hMT₁ και CHO-hMT₂

Από τα παραπάνω αποτελέσματα καθίσταται εμφανές ότι η πλέον δραστική ένωση της Σειράς A, έναντι του hMT₂ υποδοχέα, είναι το βουτυραμιδο-ανάλογο **32**. Ακολουθούν το προπαναμιδο-ανάλογο **34** και το ακεταμιδο-ανάλογο **33**. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και οι δύο (**33**, **34**) από τις τρεις αυτές ενώσεις επιδεικνύουν εκλεκτικότητα ως προς τον hMT₂ υποδοχέα, έναντι του hMT₁. Επίσης, ενώ το παράγωγο **33** εμφανίζει εξαιρετική εκλεκτικότητα για τον hMT₂ ($K_{iMT1}/K_{iMT2} = 113$), αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μία αύξηση του μήκους του ακυλίου κατά δύο μεθύλια (ένωση **32**) έναντι της αντίστοιχης ακεταμιδο-ομάδας (ανάλογο **33**) οδήγησε σε αύξηση της τιμής της σταθεράς σύνδεσης κατά 28 φορές.



Σχήμα 17: Φαρμακολογικά αποτελέσματα των ενώσεων **37-39** της Σειράς *B*, σε κυτταρικές σειρές CHO-hMT₁ και CHO-hMT₂

Παρομοίως, και στην περίπτωση των αναλόγων της Σειράς *B*, το πλέον δραστικό παράγωγο είναι η βουτυραμιδο-υποκατεστημένη ένωση **39**, ενώ το ακεταμιδο-ανάλογο **37** εμφανίζει δράση ελαττωμένη κατά 5 φορές, σε σχέση με αυτή της ένωσης **39**. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ενώσεις της Σειράς *B*, με εξαίρεση το παράγωγο **38**, εμφανίζουν μικρότερη εκλεκτικότητα για τον hMT₂ υποδοχέα, σε σχέση με τις αντίστοιχες ενώσεις της Σειράς *A*. Ενδιαφέρον, επίσης παρουσιάζει και η εκλεκτικότητα του προπαναμιδο-παραγώγου **38** για τον hMT₁ υποδοχέα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η διευθέτηση της συγκεκριμένης πλευρικής αλυσίδας στο χώρο διαφέρει από τους προσανατολισμούς των αλυσίδων των αντίστοιχων ενώσεων, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η σύνδεση αυτού του παραγώγου με τον hMT₁ υποδοχέα. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι οι στερεοηλεκτρονικές απαιτήσεις που τίθενται από τον hMT₁ υποδοχέα, ως προς την προσέγγιση ενώσεων στα ενεργά κέντρα δράσης του, είναι πολύ πιο αυστηρές απ' ό,τι του υποδοχέα hMT₂.

Στη τρίτη σειρά παραγώγων η αντικατάσταση του C2-φαινυλο υποκαταστάτη των ενώσεων της Σειράς *B*, από το C2-μεθύλιο, οδήγησε σε σημαντική μείωση του βαθμού σύνδεσης των συγκεκριμένων αναλόγων (**44 - 46**) και ως προς τους δύο υποδοχείς. Αυτό πιθανόν να οφείλεται είτε στο μικρότερο μέγεθος του μεθυλίου σε σχέση με του φαινυλίου, είτε στη μείωση της επιθυμητής τιμής (90°) της δίδερης γωνίας C5-NH-C3, που είναι απαραίτητη για την εμφάνιση βέλτιστης σύνδεσης της C3-πλευρικής αλυσίδας με τους υποδοχείς. Επίσης, οι διαφορές των στερεοηλεκτρονικών

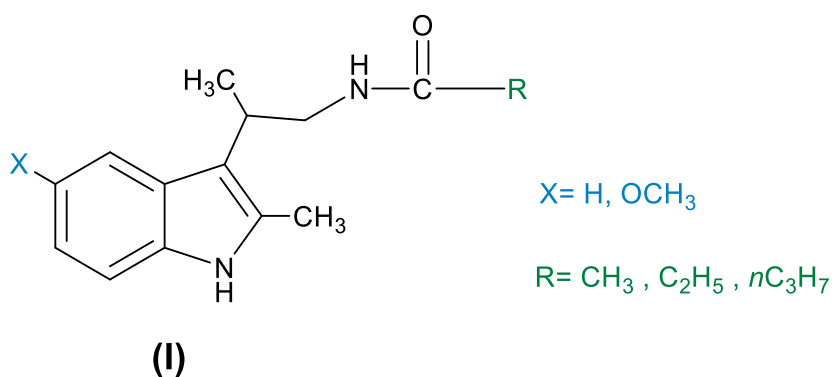
χαρακτηριστικών του μεθυλίου και του φαινυλίου δεν αποκλείεται να έχουν αποτελέσει αιτίες μείωσης του βαθμού σύνδεσης των ενώσεων της Σειράς C.

