



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ»

«ASSESSMENT OF PHYSICAL EXTRACTS WITH
BIOCHEMICAL METHODS FOR HYPOGLYCEMIC
ACTION»



ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΚΑΤΣΙΓΙΑΝΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ ΙΟΥΛΙΟΣ 2014

Θέμα:

**«Αξιολόγηση της υπογλυκαιμικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων με
βιοχημικές διαδικασίες»**

Subject:

**« Assessment of physical extracts with biochemical methods for
hypoglycemic action »**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

• ***Δρ. Δημήτριος Δ. Λεωνίδας***

Αναπληρωτής καθηγητής βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

• ***Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρά***

Επίκουρος καθηγητής βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

• ***Δρ. Μπαλατσός Νικόλαος***

Επίκουρος καθηγητής βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΣΤΟΧΟΣ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	8

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΘΕΜΑ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	9
1.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	9
1.2 ΤΥΠΟΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ	11
1.2.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1 (ΙΝΣΟΥΛΙΝΟ- ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΣ, IDDM).....	11
1.2.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ2 (ΜΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟ- ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΣ, NIDDM)	12
1.3 ΓΛΥΚΟΖΗ	13
1.4 ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ	15
1.5 ΓΛΥΚΑΓΟΝΗ	17
1.6 ΓΛΥΚΟΓΟΝΟ	18
1.6.1 ΔΟΜΗ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	18
1.6.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	19
1.6.3 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	20
1.6.4 ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	22
1.6.5 ΜΥΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ.....	25
1.6.6 ΗΠΑΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	27
1.7 ΚΕΝΤΡΑ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	28
1.8 Η ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΚΑΙ Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΝΤΑΙ ΑΝΤΙΡΡΟΠΑ	30
1.9 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ	31
1.9.1 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ	35

1.9.2 PYRACANTHA COCCINEA	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ Β ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	54
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΠΙΝΑΚΩΝ

Εικόνα 1: Κύρια συμπτώματα διαβήτη	13
Εικόνα 2 :Δομή γλυκόζης (συντακτική και τρισδιάστατη δομή)	14
Εικόνα 3: Η ανθρώπινη ινσουλίνη (και τρισδιάστατη μορφή της).....	16
Εικόνα 4 :Δομική αναπαράσταση της Γλυκαγόνης	17
Εικόνα 5: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ενός ηπατικού κυττάρου. Τα πυκνά σωμάτια του κυτταροπλάσματος αποτελούν τους κόκκους του γλυκογόνου..	19
Εικόνα 6 : Η δομή του γλυκογόνου	19
Εικόνα 7: Συνθετική πορεία του γλυκογόνου.....	20
Εικόνα 8: Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	21
Εικόνα 9 :τρειςδιάστατη και συντακτική δομή της PLP	23
Εικόνα 10 : Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.	23
Εικόνα 11: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η φωσφορική πυριδοξάλη σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης.....	24
Εικόνα 12: Οι δομές της φωσφορυλάσης α και b.	25
Εικόνα 13 :Σχηματική απεικόνιση του διμερούς μορίου της GPb	26
Εικόνα 14: Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί την μετάβαση στη μορφή R.....	27
Εικόνα 15: Αλλοστερική ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης	28
Εικόνα 16 : Συντονισμένος έλεγχος του μεταβολισμού του γλυκογόνου.	31
Εικόνα 17 :Κινητική Michaelis-Menten.....	32
Εικόνα 18: Διάκριση μεταξύ ενός συναγωνιστικού και ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα.	35
Εικόνα 19 :Κινητική ενός συναγωνιστικού αναστολέα.	36
Εικόνα 20: Κινητική ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα.	36
Εικόνα 21 : το λουλούδι των <i>Pyraecantha coccinea</i>	37
Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb.	54
Εικόνα 23: Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος G-1-P (2.0, 4.0, 60, 10.0, 20.0mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου.	55
Εικόνα 24 :Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος	56
Πίνακας 1 Παρασκευή των διαλυμάτων υποστρώματος	45
Πίνακας 2 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρώματος παρουσία αναστολέα.....	49

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιομηχανικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2013-Μάρτιος 2014.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δρ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα, που με τις γνώσεις του, τις εμπειρίες του και την καθοδήγησή του με βοήθησε να ολοκληρώσω με επιτυχία την διπλωματική μου εργασία. Η καθοδήγηση του ήταν πολύτιμη για την διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών και την ολοκλήρωση του θέματος που μου ανέθεσε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Άννα-Μαρία Ψαρρά, επίκουρο καθηγητή βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και τον κύριο Μπαλατσό, επίκουρο καθηγητή βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την άριστη συνεργασία τους και τις γνώσεις τους που μου πρόσφεραν κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήταν παράλειψη να μην εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Αναστασία Καντσάδη, που παρά τις συνεχείς υποχρεώσεις της στο εργαστήριο ήμουν συνεχώς υπό την παρακολούθηση της και η βοήθεια της ήταν ανεκτίμητη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιομηχανικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς και όλους όσους συνέβαλαν στη διεκπεραίωση της.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια από τις ορμονικές διαταραχές του μεταβολισμού. Χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Η διάγνωση του διαβήτη επιτυγχάνεται με μέτρηση του σακχάρου του αίματος και η διατήρηση του κοντά στα φυσιολογικά όρια αποτελεί κύριο στόχο για τη θεραπεία της ασθένειας. Ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης αποτελούν τον κύριο στόχο για το σχεδιασμό ενώσεων που θα χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα για τη θεραπεία της ασθένειας. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ένζυμο που αποτελεί κύριο στόχο για τους επιστήμονες για την ανάπτυξη υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, απομονώσαμε το ένζυμο φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) και πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της επίδρασης φυσικών εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες του *Pyracantha coccinea* στην δραστηριότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα αυτά αναστέλλουν την δραστηριότητα του ενζύμου με άμεση συνέπεια τη μείωση της σύνθεσης γλυκογόνου .

ABSTRACT

Diabetes mellitus is one of the more serious hormonal imbalance diseases. It is characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia) and glucose metabolism imbalance because of decreased insulin secretion or decrease in body cells sensitivity to insulin. Diabetes can be diagnosed by measuring the blood sugar levels and treated by maintaining it up to normal levels. Enzymes and receptors involved in the regulation of glucose levels are the main target for the design of compounds to be used as drugs to treat the disease. The glycogen phosphorylase is an enzyme that is a key target for scientists developing hypoglycemic drugs.

In this dissertation, we isolated the glycogen enzyme phosphorylase b (GPb) and held kinetic study of the effect of natural extracts of various varieties of *Pyracantha coccinea* in enzyme activity. The results showed that these extracts inhibit the enzyme activity resulting in reduced glycogen synthesis.

ΣΤΟΧΟΣ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία, ο στόχος ήταν να απομονώσουμε το ένζυμο φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μύες κουνελιού και να μελετήσουμε με κινητικά πειράματα την επίδραση φυσικού εκχυλίσματος από *Pyracantha coccinea* στην ενζυμική δραστηριότητα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, το καθοριστικό ένζυμο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου, αποτελεί τον κύριο στόχο των επιστημόνων για την παραγωγή υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι εκχυλίσματα από ποικιλίες του *Pyracantha coccinea* αναστέλλουν μέτρια την δραστηριότητα του ενζύμου με σταθερά αναστολής να κυμαίνεται $20,06 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΘΕΜΑ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης κατατάσσεται στα νοσήματα διαταραχής του μεταβολισμού. Ο μεταβολισμός είναι ο μηχανισμός με τον οποίο το σώμα μας χρησιμοποιεί τις τροφές για να δώσει ενέργεια στον οργανισμό μας. Οι περισσότερες τροφές που τρώμε διασπώνται κυρίως σε γλυκόζη. Τα κύτταρα του οργανισμού μας χρησιμοποιούν τη γλυκόζη αυτή προκειμένου να την μετατρέψουν σε ενέργεια, για τη λειτουργία και την ανάπτυξή τους. Η γλυκόζη μεταφέρεται στα κύτταρα με τη βοήθεια μιας ορμόνης της ινσουλίνης. Η ορμόνη αυτή παράγεται στο πάγκρεας. Μετά το φαγητό, το πάγκρεας απελευθερώνει μια ικανή ποσότητα ινσουλίνης έτσι ώστε να ωθήσει την γλυκόζη από το αίμα προς τα κύτταρα. Αυτή η μετακίνηση αντιστοιχεί και στη μείωση των επιπέδων σακχάρου (γλυκόζης) στο αίμα. Οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη έχουν αρκετά αυξημένη ποσότητα γλυκόζης στο αίμα τους (υπεργλυκαιμία). Αυτό συμβαίνει γιατί είτε το πάγκρεας δεν παράγει αρκετή ή καθόλου ινσουλίνη ή γιατί τα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται επαρκώς στην ινσουλίνη που παράγεται από το πάγκρεας. Η αυξημένη ποσότητα γλυκόζης αποβάλλεται από το σώμα μέσω της ούρησης. Έτσι, αν το αίμα έχει μεγάλη ποσότητα γλυκόζης, τα κύτταρα δεν μπορούν να την απορροφήσουν για να ικανοποιήσουν τις ανάγκες του σώματος σε ενέργεια.^{1 2}

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, μέχρι το 2030 περισσότερα από 300 εκατομμύρια άνθρωποι θα έχουν εκδηλώσει την ασθένεια του σακχαρώδη διαβήτη που αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες. Η νόσος έχει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στο δυτικό κόσμο και αυτό αποτελεί μια ένδειξη για τη συσχέτιση της νόσου με το σύγχρονο τρόπο ζωής, τις διατροφικές συνήθειες και την έλλειψη σωματικής άσκησης. Κάθε χρόνο εκτιμάται ότι επιπλέον 7 εκατομμύρια συνάνθρωποί μας αναπτύσσουν διαβήτη. Τα άτομα που πάσχουν από διαβήτη στην Ευρώπη ανέρχονται σε περίπου 53 εκατομμύρια. Στην Ελλάδα εκτιμάται ότι το 10% του πληθυσμού νοσεί από την ασθένεια. Ο σακχαρώδης διαβήτης διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες.

Οι κύριοι τύποι διαβήτη είναι ο ινσουλινοεξαρτώμενος ή διαβήτης τύπου I, ο μη ινσουλινοεξαρτώμενος ή διαβήτης τύπου II. Ο διαβήτης τύπου I χαρακτηρίζεται

από καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα να υπάρχει ολική έλλειψη ή ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης. Συνήθως εμφανίζεται σε μικρότερες ηλικίες όπως παιδιά. Στους ασθενείς με διαβήτη τύπου II το πάγκρεας παράγει λιγότερη ινσουλίνη από αυτή που χρειάζεται ο οργανισμός τους με αποτέλεσμα την αυξημένη τιμή του σακχάρου στο αίμα. Στα αρχικά στάδια της νόσου συνήθως δεν εμφανίζονται καθόλου συμπτώματα και για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την εκδήλωση της νόσου ένας ασθενής μπορεί να μην έχει αντιληφθεί ότι πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη.

Τα κυριότερα συμπτώματα της νόσου είναι η έντονη δίψα, η πολουρία, η πολυφαγία, ο κνησμός, η συχνή εξάντληση χωρίς ιδιαίτερη σωματική δραστηριότητα, η δυσκολία επούλωσης των πληγών και οι συχνές φλεγμονές και λοιμώξεις. Στον διαβήτη τύπου 1, η ασθένεια εμφανίζεται γρήγορα και απότομα και συχνά η πρώτη εκδήλωσή της μπορεί να είναι η ανάπτυξη διαβητικής κετοξέωσης, με ναυτία, εμέτους, διάχυτο κοιλιακό άλγος και απώλεια συνείδησης. Στον διαβήτη τύπου 2, η νόσος εμφανίζεται σταδιακά και συχνά συνοδεύεται από αδυναμία, κόπωση, ζάλη και ευπάθεια σε λοιμώξεις.

