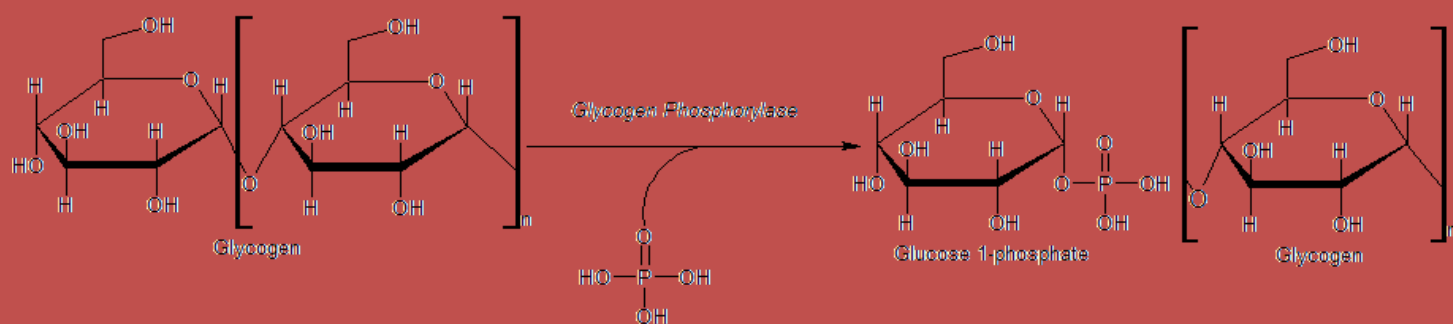


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
‘ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ’

Έλεγχος της υπογλυκαιμικής δράσης προϊόντων και παραπροϊόντων αμπελοκομίας και χυμοποίησης ροδιού σε σύστημα ηπατοκαρκινικών κυττάρων σε καλλιέργεια.

Επιμέλεια: Θεοφάνους Σταυρούλα



ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Έλεγχος της υπογλυκαιμικής δράσης προϊόντων και παραπροϊόντων αμπελοκομίας και χυμοποίησης ροδιού σε σύστημα ηπατοκαρκινικών κυττάρων σε καλλιέργεια.

Τριμελής επιτροπή:

- **Δρ. Ψαρρά Άννα Μαρία (επιβλέπουσα καθηγήτρια)**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Κοντού Μαρία**

Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
Abstract.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ	15
2.1 Γλυκόζη.....	15
2.2 Γλυκογόνο	17
2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου	19
2.2.2 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) και ο ρόλος της στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	21
2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	24
2.3.1 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	27
2.3.2 Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	33
2.4 Ενζυμική αναστολή.....	38
2.5 Μηχανισμοί ρύθμισης των ενζύμων σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου	42
2.5.1 Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται αντίρροπα	42
2.5.2 Η πρωτεϊνική φωσφατάση 11 (PP1) αντιστρέφει τη ρυθμιστική επίδραση των κινασών στο μεταβολισμό του γλυκογόνου.....	43
2.6 Μόρια Ρυθμιστές μεταβολισμού γλυκογόνου και των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα- Ορμονικός Έλεγχος.....	44
2.6.1 Ορμόνες Παγκρέατος-Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη.....	44
2.6.2 Δομή και Φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης	45
2.6.3 Μηχανισμός Δράσης ινσουλίνης - Βιολογική δράση της Ινσουλίνης	47
2.6.4 Έκκριση ινσουλίνης υπό την επίδραση γλυκόζης / Δέσμευση γλυκόζης υπό την επίδραση ινσουλίνης.....	48
2.6.5 Σύνοψη των πολλαπλών φυσιολογικών δράσεων της ινσουλίνης:	51
2.6.6 Γλυκαγόνη-Δομή και βιολογική δράση	52
2.6.7 Μηχανισμός δράσης γλυκαγόνης	53
2.6.8 Επινεφρίνη.....	56
2.6.9 Γλυκοκορτικοειδή και μεταβολισμός των υδατανθράκων.....	56
2.6.10 Υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών	57
2.6.11 Κορτιζόλη –Βιολογική δράση Κορτιζόλης	57

2.6.12 Ρύθμιση της έκκρισης κορτιζόλης	59
2.6.13 Γλυκοκορτικοειδή, γλυκόζη και γλυκογόνο.....	60
2.6.14. Δεξαμεθαζόνη.....	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	64
3.1 Γενικά Στοιχεία	64
3.2 Τύποι σακχαρώδη διαβήτη.....	66
3.3 Αιτίες πρόκλησης του σακχαρώδη διαβήτη.....	69
3.4 Κλινικά χαρακτηριστικά του σακχαρώδη διαβήτη	71
3.4.1 Κλινικές εκδηλώσεις σακχαρώδους διαβήτη τύπου I:.....	71
3.4.2 Κλινικές εκδηλώσεις σακχαρώδους διαβήτη τύπου II:	73
3.5 Υπερινσουλινισμός και Υποϊνσουλινισμός	75
3.6 Αντιμετώπιση του διαβήτη- Αντιδιαβητικά φάρμακα – ανάλογα γλυκόζης	76
3.7 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων	79
3.8 Σημασία διατροφής στην διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης	80
3.9 Φυτικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα.....	81
3.9.1 Εκχυλίσματα σταφυλιών	82
3.9.2 Σταφύλια και υποπροϊόντα οινοποίησης.....	85
3.9.3 Προετοιμασία εκχυλισμάτων	86
3.9.4 Εκχυλίσματα ροδιού	87
3.9.5 Προετοιμασία εκχυλισμάτων	91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ - ΜΕΘΟΔΟΙ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ	93
4.1 Επιλογή κυτταρικής σειράς: Κύτταρα HepG2.....	93
4.2 Συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων HepG2.....	94
4.3 Κρυοπροστασία κυττάρων	95
4.4 Απόψυξη κυττάρων HepG2	96
4.5 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης κυτταρικής καλλιέργειας με θρυψίνη (θρυψινοποίηση).....	97
4.6 Αποθήκευση και φύλαξη κυττάρων HepG2 στους -80 °C (stock).....	100
4.7 Μέτρηση κυττάρων HepG2, με αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer) για το πείραμα της κυτταροτοξικότητας.....	101
4.8 Προετοιμασία κυττάρων για το πείραμα ελέγχου κυττροτοξικότητας των εκχυλισμάτων σταφυλιού (Δοκιμή MTT).	104
4.9 Φιλτράρισμα των υδατικών διαλυμάτων των εκχυλισμάτων σταφυλιού.....	108
4.10 Προετοιμασία κυττάρων για το πείραμα ελέγχου δραστηριότητας του ενζύμου GPb.	110
4.11 Συλλογή και αποθήκευση κυττάρων που έχουν επωαστεί με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα.	113

4.12 Πείραμα δραστηριότητας του ενζύμου GPb	115
4.12.1 Παρασκευή τυφλών-δειγμάτων αναφοράς	119
4.12.2 Παρασκευή ενζυμικών διαλυμάτων.....	120
4.12.3 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος.....	121
4.12.4 Προσδιορισμός φωσφόρου.....	123
4.12.5 Μέθοδος ασκορβικού οξέος.....	123
4.13 Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης σε κάθε κυτταρικό εκχύλισμα με τη μέθοδο Bradford.	125
4.14 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα GraFit 4.0	129
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	132
5.1. Επίδραση των υδατικών διαλυμάτων των εκχυλισμάτων σταφυλιού στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.	132
5.2 Επίδραση των εκχυλισμάτων σταφυλιού στη δραστηριότητα της ενδογενούς φωσφορυλάσης γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.....	136
5.2.1 Επίδραση των υδατοδιαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων σταφυλιού στη δραστηριότητα της ενδογενούς φωσφορυλάσης γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.....	138
5.2.2 Επίδραση των σε DMSO διαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων σταφυλιού στη δραστηριότητα της ενδογενούς φωσφορυλάσης γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.....	143
5.2.3 Επίδραση των σε DMSO διαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων ροδιού στη δραστηριότητα της ενδογενούς φωσφορυλάσης γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.....	144
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	145
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	151

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το χρονικό διάστημα Απρίλιος 2012- Ιούνιος 2013, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επίκουρο καθηγήτρια κ. Ψαρρά Άννα Μαρία κυρίως για την εμπιστοσύνη και την υπομονή που έδειξε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας αλλά και για τον προσωπικό της χρόνο και κόπο που διέθεσε ώστε να μάθω από αυτήν. Επίσης πολύτιμη ήταν η συμβολή της στην ορθή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών, παρέχοντας μου τις πολύτιμες υποδείξεις της και την επιτυχημένη καθοδήγηση της με σκοπό την ολοκλήρωση του θέματος που μου ανέθεσε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Δημήτρη Λεωνίδα, καθώς και στη κα. Μαρία Κοντού για τις πολύπλευρες πληροφορίες που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας και για την συνεργασία τους. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθ. Σ. Χαρουτουιάν και στο εργαστήριό του στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την προσφορά των εκχυλισμάτων των παραπροϊόντων της διαδικασίας παραγωγής χυμού από ρόδι.

Θα ήταν παράλειψη αν δεν ανέφερα τον κύριο Γοργογιέτα Βύρωνα, και την κα Καντσάδη Αναστασία, υποψήφιους διδάκτορες, διότι η συμβολή τους ήταν καίρια καθώς ήμουν υπό τη συνεχή παρατήρησή τους και η βοήθεια που μου προσέφεραν ήταν πραγματικά ανεκτίμητη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής βιοχημείας, καθώς και όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Ο κύριος στόχος στη θεραπευτική αντιμετώπιση του διαβήτη είναι να διατηρούμε το σάκχαρο του αίματος όσον το δυνατόν πιο κοντά στα φυσιολογικά όρια. Αν αυτό επιτυγχάνεται αποφεύγεται ο κίνδυνος της εμφάνισης των χρόνιων επιπλοκών του διαβήτη.

Με σκοπό τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την εύρεση και αξιοποίηση αναστολέων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενδυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GPb) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για την ανεύρεση νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων καθώς καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P).

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε τόσο η επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων γιγάρτων (σπόρων), βοστρύχων (βλαστών), και στέμφυλων από Ελληνικές ποικιλίες σταφυλιού (*Vitis Vinifera*) όσο και εκχυλισμάτων από προϊόντα και παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής φρέσκου χυμού από το φυτό ροδιά

(*Punica Granatum*) στην ενζυμική δραστικότητα της GP με κινητικά πειράματα (δοκιμές σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2).

Αρχικά, μελέτες κυτταροτοξικότητας έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα αφού φιλτραριστούν δεν έχουν κυτταροτοξική δράση και καμία επίδραση στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Στη συνέχεια, κινητικές μελέτες έδειξαν πως α) το εκχύλισμα σταφυλιού Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008 αποτελεί ισχυρό συναγωνιστικό αναστολέα του ενζύμου με $IC_{50}=18,9778 \pm 5,5270$ και β) εκχύλισμα από παραπροϊόντα παραγωγής φρέσκου χυμού από το ρόδι (εκχύλισμα No 11) έδειξε να αναστέλλει το ένζυμο με $IC_{50}=72,1025 \pm 5,7708$.

Τέλος βρέθηκε πως τα εκχυλίσματα σταφυλιού Ασύρτικο Σαντορίνης Στέμφυλα, Βοηδόματο Σαντορίνης Βόστρυχοι και Μαυροτράγανο Βόστρυχοι σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100μg/ml προκάλεσαν αναστολή της GPb με το ποσοστό να φτάνει έως και 40% στην περίπτωση του Μαυροτράγανου.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να συμβάλλουν καθοριστικά στη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων ως θεραπευτικά βοηθήματα για τη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by concentration increasing of blood sugar (hyperglycemia) and glucose metabolism imbalance, either as a result of decreased insulin secretion or because of decrease in body cells sensitivity to insulin. The main goal in diabetes treating is to keep blood sugar as close as possible to normal limits. If this is achieved, the risk of developing chronic complications of diabetes is avoided.

To treat this pathological condition, enzymes and receptors involved in the regulation of glucose limits are used as molecular targets in order to discover and develop inhibitors with high affinity for their catalytic or regulatory sites that can be used as potential hypoglycaemic drugs. To this end, the enzyme glycogen phosphorylase (GPb) is one of the most important molecular targets for detecting new hypoglycemic drugs as it catalyzes the degradation of glycogen to glucose-1-phosphate (Glc-1-P).

In this report, we studied both the effect of natural extracts from seeds, bunches and marcs from Greek grape varieties (*Vitis Vinifera*) and extracts from industrial production products and by-products of fresh juice from the plant pomegranate (*Punica Granatum*) on the enzymatic activity of GP in *ex vivo* experiments (trials in HepG2 human liver carcinoma cell line).

At first, cytotoxicity studies showed that filtered natural extracts from grapes are not toxic. In addition, they do not affect the cell structural features as the unfiltered ones. Then, the kinetic results indicated that a) the natural extract of grape bunches Asyrtiko Santorini bunches 2008 is a potent competitive inhibitor of GP with inhibitor constant $IC_{50}=18,977 \pm 5,527 \mu\text{g/ml}$ and b) the extract 11

from industrial products and by-products of fresh juice from pomegranate is shown to inhibit satisfactorily the GPb enzyme with $IC_{50}=72,102 \pm 5,770 \mu\text{g/ml}$.

Eventually we found that extracts Asyrtiko Santorini marcs, Voidomato Santorini bunches and Mavrotragano bunches caused GP inhibition at concentrations higher than 100 $\mu\text{g/ml}$, in the case of Mavrotragano the percentage of inhibition reached 40%.

The results of this study can decisively contribute in the use of natural extracts as therapeutic devices for Diabetes mellitus type 2 treatment.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρόσληψη τροφής και η ασιτία προκαλούν συγκεκριμένες μεταβολικές αλλαγές. Η ομοιόσταση της γλυκόζης (διατήρηση σταθερής συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα) ρυθμίζεται μέσω μηχανισμών που είτε απομακρύνουν τη γλυκόζη από την κυκλοφορία του αίματος (γλυκογονογένεση, παραγωγή ενέργειας μέσω κύριας γλυκολυτικής πορείας), είτε απελευθερώνουν γλυκόζη από το ήπαρ στην κυκλοφορία (γλυκογονόλυση, γλυκονεογένεση). Η ρύθμιση της μεταβολικής ομοιόστασης είναι καθοριστικής σημασίας και επιτυγχάνεται μέσω καθορισμένης δράσης συγκεκριμένων ορμονών(ινσουλίνη, γλυκαγόνη, γλυκοκορτικοειδή). Η μη ορθή ρύθμιση έχει άμεσες συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία όπως είναι η υπογλυκαιμία και η υπεργλυκαιμία.

Η υπογλυκαιμία αποτελεί μια παθολογική κατάσταση κατά την οποία μειώνονται τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα συνήθως λόγω είτε υπερέκκρισης ορμονών που ενισχύουν τη μείωση παροχής της είτε αυξημένης απομάκρυνσης της γλυκόζης από το αίμα λόγω αυξημένης κατανάλωσης. Μπορεί να εκδηλωθεί με υπεριδρωσία, τρόμο, αίσθημα θερμότητας, άγχος - ανησυχία, ναυτία, αίσθημα πείνας, θόλωση όρασης, κατάπτωση, αδυναμία, ζάλη, σύγχυση, πονοκέφαλο, αδυναμία συγκέντρωσης αν και τα συμπτώματα ποικίλλουν από άτομο σε άτομο.

Η υπεργλυκαιμία εκφράζει τα υψηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Υπάρχουν τρεις επείγουσες καταστάσεις που σχετίζονται με πολύ υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα: η απλή υπεργλυκαιμία χωρίς οξέωση, η κετοξέωση και το υπερωσμωτικό μη κετωτικό κώμα. Η κετοξέωση σχετίζεται συχνότερα με το διαβήτη τύπου 1 και το υπερωσμωτικό μη κετωτικό

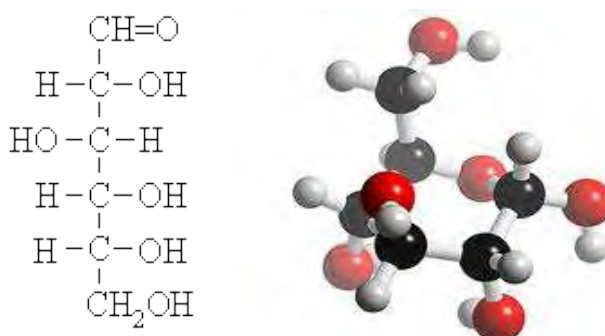
κώμα είναι πιο σύνηθες σε ηλικιωμένα άτομα με διαβήτη τύπου 2. Και οι δύο καταστάσεις μπορεί να εξελιχθούν σταδιακά, αλλά είναι σοβαρές, απειλητικές για τη ζωή, επείγουσες καταστάσεις που απαιτούν ιατρική αντιμετώπιση. Η υπεργλυκαιμία μπορεί να εκδηλωθεί μέσω μεγάλης δίψας και συχνουρίας, ατονίας, κοιλιακών πόνων, γενικευμένων πόνων, ανορεξίας, αίσθησης κακουχίας, αδιαθεσίας δύσπνοιας.

Συνήθως τόσο η υπογλυκαιμία όσο και η υπεργλυκαιμία συνοδεύουν την εκδήλωση χρόνιων παθήσεων όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

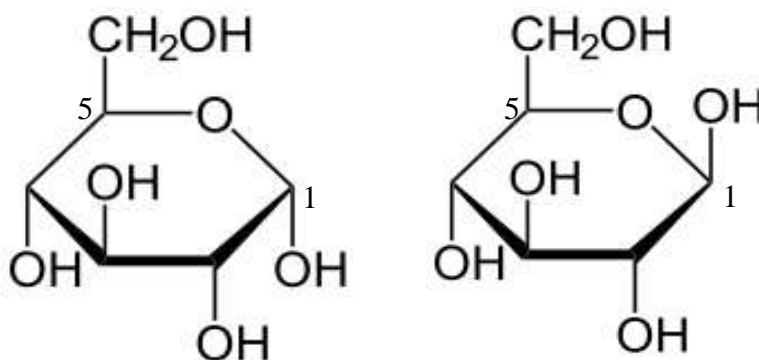
2.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου (συντακτικός τύπος $C_6H_{12}O_6$). Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική 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 (Εικόνα 1) [Stryer,1997].



Εικόνα 1: Η δομή Fisher της γλυκόζης και η τρισδιάστατη δομή της.

Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σχεδιασμός του μορίου της γλυκοπυρανόζης. Η ονομασία «α-» σημαίνει ότι η ομάδα υδροξυλίου είναι συνδεδεμένη στον C-1 και η-CH₂OH ομάδα στον C-5 σε αντίθετες

πλευρές του επιπέδου του δακτυλίου (α trans διάταξη), ενώ η ονομασία «β-» σημαίνει ότι είναι στην ίδια πλευρά του επιπέδου (μία διάταξη cis).

Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων [McArdle *et al.*, 2000]. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. 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. Έτσι ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν ως καύσιμο μόνο τη γλυκόζη. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης [McArdle *et al.*, 2000]. Η συγκέντρωση της στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [Stryer *et. al.* 1997].

Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης [McArdle *et al.*, 2000].

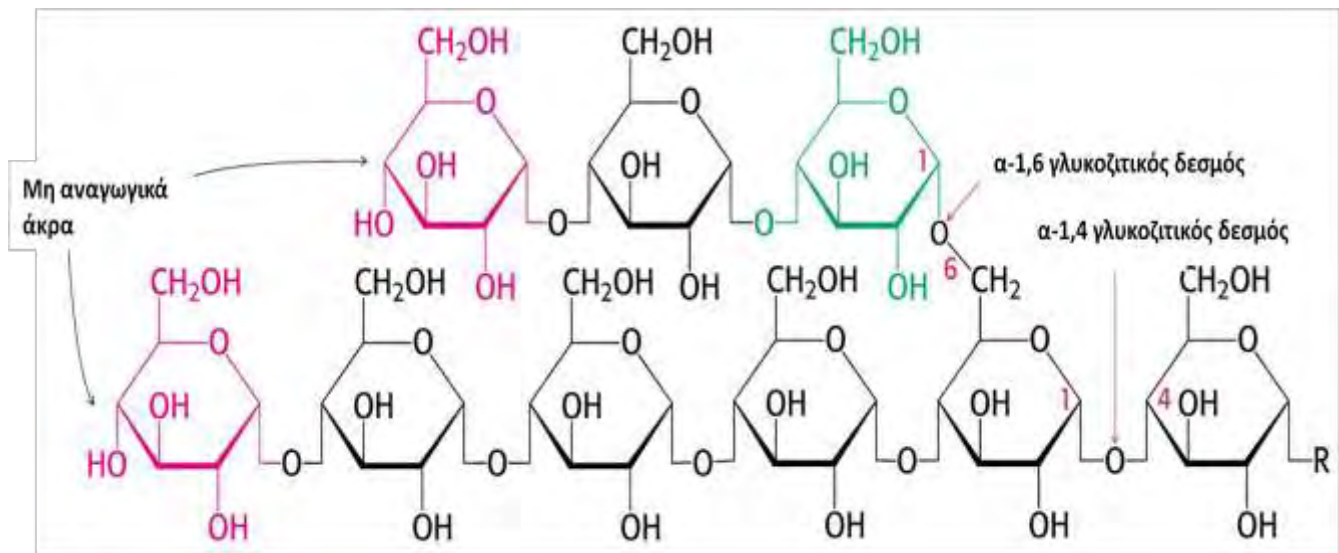
Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται

ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη. Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και τη διαιτητική κατάσταση του οργανισμού [McArdle *et al.*, 2000].

2.2 Γλυκογόνο

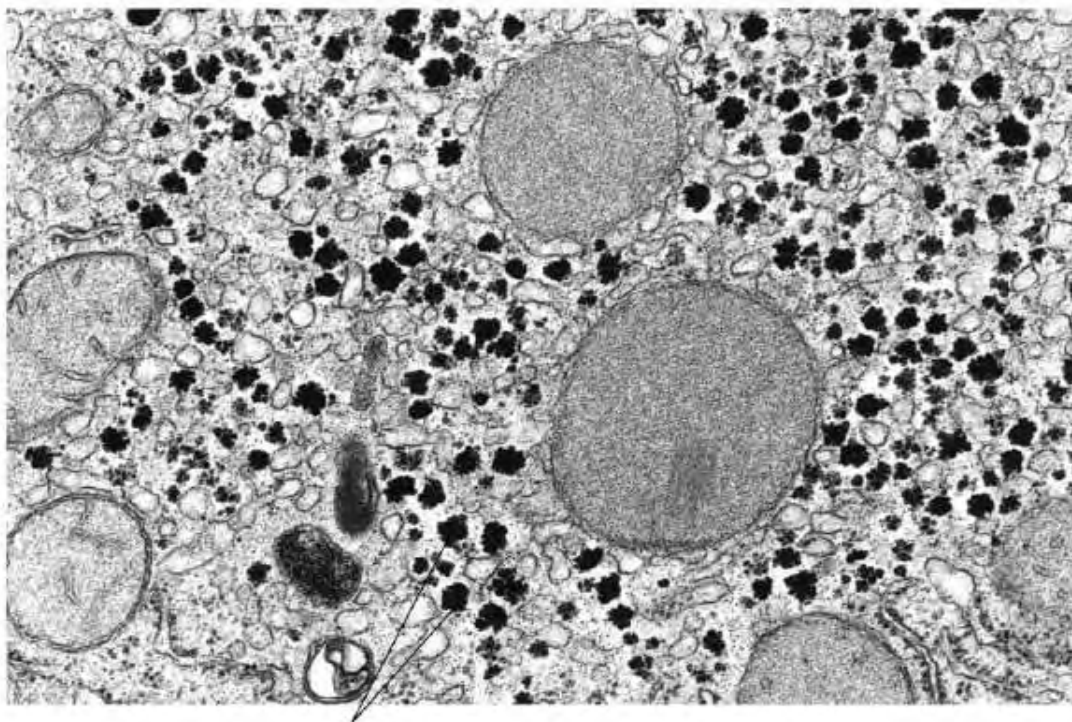
Το γλυκογόνο είναι το ανάλογο του αμύλου, ένα πολυμερές της γλυκόζης στα φυτά, και μερικές φορές αναφέρεται ως και *το άμυλο των ζώων*. Έχει παρόμοια δομή με την αμυλοπηκτίνη, αλλά είναι σε μεγαλύτερο βαθμό διακλαδισμένο και πιο συμπαγές από το άμυλο.