Στη τέταρτη σειρά ενώσεων, όπου το C_β-Me μεταφέρθηκε στη C_α-θέση, ενώ παράλληλα το C2-Me αντικαταστάθηκε από το υδρογόνο (**52-54**), η μελατονινεργική δράση βελτιώθηκε σημαντικά σε σχέση με όλα τα προηγούμενα παράγωγα των Σειρών Α-Γ. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η σταθερά σύνδεσης K_i των αναλόγων **53** και **54** για τον hMT₂ υποδοχέα είναι αυξημένη, μόνο κατά 2 και 4 φορές περίπου από την ίδια την μελατονίνη. Ακόμα πιο ενδιαφέρον, είναι το γεγονός ότι η εκλεκτικότητα των παραγώγων **53** και **54** για τον hMT₂ υποδοχέα είναι κατά 11 και 5 περίπου φορές μικρότερη από αυτή της μελατονίνης. Εξαιρετικής σημασίας είναι το γεγονός ότι η εκλεκτικότητα του R=CH₃ αναλόγου **52** έναντι του hMT₂ υποδοχέα είναι κατά 50 φορές μεγαλύτερη από αυτή της μελατονίνης.

Η τάση αυτή, ως προς την εκλεκτικότητα έναντι του υποδοχέα hMT₂, επαναλαμβάνεται και στη περίπτωση των *gem*-διμεθυλο παραγώγων της Σειράς E (**58 - 60**). Ενδεικτικά, το προπαναμιδο-ανάλογο **59** εμφανίζει εκλεκτικότητα για τον hMT₂ υποδοχέα κατά 41 φορές μεγαλύτερη από ότι η μελατονίνη, ενώ ο βαθμός σύνδεσής του με τον hMT₂ είναι ελαττωμένος κατά μόνο 2,8 φορές από αυτόν της φυσικής ορμόνης.

Από τα παραπάνω καθίσταται εμφανές ότι η C_β και C_α-μεθυλο-υποκατάσταση διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο στη μελατονινεργική δράση απ' ό,τι η C2- υποκατάσταση (Ph ή Me). Μεταξύ των δύο, η C_α-μεθυλο υποκατάσταση φαίνεται ως η πιο σημαντική, τόσο ως προς το βαθμό σύνδεσης με τους υποδοχείς hMT₁ και hMT₂, αλλά όσο και προς την εμφανιζόμενη εκλεκτικότητα έναντί τους.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, η επόμενη σειρά ενώσεων που θα εξεταστούν από την ερευνητική μας ομάδα θα αφορά τα παράγωγα του γενικού τύπου (**I**) . Με αυτόν τον τρόπο, θα εξεταστεί η επίδραση της προσθήκης 5-μεθοξυ ομάδας σε σχέση με τα C_α-Me υποκατεστημένα παράγωγα τα οποία φέρουν επίσης C2-Me υποκατάσταση.