Η διάγνωση του διαβήτη είναι εύκολη όταν είναι εμφανή τα συμπτώματα της ασθένειας και επιτυγχάνεται με μέτρηση του σακχάρου του αίματος. Η τιμή της γλυκόζης πρέπει να είναι κάθε στιγμή πάνω από 200 mg/dl. Σε ασθενείς με κλασικά συμπτώματα η διάγνωση επιτυγχάνεται με την παρουσία της γλυκοζουρίας. Σε νηστικά άτομα με συγκεντρώσεις γλυκόζης στο πλάσμα φλεβικού αίματος που υπερβαίνουν τα 7,8 mmol/l επιβεβαιώνουν την διάγνωση του διαβήτη. Σε ασθενείς που είναι συμπτωματικοί, οι τιμές αυτές πρέπει να είναι υψηλότερες περισσότερο από μια φορά ώστε να τεθεί η διάγνωση. Η πιθανότητα ανάπτυξης επιπλοκών λόγω του σακχαρώδους διαβήτη μειώνεται όσο καλύτερα ρυθμίζονται οι τιμές του σακχάρου στο αίμα. Οι επιπλοκές αυτές διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες και διάφοροι παράγοντες όπως η υπέρταση, η καθιστική ζωή και το κάπνισμα αυξάνουν την ανάπτυξη των επιπλοκών.³

1.2 ΤΥΠΟΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

1.2.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1 (ΙΝΣΟΥΛΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΣ, IDDM)

Ο νεανικός ή σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ανήκει στα αυτοάνοσα νοσήματα και παρουσιάζεται όταν δεν παράγεται καθόλου ινσουλίνη. Χαρακτηρίζεται από καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης, με αποτέλεσμα ολική έλλειψη ή ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης. Είναι πιο σπάνιος σε σχέση με τους άλλους τύπους σακχαρώδη διαβήτη (περίπου 10% των διαβητικών) και εμφανίζεται κυρίως σε άτομα νεαρής ηλικίας κάτω των 20 ετών. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναφέρει όμως ότι παρουσιάζει σημαντική αύξηση της συχνότητάς του στην Ευρώπη τα τελευταία χρόνια. Στο 90% των περιπτώσεων το ανοσοποιητικό σύστημα στρέφεται εναντίον των β-κυττάρων του παγκρέατος με συνέπεια την αδυναμία του οργανισμού να παράγει ινσουλίνη. Στο υπόλοιπο 10% τα αίτια δεν είναι γνωστά. Διάφοροι παράγοντες όπως ιοί, κληρονομικότητα και στρες είναι υπεύθυνοι για την ανοσολογική διέγερση και την επίθεση που δέχονται τα β-κύτταρα του παγκρέατος που πολιορκούνται από πληθώρα Τ-λεμφοκυττάρων που δημιουργούνται λόγω της διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων στο περιβάλλον των β-κυττάρων αρχικά τα οδηγεί σε δυσλειτουργία και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Έτσι με την πάροδο του χρόνου μειώνεται ο αριθμός τους και η παραγωγή της ινσουλίνης και εμφανίζεται η ασθένεια.⁴

Ο ασθενής με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 είναι απόλυτα εξαρτημένος από τη εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα του να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα. Επειδή η ινσουλίνη απουσιάζει το αποτέλεσμα είναι η συγκέντρωση της γλυκαγόνης να βρίσκεται σε υψηλότερο επίπεδο από το φυσιολογικό. Επειδή υπάρχει ανεπάρκεια ινσουλίνης, παρεμποδίζεται η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα. Το ήπαρ παραμένει σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης ενώ αναστέλλεται η γλυκόλυση. Όταν η ινσουλίνη δεν επιτελεί τον ρόλο της, τα υποπροϊόντα της διάσπασης των λιπών και των μυϊκών πρωτεϊνών συσσωρεύονται στο αίμα και οδηγούν στην παραγωγή ουσιών που ονομάζονται κετόνες. Έτσι, τα επίπεδα κετονών αυξάνονται μέχρι τελικά το άτομο να αναπτύξει αυτό που ονομάζεται κετοοξεωτικό κόμμα

Τα κυριότερα συμπτώματα που εμφανίζει ένα άτομο με σακχαρώδη διαβήτη 1 είναι η πολυουρία (μεγάλη ποσότητα ούρησης), η αυξημένη όρεξη (πολυφαγία), η απώλεια βάρους και η διαταραχή της όρασης. Υπάρχουν περιπτώσεις που δεν εμφανίζεται κανένα τέτοιο σύμπτωμα και πολλές φορές έχουμε ευαισθησία στις λοιμώξεις και διαταραχή στην ανάπτυξη των παιδιών. Ο νεανικός διαβήτης συνήθως εκδηλώνεται αιφνίδια στον ασθενή και ανιχνεύονται αντισώματα GAD, ICA και κατά της ινσουλίνης και συχνά συνδέεται με την εμφάνιση άλλων αυτοάνοσων νόσων όπως έλλειψη βιταμίνης B12, ανεπάρκεια επινεφριδίων, θυρεοειδή, λεύκη κ.α.⁴

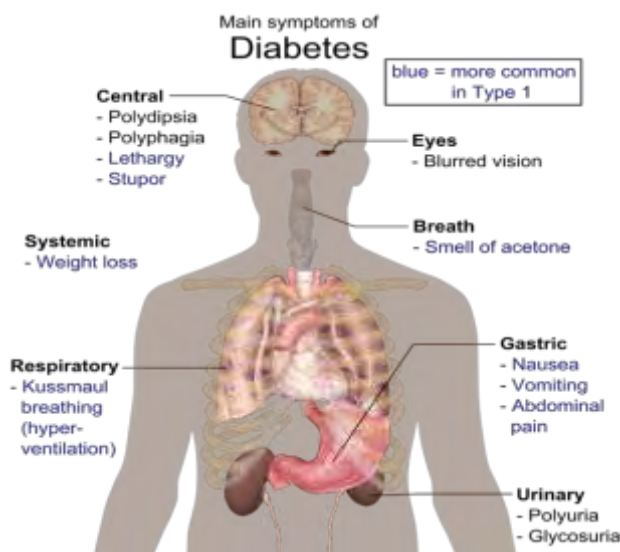
Πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του διαβήτη παίζει η εκπαίδευση του διαβητικού ασθενούς όσον αφορά στη διατροφή που πρέπει να ακολουθεί, στον έλεγχο του σακχάρου από τον ίδιο και στη χορήγηση ινσουλίνης. Η θεραπεία του νεανικού διαβήτη γίνεται με χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης. Η ινσουλίνη χορηγείται υποδόρια (κάτω από το δέρμα) με στυλό ή πένες ινσουλίνης εύκολα χωρίς καθόλου πόνο. Η χορήγηση ινσουλίνης είναι αποτελεσματική αλλά έχει ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως η υπογλυκαιμία (χαμηλή τιμή γλυκόζης). Η υπογλυκαιμία οφείλεται συνήθως σε χορήγηση μεγαλύτερης δόσης ινσουλίνης, λήψη μικρότερης ποσότητας τροφής ή υπερβολική άσκηση. Τις περισσότερες φορές μπορεί να την αντιμετωπίσει κανείς μόνος του με την πρόσληψη τροφής ή ζάχαρης (π.χ. γλυκά, καραμέλες, χυμοί φρούτων). Η μέτρηση του σακχάρου είναι απαραίτητη για το καθορισμό της σωστής δόσης ινσουλίνης αρκετές φορές μέσα στην ημέρα, και κυρίως σε νέους ανθρώπους που δεν έχουν καθορισμένο πρόγραμμα διατροφής και δραστηριότητας.⁴

1.2.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ2 (ΜΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΣ, NIDDM

Ο μη ινσουλινο-εξαρτώμενος ή διαβήτης τύπου 2 είναι η συχνότερη αιτία διαβήτη στους ενήλικους⁵. Ονομάζεται και μη ινσουλινοεξαρτώμενος γιατί η επιβίωση του ασθενούς δεν εξαρτάται από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης. Οι πάσχοντες από διαβήτη τύπου 2 αποτελούν το 90% του πληθυσμού των διαβητικών. Χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης και ελαττωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στη δράση της. Στα πρώτα στάδια της νόσου, η ελαττωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη είναι η κύρια διαταραχή, ενώ τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα είναι αυξημένα. Καθώς η ασθένεια προχωρά η παραγωγή ινσουλίνης μειώνεται και ο ασθενής χρειάζεται να παίρνει υποκατάστατα ινσουλίνης.

Τα κλασικά συμπτώματα του διαβήτη είναι η πολυουρία (συχνή ούρηση), η πολυδιψία (αυξημένη δίψα), η πολυφαγία (αυξημένη αίσθημα πείνας) και η απώλεια βάρους. Συχνά τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2 λείπουν τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 μπορεί να εμφανίσει σημαντικές επιπλοκές. Οι μακροπρόθεσμες επιπλοκές διαχωρίζονται σε μικροαγγειακές (Νεφροπάθεια, Αμφιβληστροειδοπάθεια, Νευροπάθεια) και μακροαγγειακές (Στεφανιαία νόσος, Αγγειακά Εγκεφαλικά επεισόδια, Περιφερική Αγγειοπάθεια).

Εικόνα 1: Κύρια συμπτώματα διαβήτη



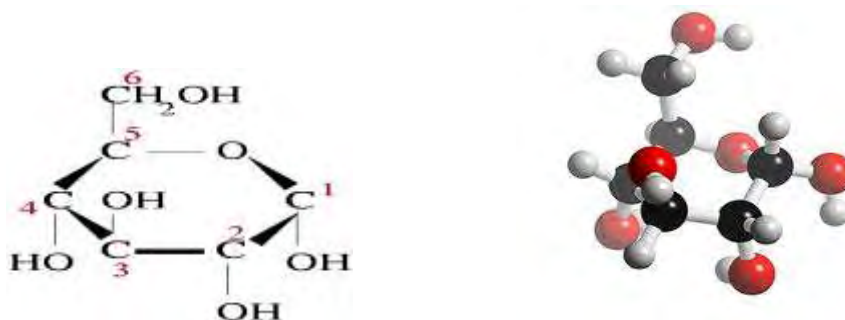
Η ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2 οφείλεται στο συνδυασμό γενετικών παραγόντων και τρόπου ζωής. Η παχυσαρκία και η διατροφή είναι σημαντικοί παράγοντες για την εμφάνιση της ασθένειας. Το πλεονάζον σωματικό λίπος συνδέεται με το 30% των περιστατικών της νόσου. Η βελτίωση της άσκησης και της διατροφής αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για τη θεραπεία του διαβήτη. Σημαντική είναι και η χορήγηση αντιδιαβητικών φαρμάκων όπως η μετφορμίνη ή ινσουλίνη.

1.3 ΓΛΥΚΟΖΗ

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης με τύπο $C_6H_{12}O_6$ ή $H-(C=O)-(CHOH)_5-H$, της οποίας πέντε υδροξυλικές (OH) ομάδες είναι τοποθετημένες με ένα ειδικό τρόπο κατά μήκος των έξι ατόμων άνθρακα του κορμού της. Είναι ένας από τους τρεις διατροφικούς μονοσακχαρίτες, μαζί με τη φρουκτόζη και τη γαλακτόζη, οι

οποίοι απορροφώνται άμεσα στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια της πέψης. Η γλυκόζη είναι ένα από τα κύρια προϊόντα της φωτοσύνθεσης και χρησιμοποιείται ως καύσιμο για κυτταρική αναπνοή.[6] Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη μερικές φορές αναφέρεται ως δεξτρόζη. Ο όρος δεξτρόζη προέρχεται από την «δεξιόστροφη» γλυκόζη. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϊδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη.

Εικόνα 2 :Δομή γλυκόζης (συντακτική και τρισδιάστατη δομή)



Χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας από τους περισσότερους οργανισμούς και αποτελεί σημαντικό ενεργειακό καύσιμο . Η κατανάλωση της γλυκόζης μπορεί να γίνεται είτε με αερόβια αναπνοή, αναερόβια αναπνοή ή ζύμωση. Στην αναερόβια αναπνοή ένα μόριο γλυκόζης παράγει ως καθαρό κέρδος δύο μόρια ATP και παράγονται και δυο μόρια πυροσταφυλικού. Στην αερόβια αναπνοή παράγεται ενεργειακό κέρδος 32 μόρια ATP. ⁶

Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η γλυκόζη είναι μια πρωταρχική πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλο και επομένως η διαθεσιμότητα της επηρεάζει ψυχολογικές διεργασίες. Όταν οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης είναι χαμηλές, οι ψυχολογικές διεργασίες που απαιτούν πνευματική προσπάθεια είναι μειωμένες. Εάν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα μειωθεί πολύ, τότε μειώνεται αντίστοιχα και η λειτουργία του εγκεφάλου. ⁷

Η γλυκόζη που βρίσκεται ελεύθερη στο σώμα προέρχεται: α) από τη γλυκόζη που απορροφήθηκε από την πέψη των υδατανθράκων β) από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου γ) άλλες ουσίες. Ο ρόλος της γλυκόζης στο σώμα περιλαμβάνει : α)την καύση της για την παραγωγή ενέργειας β) τη μετατροπή της σε γλυκογόνο που αποτελεί αποθήκη γλυκόζης και γ) τη μετατροπή της σε άλλες ουσίες απαραίτητες για τον οργανισμό (λίπος).⁸

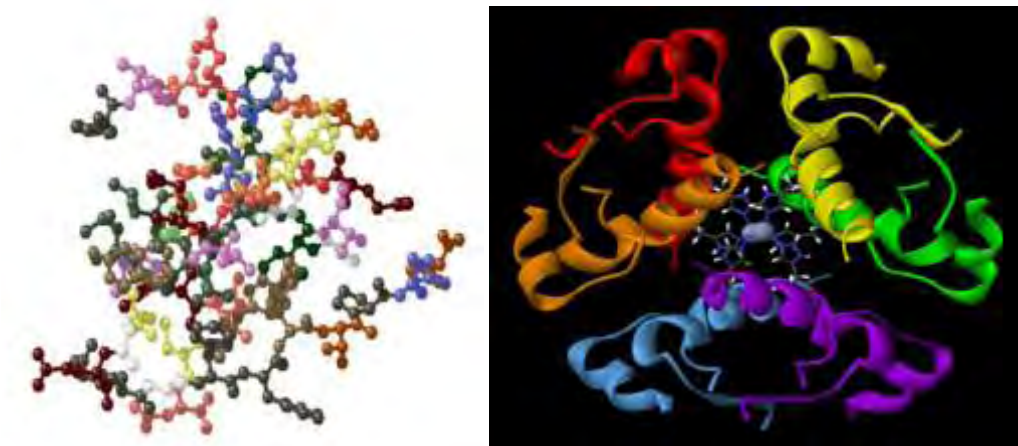
Η ομοιοστασία της γλυκόζης εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ και της χρησιμοποίησής της, τόσο από ισουλινεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο λιπώδης και ο μυϊκός ιστός, όσο και από μη ισουλινεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος και ο νεφρικός ιστός. Η συγκέντρωση της ινσουλίνης ελέγχεται από τις ορμόνες ινσουλίνη και γλυκαγόνη. Η ομοιοστασία της γλυκόζης επιτυγχάνεται με την ικανότητα του παγκρέατος να εκκρίνει ινσουλίνη αλλά και της ορμόνης να προωθεί την εναπόθεση της γλυκόζης στο ήπαρ⁷.