Το γλυκογόνο αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης και είναι η κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης (εικόνα 8) [Stryer *et al.* 1997].



Εικόνα 3: Η δομή του γλυκογόνου.

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. 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 μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο. Το γλυκογόνο βρίσκεται στο κυτοσόλιο με τη μορφή κοκκίων με διάμετρο από 10 έως 40 nm [Stryer et. al . 1997].



Κοκκία Γλυκογόνου

Εικόνα 4: Ηλεκτρονιομικρογραφία ενός ηπατικού κυττάρου. Τα πυκνά σωματίδια στο κυτταρόπλασμα είναι κοκκία γλυκογόνου.

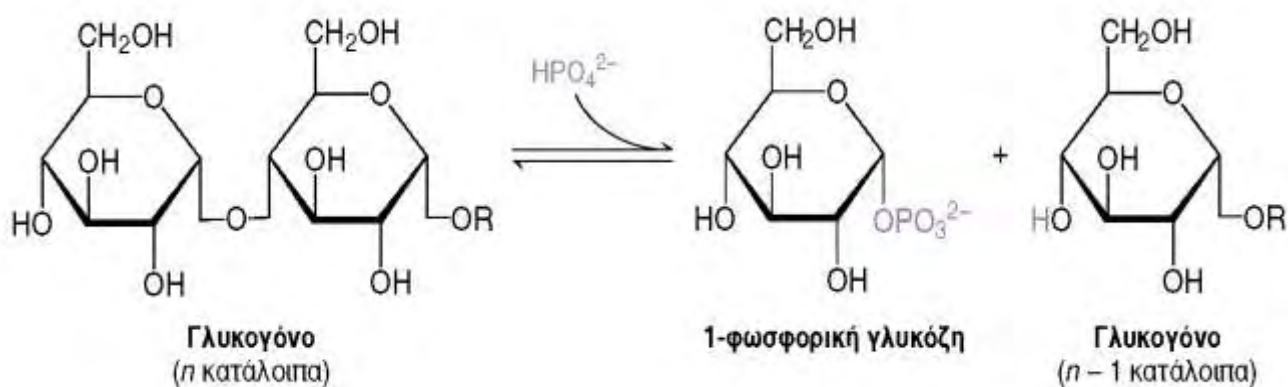
2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η αποδοτική αποικοδόμηση του γλυκογόνου για να προμηθεύσει 6-φωσφορική γλυκόζη χρειάζεται τέσσερις ενζυμικές δραστηριότητες:

- μια να αποικοδομεί το γλυκογόνο
- δύο να ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο ώστε να παραμένει ένα υπόστρωμα για αποικοδόμηση
- μία να μετατρέπει το προϊόν καταβολισμού του γλυκογόνου σε μια μορφή κατάλληλη για περαιτέρω μεταβολισμό.

Καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου αποτελεί **η φωσφορυλάση του γλυκογόνου**. Η φωσφορυλάση του

γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού ιόντος αναφέρεται ως φωσφορόλυση (εικόνα 5) [Stryer et. al . 1997].



Εικόνα 5: Αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου.

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. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση. 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 ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου

διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται.

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6.

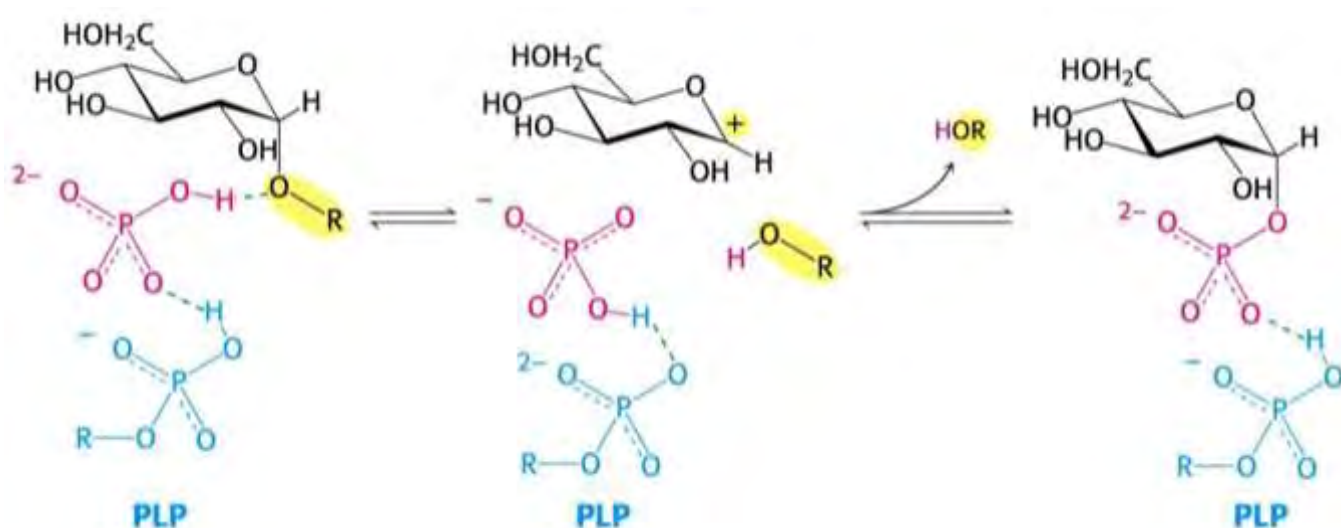
Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο 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, σε αντίθεση με τη γλυκόζη [Stryer et. al . 1997].

2.2.2 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) και ο ρόλος της στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση αντιμετωπίζει μια ιδιαίτερη πρόκληση: να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο.

Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του

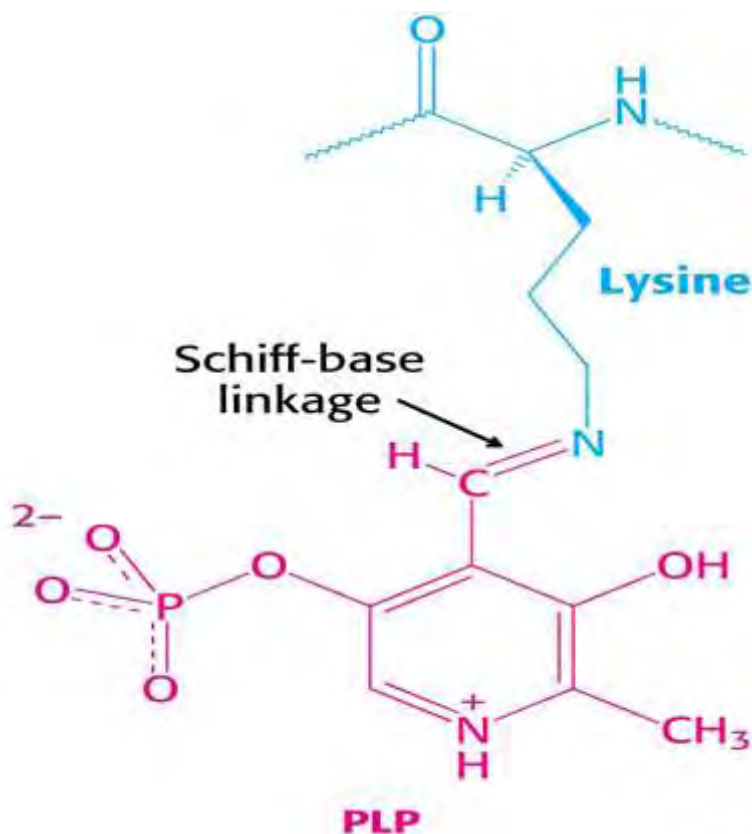
φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη (εικόνα 6) [Stryer et. al. 1997].



Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η ένδειξη PLP αφορά τη φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μία βάση του Schiff στην ε-NH₂ της λυσίνης 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο.

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου (Εικόνα 7). 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) [Stryer, 1997].



Εικόνα 7: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης

Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, 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.

2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

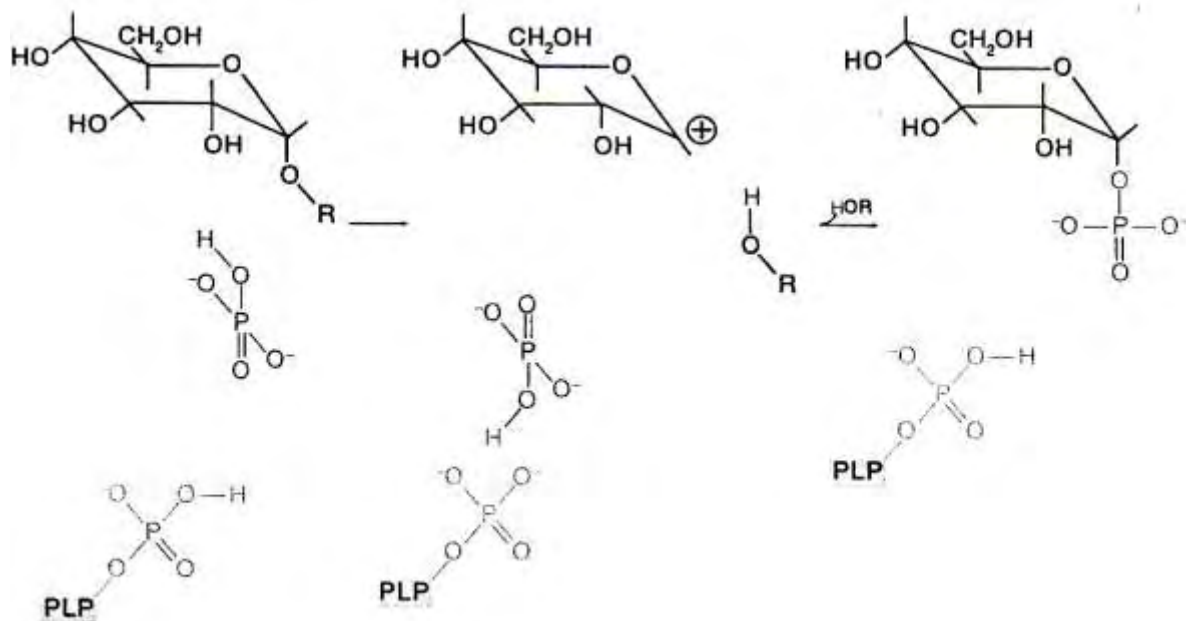
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης [Stryer et. al . 1997].

Δομικά η GP είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ότι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B₆. Με βάση διάφορα πειράματα που έγιναν στο παρελθόν αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστικότητα του ενζύμου. Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η

καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση [McLaughlin 1984].



Εικόνα 8: Προτεινόμενος μηχανισμός φωσφορυλίωσης του γλυκογόνου από την GP. Η ένδειξη PLP αφορά τη φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μία βάση του Schiff στην ϵ -NH₂ της λυσίνης 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α -D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο.

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατροπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση ρυθμίζοντας φυσιολογικά τη δραστηριότητά της GP. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G,(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP) [Stryer et. al . 1997].

2.3.1 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες γίνεται με την βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η λειτουργική δομή των οποίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την καταλυτική τους δράση ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο ευθύνεται για την βιολογική δράση της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής προκαλεί μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται αλλοστερική μετάπτωση. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή [Monod *et al.*, 1963].

Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή [Monod *et al.*, 1963].

Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται σε ομοτροπικές, μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά

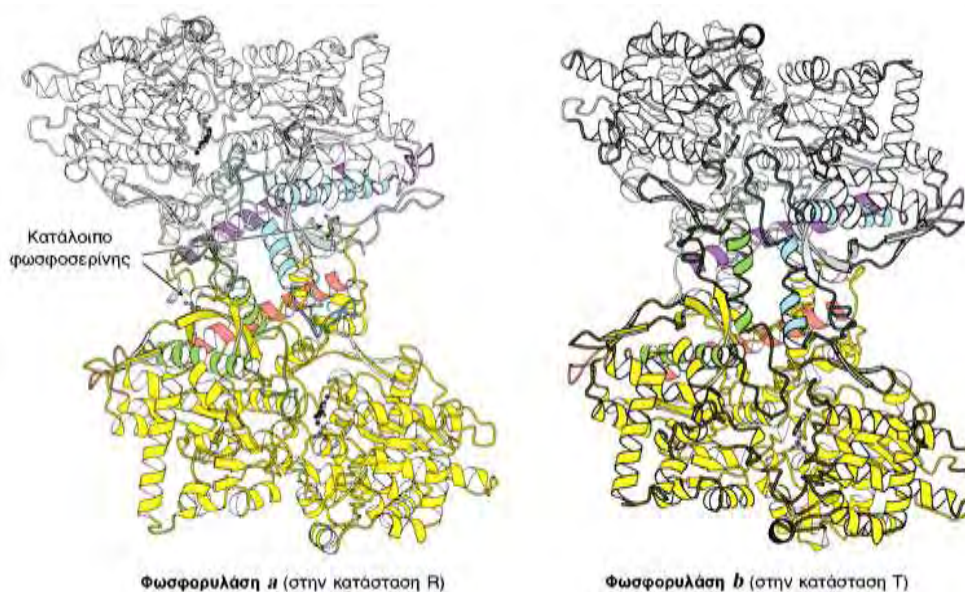
παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την T μορφή και τη R μορφή, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά L. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγένειά τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε μονομερές δεν επηρεάζει κατά κανένα τρόπο την σύνδεσή του στα υπόλοιπα μονομερή (δηλαδή οι μικροσκοπικές σταθερές διάστασης στα σύμπλοκα μεταξύ μονομερών T ή R διαμόρφωσης και υποστρώματος είναι αντίστοιχα ίδιες [Monod *et al.*, 1965]).

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα [Monod *et al.*, 1965].

Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται ανάλογα με το αν η αλλοστερική μετάπτωση προκαλείται από αναστολέα ή

ενεργοποιητή του ενζύμου. Σημειώνεται ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών [Monod et al., 1965, Oikonomakos et al., 1977].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T (εικόνα 9). Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση a) συνδέεται με 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 [Stryer et. al . 1997].



Εικόνα 9: Οι δομές της φωσφορυλάσης a και b. Η φωσφορυλάση a 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 b δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται κυρίως στην T διαμόρφωση.

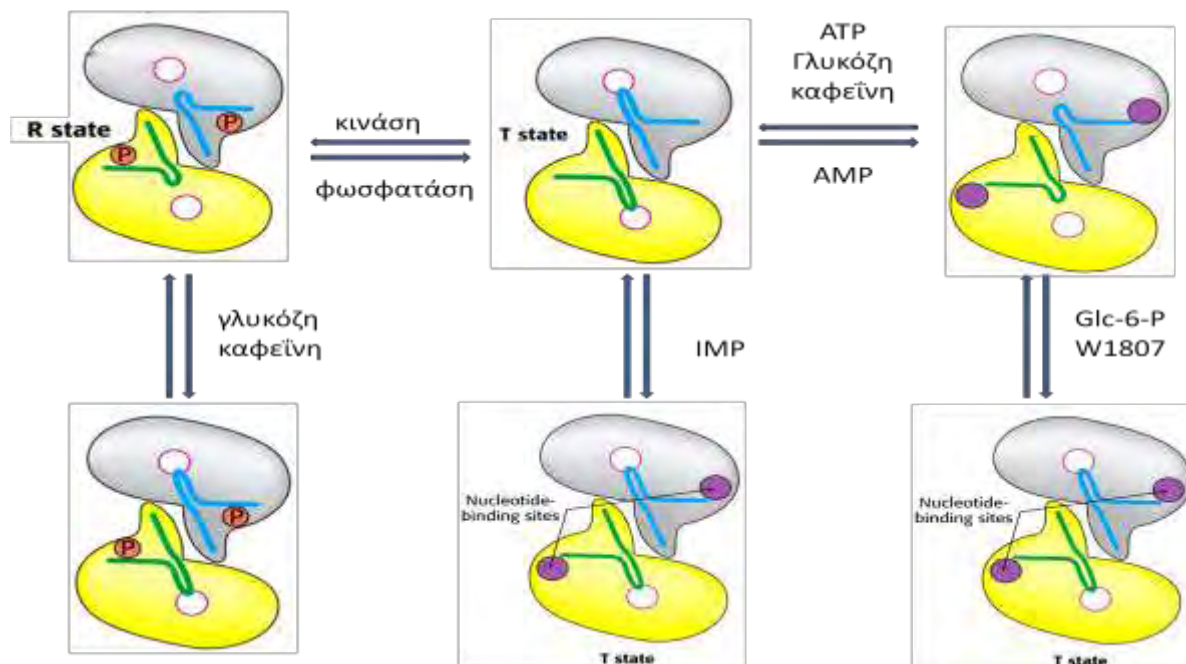
Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση 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.

Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο

δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση. Τέλος στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T κατάσταση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την R κατάσταση και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP [Oikonomakos 2001].

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης b μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν *in vitro* να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} [Oikonomakos *et al.*, 1992].

Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P (Johnson *et al.*, 1989) (Εικόνα 10).

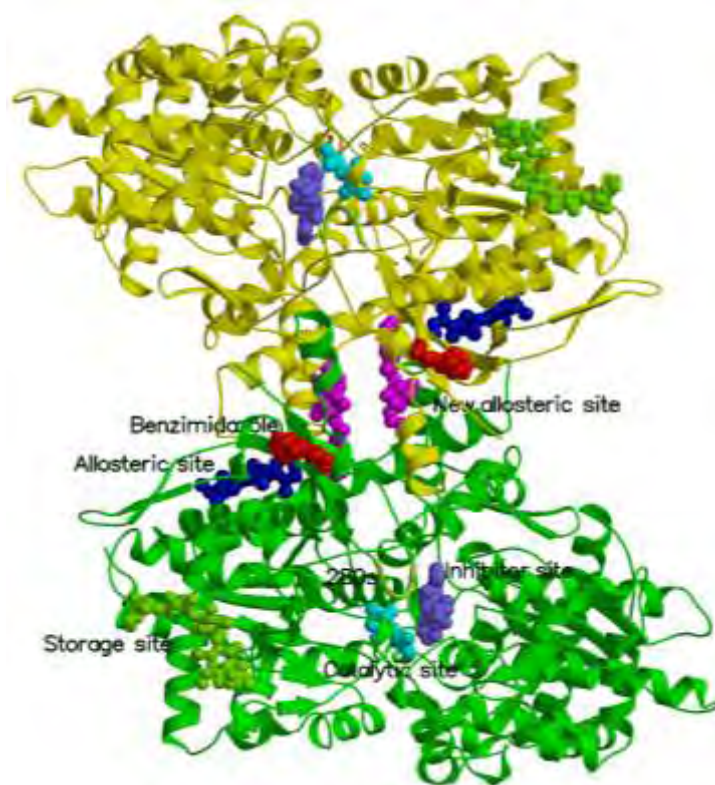


Εικόνα 10: Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης (Stryer 1997).

Η ρύθμιση της δράσης 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 συνόλου. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α, αλλά όχι η β 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 α 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 [Stryer et. al . 1997].

2.3.2 Κέντρα σύνδεσης της φωσφορύλιωσης του γλυκογόνου

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου μπορεί να χωριστεί σε δυο αυτοτελείς περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1, που ονομάζεται και ρυθμιστική, αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο φωσφορύλιωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2, που ονομάζεται και καταλυτική, αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων.



Εικόνα11: Σχηματική απεικόνιση της δομής του διμερούς μορίου της GPb. Το διμερές μόριο της GPb όπως φαίνεται κατά μήκος του μοριακού άξονα συμμετρίας

δεύτερης τάξης στο οποίο υποδεικνύονται τα κέντρα σύνδεσης των διάφορων τροποποιητών: με μωβ το κέντρο αναστολής (φλαβοπιριδόλη), με κυανό το καταλυτικό κέντρο (GlucNaC), με μπλε το αλλοστερικό κέντρο (Acurea), με πράσινο το αποθηκευτικό κέντρο (κυκλοδεξτρίνη), και με ροζ το νέο αλλοστερικό κέντρο (CP320626).

- Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

Η φωσφορυλίωση της σερίνης 14 είναι υπεύθυνη για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή a στη μορφή b. Το κέντρο φωσφορυλίωσης βρίσκεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της Ser 14, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο του ενζύμου. Στην GPb, αυτά τα αμινοξέα είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στη GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των 2 υπομονάδων [Stryer et. al . 1997].

- 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. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις 2 διαμορφώσεις, T και R, της GPa και της GPb. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από 3 υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

1. Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
2. Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων ριβόζης
3. Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων πουρίνης

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο (AMP, IMP, G1P, Pi, SO₄²⁻), είτε ενεργοποιούν, είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP, όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων [Oikonomakos *et al.*, 1992].

- Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από την σύνδεση των υποστρωμάτων (Glc-1-P, Pi) και αναλόγων τους. Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε μια απόσταση 15 Å από την επιφάνεια. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση επιτυγχάνεται μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται από τον βρόχο αμινοξικής αλληλουχίας 282-285. Κατά τη μετάπτωση από T σε R, ο βρόχος 282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από τη βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 οδηγεί στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας [Oikonomakos 2001].

- 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. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αυλάκι που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας [Johnson *et al.*, 1989]. Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί και ως κέντρο ρύθμισης, μιας και η κατάληψη του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης [Oikonomakos 2001].

- Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής, είναι ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης το οποίο εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου, σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (13-484 αμινοξέα), καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (485-842 αμινοξέα). Στην T διαμόρφωση, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού, που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχθεί ότι: πουρίνες όπως η αδεΐνη, νουκλεοσίδια όπως η αδενοσίνη και η ινοσίνη, φωσφονουκλεοτίδια όπως το AMP, το IMP και το ATP, το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σωματίδια, συνδέονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GPα και GPβ,

όχι όμως και στη ηπατική GPα, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα [Oikonomakos *et al.*, 2002].

Στην T διαμόρφωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η Phe285 του βρόχου 280 εντοπίζεται κοντά στη Tyr613 από την έλικα α-19, και μαζί αυτά τα δύο υδρόφοβα μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η σύνδεση στο κέντρο αυτό, έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου και συγχρόνως την φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η σύνδεση των αναστολέων με το ένζυμο δεν οφείλεται σε ηλεκτροστατικούς δεσμούς, καθώς θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει, ότι η κύρια πηγή ενέργειας σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων [Sprang *et al.*, 1982].

- Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPβ. Σε αυτό συνδέεται η ένωση CP320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοκυρανοζυλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPβ. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPα [Oikonomakos *et al.*, 2002].

2.4 Ενζυμική αναστολή

Γενικά είναι αποδεκτό ότι μόνο μία μικρή περιοχή (ενεργός περιοχή) του συνολικού ενζυμικού μορίου εμπλέκεται άμεσα στην καταλυτική διεργασία. Ένας δε κύριος ρόλος του υπόλοιπου μορίου είναι να διατηρεί την ενεργό περιοχή σε στερεοδιατάξεις καταλυτικά δραστικές, ώστε να δεσμεύει και να δρα στα υποστρώματα. Συνέπεια τούτου είναι τα ένζυμα, στην πράξη, να εμφανίζουν δύο άριστες (βέλτιστες) συνθήκες. Μία που αφορά στη δομική σταθερότητα του μορίου γενικά, και μια που αφορά άμεσα στην καταλυτική ικανότητα (δραστηκότητα) και αντικατοπτρίζει την κατάσταση στην ενεργό περιοχή [Georgatsos *et al.*, 2002].

Ως αναστολείς (παρεμποδιστές, inhibitors) θεωρούνται ουσίες οι οποίες, σε χαμηλή συγκέντρωση, ελαττώνουν την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, έχοντας την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το ένζυμο και να παρεμποδίζουν τη δράση του. Οι αναστολείς λειτουργούν εκλεκτικά, αλληλεπιδρώντας με λίγες και συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης επί του ενζυμικού μορίου.

Οι αναστολείς διακρίνονται σε αντιστρεπτούς (reversible) και μη αντιστρεπτούς (irreversible). Οι αντιστρεπτοί αναστολείς, δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο, οπότε το τελευταίο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστηκότητά του, όταν αφαιρεθεί ο αναστολέας. Ο βαθμός αναστολής της ενζυμικής αντιδράσεως παρουσία αναστολέα παραμένει σταθερός τουλάχιστον για το αρχικό στάδιο της αντίδρασης και εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις αναστολέα, ενζύμου και υποστρώματος.

Αντίθετα, οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται κατά τρόπο μόνιμο (π.χ. σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού), οπότε το ένζυμο αδρανοποιείται, συνήθως, οριστικά [Georgatsos *et al.*, 2002].

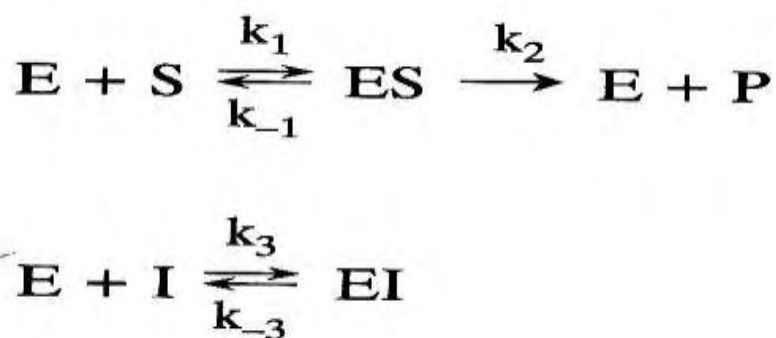
Στην κλασική ενζυμική κινητική διακρίνονται διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής, π.χ. συναγωνιστική, ανταγωνιστική, μικτή, μη συναγωνιστική, μερική, υποστρώματος, προϊόντος και αλλοστερική. Όλες διακρίνονται μεταξύ τους μέσω κινητικής μελέτης που βασίζεται στην αρχική αντίδραση.

- Η ενζυμική αναστολή γίνεται από ειδικά μικρά μόρια ή ιόντα που αναστέλλουν ακόμη και μη αλλοστερικά ένζυμα.
- Στη μη αντιστρεπτή αναστολή, ο αναστολέας ενώνεται ομοιοπολικά με το ένζυμο ή συνδέεται τόσο ισχυρά, ώστε ο διαχωρισμός του από το ένζυμο να είναι πολύ αργός. Οι ομοιοπολικοί αναστολείς παρέχουν έναν τρόπο χαρτογράφησης του ενεργού κέντρου του ενζύμου.
- Η αντιστρεπτή αναστολή χαρακτηρίζεται από μια ταχεία ισορροπία μεταξύ του ενζύμου και του αναστολέα.
- Ένας συναγωνιστικός αναστολέας εμποδίζει το υπόστρωμα από την πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο. Ελαττώνει την ταχύτητα της αντίδρασης με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας ελαττώνει τον αριθμό μετατροπής.
- Η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να διακριθεί από τη μη συναγωνιστική αναστολή, με το να προσδιοριστεί εάν η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας από ειδικά μικρά μόρια και ιόντα είναι σημαντική γιατί αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς ελέγχου στα βιολογικά συστήματα.

Επίσης, πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν με αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Περαιτέρω, η ενζυμική αναστολή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την κατανόηση του μηχανισμού της ενζυμικής δράσης. Κατάλοιπα αμινοξέων κρίσιμα για την κατάλυση μπορούν συχνά να προσδιοριστούν με τη χρησιμοποίηση ειδικών αναστολέων. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, γιατί συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα [Georgatsos *et al.*, 2002].

Στη συναγωνιστική αναστολή, το ένζυμο μπορεί να προσδένει υπόστρωμα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI) αλλά όχι και τα δύο (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Συναγωνιστική αναστολή: Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος S, τότε τα I και S συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός αναστολέας. [Georgatsos *et al.*, 2002].

Πολλοί συναγωνιστικοί αναστολείς μοιάζουν με το υπόστρωμα και προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της

κατάλυσης, με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα με ένα υπόστρωμα [Georgatsos *et al.*, 2002].

Η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα σ' ένα μόριο ενζύμου. Αυτό σημαίνει ότι οι περιοχές πρόσδεσής τους δεν επικαλύπτονται. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα με το υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος (εικόνα 13) [Georgatsos *et al.*, 2002].



Εικόνα 13: Τρόποι δράσης αναστολέων: α) Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος απουσία αναστολέα. β) Συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το υπόστρωμα δεν συνδέεται. γ) Μη συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται σε σημείο διαφορετικό με το ενεργό κέντρο. Το υπόστρωμα συνεχίζει να συνδέεται, αλλά το ένζυμο δεν καταλύει την αντίδραση λόγω της παρουσίας του αναστολέα.

Μια πιο περίπλοκη αναστολή, που ονομάζεται μεικτή αναστολή, παράγεται όταν ένας αναστολέας και επηρεάζει την πρόσδεση του

υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου [Georgatsos *et al.*, 2002].

2.5 Μηχανισμοί ρύθμισης των ενζύμων σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου

Η ρύθμιση των διεργασιών της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου είναι αρκετά πολύπλοκη. Διάφορα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό του γλυκογόνου αποκρίνονται αλλοστερικά σε μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Αυτές οι αλλοστερικές αποκρίσεις επιτρέπουν τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας ώστε να ικανοποιεί τις ανάγκες του κυττάρου στο οποίο τα ένζυμα εκφράζονται. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται επίσης από ορμονικά διεγερόμενους καταρράκτες, οι οποίοι οδηγούν σε αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των ενζύμων, που αλλάζει τις κινητικές τους ιδιότητες. Η ρύθμιση από ορμόνες επιτρέπει στο μεταβολισμό του γλυκογόνου να προσαρμόζεται στις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού. Και με τους 2 αυτούς μηχανισμούς, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ενοποιείται με τη σύνθεσή του [Stryer *et. al.* 1997].

2.5.1 Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται αντίρροπα

Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται αντίρροπα από τον καταρράκτη της κυκλικής AMP που διεγείρεται από μια ορμόνη και δρα μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A. Η πρωτεϊνική κινάση A πέραν του ότι φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης, προσθέτει και μια φωσφορική

ομάδα στη συνθάση του γλυκογόνου, γεγονός που οδηγεί σε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Αυτός ο σπουδαίος μηχανισμός ελέγχου εμποδίζει τη σύνθεση του γλυκογόνου ταυτόχρονα με την αποικοδόμηση του [Stryer et. al . 1997].

2.5.2 Η πρωτεϊνική φωσφατάση 11 (PP1) αντιστρέφει τη ρυθμιστική επίδραση των κινασών στο μεταβολισμό του γλυκογόνου.

Το ένζυμο πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1), παίζει καθοριστικούς ρόλους στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Η PP1 απενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης και τη φωσφορυλάση α με αποφωσφορυλίωση των ενζύμων αυτών. Η PP1 μειώνει τον ρυθμό αποικοδόμησης του γλυκογόνου: αυτή αντιστρέφει τις επιδράσεις του καταρράκτη φωσφορυλίωσης. Εκτός αυτού, η PP1 απομακρύνει τη φωσφορική ομάδα από τη συνθάση b του γλυκογόνου και τη μετατρέπει στην πολύ πιο ενεργό μορφή α. Συνεπώς η PP1 επιταχύνει τη σύνθεση του γλυκογόνου. Η PP1 αποτελεί ένα ακόμη μοριακό τέχνασμα για τον συντονισμό αποθήκευσης υδατάνθρακα [Stryer et. al . 1997].

Το πλήρες σύμπλοκο της PP1 αποτελείται από τρία συστατικά: την ίδια την PP1, μια καταλυτική υπομονάδα 37 kd - μια υπομονάδα RG₁ 123 kd η οποία προσφέρει υψηλή συγγένεια για το γλυκογόνο - και τον αναστολέα 1, μια μικρή ρυθμιστική υπομονάδα η οποία όταν φωσφορυλιωθεί αναστέλλει την PP1. Η σπουδαιότητα της υπομονάδας RG₁ έγκειται στο ότι φέρει την PP1, η οποία είναι ενεργός μόνο όταν συνδέεται με τα μόρια γλυκογόνου, σε προσέγγιση με το υπόστρωμά της [Stryer et. al . 1997].

Ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζεται η δραστηριότητα φωσφατάσης της ίδιας της PP1 πχ στην περίπτωση που η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι επικρατούσα περιγράφεται ως εξής: Η PKA είναι ενεργός. Δύο συστατικά της PP1 είναι τα ίδια υποστρώματα για την πρωτεϊνική κινάση A. Φωσφορυλίωση του συστατικού RG_1 από την πρωτεϊνική κινάση A εμποδίζει τη δέσμευση της RG_1 από την καταλυτική υπομονάδα της PP1. Συνεπώς ενεργοποίηση του καταρράκτη της κυκλικής AMP οδηγεί σε απενεργοποίηση της PP1 διότι αυτή δεν μπορεί να δεσμευτεί πλέον στα υποστρώματά της. Φωσφορυλίωση του αναστολέα 1 με την πρωτεϊνική κινάση A εμποδίζει την κατάλυση από την PP1. Έτσι, όταν η αποικοδόμηση του γλυκογόνου διεγείρεται από την κυκλική AMP, η επακόλουθη φωσφορυλίωση του αναστολέα 1 διατηρεί τη φωσφορυλάση στην ενεργό μορφή α και τη συνθάση του γλυκογόνου στην ανενεργό μορφή β [Stryer et. al. 1997].

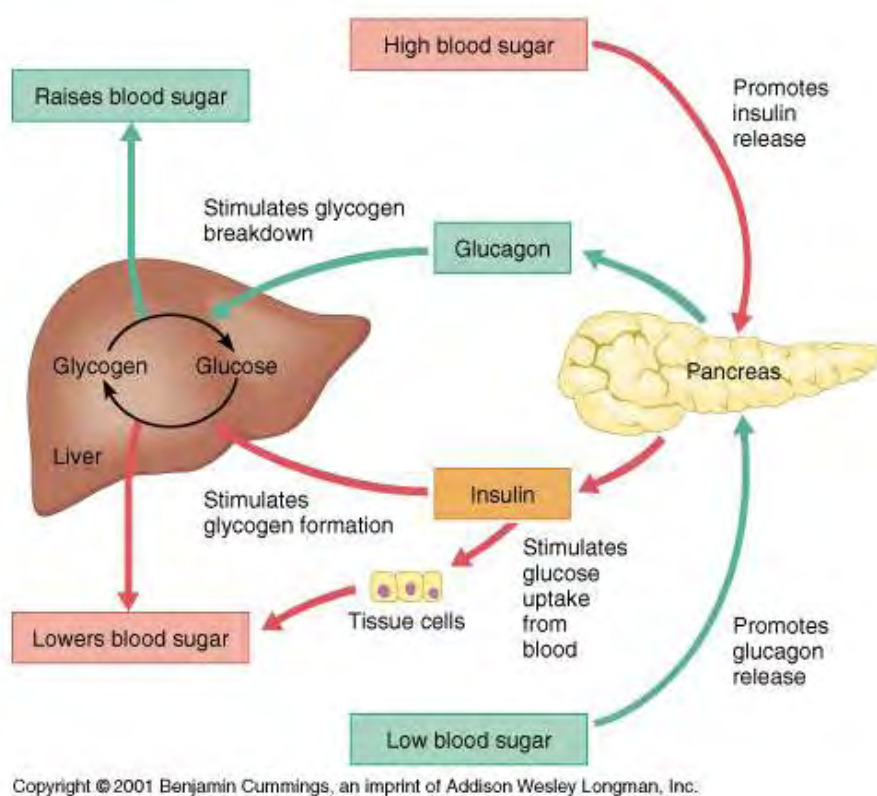
2.6 Μόρια Ρυθμιστές μεταβολισμού γλυκογόνου και των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα- Ορμονικός Έλεγχος

Η ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου υπόκειται σ' έναν αυστηρό ορμονικό έλεγχο. Στον έλεγχο αυτό λαμβάνουν καθοριστικό ρόλο πεπτιδορμόνες (ορμόνες παγκρέατος), στεροειδής ορμόνες (κορτιζόλη) και παράγωγα αμινοξέων (επινεφρίνη).

2.6.1 Ορμόνες Παγκρέατος-Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη

Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη αποτελούν πολυπεπτιδικές ορμόνες οι οποίες εκκρίνονται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του

αίματος από το πάγκρεας (ενδοκρινείς ορμόνες). Με τις δύο αυτές ορμόνες ρυθμίζεται η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, που κατά μέσον όρο πρέπει να παραμένει σε μια στενή περιοχή (70 mg/dL έως 110 mg/dL). Και οι δύο ορμόνες παράγονται στα νησίδια Langerhans του παγκρέατος και έχουν ακριβώς αντίθετη δράση, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα [Smokonitis 2004](εικόνα 14).

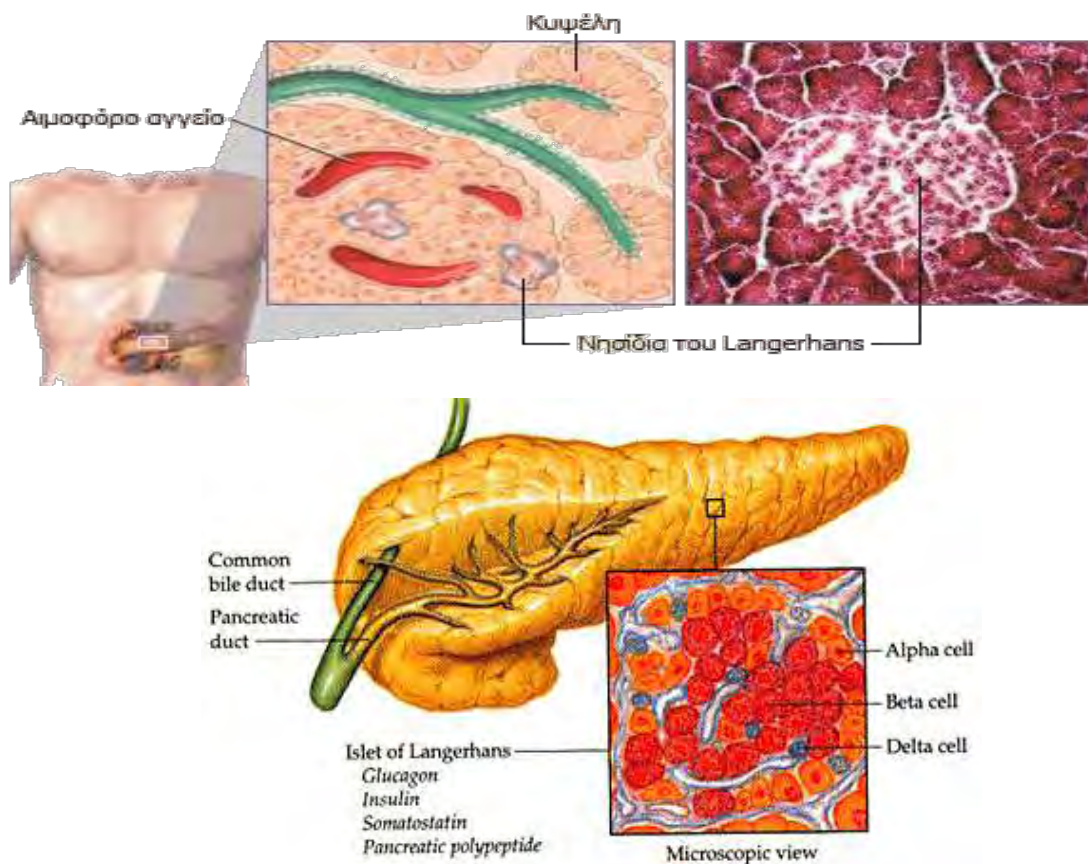


Εικόνα 14 : Το διάγραμμα ομοιόστασης ινσουλίνης/γλυκαγόνης απεικονίζει την αντίθετη δράση ινσουλίνης- γλυκαγόνης (feedback loop). Με κόκκινα βέλη απεικονίζεται το μονοπάτι παραγωγής και δράσης της ινσουλίνης (αυξημένη γλυκόζη στο αίμα) και με πράσινο το μονοπάτι παραγωγής και δράσης της γλυκαγόνης (μειωμένη γλυκόζη στο αίμα).

2.6.2 Δομή και Φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι ορμόνη που παράγεται σε ειδική μοίρα του παγκρέατος (και συγκεκριμένα από ομάδες κυττάρων που ονομάζονται «νησίδια του Langerhans») που αποτελούν το 60-85%

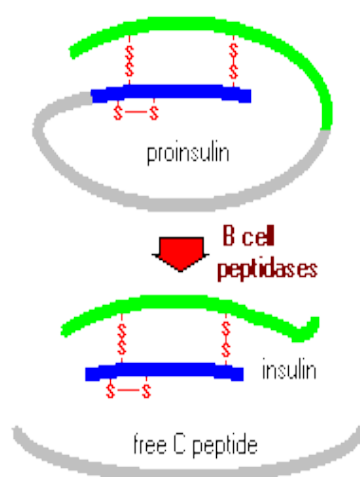
των κυττάρων των νησιδίων Langerhans. (εικόνα 15) και παίζει πρωτεύοντα ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων (σακχάρων) του οργανισμού. Τα β-κύτταρα "διεγείρονται" από τα μόρια γλυκόζης και η δράση της είναι ξεκάθαρα αναβολική. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνει ο ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης.



Εικόνα 15: Μορφολογία των νησιδίων του Langerhans και τοπολογία των β (έκκριση ινσουλίνης) και α κυττάρων (έκκριση γλυκαγόνης) του παγκρέατος.

Η ινσουλίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από το πάγκρεας το 1922 από τους Banting και Best. Συντίθεται αρχικά υπό την μορφή προορμόνης, της προ-ινσουλίνης. Η προ-ινσουλίνη διασπάται προ της έκκρισης από τις πεπτιδάσες των β-κυττάρων σε ειδικά κυστίδια και παράγεται η δραστική ινσουλίνη και το ανενεργό C-πεπτίδιο. Η ώριμη πλέον ινσουλίνη αποτελείται από δύο

πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενωμένες με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Η ινσουλίνη και το C-πεπτίδιο αποδεσμεύονται στην κυκλοφορία μετά τη σύντηξη των κυστιδίων με την πλασματική μεμβράνη μετά από ορμονικά, νευρικά και άλλα ερεθίσματα καθώς και λόγω της συγκέντρωσης της γλυκόζης στην κυκλοφορία.



Εικόνα 16: Η προ-ινσουλίνη διασπάται από τις πεπτιδάσες των β-κυττάρων και παράγεται η δραστική ινσουλίνη και το ανενεργό C-πεπτίδιο. Η ώριμη ινσουλίνη αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενωμένες με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς.

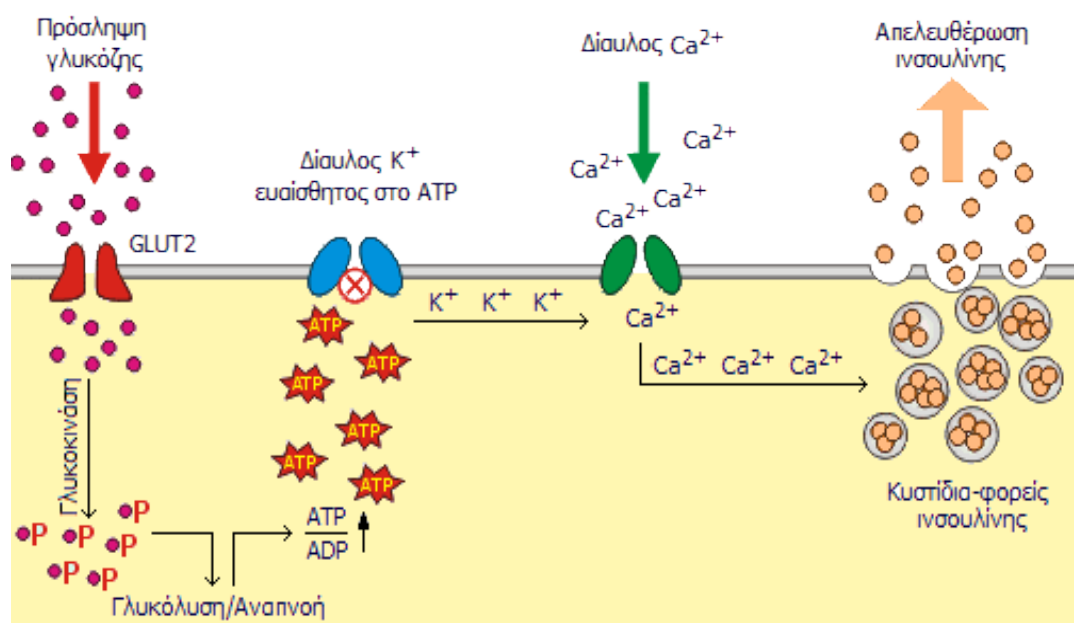
2.6.3 Μηχανισμός Δράσης ινσουλίνης - Βιολογική δράση της Ινσουλίνης

Πολλαπλές φωσφορυλιώσεις χρησιμεύουν ως ερέθισμα για ένα ρυθμιστικό κύμα αποφωσφορυλιώσεων. Η δέσμευση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της, οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας πρωτεϊνικής κινάσης ευαίσθητης στην ινσουλίνη η οποία φωσφορυλιώνει την υπομονάδα RG_1 της $PP1$ σε μια θέση διαφορετική από εκείνη που τροποποιείται με την πρωτεϊνική κινάση A. Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί στη σύνδεση της υπομονάδας RG_1 με την $PP1$ και το μόριο γλυκογόνου. Η επακόλουθη αποφωσφορυλίωση της συνθάσης του γλυκογόνου, της κινάσης της

φωσφορυλάσης και της φωσφορυλάσης προάγει τη σύνθεση γλυκογόνου και εμποδίζει την αποικοδόμηση του. Αυτό αποδεικνύει τον συντονισμένο έλεγχο της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου.