6. Βιβλιογραφία

1. McCord, C. P. & Allen, F. P. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *Journal of Experimental Zoology***23**, 207–224 (1917).
2. Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H. & Mori, W. Isolation of Melatonin, The Pineal Gland Factor that Lightens Melanocytes. *Journal of the American Chemical Society***80**, 2587–2587 (1958).
3. Lerner, A. B., Case, J. D. & Heinzelman, R. V. Structure of Melatonin. *Journal of the American Chemical Society***81**, 6084–6085 (1959).
4. Lerner, A. B. Melatonin—Without The Hype. in *Melatonin After Four Decades* (ed. Olcese, J.) **460**, 1–3 (Kluwer Academic Publishers, 2002).
5. Caniato, R. *et al.* Melatonin in plants. *Adv. Exp. Med. Biol.***527**, 593–597 (2003).
6. Paredes, S. D., Korkmaz, A., Manchester, L. C., Tan, D.-X. & Reiter, R. J. Phytomelatonin: a review. *Journal of Experimental Botany***60**, 57–69 (2009).
7. Roseboom, P. H. *et al.* Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology***137**, 3033–3045 (1996).
8. *Melatonin: biological basis of its function in health and disease.* (Landes Bioscience ; Eurekah.com, 2006).
9. The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine - Advanced Information: Discoveries of Molecular Mechanisms Controlling the Circadian Rhythm ". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2017/advanced.html>.
10. Halberg, F. [Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle]. *Int Z Vitaminforsch Beih***10**, 225–296 (1959).
11. Halberg, F., Carandente, F., Cornelissen, G. & Katinas, G. S. [Glossary of chronobiology (author's transl)]. *Chronobiologia***4** Suppl 1, 1–189 (1977).
12. Claustrat, B., Brun, J. & Chazot, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews***9**, 11–24 (2005).
13. Zawilska, J. & Nowak, J. Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochemistry International***20**, 23–36 (1992).
14. Zhdanova, I. V. & Tucci, V. Melatonin, circadian rhythms, and sleep. *Current Treatment Options in Neurology***5**, 225–229 (2003).
15. Horst-W.Korf. Evolution of Melatonin-Producing Pinealocytes. in *Melatonin after four decades: an assessment of its potential* **17,18** (2004).
16. Sugden, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia***45**, 922–932 (1989).
17. Voisin, F., Namboodiri, M.A.A. & Klein, D.C. Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J Biol Chem***259**, 10913–10918 (1984).
18. Tosini, G., Owino, S., Guillaume, J.-L. & Jockers, R. Understanding melatonin receptor pharmacology: Latest insights from mouse models, and their relevance to human disease: Prospects & Overviews. *BioEssays***36**, 778–787 (2014).
19. Mallo, C. *et al.* Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *European Journal of Clinical Pharmacology***38**, 297–301 (1990).
20. Yeleswaram, K., Vachharajani, N. & Santone, K. Involvement of cytochrome P-450 isozymes in melatonin metabolism and clinical implications. *Journal of Pineal Research***26**, 190–191 (1999).
21. Kopin, I. J., Pare, C. M., Axelrod, J. & Weissbach, H. The fate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem.***236**, 3072–3075 (1961).
22. Karasek, M. Does melatonin play a role in aging processes? *J. Physiol. Pharmacol.***58** Suppl 6, 105–113 (2007).
23. Fusao Hirata, Osamu Hayaishi & Siro Senoh. In Vitro and in Vivo Formation of Two New Metabolites of Melatonin. *J Biol Chem***249**, 1311–1313 (1974).
24. Margarita L. Dubocovich, Monica I. Masana & Susan Benloucif. Molecular Pharmacology and Function of Melatonin Receptor Subtypes. in *Melatonin after four decades: an assessment of its potential***460**, 181–190 (2004).
25. Finocchiaro, L. M. & Glikin, G. C. Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. *J. Pineal Res.***24**, 22–34 (1998).
26. Benítez-King, G. & Antón-Tay, F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia***49**, 635–641 (1993).
27. Bettahi, I., Guerrero, J. M., Reiter, R. J. & Osuna, C. Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. *J. Pineal Res.***25**, 34–40 (1998).
28. Missbach, M. *et al.* Thiazolidine Diones, Specific Ligands of the Nuclear Receptor Retinoid Z Receptor/Retinoid Acid Receptor-related Orphan Receptor α with Potent Antiarthritic Activity. *Journal of Biological Chemistry***271**, 13515–13522 (1996).
29. Cardinali, D. P., Vacas, M. I. & Boyer, E. Esté. Specific Binding of Melatonin in Bovine Brain*. *Endocrinology***105**, 437–441 (1979).
30. Cohen, M., Roselle, D., Chabner, B., Schmidt, T. J. & Lippman, M. Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature***274**, 894–895 (1978).
31. Niles, L. P., Wong, Y. W., Mishra, R. K. & Brown, G. M. Melatonin receptors in brain. *Eur. J. Pharmacol.***55**, 219–220 (1979).
32. Vanecek, J. Cellular Mechanisms of Melatonin Action. *Physiological Reviews***78**, 687–721 (1998).