1.4 ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

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

Έχει μοριακό βάρος 6.000. Αποτελείται από μια α-αλυσίδα από 21 αμινοξέα και μια β-αλυσίδα από 30 αμινοξέα που συνδέονται με σουφρυδρλικούς δεσμούς. Ο πρόδρομος της ινσουλίνης στα β-κύτταρα είναι η προινσουλίνη στην οποία οι Α και Β αλυσίδες συνδέονται με ένα συνδετικό επίπεδο, το C, που στον άνθρωπο αποτελείται από 31 αμινοξέα. Το φυσιολογικό πάγκρεας παράγει 40 μονάδες ινσουλίνης την ημέρα.

Εικόνα 3: Η ανθρώπινη ινσουλίνη (και τρισδιάστατη μορφή της)



Οι δράσεις της ινσουλίνης είναι πολλαπλές:

A) στον μεταβολισμό των υδατανθράκων

Η γλυκόζη που απορροφάται από το αίμα μετά από γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες προκαλεί ραγδαία έκκριση ινσουλίνης. Η ινσουλίνη προκαλεί γρήγορη πρόσληψη και εναποθήκευση και χρησιμοποίηση της γλυκόζης από όλους τους ιστούς και κυρίως:

- Στο ήπαρ: η ινσουλίνη εναποθηκεύεται με τη μορφή του γλυκογόνου της γλυκόζης
- Στο λιπώδη ιστό: η ινσουλίνη προάγει τη μετατροπή της γλυκόζης του ήπατος σε λιπαρά οξέα τα οποία μεταφέρονται και εναποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό ως λίπος.
- Στους ιστούς: η ινσουλίνη προάγει τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης και την εναποθήκευση της με μορφή γλυκογόνου.

B) στο μεταβολισμό των λιπών

- Διεγείρει τη λιπογένεση και εμποδίζει τη λιπόλυση, αναστέλλοντας τη δράση της λιπάσης
- Αναστέλλει την κινητοποίηση των λιπών από τις λιποαποθήκες με άμεση συνέπεια την αύξηση του λίπους

Γ) στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών

- Διευκολύνει την είσοδο αμινοξέων στα κύτταρα του μυϊκού ιστού
- Αυξάνει τη σύνθεση των πρωτεϊνών και αναστέλλει την γλυκονεογένεση δηλαδή την παραγωγή γλυκόζης από πρωτεΐνες

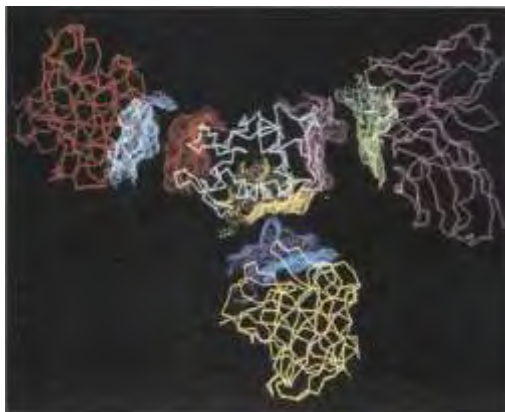
- Αυξάνει την πρόσληψη K^+ από τα λιπώδη και μυϊκά κύτταρα ⁸

Ο κύριος ρόλος της ινσουλίνης είναι να ελέγχει τα επίπεδα της γλυκόζης. Η έκκριση γλυκόζης προκαλεί άμεση αύξηση στην έξοδο ινσουλίνης, πιθανόν από απελευθέρωση προσχηματισμένης ορμόνης. Πιο παρατεταμένη έκθεση στη γλυκόζη προκαλεί αύξηση της σύνθεσης της ινσουλίνης. Αντίθετα, πτώση της γλυκόζης στο αίμα αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης. ⁶

1.5 ΓΛΥΚΑΓΟΝΗ

Η γλυκαγόνη είναι μία ορμόνη που παράγεται στο πάγκρεας από τα α-κύτταρα στα νησίδια του Langerhans. Είναι μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 29 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 3.485. Έχει αντίστροφη δράση από την ινσουλίνη και ο κύριος ρόλος της είναι η αύξηση της γλυκόζης στο αίμα. Η έκκρισή της ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυϊκή δραστηριότητα. Οι δράσεις της γλυκόζης στο μεταβολισμό είναι: (α) Έλεγχος της πρόσληψης ορισμένων ουσιών και κυρίως της γλυκόζης από τους μυϊκούς και τους λιπώδεις ιστούς. (β) Ενίσχυση των μηχανισμών αντιγραφής του DNA και της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω ελέγχου της πρόσληψης αμινοξέων. (γ) Τροποποίηση της δραστηριότητας πολλών ενζύμων. ⁹

Εικόνα 4 :Δομική αναπαράσταση της Γλυκαγόνης



Η γλυκόζη αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα ρύθμισης της γλυκαγόνης στο αίμα. Σε κατάσταση υπογλυκαιμίας αυξάνεται η παραγωγή προκειμένου να αυξήσει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η γλυκαγόνη ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης με δυο τρόπους: α) με διάσπαση του γλυκογόνου του ήπατος β) αύξηση της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ. ¹⁰

1.6 ΓΛΥΚΟΓΟΝΟ

1.6.1 ΔΟΜΗ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

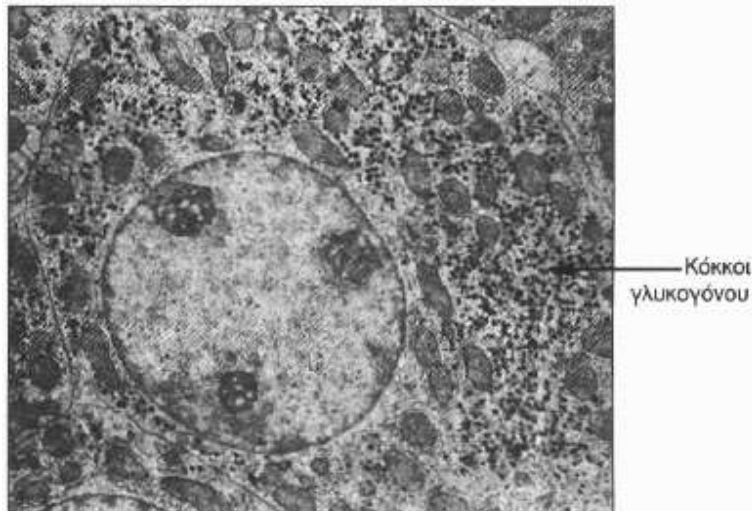
Το γλυκογόνο είναι μια άμεση κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Είναι ένα μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όταν χρειάζεται ενέργεια. Τα περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης στο γλυκογόνο συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4. Οι διακλαδώσεις που απαντούν σε κάθε δέκατο κατάλοιπο σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6. Το γλυκογόνο είναι αποταμιευτική ουσία των ζώων και των μυκήτων. Ιδιαίτερα πλούσιοι σε γλυκογόνο είναι οι σκελετικοί μυς και το ήπαρ. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στα ηπατικά κύτταρα είναι υψηλότερη από ότι στα μυϊκά, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο. Αυτό βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή κόκκων διαμέτρου 100 έως 400 Å που περιέχουν τα ένζυμα τα οποία καταλύουν τη σύνθεση και την αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Ο μεγάλος αριθμός των διακλαδώσεων του γλυκογόνου έχει ιδιαίτερη σημασία από φυσιολογική άποψη. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται πολλά ελεύθερα άκρα, στα οποία προσκολλώνται τα πλεονάζοντα μόρια της γλυκόζης που αποθηκεύεται προσωρινά και από τα οποία μπορεί να αρχίσει συγχρόνως η απομάκρυνση μορίων γλυκόζης όταν οι ανάγκες του οργανισμού το απαιτούν.^{6, 11}

Το γλυκογόνο είναι ένα σημαντικό απόθεμα καύσιμων μορίων για διάφορους λόγους. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος αυτός του γλυκογόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικός, διότι η γλυκόζη ουσιαστικά είναι το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό,τι στους μυς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο.

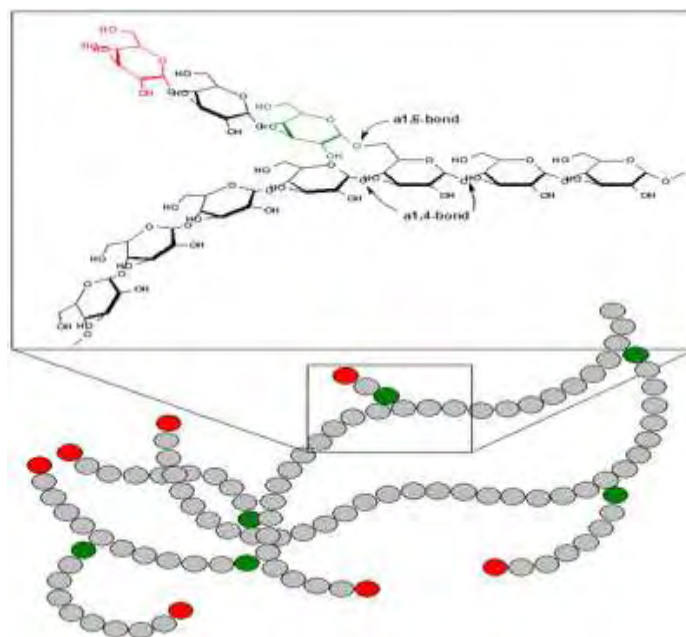
Στο ήπαρ η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως σύνολο. Αντίθετα στους μύες

οι διαδικασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μόνο.⁶

Εικόνα 5 : Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ενός ηπατικού κυττάρου. Τα πυκνά σωμάτια του κυτταροπλάσματος αποτελούν τους κόκκους του γλυκογόνου.



Εικόνα 6 : Η δομή του γλυκογόνου



1.6.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

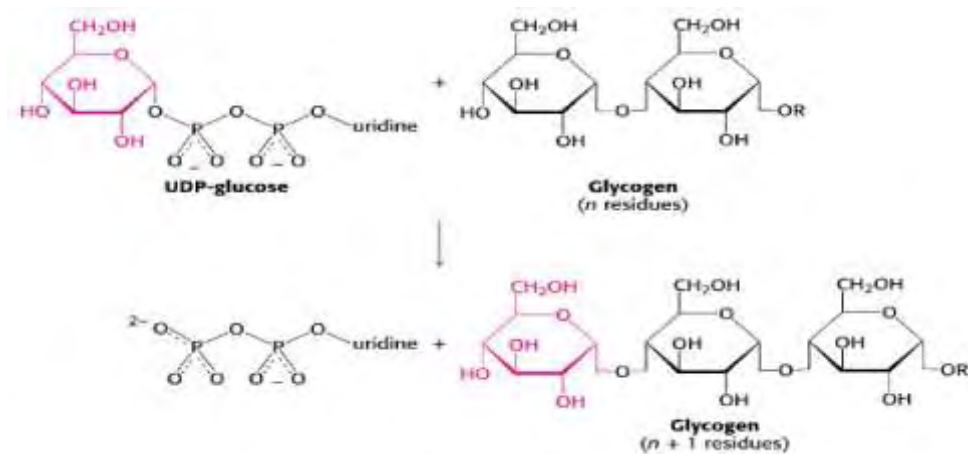
Το 1957, ο Luis Leloir και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το γλυκογόνο συντίθεται με μια πορεία που χρησιμοποιεί ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (**UDP-Γλυκόζη**). Είναι μια ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης και συντίθεται από 1-

φωσφορική γλυκόζη και τριφωσφορική ουριδίνη(UTP) σε μια αντίδραση που καταλύεται από την πυροφωσφορυλάση της UDP-Γλυκόζης. Η **συνθάση του γλυκογόνου** είναι το καθοριστικό ένζυμο στη σύνθεση του γλυκογόνου.