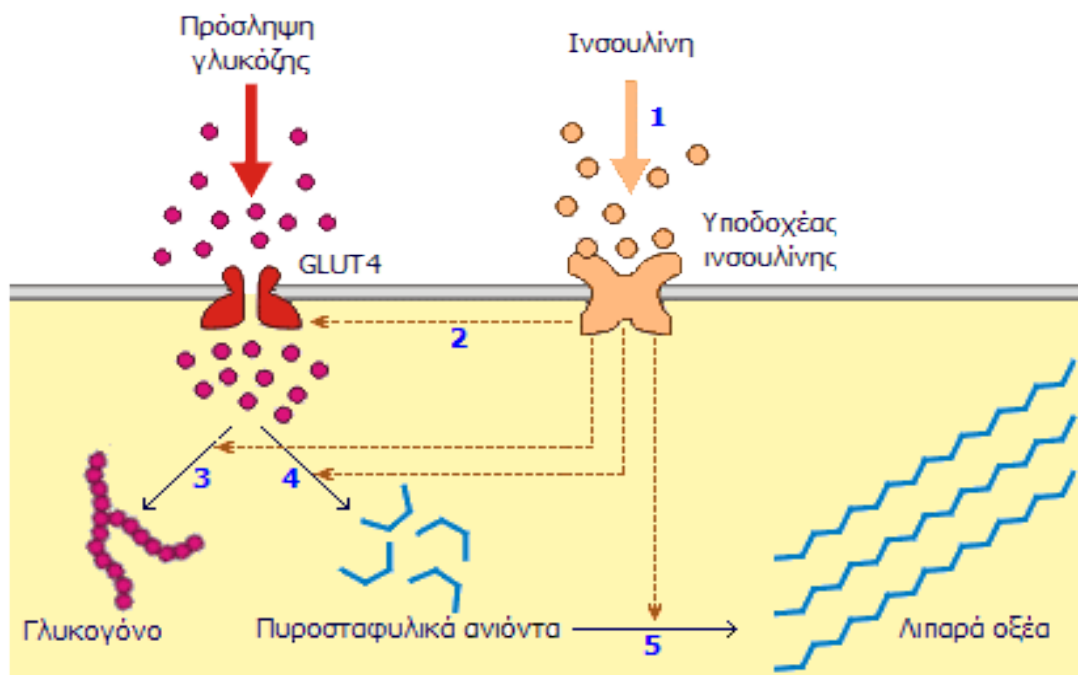
2.6.4 Έκκριση ινσουλίνης υπό την επίδραση γλυκόζης / Δέσμευση γλυκόζης υπό την επίδραση ινσουλίνης

Υπάρχει μια μοναδική αλληλεξάρτηση μεταξύ των μορίων γλυκόζης και ινσουλίνης. Η ινσουλίνη παράγεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος όταν αυτά δεχθούν την επίδραση της γλυκόζης, ενώ τα μυϊκά και λιπώδη κύτταρα αρχίζουν να προσλαμβάνουν γλυκόζη όταν δεχθούν την επίδραση της ινσουλίνης. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί είναι πολλοί και πολύπλοκοι και σε γενικές γραμμές περιγράφονται από το παρακάτω σχήμα (εικόνα 17).



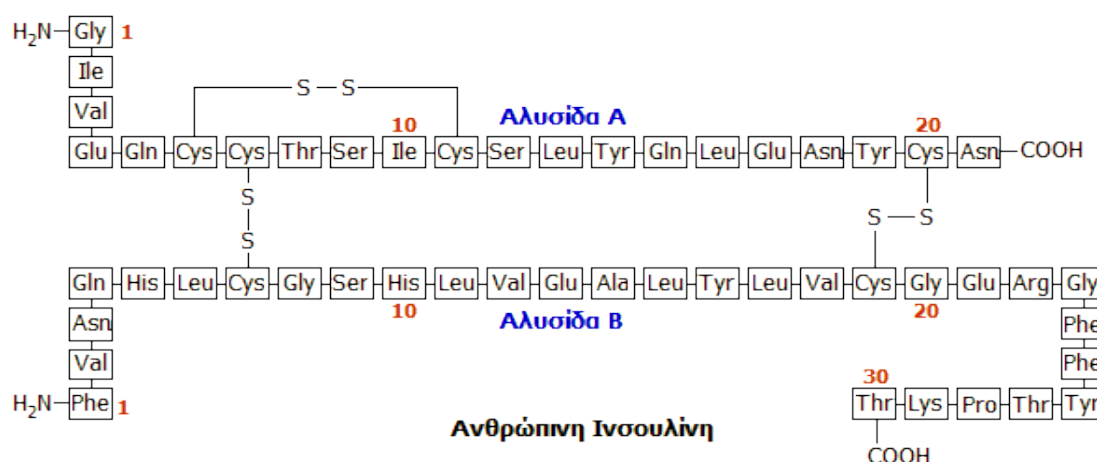
Εικόνα 17: Μηχανισμός έκκρισης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος: Γλυκόζη από το αίμα μεταφέρεται στο κύτταρο μέσω των μεταφορέων (transporter) GLUT2. Η γλυκόζη υπόκειται σε γλυκολυτική φωσφορυλίωση και εισέρχεται στον αναπνευστικό κύκλο, ενώ παράγεται ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη), στην οποία αποθηκεύεται "χημική ενέργεια" και αυξάνεται ο λόγος ATP/ADP στο κυτταρόπλασμα. Η

αύξηση αυτή "κλειδώνει" τον διάυλο ιόντων καλίου αποπολώνοντας την κυτταρική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη διάνοιξη του διαύλου ιόντων ασβεστίου και στο κύτταρο εισέρχονται ιόντα ασβεστίου. Η αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου προκαλεί την εξωκυτταρική έκλυση ινσουλίνης από τα κυστίδια παρακαταθήκης της. Στους ασθενείς με διαβήτη τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης), ο μηχανισμός αυτός δεν υφίσταται, αφού τα β-κύτταρα ουσιαστικά έχουν "αυτοκαταστραφεί".



Εικόνα 18: Πρόσληψη γλυκόζης από μυϊκά και λιπώδη κύτταρα και μεταβολισμός της: Μόλις το μόριο της ινσουλίνης "προσδεθεί" στους υποδοχείς ινσουλίνης του κυττάρου (1), μέσω χημικών σημάτων από τον υποδοχέα ενεργοποιείται ο μεταφορέας γλυκόζης GLUT4 που επιτρέπει την είσοδο γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα. Ανάλογα με τη φύση του κυττάρου ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί σύνθεσης γλυκογόνου (3) και γλυκόλυσης (4). Η εισερχόμενη γλυκόζη υπόκειται σε γλυκόλυση, δηλαδή διασπάται προς πυροσταφυλικά ανιόντα (4) και η εκλυόμενη ενέργεια αποθηκεύεται ως ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη). Στη συνέχεια τα πυροσταφυλικά ανιόντα χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων (5). Στον διαβήτη τύπου II (μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης ενηλίκων) τα χημικά σήματα από τη δέσμευση της ινσουλίνης είναι ανεπαρκή και σε προχωρημένα στάδια δεν υφίσταται ούτε ο μηχανισμός παραγωγής ινσουλίνης. Και στις δύο περιπτώσεις διαβήτη παύει η πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσής της στο αίμα.

Μόλις "προσδεθεί" το μόριο της ινσουλίνης και προκαλέσει την πρόσληψη γλυκόζης, όπως δείχνεται στο επάνω σχήμα, μπορεί να απελευθερωθεί στο εξωκυτταρικό περιβάλλον ή μπορεί να απορροφηθεί (μαζί με τον υποδοχέα) και να διασπαστεί από το κύτταρο με τη βοήθεια ειδικού ενζύμου. Τα περισσότερα μόρια ινσουλίνης καταστρέφονται από ηπατικά κύτταρα. Έχει υπολογιστεί ότι ένα μόριο ινσουλίνης καταστρέφεται περίπου 71 min μετά την εισαγωγή του στην κυκλοφορία του αίματος [Larner 1990].



Εικόνα 19 : Η αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης ινσουλίνης

Με τη σειρά της η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα (adipocytes). Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη που αποτελεί την κύρια πηγή χημικής ενέργειας. Επιπλέον, η ινσουλίνη προκαλεί την "αποταμίευση" γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη μορφή γλυκογόνου (glycogen).

Εάν το ήπαρ "κορεσθεί" σε γλυκογόνο, η γλυκόζη αρχίζει να κατευθύνεται στα λιπώδη κύτταρα όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και γλυκερόλης και τελικά τριγλυκεριδίων. Η ινσουλίνη "καθοδηγεί" τα κύτταρα, όταν αυτά αναζητούν ενέργεια, να καταναλώσουν γλυκόζη αντί λιπαρών οξέων και επομένως εμπλέκεται στους μηχανισμούς συσσώρευσης λίπους στο σώμα. Πέραν της εμπλοκής της ινσουλίνης στο ισοζύγιο σακχάρου/λίπους, η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη αμινοξέων για σχηματισμό πρωτεϊνών, ενώ η έλλειψή της (όπως π.χ. σε καταστάσεις νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση και αλλοίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. αποδέσμευση λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία [Larner 1990].

2.6.5 Σύνοψη των πολλαπλών φυσιολογικών δράσεων της ινσουλίνης:

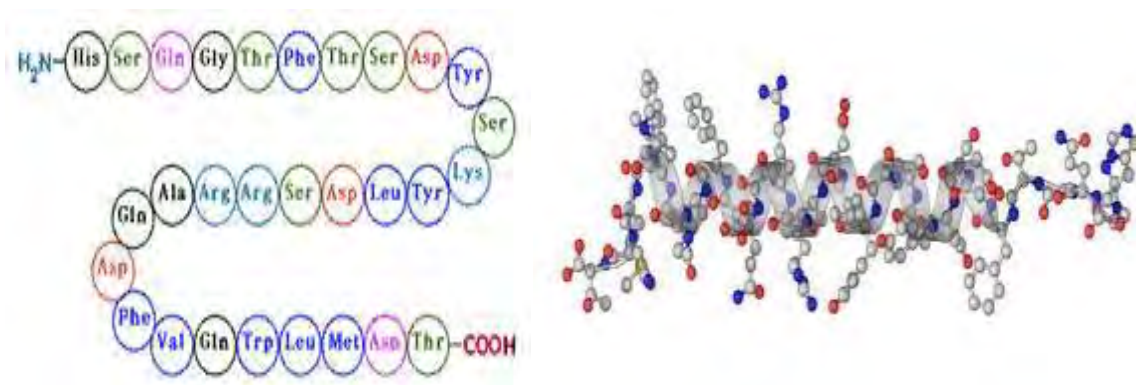
Στον μεταβολισμό: (1) Έλεγχος της πρόσληψης ορισμένων ουσιών και κυρίως της γλυκόζης από τους μυϊκούς και τους λιπώδεις ιστούς. (2) Ενίσχυση των μηχανισμών αντιγραφής του DNA και της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω ελέγχου της πρόσληψης αμινοξέων. (3) Τροποποίηση της δραστηριότητας πολλών ενζύμων.

Η δράση της στα κύτταρα περιλαμβάνει: (1) Ενίσχυση του μηχανισμού σύνθεσης γλυκογόνου και αποθήκευσής του. (2) Ενίσχυση των μηχανισμών σύνθεσης λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων στα λιπαρά κύτταρα. (3) Περιορίζει τη διάσπαση των πρωτεϊνών. (4) Περιορίζει τον σχηματισμό γλυκόζης από μη υδατανθρακικά μόρια. (5) Περιορίζει τις βλάβες που υφίστανται οργανίδια των κυττάρων. (6) Βελτιώνει την πρόσληψη αμινοξέων.

(7) Βοηθά στην πρόσληψη καλίου από τα κύτταρα και έτσι μειώνει τη συγκέντρωσή του στο αίμα. (8) Χαλαρώνει το μυϊκό τόνο, αυξάνει τη ροή αίματος ιδιαίτερα μέσω των μικροαρτηριών. (9) Βοηθά στην έκκριση υδροχλωρικού οξέος από τα επιθηλιακά καλυπτήρια κύτταρα του στομάχου.

2.6.6 Γλυκαγόνη-Δομή και βιολογική δράση

Η γλυκαγόνη (εικόνα 20) εκκρίνεται από τα α -κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων και η δράση της είναι ξεκάθαρα καταβολική. Αντίθετα με την ινσουλίνη, η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος. Η έκκρισή της ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυϊκή δραστηριότητα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη στάθμη της γλυκόζης στο αίμα επειδή διασπά το αποταμιευμένο γλυκογόνο στο ήπαρ (κυρίως) και στους μύες προς γλυκόζη. Επιπλέον, ενεργοποιεί τη λιπόλυση στους λιπώδεις ιστούς.



Εικόνα 20: Η αμινοξική αλληλουχία και η τρισδιάστατη δομή της γλυκαγόνης.

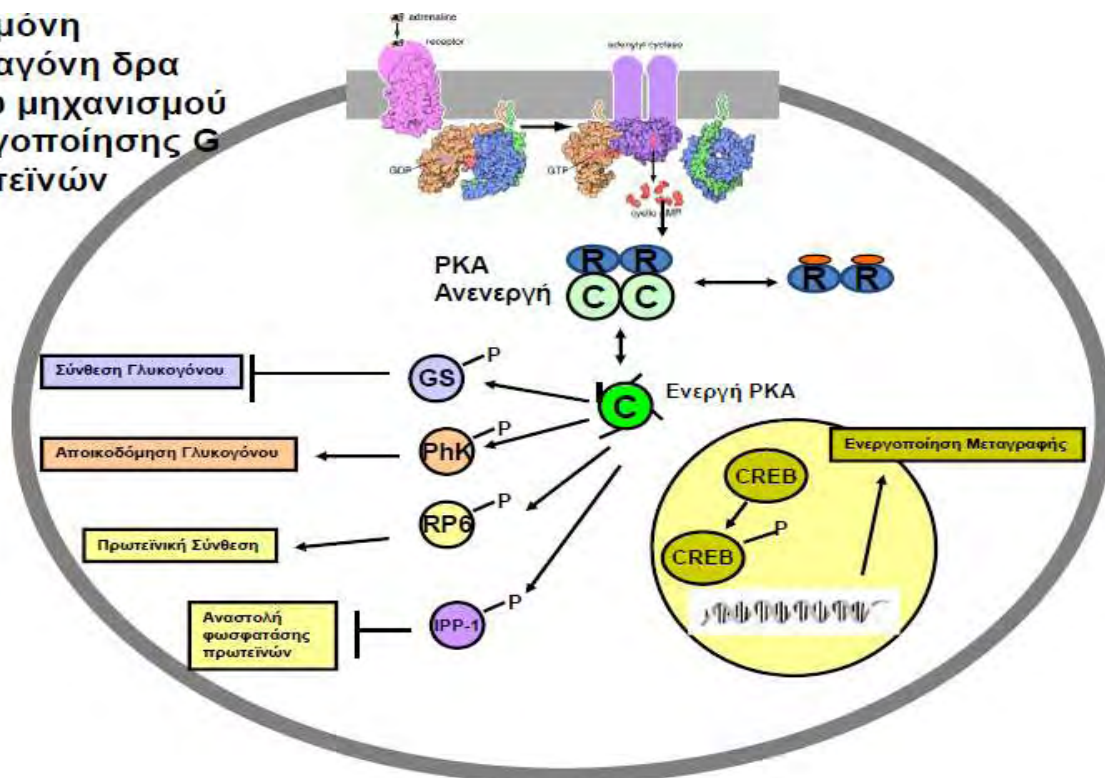
2.6.7 Μηχανισμός δράσης γλυκαγόνης

Το σηματοδοτικό μόριο γλυκαγόνη προσδένεται στους ειδικούς υποδοχείς 7TM στην κυτταρική μεμβράνη των μυϊκών και ηπατικών κυττάρων αντίστοιχα. Η γλυκαγόνη προσδένεται στον υποδοχέα της γλυκαγόνης. Η πρόσδεση αυτή ενεργοποιεί την υπομονάδα α της ετερομερούς πρωτεΐνης Gs. Ένα ειδικό εξωκυτταρικό σήμα έχει διαβιβαστεί μέσα στο κύτταρο μέσω δομικών αλλαγών, αρχικά στον υποδοχέα και στη συνέχεια στην πρωτεΐνη G.

Η μορφή της υπομονάδας α της πρωτεΐνης Gs που δεσμεύει GTP, ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία καταλύει το σχηματισμό του δεύτερου αγγελιοφόρου της κυκλικής AMP από ATP.

Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της κυκλικής AMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A μέσω της δέσμευσης της κυκλικής AMP στη ρυθμιστική υπομονάδα, η οποία στη συνέχεια αποδεσμεύεται από την καταλυτική υπομονάδα. Η ελεύθερη καταλυτική υπομονάδα είναι πλέον ενεργή. Η πρωτεϊνική κινάση A φωσφορυλιώνει την υπομονάδα β της κινάσης της φωσφορυλάσης η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Η ορμόνη γλυκαγόνη δρα μέσω μηχανισμού ενεργοποίησης G πρωτεϊνών



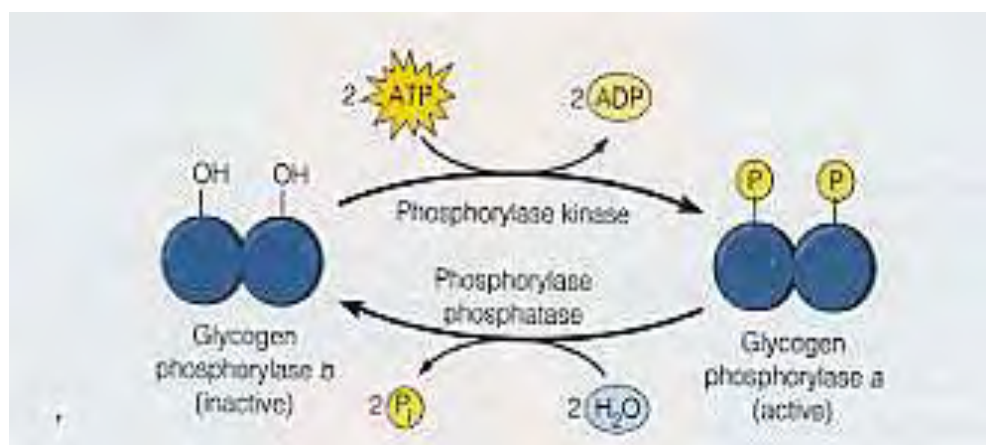
Εικόνα 21: Διάγραμμα μεταγωγής σήματος μετά την πρόσδεση γλυκαγόνης στον υποδοχέα της στην κυτταρική μεμβράνη και τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται/απενεργοποιούνται.

Ο καταρράκτης της κυκλικής AMP ενισχύει σε μεγάλο βαθμό τις δράσεις των ορμονών. Συνεπώς, η δέσμευση ενός μικρού αριθμού μορίων ορμόνης στους υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια οδηγεί στην απελευθέρωση ενός μεγάλου αριθμού μονάδων σακχάρου. Πράγματι, η ενίσχυση είναι τόσο μεγάλη ώστε μεγάλη ποσότητα από το αποθηκευμένο γλυκογόνο θα μπορούσε να κινητοποιηθεί σε χρόνο δευτερολέπτων, αν το σύστημα δεν ρυθμιζόταν αντίρροπα όπως και γίνεται [Stryer et.al. 2007].

Η πορεία μεταγωγής σήματος που οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου τερματίζεται με τη διεργασία που

ήδη περιγράφηκε για πορείες 'όπως εκείνες που χρησιμοποιούν πρωτεΐνες G και κυκλική AMP.

Η ενυπάρχουσα δραστικότητα GTPάσης της πρωτεΐνης G μετατρέπει την προσδεμένη GTP σε GDP σταματώντας έτσι τη μεταγωγή σήματος. Τα κύτταρα εμφανίζουν επίσης δραστικότητα φωσφοδιεστεράσης η οποία μετατρέπει την κυκλική AMP σε AMP. Η πρωτεϊνική κινάση α καθορίζει το βήμα τερματισμού της αποικοδόμησης του γλυκογόνου με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην υπομονάδα α της κινάσης της φωσφορυλάσης μετά την πρώτη φωσφορυλίωση της υπομονάδας β. Η προσθήκη αυτής της φωσφορικής ομάδας καθιστά το ένζυμο ένα καλύτερο υπόστρωμα για την αποφωσφορυλίωση και την επακόλουθη απενεργοποίηση από το ένζυμο πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1). Η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 απομακρύνει επίσης τη φωσφορική ομάδα από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου α (ενεργή μορφή) μετατρέποντας το ένζυμο στη συνήθως ανενεργό μορφή β (εικόνα 22).



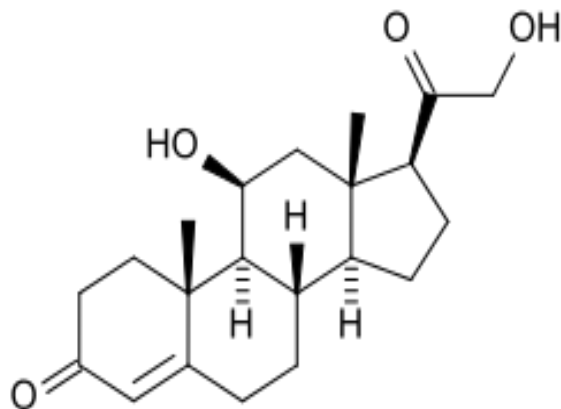
Εικόνα 22: Δράση της πρωτεϊνικής φωσφατάση 1(PP1) που σχετίζεται με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου: απομάκρυνση φωσφορικής ομάδας και μετατροπή της ενεργής μορφής σε μη ενεργή.

2.6.8 Επινεφρίνη

Η επινεφρίνη όπως και γλυκαγόνη, διεγείρει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Η επινεφρίνη που αποτελεί παράγωγο αμινοξέων, διεγείρει σε μεγάλο βαθμό την αποικοδόμηση του γλυκογόνου στους μυς και σε μικρότερη έκταση στο ήπαρ. Ο μηχανισμός δράσης της επινεφρίνης είναι όμοιος με αυτόν της γλυκαγόνης δηλαδή μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες. Η επινεφρίνη προσδέεται στον αδρενεργικό υποδοχέα β στους μυς.

2.6.9 Γλυκοκορτικοειδή και μεταβολισμός των υδατανθράκων

Τα κορτικοειδή (συνών. κορτικοστεροειδή, στεροειδή, στερινοειδή, κορτικοστερινοειδή) είναι ορμόνες απεκκρινόμενες από τον φλοιό των επινεφριδίων ή συνθετικά ανάλογά τους. Όλα τα σκευάσματα των κορτικοειδών έχουν ένα κοινό σκελετό άνθρακα. Με βάση την κύρια φαρμακολογική τους δράση, τα κορτικοειδή διακρίνονται σε αλατοκορτικοειδή και γλυκοκορτικοειδή, αν και η διάκριση αυτή δεν είναι απόλυτη. Τα γλυκοκορτικοειδή (ανήκουν στις στεροειδείς ορμόνες) συντίθενται από την χοληστερόλη στον φλοιό των επινεφριδίων μέσω μιας διαδικασίας που είναι γνωστή ως στεροειδογένεση.. Ο όρος «γλυκοκορτικοειδή» δηλώνει την ιδιότητα των παραγόντων αυτών να διεγείρουν την εναπόθεση γλυκογόνου στο ήπαρ και την γλυκονεογένεση [Psarra AM et. al. 2008].