33. Mahle, C. D., Takaki, K. S. & Watson, A. J. Melatonin Receptor Ligands and Their Potential Clinical Applications. in *Annual Reports in Medicinal Chemistry***32**, 31–40 (Elsevier, 1997).
34. Belmonte, S. L. & Blaxall, B. C. G Protein Coupled Receptor Kinases as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circulation Research***109**, 309–319 (2011).
35. Dubocovich, M. L. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharmacological Reviews***62**, 343–380 (2010).
36. Dubocovich, M. L. Melatonin receptors: Are there multiple subtypes? *Trends in Pharmacological Sciences***16**, 50–56 (1995).
37. Reiter, R. J. *et al.* A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.***18**, 1–11 (1995).
38. Reppert, S. M., Weaver, D. R. & Godson, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.***17**, 100–102 (1996).
39. Dubocovich, M. L., Masana, M. I., Iacob, S. & Sauri, D. M. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.***355**, 365–375 (1997).
40. Reppert, S. M. & Weaver, D. R. Melatonin madness. *Cell***83**, 1059–1062 (1995).
41. Liu, J. *et al.* MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology***56**, 361–383 (2016).
42. Serle, J. B., Wang, R.-F., Peterson, W. M., Plourde, R. & Yerxa, B. R. Effect of 5-MCA-NAT, a putative melatonin MT3 receptor agonist, on intraocular pressure in glaucomatous monkey eyes. *J. Glaucoma***13**, 385–388 (2004).
43. Sugden, D., Chong, N. W. S. & Lewis, D. F. V. Structural requirements at the melatonin receptor. *British Journal of Pharmacology***114**, 618–623 (1995).
44. Jansen, J. M. *et al.* The high affinity melatonin binding site probed with conformationally restricted ligands—I. Pharmacophore and minireceptor models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry***4**, 1321–1332 (1996).
45. Navajas, C. *et al.* A rhodopsin-based model for melatonin recognition at its G protein-coupled receptor. *Eur. J. Pharmacol.***304**, 173–183 (1996).
46. Ivanov, A. A., Voronkov, A. E., Baskin, I. I., Palyulin, V. A. & Zefirov, N. S. The study of the mechanism of binding of human ML1A melatonin receptor ligands using molecular modeling. *Dokl. Biochem. Biophys.***394**, 49–52 (2004).
47. Mazna, P. *et al.* Ligand binding to the human MT2 melatonin receptor: The role of residues in transmembrane domains 3, 6, and 7. *Biochemical and Biophysical Research Communications***332**, 726–734 (2005).
48. Mazna, P. *et al.* Molecular modeling of human MT2 melatonin receptor: the role of Val204, Leu272 and Tyr298 in ligand binding. *Journal of Neurochemistry***91**, 836–842 (2004).
49. Zefirova, O. N., Baranova, T. Y., Ivanova, A. A., Ivanov, A. A. & Zefirov, N. S. Application of the bridgehead fragments for the design of conformationally restricted melatonin analogues. *Bioorganic Chemistry***39**, 67–72 (2011).
50. Farce, A. *et al.* Homology modeling of MT1 and MT2 receptors. *European Journal of Medicinal Chemistry***43**, 1926–1944 (2008).
51. Masana, M. I. & Dubocovich, M. L. Melatonin Receptor Signaling: Finding the Path Through the Dark. *Science Signaling***2001**, pe39–pe39 (2001).
52. Van der Maren, S. *et al.* Daily Profiles of Light Exposure and Evening Use of Light-emitting Devices in Young Adults Complaining of a Delayed Sleep Schedule. *Journal of Biological Rhythms***33**, 192–202 (2018).
53. Yang, M. *et al.* The Acute Effects of Intermittent Light Exposure in the Evening on Alertness and Subsequent Sleep Architecture. *International Journal of Environmental Research and Public Health***15**, 524 (2018).
54. Garfinkel, D., Zisapel, N., Wainstein, J. & Laudon, M. Facilitation of benzodiazepine discontinuation by melatonin: a new clinical approach. *Arch. Intern. Med.***159**, 2456–2460 (1999).
55. Garfinkel, D., Laudon, M. & Zisapel, N. Improvement of sleep quality by controlled-release melatonin in benzodiazepine-treated elderly insomniacs. *Archives of Gerontology and Geriatrics***24**, 223–231 (1997).
56. Hardeland, R. *et al.* Melatonergic Drugs in Clinical Practice. *Arzneimittelforschung***58**, 1–10 (2011).
57. Srinivasan, V., Spence, D. W., Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I. & Cardinali, D. P. Jet lag: Therapeutic use of melatonin and possible application of melatonin analogs. *Travel Medicine and Infectious Disease***6**, 17–28 (2008).
58. Petrie, K., Dawson, A. G., Thompson, L. & Brook, R. A double-blind trial of melatonin as a treatment for jet lag in international cabin crew. *Biol. Psychiatry***33**, 526–530 (1993).
59. Liu, R. *et al.* Melatonin Inhibits Reactive Oxygen Species-Driven Proliferation, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Vasculogenic Mimicry in Oral Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity***2018**, 1–13 (2018).
60. Reiter, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.***9**, 526–533 (1995).
61. de Castro, T. B., Bordin-Junior, N. A., de Almeida, E. A. & de Campos Zuccari, D. A. P. Evaluation of melatonin and AFMK levels in women with breast cancer. *Endocrine* (2018). doi:10.1007/s12020-018-1624-2
62. Cos, S. & Sánchez-Barceló, E. J. Melatonin inhibition of MCF-7 human breast-cancer cells growth: influence of cell proliferation rate. *Cancer Lett.***93**, 207–212 (1995).
63. Lissoni, P. *et al.* Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. *Br. J. Cancer***71**, 854–856 (1995).
64. Mulder, H., Nagorny, C. L. F., Lyssenko, V. & Groop, L. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia***52**, 1240–1249 (2009).
65. Peschke, E. *et al.* Melatonin and type 2 diabetes ? a possible link? *Journal of Pineal Research***42**, 350–358 (2007).