Η συνθάση του γλυκογόνου μπορεί να προσθέσει κατάλοιπα γλυκόζης μόνο εάν η πολυσακχαριτική αλυσίδα περιέχει περισσότερα από τέσσερα κατάλοιπα. Για να ξεκινήσει η σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται ένας εκκινητής και αυτό επιτυγχάνεται με τη γλυκογονίνη. Αυτή είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες 37 kD ,κάθε μια από τις οποίες περιέχει έναν ολιγοσακχαρίτη αποτελούμενο από γλυκόζες με δεσμούς α-1,4. Η δραστηριότητα της συνθάσης του γλυκογόνου ρυθμίζεται με ομοιοπολική τροποποίηση. Το ένζυμο φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλές θέσεις με την πρωτεϊνική κινάση A και άλλες κινάσες. ⁶

Εικόνα 7 : Συνθετική πορεία του γλυκογόνου



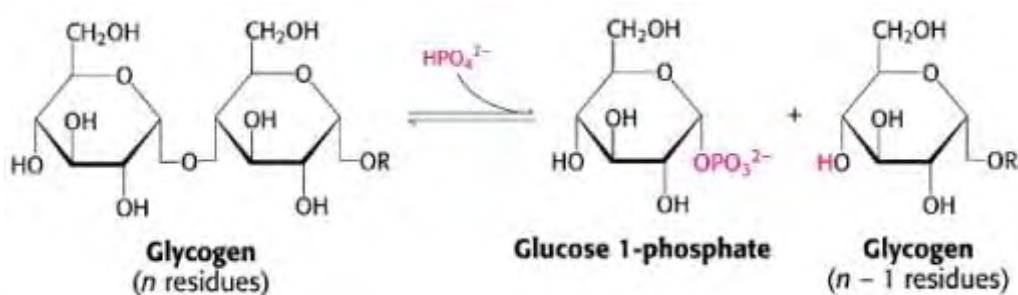
1.6.3 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936. Η *φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)* διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού (Pi), προς απόδοση *1-φωσφορικής γλυκόζης*. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση. Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του

μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται ⁶.



Εικόνα 8 : Αποικοδόμηση γλυκογόνου



Κατά την αποικοδόμηση του γλυκογόνου απελευθερώνονται μονάδες 1-φωσφορικής γλυκόζης, οι οποίες μετατρέπονται σε 6-φωσφορική γλυκόζη με τη βοήθεια του ενζύμου *φωσφογλυκομουτάση*. Η φωσφορυλιωμένη γλυκόζη, σε αντίθεση με τη γλυκόζη, δε διαχέεται έξω από τα κύτταρα. Το ήπαρ περιέχει ένα υδρολυτικό ένζυμο, τη φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, το οποίο απομακρύνει τη φωσφορική ομάδα της 6-φωσφορικής γλυκόζης, που παράγεται κατά τη διάσπαση του γλυκογόνου, και έτσι ελευθερώνει τη γλυκόζη στο αίμα. Επίσης, η 6-φωσφορική γλυκόζη μπορεί να αποτελεί υπόστρωμα για τη γλυκόλυση ή να υφίστανται επεξεργασία με την πορεία των φωσφορικών πεντοζών προς απόδοση NADPH και παραγώγων της ριβόζης.

Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου είναι το *ήπαρ* και οι *σκελετικοί μύες*. Η συγκέντρωσή του είναι υψηλότερη στο ήπαρ παρά στους μύες. Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6 Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια

υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου ⁶.

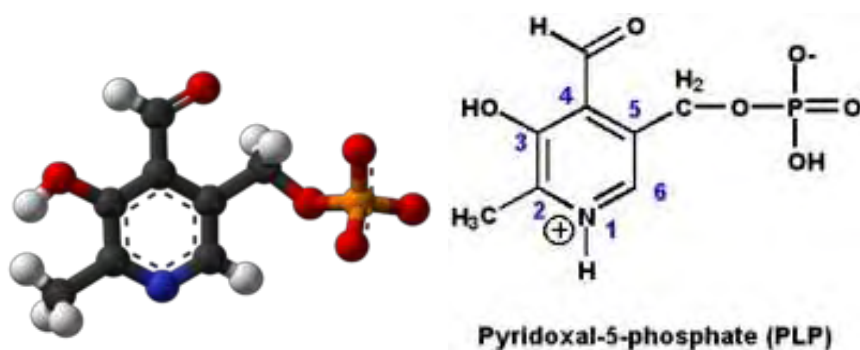
1.6.4 ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο, που βρίσκεται σε τρεις ισομορφές στο ήπαρ στους μυς και στον εγκέφαλο. Η GP είναι το βασικό ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση το γλυκογόνου για να παραχθεί 1-φωσφορική γλυκόζη. Στους μυς, η 1-φωσφορική γλυκόζη χρησιμοποιείται μέσω της γλυκόλυσης για να παραχθεί ενέργεια για τον μεταβολισμό. Στο ήπαρ, η 1-φωσφορική γλυκόζη με τη βοήθεια του ενζύμου φωσφογλυκομουτάση μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη και στη συνέχεια σε γλυκόζη που χρησιμοποιείται για τις ανάγκες άλλων ιστών και ιδιαίτερα του νευρικού συστήματος. Η GP υπάρχει σε δύο καταστάσεις την T (ενεργός τεταμένη κατάσταση) και R (ενεργός χαλαρή κατάσταση).^{12 13}

Είναι ένα διμερές που αποτελείται από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες MB 97.5 kD. και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα.[17] Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε μια αμινο-τελική δομική περιοχή(480) κατάλοιπα που περιέχει μια θέση πρόσδεσης γλυκογόνου και μια καρβοξυ-τελική δομική περιοχή (360 κατάλοιπα). Το καταλυτικό κέντρο εντοπίζεται σε μια βαθιά σχισμή που σχηματίζεται με κατάλοιπα από τις αμινο- και καρβοξυ- τελικές περιοχές.

Η βιταμίνη B6 αποτελεί σύμπλεγμα 6 βιταμινών πυριδοξίνης, πυριδοξάλης, πυριδοξαμίνης και των αντίστοιχων φωσφορικών εστέρων. Από τις 6 βιταμίνες B6, η πιο σημαντική ποσοτικά και βιολογικά είναι **η φωσφορική πυριδοξάλη**. Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) αποτελεί συμπράγοντα πολλών ενζύμων στα οποία περιλαμβάνονται οι τρανσαμινάσες, οι αποκαρβοξυλάσες των α-αμινοξέων και η γλυκογονική φωσφορυλάση.⁶

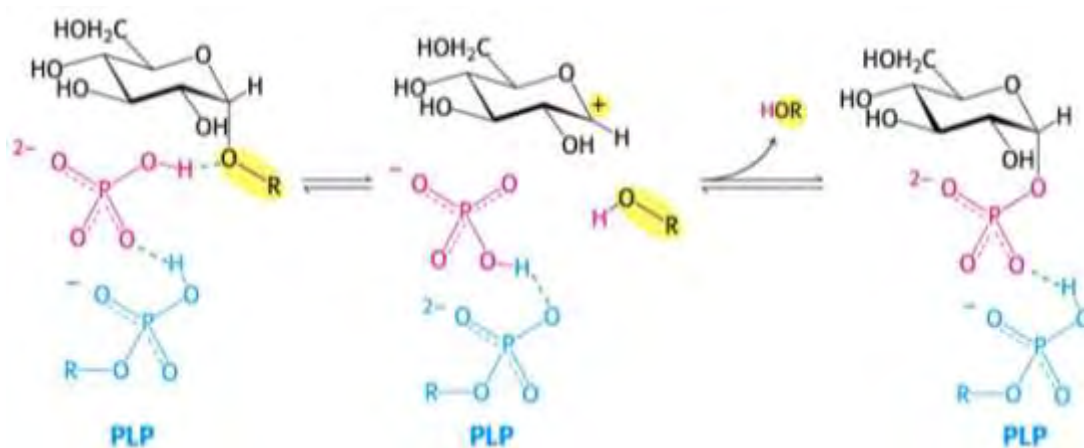
Εικόνα 9 : τρισδιάστατη και συντακτική δομή της PLP



Η διάσπαση του γλυκογόνου πρέπει να γίνει φωσφορλυτικά και όχι υδρολυτικά ώστε να εξοικονομήσει το ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης και για αυτό χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο.

Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1(ο χαρακτηρισμός α σημαίνει ότι το άτομο οξυγόνου που συνδέεται με τον C-1 είναι κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Μια προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν.⁶

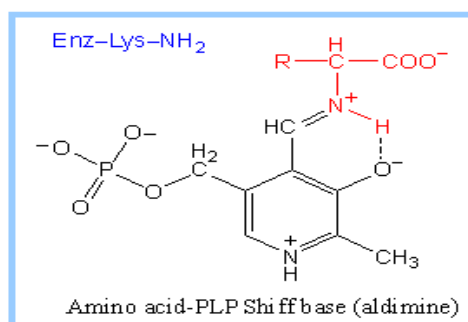
Εικόνα 10 : Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.



Μια προσδεμένη ομάδα HPO_4^{2-} (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζυτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου από τη πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης.

Ο μηχανισμός της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου απαιτεί φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), ένα παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6). Η αλδεϋδική ομάδα του συνενζύμου αυτού σχηματίζει μια βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα μιας συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου. Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης.⁶

Εικόνα 11: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η φωσφορική πυριδοξάλη σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης.



Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ρυθμίζεται με διάφορους αλλοστερικούς τελεστές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, όπως επίσης με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση, ως απόκριση σε ορμονικά σήματα όπως της ινσουλίνης, της γλυκαγόνης και της επινεφρίνης. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου εμφανίζει διαφορές ανάμεσα στους σκελετικούς μυς και στο ήπαρ. Οι διαφορές

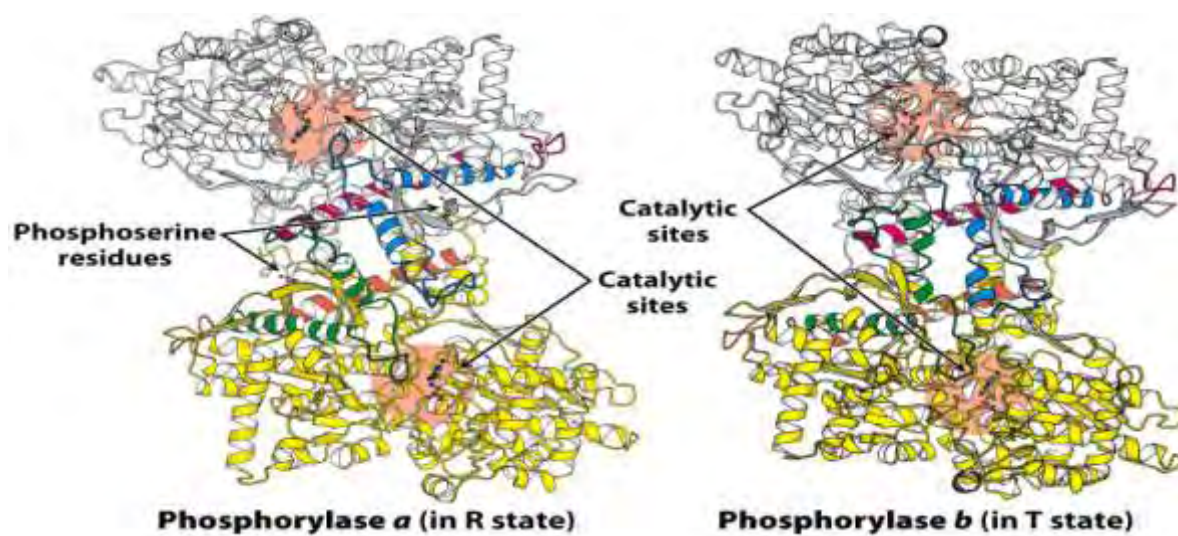
οφείλονται στο γεγονός ότι οι μυς χρησιμοποιούν τη γλυκόζη για να παράγουν ενέργεια, ενώ το ήπαρ διατηρεί την ομοιοστασία της γλυκόζης του οργανισμού.⁶

1.6.5 ΜΥΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Υπάρχει σε δυο μορφές που είναι μια συνήθως ενεργό φωσφορυλάση α και μια συνήθως ανενεργό φωσφορυλάση b. Κάθε μια από τις δυο αυτές μορφές βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργούς κατάστασης R και μιας λίγο ενεργούς κατάστασης T. Η ισορροπία για τη φωσφορυλάση α ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T.⁶

Η φωσφορυλάση α και b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η ενεργότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση του καταλοίπου σερίνης 14 από την *κινάση της φωσφορυλάσης*, η οποία μετατρέπει τη φωσφορυλάση b σε α. Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση α) συνεπάγεται δομικές αλλαγές στις α- έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη.

Εικόνα 12: Οι δομές της φωσφορυλάσης α και b.



Η φωσφορυλάση α είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή R διαμόρφωση. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση

φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση β δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται κυρίως στην T διαμόρφωση.