Εικόνα 23: Το μόριο της κορτικοστερόνης

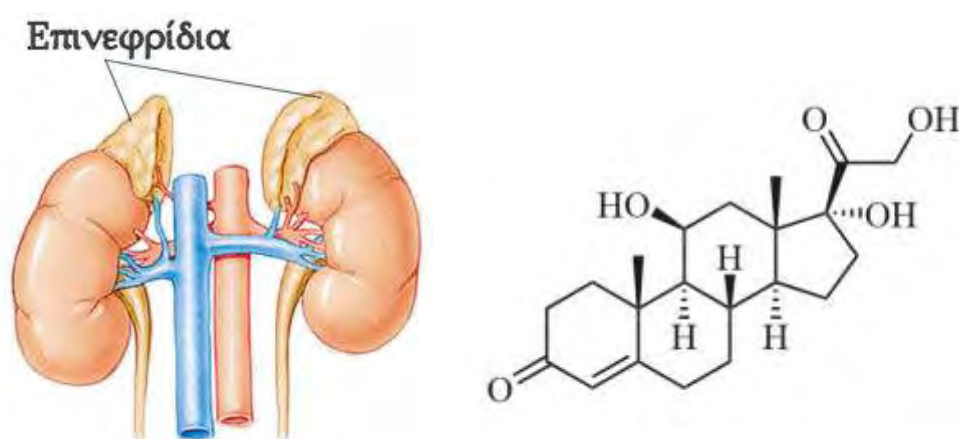
2.6.10 Υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών

Οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών μεταβιβάζονται μέσω σύνδεσης με ειδικούς υποδοχείς που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων. Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται υπό σύμπλοκη μορφή με άλλες πρωτεΐνες και καθώς η ορμόνη συνδέεται στο σύμπλεγμα αυτό, πρωτεΐνες απελευθερώνονται και έτσι επιτρέπεται η ενεργοποίηση του υποδοχέα. Το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα ορμόνη - υποδοχέας μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και συνδέεται σε ειδική ρυθμιστική θέση στο DNA του πυρήνα (steroid responsive element). Εκεί, δρώντας ως παράγοντας μεταγραφής, ρυθμίζει (διεγερτικά ή ανασταλτικά) τη μεταγραφή γειτονικών γονιδίων και το σχηματισμό ειδικών m RNA [Psarra AM et. al. 2008].

2.6.11 Κορτιζόλη –Βιολογική δράση Κορτιζόλης

Η κορτιζόλη ως γλυκοκορτικοειδής, έχει σημαντικές επιδράσεις στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπιδίων, στη συντήρηση του μυϊκού ιστού, την ακεραιότητα του μυοκαρδίου και την καταστολή φλεγμονωδών αποκρίσεων.

Η κορτιζόλη παράγεται στη στηλιδωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων και προωθεί την διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης ενισχύοντας τη δράση ενζύμων της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ και αναστέλλοντας τη χρήση της γλυκόζης στους περιφερειακούς ιστούς [Chamandari et al. 2009].



Εικόνα 24: Τοπολογία του φλοιού των επινεφριδίων(αριστερά). Η δομή του μορίου της κορτιζόλης(δεξιά).

Επιπλέον, η κορτιζόλη ενισχύει την ηπατική πρωτεϊνοσύνθεση και τον καταβολισμό πρωτεϊνών στο υπόλοιπο σώμα. Με το να υποστηρίζει τη σύνθεση της ορμονοευαίσθητης λιπάσης, επίσης, η κορτιζόλη ελέγχει την απελευθέρωση των λιπαρών οξέων από τους λιπώδεις ιστούς.

Ένας ακόμη ρόλος της κορτιζόλης είναι η διατήρηση της απόκρισης των ιστών στις κατεχολαμίνες, και να ενεργοποιεί τη λειτουργία του α-αδρενεργικού υποδοχέα και υποδοχέων που βρίσκονται στα λεία μυϊκά κύτταρα και τα νευρικά κύτταρα.

Τεράστιες ποσότητες κορτιζόλης εκκρίνονται σε απόκριση φυσικών, φυσιολογικών ή μη σημάτων. Η κορτιζόλη επίσης δρα ως

αντιφλεγμονώδες, καταστέλλοντας τη λειτουργία της φωσφολιπάσης A2, η οποία προωθεί τη σύνθεση του αραχιδονικού οξέος, που είναι ο πρόδρομος των προφλεγμονωδών προσταγλανδινών. Άλλο αποτέλεσμα της έκκρισης κορτιζόλης είναι η μειωμένη διαπερατότητα του τριχοειδούς επιθηλίου

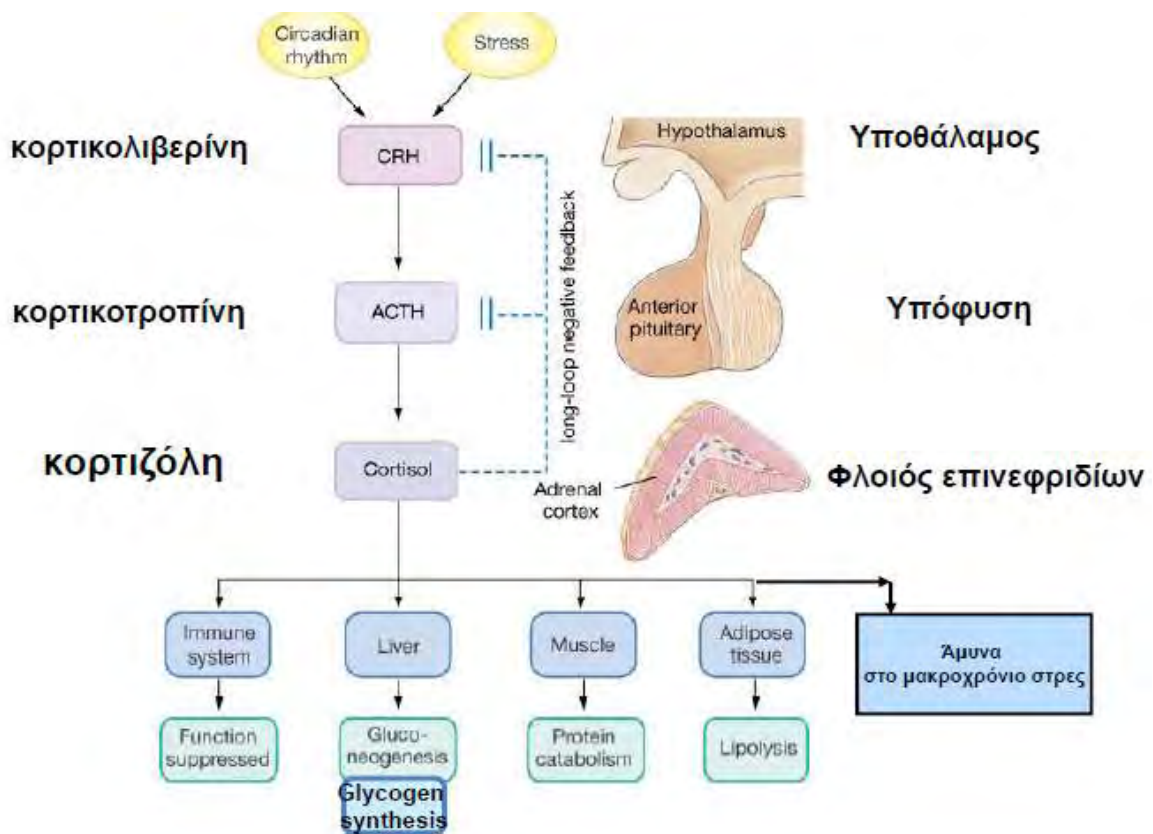
Φυσιολογικά η παραγωγή κορτιζόλης κυμαίνεται μεταξύ 6-7 mg/m²/24ωρο. Το 90 % της κορτιζόλης που κυκλοφορεί στο αίμα είναι συνδεδεμένο με τη δεσμευτική σφαιρίνη των κορτικοστεροειδών (CBG) ενώ το υπόλοιπο 10% είναι ελεύθερο ή συνδεδεμένο με την αλβουμίνη και αυτό το κλάσμα αποτελεί την βιολογικά ενεργή ορμόνη. Όταν η συγκέντρωση στο πλάσμα υπερβεί τα μg/dl παρατηρείται πλήρης κορεσμός της CBG (στο ήπαρ πραγματοποιείται η μετατροπή της κορτιζόνης σε κορτιζόλη ενώ η αδρανοποίηση της κορτιζόλης πραγματοποιείται στους νεφρούς) [Chamandari et al. 2009].

2.6.12 Ρύθμιση της έκκρισης κορτιζόλης

Η ρύθμιση των συγκεντρώσεων των γλυκοκορτικοειδών στο αίμα αντανακλά τις φυσιολογικές ανάγκες του οργανισμού για τις ορμόνες αυτές .

Η σύνθεση και έκκριση της κορτιζόλης ρυθμίζεται κυρίως από τη φλοιοεπινεφριδιοτρόπο ορμόνη (ACTH), μια πεπτιδική ορμόνη 39 αμινοξέων, που εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης ύστερα από διέγερση από δύο υποθαλαμικά νευροπεπτίδια, την εκλυτική ορμόνη της ACTH (CRH, corticotropine-releasing hormone) και την αντιδιουρητική ορμόνη (AVP, argentine vassopresine).

Η κορτιζόλη αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της δραστηριότητας του άξονα υποθαλάμου -υπόφυσης- επινεφριδίων διαμέσου αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης στην πρόσθια υπόφυση, τον υποθάλαμο καθώς και στα υπερκείμενα του υποθαλάμου κέντρα. Έτσι η έκκριση των ACTH και CRH αναστέλλεται από τα γλυκοκορτικοειδή (εικόνα 25) [Psarra AM et. al. 2008].



Εικόνα 25: Ρύθμιση παραγωγής της κορτιζόλης: μηχανισμός παλίνδρομης ρύθμισης.

2.6.13 Γλυκοκορτικοειδή, γλυκόζη και γλυκογόνο

Τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης στο πλάσμα διαμέσου της δράσης τους στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Στο ήπαρ τα γλυκοκορτικοειδή διεγείρουν την εναπόθεση γλυκογόνου μέσω

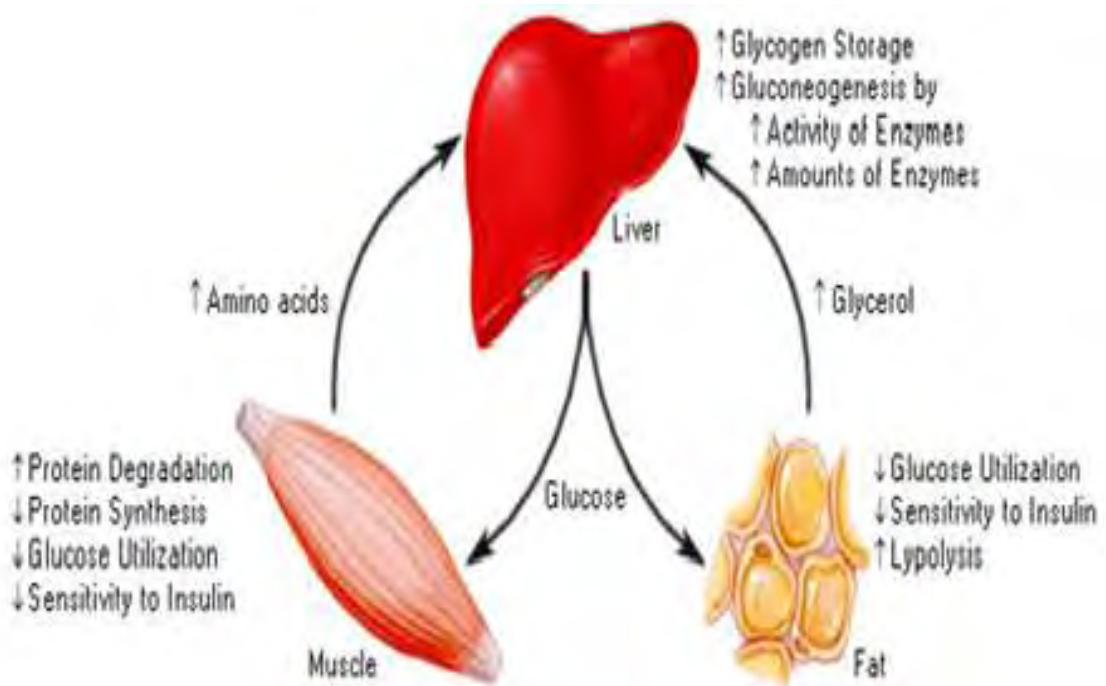
αύξησης της ενεργότητας της συνθάσης γλυκογόνου και ελάττωσης της ενεργότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Η απελευθέρωση γλυκόζης από το ήπαρ αυξάνει λόγω ενεργοποίησης ενζύμων που συμμετέχουν στη γλυκονεογένεση όπως της 6-φωσφορικής γλυκόζης και της φωσφοενολοπυροσταφυλικής καρβοξικινάσης. Στους περιφερικούς ιστούς όπως στο μυϊκό και λιπώδη ιστό τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την πρόσληψη και χρησιμοποίηση της γλυκόζης [Exton 1989].

Στο λιπώδη ιστό μειώνουν την αξιοποίηση της γλυκόζης από τα κύτταρα και την ινσουλινοευαισθησία. Επίσης ενεργοποιείται η λιπόλυση οδηγώντας σε απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία του αίματος, αύξηση των συγκεντρώσεων της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων και ελάττωση της HDL χοληστερόλης.

Στο μυϊκό ιστό ελαττώνουν την ευαισθησία στην ινсуλίνη, προκαλούν ατροφία των μυϊκών ινών και ελαττώνουν τη σύνθεση πρωτεϊνών. Επίσης αναστέλλουν τη λειτουργία των οστεοβλαστών με αποτέλεσμα την οστεοπενία και την οστεοπόρωση που χαρακτηρίζει καταστάσεις χρόνιας υπερκορτιζολαιμίας.

Τα γλυκοκορτικοειδή επίσης διαμεσολαβούν για τη δράση άλλων ορμονών όπως οι κατεχολαμίνες και η γλυκαγόνη με αποτέλεσμα να προκαλείται ινσουλινοαντοχή και αύξηση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης σε βάρος του καταβολισμού των πρωτεϊνών και των λιπιδίων [Chamandari et al. 2009].



Εικόνα 26: Συνοπτική παρουσίαση των δράσεων των γλυκοκορτικοειδών στο ήπαρ, στο λιπώδη και στο μυϊκό ιστό.

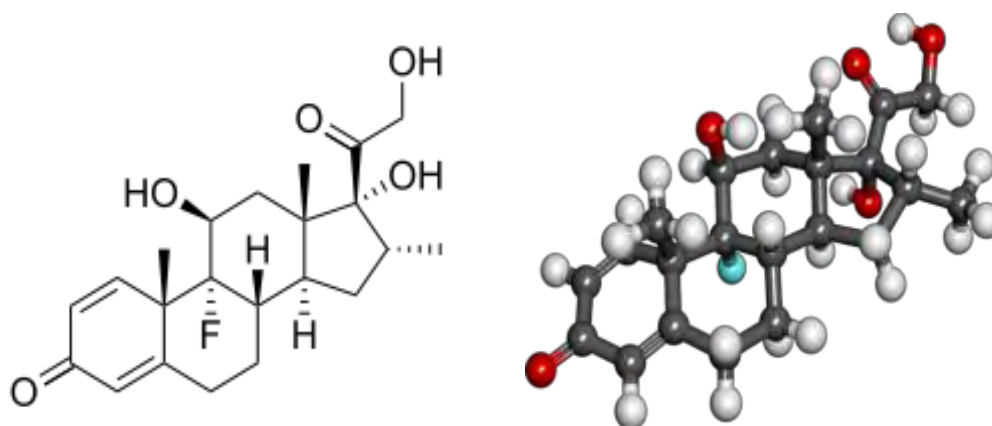
Συνθετικά γλυκοκορτικοειδή που βρίσκονται σε κλινική χρήση αναφέρονται παρακάτω:

- Βηταμεθαζόνη (betamethasone)
- Μπεκλομεθαζόνη (beclomethasone)
- Κορτιζόνη (cortisone)
- Υδροκορτιζόνη (hydrocortisone)
- Δεξαμεθαζόνη (dexamethasone)
- Φλουνισολίδη (flunisolide)
- Μεπρεδνιζόνη (meprednisone)
- Μεθυλπρεδνιζολόνη (methylprednisolone)
- Παραμεθαζόνη (paramethasone)
- Πρεδνιζόνη (prednisone)
- Πρεδνιζολόνη (prednisolone)
- Τριαμσινολόνη (triamcinolone)

- Φθοριοκορτιζόνη (fludrocortisone) : επίσης γλυκοκορτικοειδές, αλλά και με ισχυρές αλατοκορτικοειδείς ιδιότητες

2.6.14. Δεξαμεθαζόνη

Η δεξαμεθαζόνη (dexamethasone) αποτελεί ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές με επταπλάσια αντιφλεγμονώδη δράση από την πρεδνιζολόνη. Όπως άλλα γλυκοκορτικοειδή, η δεξαμεθαζόνη έχει επίσης αντιαλλεργικές, αντιτοξικές, αντιπυρετικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται ως μιμητικό για τη φυσιολογική δράση της κορτιζόλης.



Εικόνα 27: Δομή δεξαμεθαζόνης

Η διατάραξη των ρυθμιστικών μηχανισμών διατήρησης της φυσιολογικών επιπέδων οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις, σημαντικότερη εξ αυτών ο σακχαρώδης διαβήτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

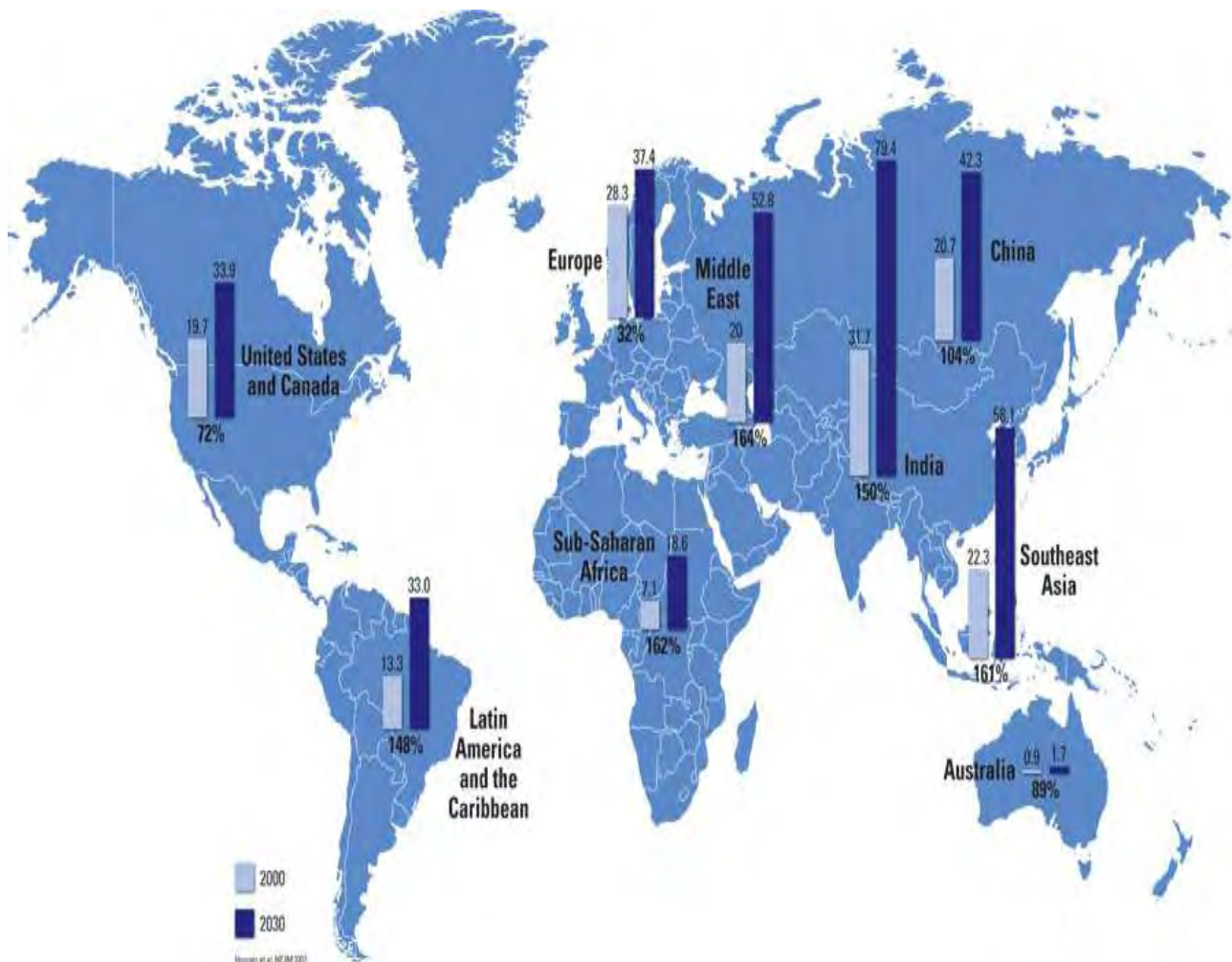
3.1 Γενικά Στοιχεία

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί ιατρικό πρόβλημα εδώ και 3500 χρόνια. Είναι μία πάθηση κατά την οποία το σώμα δεν παράγει ή δεν χρησιμοποιεί σωστά την ινσουλίνη. Η ινσουλίνη είναι μία ορμόνη που απαιτείται για τον μετασχηματισμό της ζάχαρης, του αμύλου και άλλων τροφών σε ενέργεια, απαραίτητη για καθημερινές ανάγκες. Οι ακριβείς αιτίες που προκαλούν τον σακχαρώδη διαβήτη συνεχίζουν να παραμένουν ένα μυστήριο, αν και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο για τη δημιουργία του, τόσο η γενετική, όσο και περιβαλλοντικοί λόγοι, όπως η παχυσαρκία και η έλλειψη εξάσκησης.

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια πάθηση η οποία μπορεί να παραμένει «σιωπηλή» για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Χαρακτηρίζεται από την αύξηση του σακχάρου του αίματος, με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση διάφορων επιπλοκών που αφορούν την καρδιά, τα αγγεία, τα μάτια, τους νεφρούς και το νευρικό σύστημα. Τα υποκειμενικά ενοχλήματα των ασθενών, συχνά δε συνδέονται με τα ευρήματα του αντικειμενικού ελέγχου και η εξέλιξη της νόσου είναι απρόβλεπτη. Ο διαβήτης δεν μπορεί να ιαθεί οριστικά, μπορεί όμως να ελεγχθεί με τη βοήθεια της φαρμακευτικής θεραπείας αλλά και της πειθαρχίας από πλευράς του ασθενούς όσον αφορά τον τρόπο ζωής του. Η τέλεια ρύθμιση των επιπέδων σακχάρου στόχο έχει την πρόληψη τόσο των οξέων αλλά και των χρόνιων επιπλοκών της νόσου.