66. Maestroni, G. J. M., Hertens, E., Galli, P., Conti, A. & Pedrinis, E. Melatonin-induced T-helper cell hematopoietic cytokines resembling both interleukin-4 and dynorphin. *Journal of Pineal Research***21**, 131–139 (1996).
67. Pierpaoli, W., Regelson, W. & Colman, C. *The melatonin miracle: nature's age-reversing, disease-fighting, sex-enhancing hormone*. (Pocket Books, 1996).
68. Shibui, K. *et al.* Diurnal fluctuation of sleep propensity and hormonal secretion across the menstrual cycle. *Biol. Psychiatry***48**, 1062–1068 (2000).
69. Rosenthal, N. E. *et al.* Melatonin in seasonal affective disorder and phototherapy. *J. Neural Transm. Suppl.***21**, 257–267 (1986).
70. Tchekalarova, J., Stoyanova, T., Ilieva, K., Mitreva, R. & Atanasova, M. Agomelatine treatment corrects symptoms of depression and anxiety by restoring the disrupted melatonin circadian rhythms of rats exposed to chronic constant light. *Pharmacology Biochemistry and Behavior***171**, 1–9 (2018).
71. Chong, N. W. S., Evans, J. E. & Sugden, D. N-Bromoacetyl 5-Methoxytryptamine: An Irreversible Melatonin Ligand? *Biochemical and Biophysical Research Communications***193**, 1355–1361 (1993).
72. Mor, M. *et al.* Melatonin Receptor Ligands: Synthesis of New Melatonin Derivatives and Comprehensive Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) Study. *Journal of Medicinal Chemistry***41**, 3831–3844 (1998).
73. Tsotinis, A., Eleutheriades, A., Hough, K. & Sugden, D. Design and synthesis of potent N1-substituted indole melatonin receptor agonists. *Chem. Commun. (Camb.)* 382–383 (2003).
74. Sugden D & Rowe S.J. 2-Iodo-N-butanoyl-5-methoxytryptamine: a potent melatonin receptor agonist. *Pharmacol Commun* 267–276 (1994).
75. Tarzia, G. *et al.* 1-(2-Alkanamidoethyl)-6-methoxyindole Derivatives: A New Class of Potent Indole Melatonin Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry***40**, 2003–2010 (1997).
76. Fukatsu, K. *et al.* Synthesis of a novel series of benzocycloalkene derivatives as melatonin receptor agonists. *J. Med. Chem.***45**, 4212–4221 (2002).
77. Depreux, P. *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of novel naphthalenic and bioisosteric related amidic derivatives as melatonin receptor ligands. *J. Med. Chem.***37**, 3231–3239 (1994).
78. Zlotos, D. P. Recent progress in the development of agonists and antagonists for melatonin receptors. *Curr. Med. Chem.***19**, 3532–3549 (2012).
79. Garratt, P. J., Travard, S., Vonhoff, S., Tsotinis, A. & Sugden, D. Mapping the Melatonin Receptor. 4. Comparison of the Binding Affinities of a Series of Substituted Phenylalkyl Amides. *Journal of Medicinal Chemistry***39**, 1797–1805 (1996).
80. Tsotinis, A., Vlachou, M., Papahatjis, D., Nikas, S. & Sugden, D. An Efficient Synthesis of Simple β, β' -Cyclobisalkylated Melatonergic Phenylalkylamides. *Letters in Organic Chemistry***4**, 92–95 (2007).
81. Tsotinis, A., Panoussopoulou, M., Sivananthan, S. & Sugden, D. Synthesis of new tricyclic melatonergic ligands. *Farmacology***56**, 725–729 (2001).
82. Kato, K. *et al.* Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology***48**, 301–310 (2005).