Στη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η μετάβαση από την κατάσταση T στην R μέσω φωσφορυλίωσης επάγει σημαντική αλλαγή στη τεταρτοταγή δομή του ενζύμου που οδηγεί σε περιστροφή της κάθε υπομονάδας κατά 5 μοίρες γύρω από έναν άξονα στην επιφάνεια του διμερούς. Στην κατάσταση T του ενζύμου δεν υπάρχει πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο από την επιφάνεια καθώς αυτό εμποδίζεται από το βρόχο 280s. Στη μετάβαση από τη T στη R κατάσταση ο βρόχος 280s καταστρέφεται και αντικαθίσταται, δημιουργώντας ένα κανάλι που επιτρέπει το γλυκογόνο να φτάσει στην ενεργό περιοχή από την επιφάνεια.^{14 15}

Κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη έξι κέντρων σύνδεσης:

- ✓ Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- ✓ Αλλοστερικό κέντρο (N)
- ✓ Καταλυτικό κέντρο
- ✓ Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- ✓ Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- ✓ Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων).^{15 16}

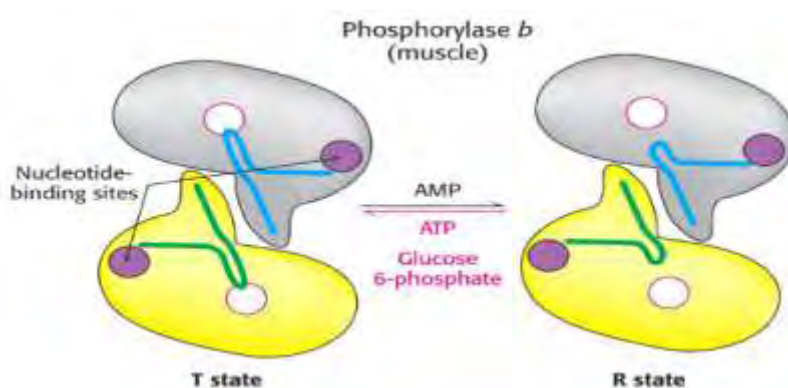
Εικόνα 13 :Σχηματική απεικόνιση του διμερούς μορίου της GPb



Στην παραπάνω εικόνα βλέπουμε τις θέσεις του καταλυτικού, του αλοστερικού, του κέντρου πρόσδεσης του αναστολέα και του νέου αλοστερικού κέντρου.¹⁵

Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Το ATP δρα ως αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος το AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια. ⁶

Εικόνα 14 : Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί την μετάβαση στη μορφή R.



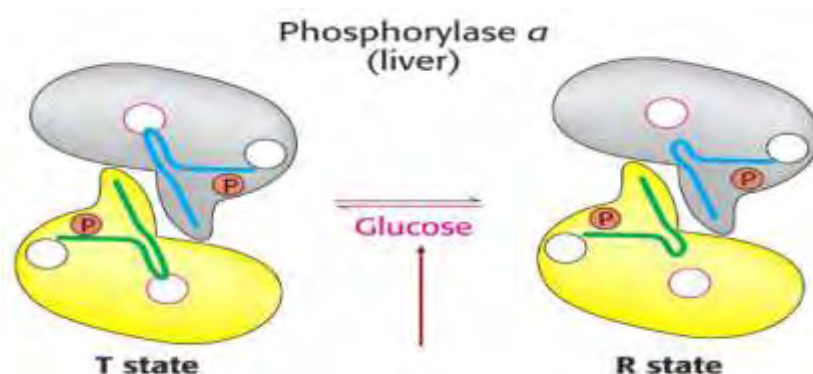
Πηγή : Google

1.6.6 ΗΠΑΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Η ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση a αλλά όχι και η b παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης a από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε

ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο.⁶

Εικόνα 15 : Αλλοστερική ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης



Η πρόσδεση της γλυκόζης στη φωσφορυλάση α μετατοπίζει την ισορροπία προς την κατάσταση T και απενεργοποιεί το ένζυμο. Έτσι το γλυκογόνο δεν κινητοποιείται όταν η γλυκόζη είναι ήδη σε αφθονία.

1.7 ΚΕΝΤΡΑ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

❖ Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

Το κέντρο αυτό είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή α στη μορφή β. Εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων. Η Ser 14 φωσφορυλιώνεται και οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο του ενζύμου.⁶

❖ Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από την Ser14. Το αλλοστερικό κέντρο δεσμεύει τον αλλοστερικό ενεργοποιητή AMP, που βρίσκεται στη διεπιφάνεια των υπομονάδων 30 Å από το καταλυτικό κέντρο. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι αποτελείται από 3 υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

- Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων ριβόζης
- Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων πουρίνης

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο, είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, G1P, Pi, SO_4^{2-}), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου.^{17 18}

❖ Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε με κρυσταλλογραφικές μελέτες. Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή στο κέντρο του μορίου σε μια απόσταση 15 Å από την επιφάνεια και κοντά στο συνένζυμο PLP. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στο κέντρο του μονομερούς, όπου οι επικράτειες 1 (κατάλοιπα 1-484) και 2 (κατάλοιπα 485-842) ενώνονται. Το κέντρο αυτό έχει έντονα ερευνηθεί με αναστολείς αναλόγων γλυκόζης που συνδέονται σε αυτή την περιοχή και προωθεί την κατάσταση T με σταθεροποίηση της θέσης του βρόχου 280s. Από τη μετάβαση από την T κατάσταση στην R, ο βρόχος 280s παρεμποδίζεται και αντικαθίσταται και δημιουργεί μια δίοδο που επιτρέπει την είσοδο του Arg569 στο καταλυτικό κέντρο. Αυτό δημιουργεί το κέντρο αναγνώρισης για τη φωσφατάση που, επίσης, επιτρέπει την πρόσβαση του γλυκογόνου στο καταλυτικό κέντρο.^{18 19}

❖ Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε μια σχισμή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας.^{17, 18}

❖ Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτικό κέντρο)

Είναι ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και απόσταση 12 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και δεσμεύει κατάλοιπα πουρινών, νουκλεοτίδια ή νουκλεοσίδια. Στην T διαμόρφωση του ενζύμου, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχθεί ότι: πουρίνες όπως η αδερίνη, νουκλεοσίδια όπως η αδενοσίνη και η ινωσησίνη, φωσφονουκλεοτίδια όπως το AMP, το IMP και το ATP, το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σωμάτια, συνδέονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GPα και GPβ, όχι όμως και στη ηπατική GPα, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα.¹⁸

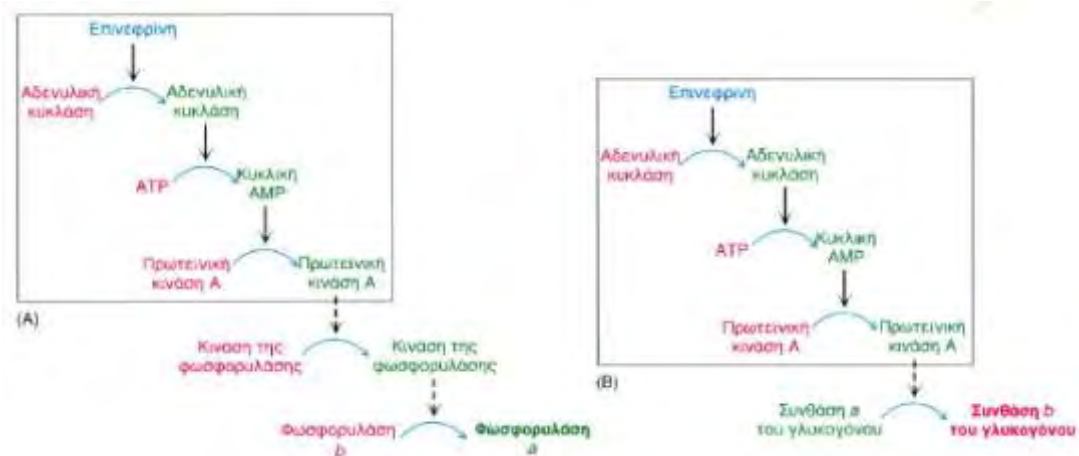
1.8 Η ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΚΑΙ Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΝΤΑΙ ΑΝΤΙΡΡΟΠΑ

Η πρωτεϊνική κινάση A ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και παράγεται γλυκογόνο. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου επηρεάζεται από ορισμένες ορμόνες όπως η γλυκαγόνη και η επινεφρίνη. Η μυϊκή δραστηριότητα ή η αναμονή της οδηγούν σε απελευθέρωση από το μυελό των επινεφριδίων επινεφρίνης (αδρεναλίνης), μιας κατεχολαμίνης που προκύπτει από τυροσίνη. Η επινεφρίνη διεγείρει σε μεγάλο βαθμό στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου στους μυς και σε μικρότερο βαθμό στο ήπαρ. Το ήπαρ είναι περισσότερο ευαίσθητο στη γλυκαγόνη που παράγεται από τα α-κύτταρα του παγκρέατος, όταν η συγκέντρωση του σακχάρου είναι χαμηλή.⁶

Οι ορμόνες, γλυκαγόνη και η επινεφρίνη, δίνουν το έναυσμα για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σύμφωνα με το *καταρράκτη της κυκλικής AMP*.

- Η επινεφρίνη προσδένεται στον αδρενεργικό υποδοχέα β στους μυς, ενώ η γλυκαγόνη προσδένεται στον υποδοχέα της γλυκαγόνης. Η πρόσδεση αυτή ενεργοποιεί την υπομονάδα α της ετερομερούς πρωτεΐνης Gs.
- Η υπομονάδα α της Gs που δεσμεύει, ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία καταλύει τον σχηματισμό του δεύτερου αγγελιοφόρου της κυκλικής AMP από ATP
- Η αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση της κυκλικής AMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A.
- Η πρωτεϊνική κινάση A φωσφορυλιώνει την υπομονάδα β της κινάσης της φωσφορυλάσης, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Εικόνα 16 : Συντονισμένος έλεγχος του μεταβολισμού του γλυκογόνου.



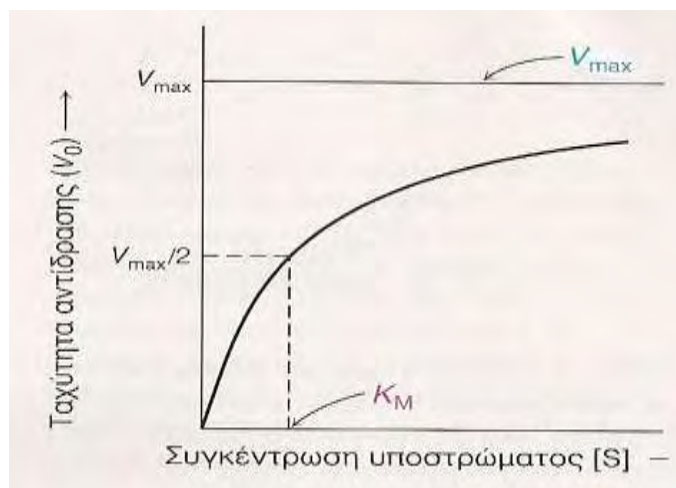
Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται με καταρράκτες κυκλικής AMP με ορμονικό έναυσμα: Α) αποικοδόμηση του γλυκογόνου β) σύνθεση του γλυκογόνου. Οι ανενεργές μορφές δείχνονται με κόκκινο και οι ενεργές με πράσινο. Η αλληλουχία των αντιδράσεων που οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης Α είναι η ίδια στη ρύθμιση της αποικοδόμησης και τη σύνθεσης του γλυκογόνου. Η κινάση της φωσφορυλάσης απενεργοποιεί επίσης τη συνθάση του γλυκογόνου.

Η πρωτεϊνική κινάση Α πέρα ότι ενεργοποιεί και φωσφορυλιώνει την κινάση της φωσφορυλάσης, προσθέτει και μια φωσφορική ομάδα στη συνθάση του γλυκογόνου. Έτσι, μειώνεται η ενζυμική δραστηριότητα. Το αποτέλεσμα είναι να εμποδίζεται η σύνθεση του γλυκογόνου ταυτόχρονα με την αποικοδόμηση του.

1.9 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ

Η πρωταρχική λειτουργία των ενζύμων είναι να αυξάνουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων έτσι ώστε να είναι συμβατές με τις ανάγκες του οργανισμού. Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης V_0 , η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο, μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$. Η ταχύτητα της κατάλυσης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος.⁶

Εικόνα 17 :Κινητική Michaelis-Menten.



Ένα διάγραμμα της ταχύτητας (V_0) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$, για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά Michaelis (K_M) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με $V_{max}/2$.

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_M , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}).

Η εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{MAX} \left(\frac{[S]}{K_M + [S]} \right)$$

- i. V_0 η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης
- ii. $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος,
- iii. V_{MAX} η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε
- iv. K_M η σταθερά Michaelis.

Από την εξίσωση Michaelis-Menten προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το

διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας, V_0 , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, είναι μια *ορθογώνια υπερβολή*.

Το 1913, ο Leonor Michaelis και η Maud Menten πρότειναν ένα απλό μοντέλο που εξηγεί αυτά τα κινητικά χαρακτηριστικά. Το κρίσιμο χαρακτηριστικό στη συμπεριφορά των ενζύμων είναι ότι ένα ειδικό σύμπλοκο ES είναι το αναγκαίο ενδιάμεσο στην κατάλυση. Το μοντέλο που προτάθηκε, το οποίο είναι το απλούστερο που εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων, είναι:



Από την παραπάνω σχέση προκύπτει μια σταθερά, η σταθερά Michaelis-Menten, η οποία ορίζεται ως εξής:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{ή} \quad K_M = \frac{[E] + [S]}{[ES]}$$

Η σταθερά Michaelis είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Έτσι έχουμε μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Οι καταλυτικές σταθερές K_M και V_{MAX} είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή K_M για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα αλλά και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως: το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Για τα περισσότερα ένζυμα, η K_M έχει τιμές μεταξύ 10^{-1} και 10^{-7} .

Οι κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων δε μπορούν να εξηγηθούν με το μοντέλο Michaelis –Menten. Τα *αλλοστερικά* ένζυμα είναι μια ομάδα ενζύμων που δεν υπακούουν στην κινητική Michaelis –Menten. Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες και πολλαπλά ενεργά κέντρα. Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν συχνά σιγμοειδείς γραφικές παραστάσεις της ταχύτητας V_0 σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$. Στα αλλοστερικά ένζυμα, η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες των άλλων ενεργών κέντρων στο ίδιο μόριο. Η πρόσδεση του υποστρώματος γίνεται

συνεργειακά, δηλαδή η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο διευκολύνει την πρόσδεση στα άλλα ενεργά κέντρα.

Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Αυτός ο τρόπος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας παίζει τον ρόλο του κύριου μηχανισμού ελέγχου στα βιολογικά συστήματα. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε **αντιστρεπτή** είτε **μη αντιστρεπτή**. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, καθώς συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Αντιθέτως, η αντιστρεπτή αναστολή χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα.⁶

Στην κλασική ενζυμική κινητική διακρίνονται διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής όπως⁶:

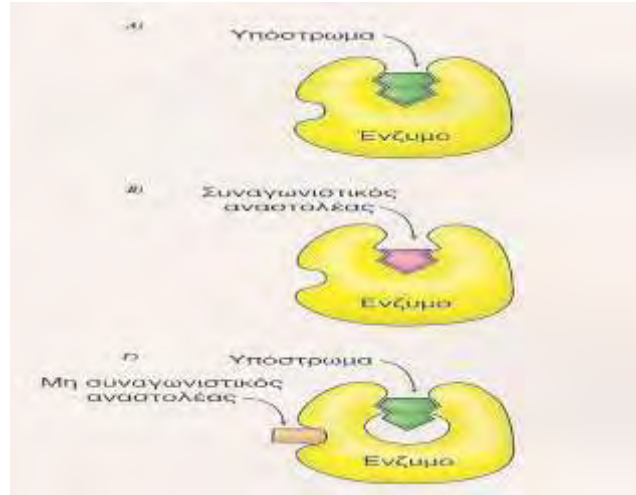
- ✓ Στη **συναγωνιστική αναστολή** το ένζυμο (E) μπορεί να προσδέσει το υπόστρωμα (ES) ή τον αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο μαζί (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ο συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα σε ένα υπόστρωμα.
- ✓ Στη **μη συναγωνιστική αναστολή**, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδεθούν ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου (ESI) σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης. Ο μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Έτσι, η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Τα είδη αναστολής είναι:

1. **Συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition)** στην οποία αντί ο αναστολέας να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ενζύμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή.
2. **Μικτή αναστολή (mixed inhibition)** σε αυτούς τους αναστολείς οι σταθερές διαστάσεως του S από το ES διαφέρουν με εκείνη του S από το EIS

3. **Ανταγωνιστική αναστολή (uncompetitive inhibition)** σε αυτή την περίπτωση αναστολής η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος. ⁶

Εικόνα 18 : Διάκριση μεταξύ ενός συναγωνιστικού και ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα.



A) Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος B) Συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου και εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος . Γ) Μη συναγωνιστικός αναστολέας δεν εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος

1.9.1 ENZYMIKH ANASTOLH

Στη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για το ενεργό κέντρο. Η σταθερά διάστασης για τον αναστολέα δίνεται από τη σχέση:

$$K_i = [E][I]/[EI]$$

Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή της (V_{max}), γιατί αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Η σφραγίδα γνησιότητας της συναγωνιστικής αναστολής είναι ότι μπορεί να υπερνικηθεί από αρκετά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος. Έτσι, η φαινομενική τιμή της K_M μεταβάλλεται. Αυτή η τιμή της K_M δίνεται από τη σχέση:

$$K^{app} = K_M (1 + [I]/K_i)$$

- ❖ [I] είναι η συγκέντρωση του αναστολέα
- ❖ K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος

Όταν αυξάνεται η τιμή $[I]$, αυξάνεται και η τιμή K^{app} . Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια V_{max} όταν υπάρχει ή δεν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας.

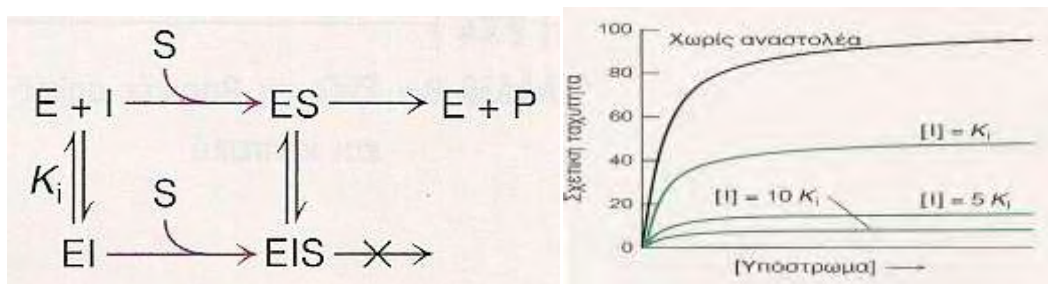
Εικόνα 19 :Κινητική ενός συναγωνιστικού αναστολέα.



Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί η μέγιστη ενζυμική ταχύτητα. Η πορεία της αντίδρασης υποδηλώνει πόσο υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να υπερνικηθεί η συναγωνιστική αναστολή.

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα. Όμως, το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Η τιμή της V_{max} ελαττώνεται σε μια νέα τιμή που ονομάζεται V^{app} ενώ δεν αλλάζει η τιμή της K_M . Η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.⁶

Εικόνα 20 : Κινητική ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα.



Η πορεία της αντίδρασης δείχνει ότι ο αναστολέας προσδένεται και στο ελεύθερο ένζυμο και στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Συνεπώς, η ταχύτητα δεν μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή V_{max} , ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος.

1.9.2 PYRACANTHA COCCINEA

Είναι μια ποικιλία φυτού που εμφανίστηκε στην Ευρώπη και καλλιεργήθηκε από το 16^ο αιώνα. Το φυτό έχει μικρά άσπρα λουλούδια σε συστάδες και παράγει μικρά κόκκινα μούρα. Ο καρπός είναι πικρός και πτητικός και είναι μη φαγώσιμος εάν δεν κατεργαστεί. Χρησιμοποιείται σε μαρμελάδες, σως και σάλτσες στη μαγειρική. Η καλλιέργειά του γίνεται από τη Βόρεια Ευρώπη μέχρι τη Νότια Ασία.

Έχει σκληρά και ακανθώδη κλαδιά αλλά και πράσινο σκούρο φύλλωμα. Η άνθιση των λουλουδιών γίνεται από τέλη Μαΐου μέχρι αρχές Ιουνίου ενώ ο καρπός έχει χρώμα κόκκινο προς πορτοκαλί και ωριμάζει στα τέλη Σεπτεμβρη. Επίσης, οι καρποί διατηρούνται για μικρό χρονικό διάστημα το χειμώνα. Οι καρποί του είναι σε συστάδες και είναι έντονα εμφανίσιμοι.²⁰

Εικόνα 21 : το λουλούδι των *Pyracantha coccinea*



Οι ευνοϊκές συνθήκες για την καλλιέργεια και για την καρποφορία του φυτού είναι η ηλιοφάνεια και η ελάχιστη υγρασία του εδάφους αλλά το φυτό εμφανίζει ανθεκτικότητα στη σκιά. Ανήκει στα αειθαλή και τα φύλλα του είναι στενά με έντονα σκούρο χρώμα και ποικίλη διάταξη .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A) Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού πραγματοποιείται με την κατά κάποιο τρόπο τροποποιημένη μέθοδο Fischer & Krebs (1962). Συγκεκριμένα, γίνεται χρήση της 2-μερκαπτο-αιθανόλης ως αναγωγικός παράγοντας αντί της L-κυστεΐνης καθ' όλη την πορεία καθαρισμού.

Βήμα 1^ο : Παραλαβή μυϊκού εκχυλίσματος

ΥΛΙΚΑ

- 2-4 κουνέλια
- Μαχαίρι
- Ξύλινη βάση
- Δοχεία 20 Lt (κουβάδες)
- Γάζα
- Υαλοβάμβακας
- Μεγάλα tubes φυγοκέντρησης
- Αντλία κενού
- Χάρτινα φίλτρα
- Ογκομετρικός κύλινδρος 2 Lt
- Πάγος
- CH₃COOH 1 N
- Κεκορεσμένο διάλυμα KHCO₃
- Διάλυμα 90 % w/v (NH₄)₂SO₄

Ο μυϊκός ιστός λαμβάνεται από τα πίσω πόδια καθώς και από τους ραχιαίους μυς κοντά στη σπονδυλική στήλη από 3-4 κουνέλια και τοποθετείται αμέσως σε πάγο. Στη συνέχεια, ομογενοποιείται σε κρεατομηχανή, ζυγίζεται και επανατοποθετείται σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η άλεση όλου του ιστού. Ο κιμάς

εκχυλίζεται με απιονισμένο ύδωρ τρεις φορές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε χρονικό διάστημα τριάντα λεπτών. Το εκχύλισμα διηθείται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

Βήμα 2^ο: Οξινή καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Ρύθμιση του pH του ψυχρού εκχυλίσματος σε 5.1 – 5.2 με προσθήκη 1 N CH₃COOH υπό ελαφρά ανάδευση. Η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνει κατά τη ρύθμιση του pH εξαιτίας της κατακρήμνισης διάφορων πρωτεϊνών. Το εκχύλισμα αφήνεται σε πάγο για πέντε λεπτά. Στη συνέχεια, απομακρύνουμε τις πρωτεΐνες που καταβυθίστηκαν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 4.225 rcf για τριάντα λεπτά. Η φυγοκέντρηση γίνεται με τη χρήση της μεγάλης κεφαλής της ψυχομένης φυγοκέντρου.

Μετά, έγινε διήθηση του υπερκείμενου υγρού με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί Buchner εν ψυχρώ για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Η συσκευή διήθησης αποτελείται από χωνί Buchner, κωνική φιάλη δύο λίτρων ή οποία πρέπει να βρίσκεται μέσα σε μία λεκάνη με πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της διήθησης, λαστιχάκι συνδεδεμένο με την αντλία κενού και χάρτινα φίλτρα. Η διαδικασία ξεκινά με την τοποθέτηση δύο χάρτινων φίλτρων στο χωνί Buchner και τη δημιουργία κενού με την λειτουργία της αντλίας κενού. Σταδιακά μικροί όγκοι εκχύνονται από τα δοχεία της φυγοκέντρου στο χωνί Buchner. Τα χάρτινα φίλτρα αλλάζουν μετά την απόχυση του περιεχομένου δύο δοχείων της φυγοκέντρου στο χωνί Buchner. Όταν ο όγκος του διαλύματος μέσα στην φιάλη γίνει περίπου 1.5 λίτρα αφαιρείται πρώτα το λάστιχο που συνδέει την κωνική φιάλη με την αντλία κενού ώστε να αποφευχθεί αναρρόφηση και ο όγκος του υγρού μετράται με ογκομετρικό κύλινδρο και φυλάσσεται σε δοχείο των 20 λίτρα εν ψυχρώ. Η διήθηση με τη χρήση της συσκευής Buchner συνεχίζεται για το συνολικό όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος. Τέλος, έγινε ρύθμιση του pH του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος σε 6.8 με τη χρήση του κεκορεσμένου διαλύματος KHCO₃.

Αρχικά, έγινε ρύθμιση του pH του διαλύματος του θειικού αμμωνίου σε 6.8 με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνής αμμωνίας (NH₄OH). Ο όγκος του διαλύματος του θειικού αμμωνίου που χρησιμοποιήσαμε ήταν ίσο με τον όγκο του εκχυλίσματος πολλαπλασιασμένο με 0,837 και προστίθεται στο πρωτεϊνικό διάλυμα

αργά και με συνεχή ανάδευση και μετά αφήνεται στο ψυκτικό θάλαμο για ένα εικοσιτετράωρο.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση του ενζύμου με θεικό αμμώνιο (90%)

ΥΛΙΚΑ

- Αντλία κενού
- Μεγάλα tubes φυγοκέντρησης
- Σακουλάκια διαπίδυσης

Διάλυμα Tris 2M (20 mL χωρίς ρύθμιση pH)

Αρχικά, αποχύσαμε το μεγαλύτερο όγκο του υπερκείμενου διαλύματος με τη χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 5110 rcf επί 40 λεπτά με τη χρήση της μεγάλης κεφαλής. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα αποχύνεται και το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, έγινε προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001 M pH 7.5 όγκου 2 λίτρων. Τα σακουλάκια διαπίδυσης πλύθηκαν με απιονισμένο ύδωρ για την απομάκρυνση του αιθανολικού διαλύματος και το διαλυτοποιημένο ένζυμο τοποθετείται σε σακουλάκια διαπίδυσης τα οποία εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001 M, pH 7.5 στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό Ph

ΥΛΙΚΑ

- Μικρά tubes φυγοκέντρησης
- Υδατόλουτρο στους 37 °C
- Διάλυμα 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0 ($\rho=1.114$ gr/mL, M.W.=78.3). Ρύθμιση του pH με 1 N NaOH και πεχαμετρικό χαρτί.
- Διάλυμα EDTA 0.1 M, pH 7.0. Ρύθμιση του pH με 1 N NaOH και πεχάμετρο
- Διάλυμα Tris 2.0 M

- Διάλυμα CH₃COOH 1 N
- AMP 0.1 M, pH 7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg, pH 7.0