Υπολογίζεται, ότι σήμερα το 6,3% του πληθυσμού της γης πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη. Σε περίπου 13 εκατομμύρια άτομα από αυτούς ο σακχαρώδης διαβήτης έχει διαγνωστεί, ενώ περίπου

5,2 εκατομμύρια άτομα (δηλαδή το 1/3 από το τελικό ποσοστό) δε γνωρίζουν ότι έχουν την πάθηση. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το διαβήτη (IDF) 194 εκ. άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί σε 333 εκ. το 2025, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού, και τις αλλαγές στον τρόπο ζωής. Στην Ευρώπη σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, το 2000 υπήρχαν 33.3 εκ άτομα με διαβήτη ενώ προβλέπεται ότι το 2030 ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 48 εκ. Στην Ελλάδα το ποσοστό του πληθυσμού που πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη είναι περίπου 10%. Υπάρχουν δύο τύποι διαβήτη, γνωστοί ως τύπου I και II, αντίστοιχα. Το 80% των ασθενών με διαβήτη τύπου 2 είναι παχύσαρκοι και σύμφωνα με την επιδημιολογική μελέτη της Ελληνικής Εταιρίας Παχυσαρκίας, το 41% των ανδρών και το 30% των γυναικών είναι υπέρβαροι γεγονός που κατατάσσει τη χώρα μας στις πρώτες θέσεις στην ΕΕ κατανάλωσης φαρμάκων έναντι του σακχαρώδη διαβήτη. [Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας]. Οι πρώτες δέκα χώρες σε αριθμό ασθενών με διαβήτη είναι οι εξής: Ινδία, Κίνα, ΗΠΑ, Ινδονησία, Ιαπωνία, Πακιστάν, Ρωσία, Βραζιλία, Ιταλία και Μπαγκλαντές. Στις χώρες αυτές ένας στους τέσσερις θανάτους σε άτομα ηλικίας 35 με 64 χρόνων, οφείλεται στο σακχαρώδη διαβήτη (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Τα παγκόσμια ποσοστά του διαβήτη τύπου 2 το 2000 και τα αναμενόμενα ποσοστά το 2030.

3.2 Τύποι σακχαρώδη διαβήτη

Όπως προαναφέρθηκε υπάρχουν δύο κύριοι τύποι σακχαρώδη διαβήτη:

- Ο νεανικός διαβήτης τύπου 1.

Προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη και συνήθως εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 20 ετών γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ως «νεανικός». Ο όρος ινσουλινοεξαρτώμενος σημαίνει ότι το πάσχον άτομο χρειάζεται ινσουλίνη για να ζήσει. Απουσιάζει η ινσουλίνη με αποτέλεσμα 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. Οι ασθενείς που πάσχουν από ΣΔ1 αναπτύσσουν συνήθως διαβήτη σε νεαρή ηλικία, έχουν απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης και η επιβίωση τους εξαρτάται από την εξωγενή χορήγησή της.

- Ο διαβήτης τύπου 2.

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, γνωστότερος και ως «γεροντικός διαβήτης», χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινσουλίνης και πλήττει κυρίως ενήλικες. Σε αυτή τη μορφή διαβήτη έχουν παρατηρηθεί ακόμα και υψηλά επίπεδα ινσουλίνης. Η ινσουλίνη η οποία παράγεται από το πάγκρεας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται το σάκχαρο σαν κύρια πηγή ενέργειας. Συνεπώς, η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται -σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου 1 - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου II ονομάζεται και "μη ινσουλινοεξαρτώμενος"

Η αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα των ιστών να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη και τα επαγόμενα αποτελέσματα της δράσης της. Σε μερικούς ασθενείς παρουσιάζεται μειωμένος αριθμός ή συγγένεια των υποδοχέων ινσουλίνης, ενώ σε άλλους, παρόλο που η σύνδεση της ινσουλίνης είναι κανονική, παρατηρείται ανώμαλη μεταγωγή σήματος εντός του κυττάρου.

Είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη αντιστοιχώντας σε περισσότερο από το 90% των πασχόντων. Κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση

αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Οι ασθενείς που πάσχουν από ΣΔ2 είναι συχνά παχύσαρκοι. Η αναλογία στη διαταραχή τόσο στην έκκριση, όσο και στη δράση της ινσουλίνης, ποικίλλει από άτομο σε άτομο.

	Τύπου 1	Τύπου 2
Ηλικία εμφάνισης	Κυρίως < 40 ετών (αιχμή= 12ο έτος)	Κυρίως > 40 ετών (αιχμή= 60ο-70ό έτος)
Βάρος	Λειπόσωμα άτομα. Κατά κανόνα αναφέρεται απώλεια βάρους κατά την αρχική εμφάνιση.	Κατά κανόνα υπέρβαρα ή παχύσαρκα άτομα
Ανάγκη για χορήγηση ινσουλίνης	Η ινσουλίνη είναι απαραίτητη για την επιβίωση.	Η ινσουλίνη δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση.
Ικανότητα έκκρισης ινσουλίνης	Απουσία	Επαρκής

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά στοιχεία των 2 τύπων σακχαρώδη διαβήτη

Συμβαίνει συχνά να υπάρχουν άνθρωποι που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη και να μην το γνωρίζουν, γιατί τα συμπτώματά τους φαίνονται ασήμαντα. Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει ότι η πρόωρη διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη από τα συμπτώματά

του, μπορεί να μειώσει τις πιθανότητες εμφάνισης των επιπλοκών του.

Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 συνήθως εμφανίζονται απότομα και εξελίσσονται γρήγορα. Στο διαβήτη τύπου 2 τα συμπτώματα εμφανίζονται, συνήθως, σταδιακά και είναι βαθμιαία. Συχνά τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2 λείπουν τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής.

3.3 Αιτίες πρόκλησης του σακχαρώδη διαβήτη

Σε αντίθεση με άλλες παθήσεις ο σακχαρώδης διαβήτης δεν φαίνεται να είναι αυστηρά κληρονομικός. Βέβαια, υπάρχουν άνθρωποι, οι οποίοι λόγω κληρονομικότητας έχουν περισσότερες πιθανότητες να τον αποκτήσουν από ότι κάποιοι άλλοι.

Ο Διαβήτης Τύπου 1 και ο Διαβήτης Τύπου 2 έχουν διαφορετικές αιτίες. Υπάρχουν όμως δύο παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο και στις δύο περιπτώσεις. Ο πρώτος είναι η κληρονομική προδιάθεση στην πάθηση και ο δεύτερος οι περιβαλλοντικές συνθήκες που μπορεί να ωθήσουν προς εκείνη την κατεύθυνση.

Τα γονίδια από μόνα τους πάντως δεν προκαλούν σακχαρώδη διαβήτη. Μία απόδειξη αυτού είναι η περίπτωση των διδύμων. Οι δίδυμοι έχουν ίδια γονίδια. Όμως στις περιπτώσεις που ένας από τους δίδυμους έχει Διαβήτη Τύπου 1, ο άλλος τον παρουσιάζει μόνο κατά το 50%, δηλαδή τις μισές φορές. Στις περιπτώσεις που ένας από τους δίδυμους έχει Διαβήτη Τύπου 2, ο άλλος τον παρουσιάζει τις 3 από τις 4 φορές.

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων κάποιος αποκτά Διαβήτη Τύπου 1, όταν υπάρχει προδιάθεση και από τους δύο γονείς του. Η

προδιάθεση αυτή κατά πάσα πιθανότητα βασίζεται σε παράγοντες που αφορούν τους λευκούς, γιατί οι λευκοί παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά Διαβήτη Τύπου 1.

Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, έρευνες έχουν δείξει ότι έχουν να κάνουν κυρίως με το κρύο νερό. Ο Διαβήτης Τύπου 1 εμφανίζεται συχνότερα το χειμώνα από το καλοκαίρι και σε περιοχές με ψυχρά κλίματα από θερμά. Επίσης συγκεκριμένο ρόλο φαίνεται να έχουν οι ιοί. Ίσως ένας ιός που δεν έχει και πολύ σοβαρά συμπτώματα να επηρεάζει τον ανθρώπινο οργανισμό με τέτοιο τρόπο, ώστε να ενισχύει τον Διαβήτη Τύπου 1. Επίσης σημαντική είναι και η διατροφή κατά τη βρεφική ηλικία. Έχει διαπιστωθεί ότι οι άνθρωποι που τρέφονταν δια θηλασμού περισσότερο χρονικό διάστημα, έχουν μικρότερες πιθανότητες να εμφανίσουν Διαβήτη Τύπου 1.

Τέλος, έχει διαπιστωθεί από πειράματα, ότι οι άνθρωποι που είχαν χαμηλά ποσοστά αντισωμάτων στον οργανισμό τους στο παρελθόν, έχουν τώρα μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσουν Διαβήτη Τύπου 1.

Ο Διαβήτης Τύπου 2 έχει ισχυρότερη γενετική βάση από τον Διαβήτη Τύπου 1, παρόλα αυτά κι αυτός εξαρτάται πολύ από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο δυτικός τρόπος ζωής, που ακολουθείται από κακή διατροφή κι ελάχιστη άσκηση, είναι αρκετά επιρρεπής προς τον Διαβήτη Τύπου 2. Αντίθετα οι άνθρωποι των χωρών εκείνων που δεν έχουν ακολουθήσει τον δυτικό τρόπο ζωής, δεν εμφανίζουν συχνά τον Διαβήτη Τύπου 2, ανεξάρτητα από την γενετική τους προδιάθεση. Η παχυσαρκία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες για την εμφάνιση του Διαβήτη Τύπου 2.

3.4 Κλινικά χαρακτηριστικά του σακχαρώδη διαβήτη

Υπάρχουν δύο όψεις όσον αφορά τις κλινικές εκδηλώσεις του σακχαρώδη διαβήτη: αυτές που σχετίζονται άμεσα με τις μεταβολικές διαταραχές και αυτές που σχετίζονται με τις μακροπρόθεσμες επιπλοκές της κατάστασης αυτής. Η επικράτηση των μακροπρόθεσμων επιπλοκών (νεφροπάθεια, νευροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια και αρτηριοπάθεια) αυξάνει με τη διάρκεια της ασθένειας [Marshall 2000].

3.4.1 Κλινικές εκδηλώσεις σακχαρώδους διαβήτη τύπου I:

Η εισβολή της νόσου στους διαβητικούς τύπου I είναι συνήθως απότομη, παρά την προϋπάρχουσα επί μακρόν ανοσολογική καταστροφή των β- νησιδίων του παγκρέατος. Η συμπτωματολογία έναρξης της νόσου μπορεί να είναι θορυβώδης έως και δραματική, ιδίως στα μικρά παιδιά και τους εφήβους, λόγω της παντελούς έλλειψης ινσουλίνης.

Τα κλασσικά συμπτώματα του Σακχαρώδους διαβήτη με την πολυουρία, πολυδιψία, πολυφαγία, απώλεια σωματικού βάρους, σε αρκετές περιπτώσεις οδηγούν τον ασθενή στο νοσοκομείο με την εικόνα ενός προδιαβητικού ή διαβητικού κώματος. Συμπτώματα όπως απώλεια σωματικού βάρους, αδυναμία συγκέντρωσης, αίσθημα κόπωσης, υπνηλία και σημαντικού βαθμού απώλεια μυϊκής μάζας μπορεί να εξηγηθούν από τον γενικό υπερκαταβολισμό και την αύξηση της γλυκονεογένεσης της μυϊκής μάζας. Η απώλεια σωματικού βάρους εξηγείται από την σημαντική απώλεια θερμίδων λόγω της γλυκοζουρίας, αφού έχουν παρατηρηθεί απώλειες γλυκόζης μέσω των ούρων της τάξεως των 100-200 gr ημερησίως. Μέσω λοιπόν αυτής της γλυκοζουρίας σημειώνεται απώλεια 400-

800, πολλές φορές έως και 1000 θερμίδων την ημέρα, γεγονός από το οποίο εύκολα εξηγείται η προκύπτουσα σημαντική απώλεια σωματικού βάρους σε αρρύθμιστους διαβητικούς. Στις τυπικές περιπτώσεις διαπιστώνεται αιφνίδια απώλεια βάρους (της τάξης του 1-2 kg την εβδομάδα) με συνοδό έντονη πολυφαγία, πολυδιψία και πολυουρία, ειδικά τη νύκτα, σε άτομα ηλικίας μικρότερης των 30 ετών.

Η παρατηρούμενη πολυουρία εξηγείται μέσω της ωσμωτικής διούρησης που προκαλείται από τις υψηλές πυκνότητες του σακχάρου στα ούρα. Η πολυουρία στη συνέχεια, η οποία μπορεί να φτάσει έως τα 5-6 λίτρα το εικοσιτετράωρο, οδηγεί αντισταθμιστικά στο αίσθημα της δίψας. Έτσι συντηρείται ο γνωστός φαύλος κύκλος της πολυουρίας, της πολυδιψίας και της απώλειας σωματικού βάρους. Με τον τρόπο αυτόν εξάλλου επέρχονται διαταραχές της κατανομής των υγρών μεταξύ του ενδοκυττάριου και του εξωκυττάριου χώρου, οι οποίες συνοδεύονται και από διαταραχές των ηλεκτρολυτών. Σαν αποτέλεσμα των ανωτέρω αναπτύσσεται μία τάση για εμφάνιση κετοοξέωσης [Marshall 2000].

Η αύξηση των κετονικών σωμάτων στο αίμα οδηγεί στις συχνά περιγραφόμενες στους διαβητικούς “κράμπες” της γαστροκνημίας. Η διαταραχή εξάλλου της κατανομής των υγρών μεταξύ του ενδοκυττάριου και του εξωκυττάριου χώρου αποτελεί και την αιτία που πολλές φορές διαβητικοί με απορρυθμισμένο διαβήτη παρουσιάζουν διαθλαστικές ανωμαλίες της οράσεως ή διαβητικοί στους οποίους ρυθμίστηκε ο διαβήτης τους εμφανίζουν τις διαθλαστικές αυτές ανωμαλίες της οράσεως για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα μέχρι να σταθεροποιηθεί ο διαβήτης τους. Επίσης,

από τα γενικά συμπτώματα που παρουσιάζονται στους διαβητικούς, αξίζει να αναφερθεί η μειωμένη αντίσταση στις λοιμώξεις . Συχνά, η νόσος (και σε περιπτώσεις διαβήτη τύπου II) αποκαλύπτεται επ' ευκαιρία εγκατάσταση κάποιας λοίμωξης, όπως πυοδερμίας, μυκητιασικές λοιμώξεις στην περιοχή των γεννητικών οργάνων, σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις δέρματος κ.α. Η κλινική εξέταση μπορεί να αποκαλύψει σημεία αφυδάτωσης, μυϊκής ατροφίας , ιδιαίτερα στην περιοχή του μηρού και απόπνοια οξόνης, όταν συνυπάρχει κέτωση.

Όταν η διάγνωση δεν γίνει σε αυτό το στάδιο, ο ασθενής εμφανίζει επιδείνωση των συμπτωμάτων και σημεία βαριάς αφυδάτωσης, ενώ η αύξηση των κετονικών σωμάτων στο αίμα προκαλεί ανορεξία, εμέτους, διάχυτα κοιλιακά άλγη (που μπορεί να υποδύονται οξεία κοιλία), μυϊκές κράμπες και απώλεια της συνειδήσεως. Σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών, ιδιαίτερα σε παιδιά μικρής ηλικίας, η πρώτη διάγνωση μπορεί να είναι το κετοοξεωτικό κώμα. Σε αντιδιαστολή με τον διαβήτη τύπου II , δεν παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές μικροαγγειοπαθητικές επιπλοκές της νόσου κατά το χρόνο της διάγνωσης του διαβήτη τύπου I [Marshall 2000].

3.4.2 Κλινικές εκδηλώσεις σακχαρώδους διαβήτη τύπου II:

Σε γενικές γραμμές, ο διαβήτης τύπου II τυπικά χαρακτηρίζεται από απουσία κλινικών συμπτωμάτων επί σειρά ετών και βαθμιαία εισβολή της νόσου με παρουσία πολυουρίας και πολυδιψίας για αρκετές εβδομάδες ή και μήνες πριν την επίσημη έναρξή του. Πολυφαγία παρουσιάζεται σπανιότερα, ενώ απώλεια βάρους, κόπωση, αδυναμία και λοίμωξη εμφανίζονται αρκετά συχνά. Όχι σπάνια οι ασθενείς παραπονούνται για κεφαλαλγία, ζάλη και θάμβος όρασης.

Εντούτοις, η συμπτωματολογία μπορεί να ελλείπει και οι ασθενείς έχουν την αίσθηση ότι είναι υγιείς. Στους μισούς περίπου ασθενείς υπάρχουν σε ήπιο κατά κανόνα βαθμό τα κλασικά συμπτώματα του διαβήτη (πολυουρία, πολυδιψία, ενίοτε απώλεια βάρους), ενώ ένα ποσοστό της τάξης του 20% εμφανίζει ορισμένες χαρακτηριστικές λοιμώξεις (με χαρακτηριστικότερη τη μυκητίαση των γεννητικών οργάνων). Στο 30% περίπου των περιπτώσεων, η διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II γίνεται τυχαία στα πλαίσια κάποιου ελέγχου (προσυμπτωματικός ή προεγχειρητικός έλεγχος, έλεγχος λόγω ασφαλιστικής κάλυψης κλπ.).

Οι διαταραχές της όρασης, ακόμη και όταν δεν υπάρχουν βλάβες στον αμφιβληστροειδή, είναι επίσης συχνές και οφείλονται στη συσσώρευση γλυκόζης και ύδατος στον φακό του οφθαλμού λόγω της υπεργλυκαιμίας. Μερικοί ασθενείς εμφανίζουν μυϊκές κράμπες στα κάτω άκρα, καυσαλγίες στα πέλματα και στα δάκτυλα των ποδιών ή υπεραλγησία. Σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών, ιδιαίτερα ηλικιωμένων, η πρώτη εκδήλωση του διαβήτη τύπου II μπορεί να είναι το υπεργλυκαιμικό υπερωσμωτικό κώμα λόγω παρεμπόπτουσας λοίμωξης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, σε ένα όχι αμελητέο ποσοστό ασθενών, ο διαβήτης αποκαλύπτεται με συμπτωματολογία που σχετίζεται με κάποια από τις επιπλοκές του και μάλιστα με νευροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια ή και καρδιαγγειακές επιπλοκές [Levene et al., 2011].

Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση διαβήτη τύπου II	
Ηλικία	>45 έτη
Αυξημένο σωματικό βάρος (BMI>25 kg/m)	
Οικογενειακό ιστορικό διαβήτη τύπου II	
Καθιστικός τρόπος ζωής	
Ιστορικό διαβήτη κύησης ή γέννησης παιδιών άνω των 4 kg	
Υπέρταση (>140 mmHg)	
Δυσλιπιδαιμία (HDL χοληστερόλη <35 mg/dl ή και τριγλυκερίδια νηστείας >250 mg/dl)	
Πολυκυστικές ωοθήκες	
Ιστορικό διαταραγμένης γλυκόζης νηστείας ή παθολογικής ανοχής στη γλυκόζη	
Ιστορικό αθηροσκληρυντικών αλλοιώσεων	

Πίνακας 2: Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση διαβήτη τύπου II

3.5 Υπερινσουλινισμός και Υποϊνσουλινισμός

Υπερέκκριση ινσουλίνης προκαλεί υπογλυκαιμία. Από την κατάσταση αυτή θίγεται ιδιαίτερα το νευρικό σύστημα, που εξαρτά τις ενεργειακές του ανάγκες κυρίως από τη γλυκόζη. Αυξημένη συγκέντρωση ινσουλίνης στο αίμα (από υπερέκκριση ή χορήγηση) μπορεί να προκαλέσει και κωματώδη κατάσταση.

Η μείωση της διαθέσιμης ινσουλίνης στον οργανισμό μπορεί να οφείλεται σε καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, σε μειωμένη ανταπόκριση των β-κυττάρων, σε αντισώματα κατά της ινσουλίνης, σε αυξημένη αποδόμηση της στο ήπαρ αλλά και σε δομικές ανωμαλίες στο μόριο της ινσουλίνης.

Επίσης μπορεί να είναι μειωμένη η ανταπόκριση στην ινσουλίνη των κυττάρων «στόχου», που μπορεί να οφείλεται σε μείωση του διαθέσιμου αριθμού υποδοχέων ινσουλίνης, σε μειωμένη χημική συγγένεια μεταξύ ινσουλίνης και υποδοχέων ή σε κάποια ενδοκυτταρική ανωμαλία. [Smokonitis 2004]

Η κλινική εικόνα από την ανεπάρκεια ινσουλίνης είναι γνωστή ως σακχαρώδης διαβήτης.

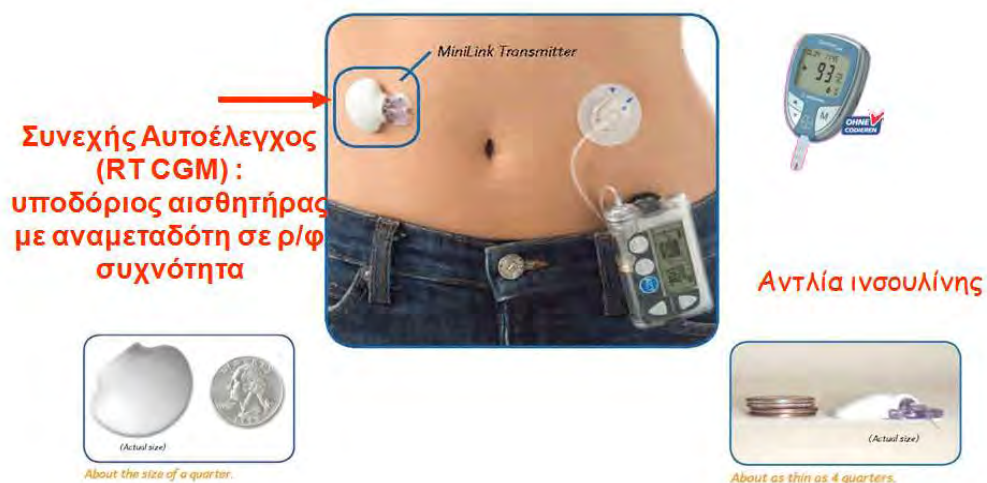
3.6 Αντιμετώπιση του διαβήτη- Αντιδιαβητικά φάρμακα - ανάλογα γλυκόζης

Η στρατηγική αντιμετώπισης του διαβήτη έχει ως στόχο αφενός τον μακροχρόνιο γλυκαιμικό έλεγχο του ασθενούς και αφετέρου την εξάλειψη των παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης των χρόνιων επιπλοκών του διαβήτη, δηλαδή τη διακοπή του καπνίσματος, τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης και των επιπέδων χοληστερόλης, την αύξηση της σωματικής άσκησης και την υιοθέτηση από τον ασθενή του υγιεινού τρόπου ζωής. Ανάλογα με τον τύπο του διαβήτη από τον οποίο πάσχει ο εκάστοτε ασθενείς ακολουθείτε διαφορετική αντιμετώπιση της ασθένειας

Ο διαβήτης τύπου 1 (όπου ο ασθενής θα χρειαστεί οπωσδήποτε ενέσεις ινσουλίνης εξαρχής) αντιμετωπίζεται με θεραπεία υποκατάστασης ινσουλίνης μέσω υποδόριας ένεσης ή αντλίας ινσουλίνης μαζί με προσοχή στη διατροφή, που συνήθως περιλαμβάνει τον έλεγχο των υδατανθράκων και την προσεκτική παρακολούθηση των επιπέδων της γλυκόζης αίματος χρησιμοποιώντας μετρητές γλυκόζης (εικόνα 29). Σήμερα, τα πιο κοινά προϊόντα ινσουλίνης είναι βιοσυνθετικά προϊόντα, που παράγονται χρησιμοποιώντας τεχνικές γενετικού ανασυνδυασμού (στο παρελθόν χρησιμοποιούνταν ινσουλίνη από βοοειδή και

χοίρους και μερικές φορές ακόμη και από ψάρια). Μια πιο πρόσφατη τάση από διάφορους προμηθευτές είναι τα ανάλογα ινσουλίνης, τα οποία είναι ελαφρώς τροποποιημένες ινσουλίνες με διαφορετικό χρόνο έναρξης και διάρκεια δράσης.