83. Uchikawa, O. *et al.* Synthesis of a novel series of tricyclic indan derivatives as melatonin receptor agonists. *J. Med. Chem.***45**, 4222–4239 (2002).
84. Borja, N. L. & Daniel, K. L. Ramelteon for the treatment of insomnia. *Clinical Therapeutics***28**, 1540–1555 (2006).
85. de Bodinat, C. *et al.* Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nature Reviews Drug Discovery***9**, 628–642 (2010).
86. Sansone, R. A. & Sansone, L. A. Agomelatine: a novel antidepressant. *Innov Clin Neurosci***8**, 10–14 (2011).
87. Kostiuik, N. V., Belyakova, M. B., Leshchenko, D. V., Zhigulina, V. V. & Miniaev, M. V. Synthetic Melatonergic Ligands: Achievements and Prospects. *ISRN Biochemistry***2014**, 1–11 (2014).
88. Hardeland, R. Tasimelteon, a melatonin agonist for the treatment of insomnia and circadian rhythm sleep disorders. *Curr Opin Investig Drugs***10**, 691–701 (2009).
89. Dubocovich, M. L. Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.***246**, 902–910 (1988).
90. Dubocovich, M. L., Yun, K., Al-ghoul, W. M., Benloucif, S. & Masana, M. I. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *The FASEB Journal***12**, 1211–1220 (1998).
91. Teh, M. T. & Sugden, D. Comparison of the structure-activity relationships of melatonin receptor agonists and antagonists: lengthening the N-acyl side-chain has differing effects on potency on *Xenopus* melanophores. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.***358**, 522–528 (1998).
92. Sundberg, R. J. *The chemistry of indoles*. (Academic Press, 1970).
93. Cipiciani, A., Clementi, S., Linda, P., Marino, G. & Savelli, G. Kinetics and mechanism of N-substitution of indoles and carbazoles in Vilsmeier-Haack acetylation. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1284–1287 (1977). doi:10.1039/P29770001284
94. Zhou, Y., Xia, Z.-L., Gu, Q. & You, S.-L. Chiral Phosphoric Acid Catalyzed Intramolecular Dearomative Michael Addition of Indoles to Enones. *Organic Letters***19**, 762–765 (2017).
95. Yang, Y. *et al.* Convenient Method for Reduction of C-N Double Bonds in Oximes, Imines, and Hydrazones Using Sodium Borohydride-Raney Ni System. *Synthetic Communications***42**, 2540–2554 (2012).
96. Sonar, V. N., Parkin, S. & Crooks, P. A. (E)-2-Methyl-3-(2-methyl-2-nitrovinyl)-1H-indole and (E)-3-(2-methyl-2-nitrovinyl)-2-phenyl-1H-indole. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications***61**, o527–o530 (2005).

97. Chakrabarty, M., Kundu, T. & Harigaya, Y. Mild Deprotection of tert-Butyl Carbamates of NH-Heteroarenes under Basic Conditions. *Synthetic Communications***36**, 2069–2077 (2006).
98. Thanetchaiyakup, A., Rattanarat, H., Chuanopparat, N. & Ngermmeesri, P. One-pot synthesis of substituted indolo[1,2- a]quinolines under transition-metal-free conditions. *Tetrahedron Letters***59**, 1014–1018 (2018).
99. Flatt, B. *et al.* Discovery of XL335 (WAY-362450), a Highly Potent, Selective, and Orally Active Agonist of the Farnesoid X Receptor (FXR). *Journal of Medicinal Chemistry***52**, 904–907 (2009).
100. Popovska-Gorevski, M., Dubocovich, M. L. & Rajnarayanan, R. V. Carbamate Insecticides Target Human Melatonin Receptors. *Chemical Research in Toxicology***30**, 574–582 (2017).