Αρχικά, συλλέξαμε το πρωτεϊνικό διάλυμα σε ένα ογκομετρικό κύλινδρο και στη συνέχεια έγινε η διαδικασία της διαύγασης, όπου το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 34.540 rcf. Το υπερκείμενο διάλυμα ογκομετρήθηκε και έγινε προσθήκη διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0 και διαλύματος EDTA 0.1 M, pH 7.0. Το διάλυμα EDTA και της μερκαπτοαιθανόλης προστίθενται για να προστατέψουν την πρωτεΐνη από μετουσίωση. Έπειτα, προσθέσαμε διάλυμα 2 M Tris ώστε το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος να γίνει 8.8. και επώασαμε το μίγμα στους 37 °C. Το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και το διάλυμα ρυθμίζεται στη τιμή pH 7. Τέλος, έγινε διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρωση σε 34.540 rcf με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση του ενζύμου

ΥΛΙΚΑ

- Μικρά tubes φυγοκέντρωσης
- Υδατόλουτρο στους 30°C
- Ρυθμιστικό διάλυμα β-GP(β-glycerophosphate)/2-μερκαπτοαιθανόλης/EDTA 50:50:1 pH 6.8. Ρύθμιση του pH με 1 N NaOH και πεχάμετρο.
- AMP 0.1 M, pH 7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg, pH 7.0

Αρχικά, κάναμε κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β. Το υπερκείμενο διάλυμα που παράγεται μετά τη φυγοκέντρωση ογκομετρείται και προσθέτουμε διάλυμα AMP 0.1 M, pH 7.0 αλλά και διάλυμα (CH₃COO)₂Mg, pH 7.0. Το διάλυμα AMP και το (CH₃COO)₂Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση. Τέλος, το διάλυμα τοποθετείται σε μικρά tubes φυγοκέντρωσης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα για να κρυσταλλωθεί. Μετά, συλλέξαμε τους κρυστάλλους της φωσφορυλάσης με φυγοκέντρωση σε 28.710 rcf σε θερμοκρασία 0 – 4 °C με τη χρήση της μικρής κεφαλής. Στη συνέχεια, το

κρυσταλλικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 pH 6.8 σε θερμοκρασία 30 °C εντός του υδατόλουτρου. Μετά έγινε διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf και το υπερκείμενο διάλυμα ογκομετρήθηκε. Στη συνέχεια, προσθέσαμε διάλυμα AMP 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό και διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0. Τέλος, το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε μικρά tubes φυγοκέντρωσης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 ώρες. Έτσι, έγινε η πρώτη ανακρυστάλλωση του ενζύμου και μετά από τρεις με τέσσερις ώρες έγινε και η δεύτερη ανακρυστάλλωση ακολουθώντας την ίδια διαδικασία.

Βήμα 6^ο: Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

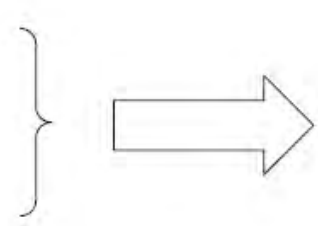
ΥΛΙΚΑ

- Μικρά tubes φυγοκέντρωσης
- Υδατόλουτρο στους 30°C
- Ρυθμιστικό διάλυμα β-GP(β -glycerophosphate)/2-μερκαπτοαιθανόλης/EDTA 50:50:1 pH 6.8. Ρύθμιση του pH με 1 N NaOH και πεχάμετρο.
- AMP 0.1 M, pH 7.0
- Διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0
- Γλυκερόλη 100 %

Έγινε επανάληψη της προηγούμενης διαδικασίας και κάναμε την τρίτη ανακρυστάλλωση. Μετά, έγινε ανακρυστάλλωση άλλες δυο φορές χωρίς την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ και στο τελικό ενζυμικό διάλυμα που πήραμε προσδιορίσαμε φωτομετρικά στα 280 nm τη συγκέντρωση της φωσφορυλάσης β σύμφωνα με το νόμο Beer- Lambert

Στην οπτική ο νόμος του Beer-Lambert, είναι μια εμπειρική σχέση που σχετίζει την απορρόφηση του φωτός με τις ιδιότητες του μέσου το οποίο διασχίζει. Ο νόμος μπορεί να εκφραστεί με την ακόλουθη σχέση

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon_{(\lambda)} l c_{\text{mol/L}} = a l c_{\text{gr/L}}$$

$$T = \frac{I}{I_0}$$


$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon_{(\lambda)} l c} \quad \text{ή} \quad \boxed{I = I_0 10^{-\varepsilon_{(\lambda)} l c}}$$

A= απορρόφηση(absorbance) Καθαρός αριθμός.

I_0 = ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας πριν διαπεράσει το υλικό

I = ένταση της εξερχόμενης από το υλικό ακτινοβολίας

T= διαπερατότητα (transmittance)

c= συγκέντρωση των συστατικών του υλικού

l = το μήκος της διαδρομής που ταξιδεύει το φως μέσα στο υλικό (οπτικό μήκος)

$\varepsilon(\lambda)$ = σταθερά αναλογίας που ονομάζεται μοριακή απορροφητικότητα (molar absorptivity) όταν η

c εκφράζεται σε mol/L,σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος

a= σταθερά αναλογίας που ονομάζεται απορροφητικότητα (molar absorptivity) όταν η c εκφράζεται σε gr/L

Ο νόμος του Beer προϋποθέτει ότι α) ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και της διαλυμένης ουσίας είναι η απορρόφηση, β) η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μονοχρωματική, γ) η απορρόφηση γίνεται σε ένα όγκο διαλύματος ομοιόμορφης διατομής και δ) ότι τα σωματίδια που απορροφούν δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο και άσχετα προς τον αριθμό και το είδος τους.

Ο νόμος του Beer δεν ισχύει για πυκνά διαλύματα ($c > 0,01M$), διότι σε αυτά οι αποστάσεις μεταξύ των σωματιδίων που απορροφούν γίνονται τόσο μικρές ώστε καθένα από αυτά να επηρεάζει την κατανομή φορτίου στα γειτονικά σωματίδια και συνεπώς και την ικανότητα τους να απορροφούν ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος. Σε πυκνά διαλύματα δεν παραμένει σταθερή η μοριακή απορροφητικότητα ε .

Στην πράξη το είδος αυτό της απόκλισης από τον νόμο του Beer σπανίως δημιουργεί πρόβλημα, γιατί συνήθως μετριέται η απορρόφηση αραιών διαλυμάτων.

Στη συνέχεια, το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρήθηκε και προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης (100%) και το φυλάξαμε στους -20°C .

B) Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

- **Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)**

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος ($\alpha\text{-D-Glc-1-P}$).

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης ($\alpha\text{-D-Glc-1-P}$) 400mM
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β -φωσφογλυκερόλης ($\beta\text{-GP}$), 50 mM β -μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM
- Διάλυμα του αναστολέα
- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα SDS 1%
- Γλυκογόνο 1 % (w/v)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen_(n)**, προς **Glycogen_(n-1)** και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**.



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, δηλαδή μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη στους $-20^{\circ}C$ παίρνουμε 10 μ l και το αραιώνουμε με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM β -γλυκερινοφωσφορικού νατρίου, 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA) .Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου, με κυβελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό διάλυμα που περιέχει 25 μ g ενζύμου ανά mL, γλυκογόνο 1 % (w/v) , ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου (β -GP 2.5 mM, β -Merc 2.5 mM, EDTA 0.05mM Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α -D- Glc-1-P 2.0, 4.0, 6.0, 10 και 20mM, με προσθήκη 200 μ L από το αντίστοιχο υπόστρωμα α -D- Glc-1-P, 18 μ L AMP 50mM και 502 μ L H_2O .

Το ενζυμικό μείγμα τοποθετείται για επώαση στους $30^{\circ}C$ επί 15 λεπτά και τα υποστρώματα επί περίπου 3 λεπτά. Στη συνέχεια, για την εκκίνηση της αντίδρασης σε όλους τους σωλήνες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180 μ l ενζυμικού μίγματος. Στις συνθήκες αυτές, στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 5.0 μ g ένζυμο/mL, AMP 1.0mM, γλυκογόνο 1%, υπόστρωμα α -D- Glc-1-P 2.0-20mM, 50 mM υδροχλωρικής τρις-αιθανολαμίνης, 100 mM KCl και 1 mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι $30^{\circ}C$ και το pH 6.8. Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1',2',3',4') λαμβάνονται δείγματα των 200 μ L από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μ L SDS 1.0% .

Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α -D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών).

Πίνακας 1 Παρασκευή των διαλυμάτων υποστρώματος

	A[2Mm]	B[4Mm]	Γ[6Mm]	Δ[10Mm]	E[20Mm]
GIP	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
AMP[50Mm]	18 μ l	18 μ l	18 μ l	18 μ l	18 μ l

H ₂ O	502 μl	502 μl	502 μl	502 μl	502 μl
------------------	--------	--------	--------	--------	--------

$V_{\text{τελ}} = 720 \mu\text{l}$

Προσδιορισμός IC₅₀ αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή, αφού η σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και κατ' επέκταση τη δράση του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο της πλήρους συναγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου «μιμούμενος» το υπόστρωμα και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Η **σταθερά IC₅₀** ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας.

Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC₅₀ και για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P (1-φωσφορικής γλυκόζης).

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (α -D- Glc-1-P) 9mM
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β -φωσφογλυκερόλης (β - GP), 50 mM β -μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM
- Διάλυμα του αναστολέα
- DMSO 100% (v/v)
- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα SDS 1%

- Γλυκογόνο 1 % (w/v)

ΟΡΓΑΝΑ

- Υδατόλουτρο
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Χρονόμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- pHμετρο

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται παίρνουμε 10 μL και το αραιώνουμε σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 (50 mM β -γλυκερινοφωσφορικού νατρίου 50 mM 2-μερκαπτοαιθανολης, 1mM EDTA). Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου (GPb), με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα που περιέχει το ένζυμο σε συγκέντρωση 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 120 μl γλυκογόνο 1% (w/v), 60 μl ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου και νερό. Η αντίδραση ενζύμου -υποστρώματος γίνεται σε καθορισμένες συνθήκες:

1. 5.0 μg ενζύμου ανά mL
2. 1mM AMP, 0.2% w/v γλυκογόνο,
3. σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος α -D-Glc-1-P (2mM)
4. μεταβαλλόμενη συγκέντρωση αναστολέα.

• Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης

Παρασκευάζονται 2 ρυθμιστικά διαλύματα:

Ρυθμιστικό διάλυμα 1: ιμιδαζόλιο 200 mM, KCL 400 mM, DTT 4 mM, EDTA 4 mM, pH 6,8

Ρυθμιστικό διάλυμα 2: ιμιδαζόλιο 135 mM, KCL 270 mM, DTT 2,7 mM, EDTA 2,7 mM, pH 6,8 (με αραιώση του ρυθμιστικού διαλύματος 1)

Φυλάσσονται στους 4 °C.

Από το πυκνό διάλυμα της G1P (400 mM), το ρυθμιστικό διάλυμα 1 και νερό, αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι ώστε να προκύψει διάλυμα G1P (90 mM), ιμιδαζόλιο (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) και με pH 6.8.

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της G1P προκύπτουν με αραίωση του διαλύματος της G1P 90 mM με το ρυθμιστικό διάλυμα 2 και νερό.

Συνολικά προκύπτουν τα παρακάτω διαλύματα:

- Glc-1-P 90mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 45mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 27mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 18mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 9mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C για να αποφευχθεί υδρόλυση της Glc-1-P.

Για τον υπολογισμό της **IC50** παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα σε σταθερή συγκέντρωση α-D- Glc-1-P 9mM και AMP 50mM ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P να είναι 2 mM και της AMP 1mM. Για την διαλυτοποίηση των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ο οργανικός διαλύτης DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Τα εκχυλίσματα διαλυτοποιήθηκαν σε 100% (v/v) DMSO ενώ η τελική συγκέντρωση του διαλύτη στην αντίδραση τελικά ήταν 2%. Σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D- Glc-1-P	200 μL	200 μL
AMP (50mM)	18 μL	18 μL
αναστολέας	-	X μL
H ₂ O	502 μL	720-(200+18+X) μL
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL

Μετά την παρασκευή και επώαση του ενζυμικού διαλύματος καθώς και των διαλυμάτων του υποστρώματος με τη διαδικασία που αναφέραμε, μεταφέρονται 180 μL από το ενζυμικό διάλυμα σε κάθε διάλυμα υποστρώματος με τη σειρά, έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια, ανά 1 λεπτό λαμβάνονται και μεταφέρονται 200 μL από το διάλυμα του ενζύμου-υποστρώματος στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν το SDS 1%. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις αναστολέα.

Πίνακας 2: Παρασκευή διαλυμάτων υποστρώματος παρουσία αναστολέα

	control	A[5μg/ml]	B[8μg/ml]	Γ[10μg/ml]	Δ[15μg/ml]	E[20μg/ml]
GIP	200μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
AMP[50 ml]	18 μl	18 μl	18 μl	18 μl	18 μl	18 μl
Inh	-	18 μl	18 μl	18 μl	18 μl	18 μl
H ₂ O	502 μl	484 μl	484 μl	484 μl	484 μl	484 μl

Στα δείγματα, προστίθενται από 2.5 mL διάλυμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου και μετά ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm για τον υπολογισμό του αριθμού των φωσφορικών ιόντων (Pi). Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών).