Αντλία ινσουλίνης ενισχυμένη με συνεχή αυτοέλεγχο



Εικόνα 29: Αντλία ινσουλίνης ενισχυμένη με αυτοέλεγχο.

Σε εξαιρετικές περιπτώσεις για την ορθή ρύθμιση της γλυκόζης επιχειρείται μεταμόσχευση παγκρέατος. Επίσης, αντικείμενο έρευνας σε πολλά ερευνητικά προγράμματα αποτελεί η πειραματική αντικατάσταση των β κυττάρων (από μεταμόσχευση ή από βλαστικά κύτταρα).

Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 η δυσκολία πρόγνωσης της ασθένειας σε συνδυασμό με την απουσία θεραπείας έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων θεραπευτικών αγωγών για τον έλεγχο και τη σταθεροποίηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η αγωγή για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2

περιλαμβάνει κυρίως κατάλληλη διατροφή, άσκηση και χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 περιλαμβάνουν ινσουλίνη, σουλφονουλουρίες, διγουανιδίνες (μετφορμίνη), αναστολείς της α-γλυκοζιτάσης, θειαζολιδινεδιόνες, τα οποία έχουν διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης.

Εκτός της ινσουλίνης (η οποία υπάρχει σε ποικίλα είδη π.χ. ταχείας δράσης, ενδιάμεσης δράσης, ανάλογα με τις ανάγκες του ασθενούς) τα φάρμακα που διατίθενται για την αντιμετώπιση του ΣΔ2 είναι:

- **Μετφορμίνη** : Μειώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη. Είναι φάρμακο φθινό, χωρίς πολλές παρενέργειες, δεν προκαλεί υπογλυκαιμίες και πλέον συνιστάται σε όλους τους διαβητικούς από τη στιγμή της διάγνωσης (αρχίζει δηλαδή ταυτόχρονα με τη δίαιτα και την άσκηση), εφόσον φυσικά δεν υπάρχει κάποια αντένδειξη.

-**Ακαρβόζη**: Μειώνει τη διάσπαση και την απορρόφηση των υδατανθράκων στο έντερο. Δεν χρησιμοποιείται πολύ συχνά πλέον.

-**Σουλφονουλουρίες**: Είναι τα κατεξοχήν ινσουλινοεκκριτικά φάρμακα. Δρουν ωθώντας το πάγκρεας να εκκρίνει περισσότερη ινσουλίνη για να καλύψει τις ανάγκες του οργανισμού. Η κυριότερη παρενέργειά τους είναι οι υπογλυκαιμίες.

-**Μεγλιτινίδες**: Επίσης ινσουλινοεκκριτικά, αλλά με μικρότερη διάρκεια από ότι οι σουλφονουλουρίες. Προκαλούν έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας για να καλυφθεί το συγκεκριμένο γεύμα κάθε φορά

-**Γλιταζόνες**: Μειώνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη

-**Αναστολείς DPP-4**: Νεότερα φάρμακα. Αυξάνουν τα επίπεδα των ινκρετινών που παράγονται από το έντερο μετά τη λήψη τροφής, αναστέλλοντας το ένζυμο που τις διασπά (το ένζυμο DPP-4). Οι ινκρετίνες με τη σειρά τους δρουν στο πάγκρεας και το αναγκάζουν να εκκρίνει ινσουλίνη.

-**Ινκρετινο-μιμητικά**: Νεότερα φάρμακα, σε ενέσιμη μορφή. Δρουν όπως οι φυσικές ινκρετίνες (αναγκάζουν το πάγκρεας να εκκρίνει ινσουλίνη) αλλά

δεν διασπώνται από το ένζυμο DPP-4 και πετυχαίνουν πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο αίμα.

Ωστόσο οι θεραπείες αυτές έχουν σχεδόν πάντα ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην διερεύνηση άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως για παράδειγμα ανταγωνιστές των υποδοχέων γλυκογόνου, αναστολείς της ηπατικής παραγωγής ινσουλίνης καθώς και συνδυαστικές θεραπείες. Υπάρχει λοιπόν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου.

3.7 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου II [Oikonomakos 2001]. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών βοηθημάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες

της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας.

Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (ηπατικής, μυϊκής , του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές. Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ [Oikonomakos et al., 2008].

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP.

3.8 Σημασία διατροφής στην διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης

Η δήλωση 'Η τροφή σου είναι το φάρμακό σου και το φάρμακό σου η τροφή σου' αποδίδεται στον Ιπποκράτη πριν από δύο χιλιάδες χρόνια και γίνεται ολοένα και πιο σημαντική σήμερα, καθώς αναγνωρίζεται η προληπτική και θεραπευτική αξία της τροφής απέναντι στην ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών.

Το περιεχόμενο της τροφής του κάθε ατόμου παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη πληθώρας χρόνιων παθήσεων,

όπως η στεφανιαία νόσος, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, η οστεοπόρωση, η παχυσαρκία και ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών ειδών καρκίνου.

Οι στόχοι διατροφής ενός ατόμου που πάσχει από ΣΔ πάντα συνιστώνται να είναι :

- Διατήρηση επιπέδων γλυκόζης στο αίμα στα φυσιολογικά επίπεδα
- Διατήρηση επιπέδων λίπους στα φυσιολογικά επίπεδα.
- Παροχή αναγκαίας ενέργειας –διατήρηση ιδανικού βάρους.
- Πρόληψη χρόνιων επιπλοκών.

Επειδή ένας στόχος της διατροφής ενός διαβητικού ατόμου είναι η διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, θα ήταν χρήσιμο να διατίθενται αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις των τροφίμων στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.

Ο ρόλος της σωστής διατροφής - και από άποψη ποιότητας, αλλά και ποσότητας - για τα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη είναι καθοριστικός και μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη των μακροχρόνιων επιπλοκών που συσχετίζονται με τη νόσο, στη διατήρηση όσο το δυνατόν πιο φυσιολογικών επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και γιατί όχι στην αντιμετώπιση της παθολογικής αυτής κατάστασης.

3.9 Φυτικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα

Τα εκχυλίσματα σταφυλιών, το κρασί, το ρόδι και τα παράγωγά του (χυμός) έχουν μελετηθεί ευρέως λόγω των ευεργετικών επιδράσεων που προσδίδουν στην ανθρώπινη υγεία [Apostolou et al 2013]. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τις πιθανές ευεργετικές ιδιότητες για τη θεραπεία του Σακχαρώδη

Διαβήτη τύπου 2 τόσο των υποπροϊόντων αμπελοκομίας (*Vitis Vinifera*) όσο και των εκχυλισμάτων από προϊόντα και παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής χυμού από το φυτό ροδιά(ποικιλία Wonderful) (δοκιμές σε καρκινικά ηπατικά κύτταρα HepG2).

3.9.1 Εκχυλίσματα σταφυλιών

Υπάρχουν λίγες μελέτες εκχυλισμάτων που έχουν ως αντικείμενο εκχυλίσματα από στελέχη σταφυλιού. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε εκχυλίσματα που προέρχονται από ελληνικές ποικιλίες *Vitis vinifera* με ποικίλα αντικείμενα και την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2), και του τραχήλου της μήτρας (HeLa).

- για την εκτίμηση του συνόλου του πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC)
- για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών που υπάρχουν σε αυτά
- για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης
- για την προστασία έναντι ROS επαγόμενης βλάβης του DNA
- για την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2), και του τραχήλου της μήτρας (HeLa).

Το *Vitis vinifera* (σταφύλι), μία από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες στον κόσμο, και το κρασί ήταν μέρος της ανθρώπινης διατροφής από την αρχαιότητα. Εκτιμάται ότι τα συνολικά ποσά της παραγωγής σταφυλιών ήταν πάνω από 60 εκατομμύρια τόνους. Κατά τα τελευταία χρόνια, εκχυλίσματα σταφυλιών και κρασί αποτελούν το κέντρο της προσοχής πολλών μελετών σχετικά με τις ευεργετικές επιδράσεις τους ανθρώπινη υγεία. Για παράδειγμα, ερευνητικές

ομάδες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα σταφυλιών παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και εμπόδισαν αντιδρώντα είδη οξυγόνου (ROS) που προκαλούν βλάβη του DNA. Όπως είναι γνωστό, η υπερβολική παραγωγή των ROS στα οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από εκφυλιστικές ασθένειες όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αλλά και η πρόωρη γήρανση και η βλάβη του DNA [Apostolou et al 2013].

Διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για τις προστατευτικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων των σταφυλιών, όπως είναι η επαγωγή της απόπτωσης μέσω της διαφοροποίησης των ρυθμιστών τόσο της σηματοδότησης των κυττάρων όσο και του κυτταρικού κύκλου, η αναστολή των ενζύμων με καθοριστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (π.χ. ανθρώπινη τοποϊσομεράσης I) και η αναστολή της αγγειογένεσης. Επιπλέον, εκχυλίσματα σταφυλιών εμφανίζονται να προλαμβάνουν την εμφάνιση καρδιαγγειακών νόσων, όπως επίσης παρουσιάζουν αντιμικροβιακή, αντιυπερτασική, και κατά του έλκους δραστηριότητα.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα συμπληρώματα διατροφής που αναφέρονται ως «εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού» καταναλώνονται σε όλο τον κόσμο λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες που αφορούν σταφύλια, αναφέρονται σε εκχυλίσματα από τη φλούδα, τους σπόρους, τον χυμό και το πυρηνέλαιο. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μόνο λίγες μελέτες που αναφέρονται σε εκχυλίσματα από σπόρους, τσαμπιά και στέμφυλα, ελάχιστα μελετημένα υποπροϊόντα που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες (περίπου 5% του αρχικού σταφυλιού) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης, καθιστώντας την εκμετάλλευσή τους

ενδιαφέρων στόχο της έρευνας. Για παράδειγμα, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μίσχοι των σταφυλιών είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, όπως φλαβονοειδή, στιλβένια, και φαινολικά οξέα, τις πιο σημαντικές φυτοχημικές ενώσεις που βρίσκονται στα σταφύλια [Apostolou et al 2013].

Υποπροϊόντα σταφυλιού που προέρχονται από τη διαδικασία οινοποίησης χρησιμοποιούνται συνήθως για εκτροφή των ζώων και για παρασκευή φυσικών οργανικών λιπασμάτων (κομποστοποίηση) που αποτελούν διαδικασίες περιορισμένου οικονομικού ενδιαφέροντος. Επιπλέον, τα απόβλητα οίνου, προκαλούν περιβαλλοντικά προβλήματα, με αποτέλεσμα η ενδεχόμενη εκμετάλλευση τους ως συμπληρώματα διατροφής ή ως μια πηγή υψηλής προστιθέμενης αξίας σε πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερος ενδιαφέρουσα λόγω του ότι συνδυάζει ένα κερδοφόρο εγχείρημα με την προστασία του περιβάλλοντος στις ζώνες παραγωγής κρασιού.

Ως εκ τούτου, ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εξέταση εκχυλισμάτων από σπόρους, τσαμπιά και στέμφυλα από τις πιο σημαντικές Ελληνική ποικιλίες τόσο για την κυτταροτοξικότητα τους σε σχέση με τα ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα, όσο και για την ικανότητα τους να αναστέλλουν το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με σκοπό να μελετηθούν ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα.

Όπως είναι γνωστό, η γεωγραφική περιοχή, συμπεριλαμβανομένων των εδαφικών και κλιματικών συνθηκών, επηρεάζει το φαινολικό περιεχόμενο των σταφυλιών, λόγω της επιρροής τους στη βιοχημική σύνθεση των ενώσεων αυτών, και κατά συνέπεια των βιολογικών τους ιδιοτήτων

Ως εκ τούτου καθίσταται σαφές πως η έρευνα των τοπικών ποικιλιών είναι καίρια και καθοριστική [Apostolou et al 2013].

3.9.2 Σταφύλια και υποπροϊόντα οινοποίησης

Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν σπόροι σταφυλιού, στέμφυλα και στελέχη που λαμβάνεται από μερικές από τις πιο αντιπροσωπευτικές κόκκινες (Βοηδόματο, Μαυροτράγανο) και λευκές (Ασύρτικο) ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα.

Τα δείγματα ελήφθησαν από το νησί της Σαντορίνης, την περιοχή της Θεσσαλίας (περιοχή Τυρνάβου) της Δυτικής Μακεδονίας το νησί της Κεφαλονιάς και της Κρήτη [Apostolou et al 2013].



Εικόνα 30: Ποικιλίες σταφυλιών Ασύρτικο (πάνω δεξιά), Μαυροτράγανο (πάνω αριστερά), Μοσχόμαυρο (κάτω δεξιά), Βοηδόματο (κάτω αριστερά).

Αφαιρέθηκαν χειροκίνητα οι βλαστοί και οι σπόροι από τους καρπούς του σταφυλιού, οι καρποί ζυγίστηκαν, αποξηράνθηκαν μέσω ψύχους (freeze-dried), επεξεργάστηκαν μηχανικά ώστε να αλεσθούν (millpowdered), και τα εκχυλίσματα σε μορφή σκόνης πλέον αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη. Βόστρυχοι και γίγαρτα (κοτσάνια και σπέρματα) ελήφθησαν άμεσα μέσω χειροκίνητου διαχωρισμού κατά τη διάρκεια των διαδικασιών αποβοστρύχωσης και εκκοκκίσεως. Αυτά τα δείγματα αποξηράνθηκαν μέσω αέρα, επεξεργάστηκαν μηχανικά ώστε να αλεσθούν, και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου [Apostolou et al 2013].

3.9.3 Προετοιμασία εκχυλισμάτων

(Η διαδικασία της επεξεργασίας των δειγμάτων έγινε από την ερευνητική ομάδα του καθ. Σ. Χαρουτουνιάν στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.)

Πενήντα γραμμάρια αποξηραμένου δείγματος (σπόροι σταφυλιών, τα υπολείμματα, ή σπέρματα/καρποί σε σκόνη) εναποτέθηκε σε ένα μίγμα 200 mL μεθανόλης (MeOH) / H₂O/1.0 N HCl (90:9.5:0.5 v /v) και επεξεργάστηκε με υπερήχους σε ένα λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά. Ο διαλύτης διαχωρίστηκε με διήθηση, και το υπόλοιπο στερεό επανα-εκχυλίστηκε τρεις επιπλέον φορές, χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη μέσω της ίδιας διαδικασίας.

Τα εκχυλίσματα, έπειτα, εξατμίστηκαν υπό κενό, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός εναιωρήματος, το οποίο διαλύθηκε σε 30 mL MeOH/H₂O (1:1) και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά (7000 rpm). Το υπερκείμενο υγρό εκχυλίστηκε με πετρελαϊκό αιθέρα (3x30 mL) με σκοπό την απομάκρυνση των λιπιδίων και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα που απέμεινε χύθηκε σε 30 ml άλμης και εκχυλίστηκε επανειλημμένα με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc, 4x30 mL).

Έτσι, όλα τα σάκχαρα παρέμειναν στην υδατική φάση. Στη συνέχεια, τα συνθετικά οργανικά στρώματα ξηράνθηκαν πάνω από άνυδρο θειικό μαγνήσιο και εξατμίστηκαν υπό κενό. Τέλος το παραμένον στερεό ζυγίστηκε και διαλύθηκε σε DMSO 100% (το κάθε 1mg διαλύθηκε σε 1000μl DMSO 100%) και στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH 6,8 (πεχαμετρικό χαρτί) με διάλυμα 0,1M NaOH. Για να αποφευχθεί η υποβάθμιση στην πολυφαινολική σύσταση, όλες οι προαναφερθείσες δραστηριότητες εκτελέστηκαν απουσία άμεσου ηλιακού φωτός και σε θερμοκρασίες κάτω των 35°C [Apostolou et al 2013].

3.9.4 Εκχυλίσματα ροδιού

Η Ροδιά παρουσιάζεται ως το παλαιότερο, καλλιεργημένο καρποφόρο δέντρο από το 3000 π.χ και οι καρποί της χρησιμοποιούνταν στην αρχαιότητα για τις θεραπευτικές ιδιότητες που διαθέτουν. Αυτό το φρούτο αναφέρεται ως σύμβολο της καλοτυχίας, της ευημερίας, της αφθονίας, της γονιμότητας και ως θεραπευτικό σε διάφορους πολιτισμούς και θρησκείες. Η ονομασία ρόδι προέρχεται από τη βοτανική ονομασία PUNICA GRANATUM που μεταφράζεται ως 'Μήλο με πολλούς καρπούς - σπόρια' [Gatsios 2010].



Εικόνα 31: Το φυτό της ροδιάς (*Punica Granatum*).

Το φυτό είναι θάμνος και ανήκει στην οικογένεια *Punicaceae*. Προέρχεται από την Ασία (Ιράν και Βόρεια Ινδία) αλλά έχει καλλιεργηθεί χιλιάδες χρόνια και στη Μεσόγειο. Η πιο εμπορική ποικιλία στην Ελλάδα είναι η Wonderful η οποία προέρχεται από τη Φλόριντα των Η.Π.Α. Σύμφωνα με εκτιμήσεις το σύνολο της παγκόσμιας παραγωγής τα τελευταία χρόνια ανέρχεται σε 2.250.000 τόνους. Τα τελευταία χρόνια, αν και δεν υπάρχουν ακριβή στατιστικά στοιχεία φαίνεται ότι οι καλλιεργούμενες εκτάσεις ροδιάς έχουν αυξηθεί σημαντικά [Pradeerkumar et al 2008].

Χώρα	Παραγωγή (τόνοι)	Ποσοστό
Ινδία	1.200.000	53,33%
Ιράν	650.000	28,89%
Η.Π.Α.	100.000	4,44%
Τουρκία	75.000	3,33%
Ισπανία	60.000	2,67%
Ισραήλ	20.000	0,89%
Λοιπές	145.000	6,44%
ΣΥΝΟΛΟ	2.250.000	

Πίνακας 3: Σημαντικότερες χώρες παραγωγής ροδιών (δεδομένα 2006)[Tzouramaniet et al 2008]

Σύμφωνα με κλινικές και επιστημονικές μελέτες, έχει αποδειχτεί ότι η κατανάλωση ροδιού έχει σημαντική ευεργετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό. Το ρόδι λόγω των συστατικών του προστατεύει τον ανθρώπινο οργανισμό και συμβάλει στην προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος, στην μείωση των συμπτωμάτων κατάθλιψης και απώλειας οστικής μάζας κατά την εμμηνόπαυση, την καταπολέμηση της υπέρτασης και την

προστασία από εγκεφαλικές βλάβες, την αποτροπή της ανάπτυξης καρκινικών όγκων, της οξείδωσης της LDL και της αρτηριοσκλήρωσης, την καλή υγεία, ευεξία και προστασία του δέρματος (αντιγηραντικές ιδιότητες), αλλά έχει και αντιδιαβητική, αντιϊκή και αντιμυκοτοκτόνο δράση. Επίσης έχει παρατηρηθεί πως ο χυμός του ροδιού καθώς και τα έλαια των σπόρων έχουν αντιμικροβιακές δράσεις και βοηθούν στην καταπολέμηση φλεγμονών. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η περιεκτικότητα του χυμού του ροδιού σε αντιοξειδωτικά είναι τρεις φορές υψηλότερη από το πράσινο τσάι και το κόκκινο κρασί.

Βιταμίνες A,C,E, σίδηρο, κάλιο, φυτικές ίνες, υδατάνθρακες αλλά και αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως τανίνες, πολυφαινόλες, ανθοκυανίνες και τόσα ακόμα πολύτιμα συστατικά χαρακτηρίζουν τη σύσταση του ροδιού. Παρακάτω σε σχετικό πίνακα απαριθμούνται τα συστατικά του και η θρεπτική τους αξία.

Θρεπτικά Συστατικά	Μονάδες	Αξία/100 grams
Νερό	g	77.93
Ενέργεια	Kcal	83
Ενέργεια	kJ	346
Πρωτεΐνες	g	1.67
Ολικά λιπαρά	g	1.17
Τέφρα	g	0.53
Υδατάνθρακες, by difference	g	18.70
Φυτικές ίνες, total dietary	g	4.0
Ολικά σάκχαρα	g	13.67
Ασβέστιο, Ca	mg	10

Σίδηρος, Fe	mg	0.30
Μαγνήσιο, Mg	mg	12
Φώσφορος, P	mg	36
Κάλιο, K	mg	236
Νάτριο, Na	mg	3
Ψευδάργυρος, Zn	mg	0.35
Χαλκός, Cu	mg	0.158
Μαγνήσιο, Mn	mg	0.119
Σελήνιο, Se	µg	0.5
Βιταμίνες C, ολικό ασκορβικό οξύ	mg	10.2
Θειαμίνη	mg	0.067
Ριβοφλαβίνη	mg	0.053
Νιασίνη	mg	0.293
Βιταμίνη B-6	mg	0.075
Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)	mg	0.60
Βιταμίνη K (φυλοκινόνη)	µg	16.4
Λιπαρά οξέα, ολικά κορεσμένα	g	0.120
12:0	g	0.006
14:0	g	0.006
16:0	g	0.070
18:0	g	0.038
Λιπαρά οξέα, ολικά μονοκορεσμένα	g	0.093
16:1	g	0.012
18:1	g	0.077
20:1	g	0.004
Λιπαρά οξέα, ολικά πολυκορεσμένα	g	0.079
18:2	g	0.079
Λιπαρά οξέα, ολικά trans λιπαρά	g	0.009
Καμπεστερόλη	mg	1
Βήτα-σιτοστερόλη	mg	4

Πίνακας 4: Θρεπτική αξία ροδιού ανά 100 gr βρώσιμου φρούτου (USDA). Βασισμένο σε δείγματα από την ποικιλία Wonderful.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η μελέτη της αντιδιαβητικής δράσης εκχυλισμάτων από προϊόντα και παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής χυμού από το φυτό ροδιά (*Punica Granatum*) σε κύτταρα του καρκίνου του ήπατος HepG2.

3.9.5 Προετοιμασία εκχυλισμάτων

(Η διαδικασία της επεξεργασίας των δειγμάτων έγινε από την ερευνητική ομάδα του καθ. Σ. Χαρουτουνιάν στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.)