Ο αναστολέας που χρησιμοποιήσαμε προέρχεται από εκχύλισμα του *Pyracantha Coccinea* και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν οι εξής:

εκχύλισμα	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν(μg/ml)
<i>Pyracantha Coccinea</i>	5,8,10,15,20

Προσδιορισμός φωσφόρου

Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στηρίζεται στην απελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen**(_n), προς **Glycogen** (_{n-1}) και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**.



Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, δηλαδή μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ορθοφωσφορικά ιόντα πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.4 μM προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Υλικά

- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου, με ρύθμιση pH 5.0. (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως γιατί είναι φωτοευαίσθητο). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με HCl 1N.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), με ρύθμιση pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N.

Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα και το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φώς και χρησιμοποιείται μετά από 15 min μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs). Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα.

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2.5 mL από το αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ισχυρή ανάμιξη οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15 min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

- **Παρασκευή τυφλών**

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC₅₀ του ενζύμου βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb. Συνεπώς, θα πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά σε 7 δοκιμαστικούς σωλήνες:

- ❖ Τυφλό νερού για τον μηδενισμό του φωτομέτρου
- ❖ Τυφλό με την συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της
- ❖ Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών
- ❖ Πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε μmol Pi.

- **Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit**

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μετά από τον προσδιορισμό φωσφόρου στα δείγματα του κινητικού πειράματος, επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit. Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων υφίστανται διορθώσεις με βάση τα δείγματα αναφοράς για τα G-1-P και το γλυκογόνο. Στη συνέχεια, γίνεται ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Η *ειδική δραστηριότητα* (specific activity) αποτελεί έκφραση της ποσότητας αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου και ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που

προκαλούν μετατροπή 1μmol υποστρώματος ή παραγωγή 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό κάτω από ορισμένες συνθήκες.

Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simple weighting'). Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

$$v = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{\text{όριο}}{\text{όριο} - \mu\text{molP}_i} \right) \text{όριο}/\text{mg}_{\text{ενζύμου}}$$

όπου k : είναι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης

t : ο χρόνος της αντίδρασης

όριο: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της G1P που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του δείγματος επί την μέγιστη υδρόλυση της G1P στην ισορροπία της αντίδρασης (78%).

Οι αρχικές ταχύτητες που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα 'explicit weighting'). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους V_{\max} και K_m και το τυπικό τους σφάλμα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten* (K_m) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten με την προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}$$



Όπου : v : Η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης.

V_{\max} : Η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

$[S]$: Η συγκέντρωση του υποστρώματος.

E : Το ένζυμο

S : Το υπόστρωμα

ES : Το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος

P : Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten, $v=V_{max}[S]/K_m + [S]$ (οπού v : ταχύτητα, V_{max} : μέγιστη ταχύτητα, $[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος, K_m : σταθερά Michaelis-Menten). Γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{max} .

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηρότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηρότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηρότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{s.a._{control} - s.a._i}{s.a._{control}} \times 100\%$$

Όπου:

s.a._{control}: η ειδική δραστηρότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

s.a._i: η ειδική δραστηρότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC_{50} θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμή της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC_{50} προκύπτει από το διάγραμμα **%αναστολή=f([I])**. Από την τιμή της IC_{50} προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής K_i που αποτελεί όπως και η K_m έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

Όπου $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος ως προς το οποίο εξετάζεται η GPb, δηλαδή η συγκέντρωση της Glc-1-P.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

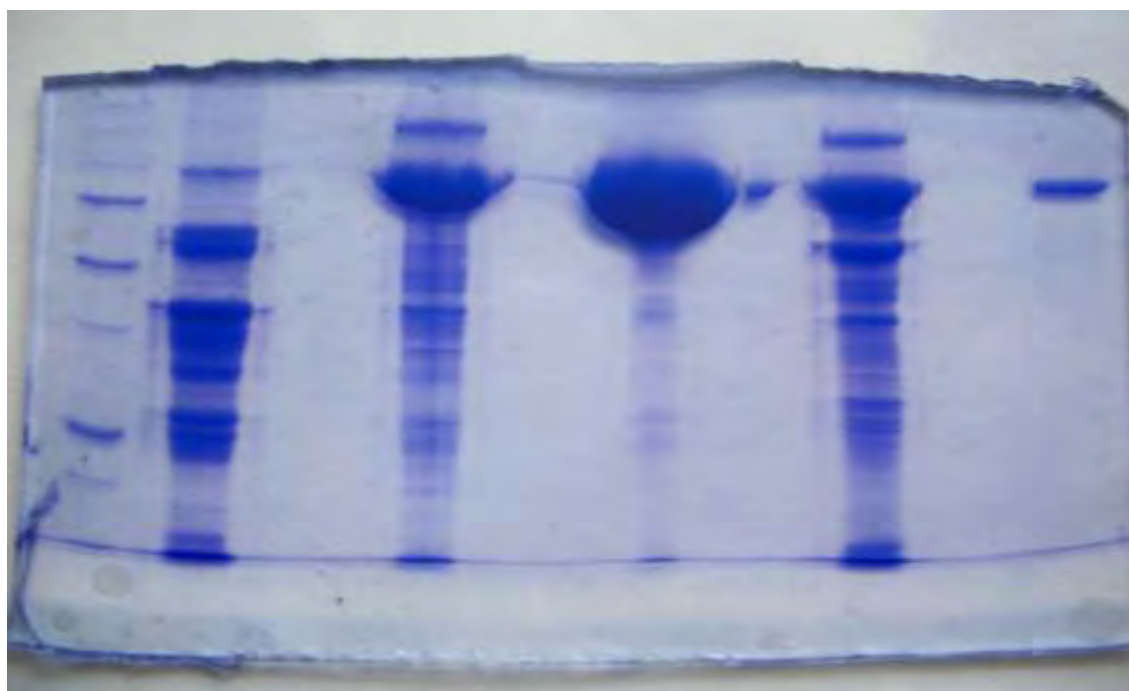
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1.ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ Β ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Η φωσφορυλάση β του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 1).

Μάρτυρας Διαδρομή 1 Διαδρομή 2 Διαδρομή 3 Διαδρομή
4 Διαδρομή 5

Εικόνα 22 : Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb.



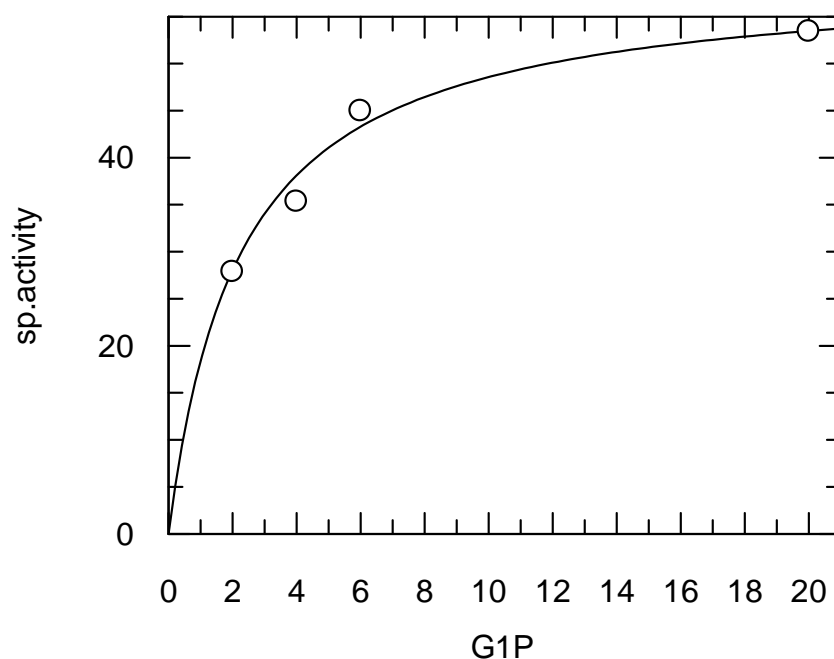
Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θεικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m .

Οι κινητικές παράμετροι του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m = 2,24 \pm 0.25$ mM, και $V_{max} = 59.46 \pm 0.90$ $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. Στην εικόνα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών/min/mg ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P).

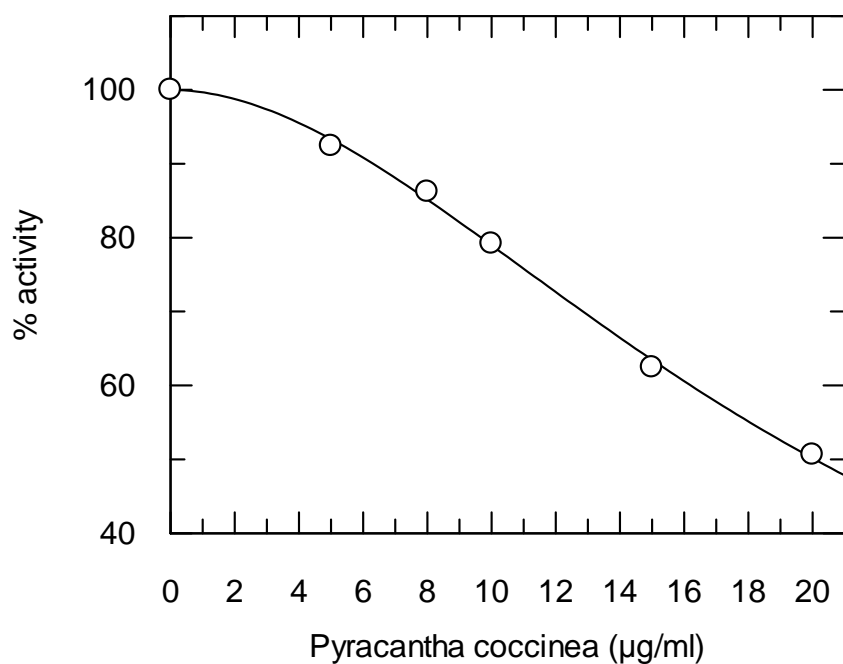
Εικόνα 23 : Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος G-1-P (2.0, 4.0, 6.0, 10.0, 20.0mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου.



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	59,46	0,90
Km	2,24	0,25

Στη συνέχεια, ακολουθεί η γραφική παράσταση που προέκυψε από το πρόγραμμα Grafit για τον υπολογισμό της IC₅₀.

Εικόνα 24 :Καμπύλη της % αναστολής της δραστηρότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος



Parameter	Value	Std. Error
IC 50	20,06	0,33

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη εκχυλισμάτων του *Pyracantha Coccinea*. Ειδικότερα, η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας ως προς την ανασταλτική επίδραση φυσικών εκχυλισμάτων έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, το καθοριστικό ένζυμο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου, αποτελεί τον κύριο στόχο των επιστημόνων για την παραγωγή υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης έδειξαν ότι το εκχύλισμα του *Pyracantha Coccinea* έχει μέτρια ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Εκκρεμούν ex vivo μελέτες του εκχυλίσματος σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, για μελετηθεί η ανασταλτική ισχύς του και σε κυτταρικό επίπεδο, καθώς και η κρυσταλλογραφική μελέτη του δείγματος ώστε να μπορέσουμε να ταυτοποιήσουμε την δραστική ουσία που προκαλεί την αναστολή, σε ποιο από τα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου προσδένεται, καθώς και το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσεται μεταξύ της πρωτεΐνης και της ουσίας έτσι ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 <http://www.iatropedia.gr/medical/malady/252>
- 2 <http://el.wikipedia.org>
- 3 Marshal W.,(2000) : Κλινική Βιοχημεία, Έκδοση 3η, ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
- 4 <http://www.endocrine.gr/index.php/menu-types/gk-menu/2012-09-30-16-47-42/n-1>
- 5 <http://www.endodiabetes.gr/pregnancy/diabetes-and-pregnancy/pregnancy-diabetes>
- 6 Stryer L (2007) : Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 3η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
- 7 <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%93%CE%BB%CF%85%CE%BA%CF%8C%CE%B6%CE%B7>
- 8 Τσώση Κων/να (1999) : Σακχαρώδης διαβήτης-Νοσηλευτική διεργασία, Πάτρα
- 9 http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_insulin.htm
- 10 Hall E. John , Guyton Arthur C. (2008) : Ιατρική Φυσιολογία, ενδέκατη έκδοση Παρισσιανου ΑΕ, σελ 1111-1113
- 11 <http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-C120/480/3166,12754/>
- 12 Newgard, C. B., Hwang, P. K., and Fletterick, R. J., (1989) : The family of glycogen phosphorylases: structure and function. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 24, 69-99.

14 Oikonomakos, N. G., (2002) : Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, 561-586.

15 Vassiliki T.Skamnaki, Anastasia L. Kantsadi, Demetra S. M. Chatzileontiadou, Georgios Stravodimos and Demetres D. Leonidas, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Greece

16 Oikonomakos, N. G. and Somsak, L., (2008) : Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9, 379-395.

17 Oikonomakos, Costas Tiriadis, Kyra-Melinda Alexacou, Spyros E. Zographos, Demetres D. Leonidas , Thanasis Gimisis, NG., A potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase

18 Oikonomakos, N. G. *Curr. (2002) : Protein Pept. Sci.* 3, 561.

19 Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M. Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. *Curr. Med. Chem.* 2008, 15, 2933.

20 <http://www.hort.uconn.edu/plants/p/pyrcoc/pyrcoc1.html>