Για να δώσει ο καρπός υψηλής ποιότητας χυμό θα πρέπει να συλλεχθεί στο κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης. Η συγκομιδή των καρπών γίνεται είτε μηχανικά είτε χειρονακτικά. Σε επόμενο στάδιο οι καρποί ελέγχονται και πλένονται εξωτερικά με νερό ή άλλα απολυμαντικά μέσα. Στη συνέχεια οδηγούνται προς αποσπύρωση-αποφλοιώση (παραπροϊόν→ φλοιός), εκχύμωση (σύνθλιψη ολόκληρου του καρπού ή συμπίεσή του αφού κοπεί στα δύο) όπου συνήθως απομονώνονται τα αρίλια και στη συνέχεια συμπιέζονται ή φυγοκεντρώνονται περισσότερες από μία φορές (καθίζηση). Η συμπίεση πρέπει να γίνει με προσοχή ώστε να μην περάσουν στο χυμό ανεπιθύμητες ουσίες ή σπόρια.

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιείται φίλτρανση και διαύγαση των προϊόντων καθώς διάφορα σωματίδια του φυτού και μη διαλυτά συστατικά όπως ίνες, άμυλο και πολυφαινόλες το καθιστούν θολό. Τέλος ο χυμός μπορεί να παστεριωθεί και συνήθως αυτό γίνεται με θέρμανση [Nagi et al. 1993].



Εικόνα 32: Συνοπτικό διάγραμμα των σταδίων της διαδικασίας παραγωγής φρέσκου χυμού.

Τα εκχυλίσματα ροδιού που εξετάζουμε προήλθαν τόσο από τα βασικά προϊόντα της παραπάνω διαδικασίας όσο και από τα ενδιάμεσα προϊόντα και από τα απορρίμματα αυτών.



Εικόνα 33: Ενδεικτικό συνοπτικό διάγραμμα ροής της διαδικασίας παραγωγής φρέσκου χυμού ροδιού από την οποία προήλθαν τα εκχυλίσματα ροδιού που εξετάσαμε. Εδώ απεικονίζονται τα ενδιάμεσα προϊόντα και απορρίμματα των 4 πρώτων σταδίων.(από αυτήν τη διαδικασία παρήχθησαν τα 9 πρώτα εκχυλίσματα ροδιού (διπλωματική εργασία Μοσχοβίδη).

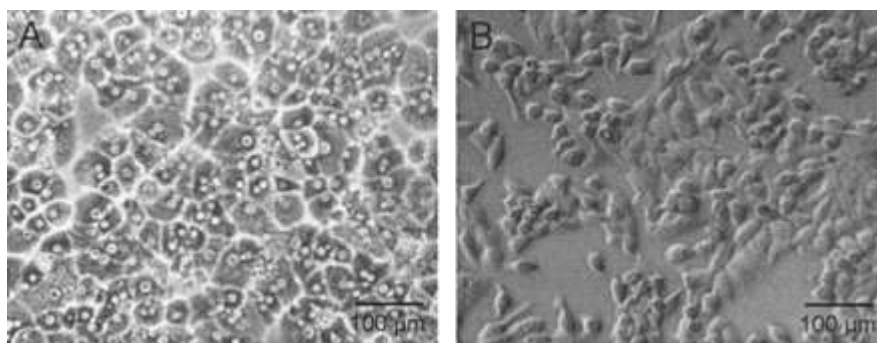
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ - ΜΕΘΟΔΟΙ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται διεξοδικά οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την επίτευξη των ερευνητικών στόχων καθώς και τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πειραματική πορεία.

4.1 Επιλογή κυτταρικής σειράς: Κύτταρα HepG2

Η δραστικότητα του ενζύμου GPb προσδιορίστηκε σε HepG2 καρκινικά ηπατικά κύτταρα. Τα HepG2 αποτελούν μια συνεχή κυτταρική σειρά που προέρχεται από το ήπαρ ενός 15χρονου Καυκάσιου Αμερικανού με ένα καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Αυτά τα κύτταρα σε μορφολογία είναι επιθηλιακά και έχουν ένα μοντέλο χρωμοσωμικού αριθμού ίσου με 55. Εκκρίνουν πληθώρα σημαντικών πρωτεϊνών του πλάσματος όπως αλβουμίνη, τρανσφερίνη, άλφα 2-μακροσφαιρίνη, άλφα 1-αντιθρυψίνη και τρανσφερίνη του πλασμινογόνου. Τα HepG2 κύτταρα έχουν αναπτυχθεί επιτυχώς σε μεγάλης κλίμακας συστήματα καλλιέργειας και μπορούν να αποκριθούν σε διέγερση με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη.

Λόγω του υψηλού βαθμού της μορφολογικής και λειτουργικής διαφοροποίησής τους *in vitro* (εικόνα 34), τα HepG2 κύτταρα είναι ένα κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής μεταφοράς και του μεταβολισμού στο ήπαρ, της τοξικότητας των ξενοβιοτικών ουσιών, της ανίχνευσης των κυτταροπροστατευτικών, αντί των περιβαλλοντικών και διατροφικών γενοτοξικών παραγόντων, της κατανόησης της ηπατοκαρκινογένεσης, καθώς και για τις μελέτες στόχευσης φαρμάκων.



Εικόνα 34: Μορφολογική σύγκριση (A) ανθρώπινων ηπατικών κυττάρων με την κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος HepG2 (B).

4.2 Συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων HepG2

Ανθρώπινα HepG2 κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media). Το DMEM αποτελεί ένα βασικό θρεπτικό μέσο που αποτελείται από βιταμίνες, αμινοξέα, σάκχαρα, γλυκόζη κι ένα δείκτη του pH (ερυθρό της φαινόλης), ενώ δεν περιέχει πρωτεΐνες και αναπτυξιακούς/αυξητικούς παράγοντες. Το ερυθρό της φαινόλης αποτελεί ένα δείκτη μεταβολής του pH που καταδεικνύει τότε το διάλυμα καθίσταται ακατάλληλο για τα κύτταρα μέσω της αλλαγής του χρώματός του. Το διάλυμα έχει τελικό pH 7,0-7,4 και η ωσμωμοριακότητά του λόγω της παρουσίας αλάτων είναι ίση με 300 mOsm. Το διάλυμα DMEM φυλάσσεται στους 2-8°C. Μετά το άνοιγμα της συσκευασίας του θρεπτικού διαλύματος (500 ml), εμπλουτίζεται με προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων:

- 10% Διαλύματος Fetal Bovine Serum (ορός εμβρύου μόσχου), FBS, (50 ml), για την προσθήκη των περιεχόμενων αναπτυξιακών/αυξητικών παραγόντων
- 1% Διαλύματος μίγματος πενικιλίνης/στρεπτομικίνης, P/S, (5 ml), για την αποφυγή μικροβιακής επιμόλυνσης, ώστε $C_{\text{τελική}} = 100\text{u/ml P, } 100\ \mu\text{g/ml S}$

- 1% Διαλύματος αμινοξέος L-γλουταμίνης, (5 ml), ώστε $C_{\text{τελική}} = 2 \text{ mM}$

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστήρα στους 37°C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂.

4.3 Κρυοπροστασία κυττάρων

Για την προστασία των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ψύξης και τη συντήρησή τους στη φυσιολογική τους μορφή χρησιμοποιούμε τα παρακάτω διαλύματα:

- **10% Διαλύματος DMSO (0,1ml)**

Το DMSO (DiMethyl SulfOxide) αποτελεί μια οργανοθειική ένωση με χημικό τύπο (CH₃)₂SO. Το άχρωμο αυτό διάλυμα είναι ένας σημαντικός πολικός διαλύτης που έχει την ικανότητα να διαλύει τόσο πολικές όσο και μη πολικές ενώσεις και να αναμειγνύεται με ένα ευρύ φάσμα οργανικών διαλυτών, καθώς και το νερό. Το DMSO χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό για τη συντήρηση οργάνων, ιστών και κυττάρων. Παρά την κυτταροτοξικότητά του, εμποδίζει τη δημιουργία κρυστάλλων στις κυτταρικές μεμβράνες και επιφάνειες και είναι ιδιαίτερα σημαντικό στο πάγωμα και στη μακροχρόνια αποθήκευση πολλών ειδών κυττάρων.

- **90% Διαλύματος Fetal Bovine Serum, FBS (0,9 ml)**

Το διάλυμα FBS είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο συμπλήρωμα ορού για την *in vitro* καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή περιεκτικότητά του σε αντισώματα. Ωστόσο, περιέχει πολλούς αναπτυξιακούς/αυξητικούς παράγοντες, που το καθιστούν κατάλληλο για χρήση σε πολλές

διαφορετικές εφαρμογές κυτταροκαλλιέργειας. Η σφαιρική πρωτεΐνη της αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, BSA) αποτελεί το πιο σημαντικό συστατικό του διαλύματος. Η μεγάλη ποικιλία των πρωτεϊνών του FBS διατηρεί τα καλλιεργούμενα κύτταρα σε ένα μέσο στο οποίο μπορούν να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να διαχωριστούν. Ο ορός αποθηκεύεται στην κατάψυξη, για τη διατήρηση της σταθερότητας των στοιχείων του, όπως οι αυξητικοί παράγοντες.

4.4 Απόψυξη κυττάρων HepG2

ΥΛΙΚΑ

- Αιθανόλη 70 %
- Θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομικίνη, 2mM L-γλουταμίνη

ΟΡΓΑΝΑ

- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας
- Υδατόλουτρο (37°C)
- Φυγόκεντρος

Αρχικά, όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου οι συνθήκες πρέπει να είναι στείρες. Στη συνέχεια, τα φυαλίδια cryovials με τα περιεχόμενα κύτταρα, που φυλάσσονται στους -80 °C, τοποθετούνται με προσοχή στο υδατόλουτρο στους 37°C, ώστε να ξεπαγώσουν. Το πώμα των φυαλιδίων δεν θα πρέπει να βυθίζεται στο νερό του υδατόλουτρου για να αποφευχθεί η μόλυνση. Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, γίνεται αποστείρωση των φυαλιδίων με 70% αιθανόλη εξωτερικά, ώστε να είναι δυνατό να μεταφερθούν στον απαγωγό. Έπειτα,

ακολουθεί η μεταφορά του 1 ml των κυττάρων σε πλαστικούς σωλήνες falcon όγκου 15 ml στους οποίους έχει προηγηθεί η προσθήκη 9 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM (συνολικός όγκος 10 ml). Το συγκεκριμένο βήμα πρέπει να πραγματοποιείται γρήγορα, καθώς το διάλυμα DMSO, το οποίο καταψύχεται μαζί με τα κύτταρα, αρχίζει να εκφράζει την τοξικότητά του σε αυτά κατά την απόψυξη.

Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1000 περιστροφές ανά λεπτό (rpm), για πέντε λεπτά, στους 25 °C προκειμένου να κατακρημνιστούν τα κύτταρα και να διαχωριστούν από το τοξικό DMSO. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το ίζημα με τα περιεχόμενα κύτταρα επαναδιαλυτοποιείται σε 5 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου DMEM. Ακολουθούν αρκετές επαναιωρήσεις, ώστε τα κύτταρα να διαχωριστούν, να γίνουν μεμονωμένα και να παραληφθεί το ομοιογενές εναιώρημά τους. Αυτό, τελικά, μεταφέρεται στις κατάλληλες φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας, 25 και 75 cm², για τα κύτταρα HepG2, αντίστοιχα και συμπληρώνονται 10 ml διαλύματος DMEM. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων στον κλίβανο, στους 37°C, για 4-5 ημέρες προκειμένου να προσκολληθούν και να αναπτυχθούν στο ταπήτιο των πλαστικών φλασκών.

4.5 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης κυτταρικής καλλιέργειας με θρυψίνη (θρυψινοποίηση)

ΜΕΘΟΔΟΣ

Για την επίτευξη της διαδικασίας θρυψινοποίησης και αποκόλλησης των κυττάρων από το ταπήτιο των φλασκών κυτταροκαλλιέργειας, χρησιμοποιείται διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0,25%. Το χηλικό αντιδραστήριο EDTA έχει την ικανότητα να

δεσμεύει δισθενή κατιόντα (Ca^{2+} και Mg^{2+}) από τα κύτταρα, καθιστώντας τα ανίκανα να παραμείνουν προσδεμένα στην επιφάνεια ανάπτυξής τους. Τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και συλλέγονται ως εναιώρημα σε θρεπτικό υλικό. Το θρεπτικό υλικό αδρανοποιεί τη δράση της θρυψίνης. Η δράση του ενζύμου είναι καταστρεπτική για τα κύτταρα όταν αυτά εκτεθούν για μεγάλη χρονική διάρκεια σε αυτό. Επίσης, το pH του διαλύματος δεν πρέπει να είναι μικρότερο του 7, καθώς τέτοιες τιμές μειώνουν τη δραστηριότητα της θρυψίνης, αλλά επιπλέον δεν πρέπει να ξεπερνά το 8, τιμές καταστρεπτικές για τα κύτταρα. Το διάλυμα θρυψίνης-EDTA χωρίζεται σε επιμέρους κλάσματα όγκου 10 ml, τα οποία φυλάσσονται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ το κλάσμα προς χρήση φυλάσσεται σε θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ΥΛΙΚΑ

- Αιθανόλη 70 %
- Διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0,25%
- Θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομικίνη, 2mM L-γλουταμίνη

ΟΡΓΑΝΑ

- Υδατόλουτρο (37°C)
- Φυγόκεντρος
- Οπτικό Μικροσκόπιο

ΠΟΡΕΙΑ

Λόγω του συνεχούς εκθετικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αναγκαία συνθήκη για τη συντήρηση της κυτταρικής καλλιέργειας, είναι η αραιώση και επανακαλλιέργεια των κυττάρων

σε μικρότερη συγκέντρωση ή η μεταφορά τους σε μεγαλύτερα σκεύη κυτταροκαλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70-90% του ταπητίου της φλάσκας κυτταροκαλλιέργειας (confluency), τότε πραγματοποιείται επανακαλλιέργεια των κυττάρων μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης.

Αρχικά, όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπου εξασφαλίζονται στείρες συνθήκες. Τα κύτταρα παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο προκειμένου να ελεγχθεί η μορφολογία τους, καθώς και η πληρότητα του ταπητίου της φλάσκας καλλιέργειάς τους (confluency). Έπειτα, απομακρύνεται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, DMEM, και προστίθεται ο κατάλληλος όγκος διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0.25%. Για τις φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας των 25 cm² προστίθεται 1 ml διαλύματος, ενώ για εκείνες των 75 cm² προστίθενται 3 ml.

Στη συνέχεια, ανακινείται η φλάσκα έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο και μεταφέρεται στον κλίβανο, στους 37°C, για περίπου 3-4 λεπτά προκειμένου να ασκήσει τη δράση του το ένζυμο. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, η φλάσκα απομακρύνεται από τον κλίβανο και ανακινείται με ελαφρά χτυπήματα προκειμένου τα κύτταρα να αποκολληθούν από το ταπήτιο της φλάσκας. Παράλληλα, τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο για να προσδιοριστεί αν παραμένουν προσδεμένα στην επιφάνεια ανάπτυξής τους. Στη συνέχεια, ακολουθούν μερικές επαναιωρήσεις των κυττάρων στο διάλυμα θρυψίνης-EDTA προκειμένου αυτά να διαχωριστούν μεταξύ τους και προστίθεται ο απαιτούμενος όγκος θρεπτικού υλικού για να

σταματήσει η αντίδραση και η δράση της θρυψίνης. Για όγκο διαλύματος θρυψίνης-EDTA ίσο με 1 ml προστίθενται 4 ml διαλύματος DMEM, ενώ για όγκο ίσο με 3 ml προστίθενται 7 ml θρεπτικού μέσου.

Το δημιουργούμενο διάλυμα των κυττάρων μεταφέρεται σε πλαστικούς σωλήνες falcon όγκου 50ml και ακολουθεί φυγοκέντρησή του στις 1000 περιστροφές ανά λεπτό, για πέντε λεπτά, στους 25 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το ίζημα με τα περιεχόμενα κύτταρα επαναδιαλυτοποιείται σε 4 ml θρεπτικού μέσου DMEM. Ακολουθούν αρκετές επαναιωρήσεις, ώστε τα κύτταρα να διαχωριστούν, να γίνουν μεμονωμένα και να παραληφθεί το ομοιογενές εναιώρημά τους. Έπειτα, λαμβάνεται η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων και προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα θρεπτικού υλικού DMEM. Τέλος, τα κύτταρα κατανέμονται με ανακίνηση ομοιόμορφα σε όλο το ταπήτιο της φλάσκας ώστε να αναπτυχθούν.

4.6 Αποθήκευση και φύλαξη κυττάρων HepG2 στους -80 °C (stock)

ΥΛΙΚΑ

- Αιθανόλη 70 %
- Διάλυμα Fetal Bovine Serum, FBS
- Διάλυμα DMSO (DiMethyl SulfOxide)
- Θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομικίνη, 2mM L-γλουταμίνη
- Φυαλίδια cryovials με τα περιεχόμενα κύτταρα

ΟΡΓΑΝΑ

- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος
- Φυαλίδια cryovial

ΠΟΡΕΙΑ

Αρχικά, όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου οι συνθήκες είναι στείρες. Μετά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και της φυγοκέντρωσης των κυττάρων, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το ίζημα με τα περιεχόμενα κύτταρα επαναδιαλυτοποιείται στον κατάλληλο όγκο διαλύματος Fetal Bovine Serum, FBS (0,9 ml για κάθε φυαλίδιο cryovial που θα φυλαχθεί).

Ακολουθούν αρκετές επαναιωρήσεις, ώστε τα κύτταρα να διαχωριστούν, να γίνουν μεμονωμένα και να παραληφθεί το ομοιογενές εναιώρημά τους. Στη συνέχεια, το δημιουργούμενο κυτταρικό διάλυμα διαχωρίζεται ισόποσα στα φυαλίδια σε καθένα από τα οποία προστίθεται, τελικά, 0,1 ml διαλύματος DMSO. Μετά από μερικές ήπιες αναδεύσεις των φυαλιδίων, αυτά μεταφέρονται γρήγορα για αποθήκευση στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ προκειμένου το διάλυμα DMSO να μην προφτάσει να εκδηλώσει την τοξικότητά του στα κύτταρα.

4.7 Μέτρηση κυττάρων HepG2, με αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer) για το πείραμα της κυτταροτοξικότητας.

ΜΕΘΟΔΟΣ

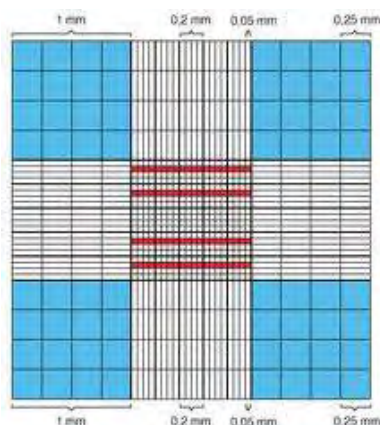
Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Newbauer). Το αιμοκυτταρόμετρο

(εικόνα 35A) είναι μια τροποποιημένη και διαβαθμισμένη αντικειμενοφόρος πλάκα, που περιέχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες, λείες επιφάνειες. Σε κάθε μια από αυτές διακρίνεται μια διαγράμμιση σε μορφή τετραγωνισμένου πλέγματος, το οποίο αποτελείται από 16 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm (συνεπάγεται ότι το εμβαδόν του τετραγώνου είναι 1mm^2). Η πλάκα Newbauer έχει κατασκευαστεί για την καταμέτρηση των στερεών συστατικών του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια) σε ορισμένο όγκο αίματος. Το όργανο, όμως, αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την καταμέτρηση άλλων μικροσκοπικών δομών ή κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα μιας κυτταροκαλλιέργειας. Το καθένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους μόλις 2,5 μm , που χρησιμεύουν για τον καθορισμό της θέσης των κυττάρων (το αν αυτά βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα). Το κάθε τετράγωνο εμφανίζει διαβαθμίσεις (χωρίζεται σε μικρότερα τετράγωνα) που εξυπηρετούν την ευκολότερη μέτρηση των κυττάρων (εικόνα 35B).

(A)



(B)



Εικόνα 35: (Α) Πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο). (Β) Σχηματική απεικόνιση της διαγράμμισης σε μορφή τετραγωνισμένου πλέγματος, το οποίο αποτελείται από 16 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm.

Το αιμοκυτταρόμετρο εμφανίζει δυο ίσου μεγέθους, λείες, προεξέχουσες επιφάνειες, με επίπεδο παράλληλο με τις διαγραμμισμένες, που ονομάζονται «ράχες», και στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Οι διαγραμμισμένες επιφάνειες βρίσκονται 0,1 mm χαμηλότερα από τις «ράχες». Μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης γυαλισμένης επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια (αυλάκωση).

ΥΛΙΚΑ

- Αιθανόλη 70 %
- Κυτταρικό εναιώρημα προς μέτρηση

ΟΡΓΑΝΑ

- Οπτικό μικροσκόπιο
- Πλάκα Neubauer

ΠΟΡΕΙΑ

Αρχικά, το αιμοκυτταρόμετρο αποστειρώνεται με 70 % αιθανόλη. Στη συνέχεια, μεταφέρονται στην κοίλη επιφάνειά του με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας 10 μl κυτταρικού εναιωρήματος, τα οποία με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνονται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Η πλάκα Neubauer τοποθετείται στο οπτικό μικροσκόπιο και εξετάζεται με μεγέθυνση 100x. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει ένα από τα εννέα

τετράγωνα είναι $0,1 \text{ mm}^3$ ($1,0 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$) ή $1 \times 10^{-4} \text{ ml}$. Έτσι, η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα / ml) είναι: Μέτρηση στο ένα από τα κύρια τετράγωνα $\times 10.000$.

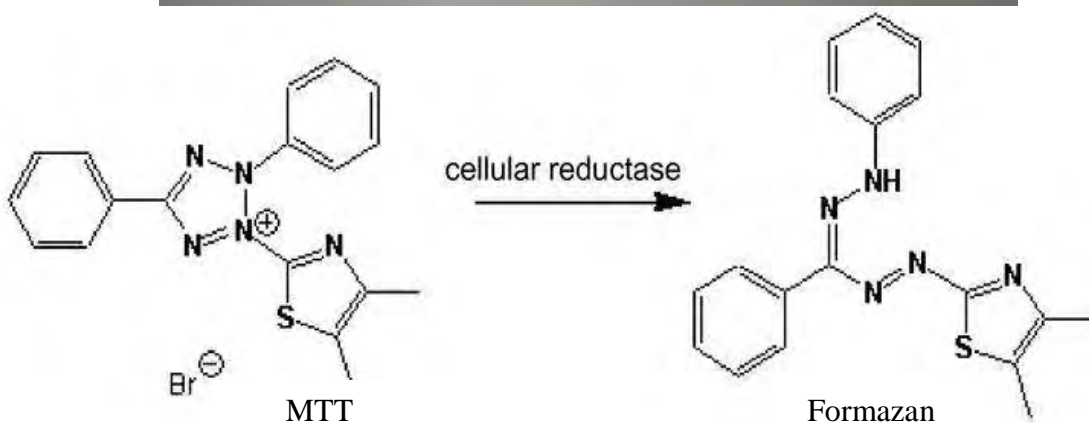
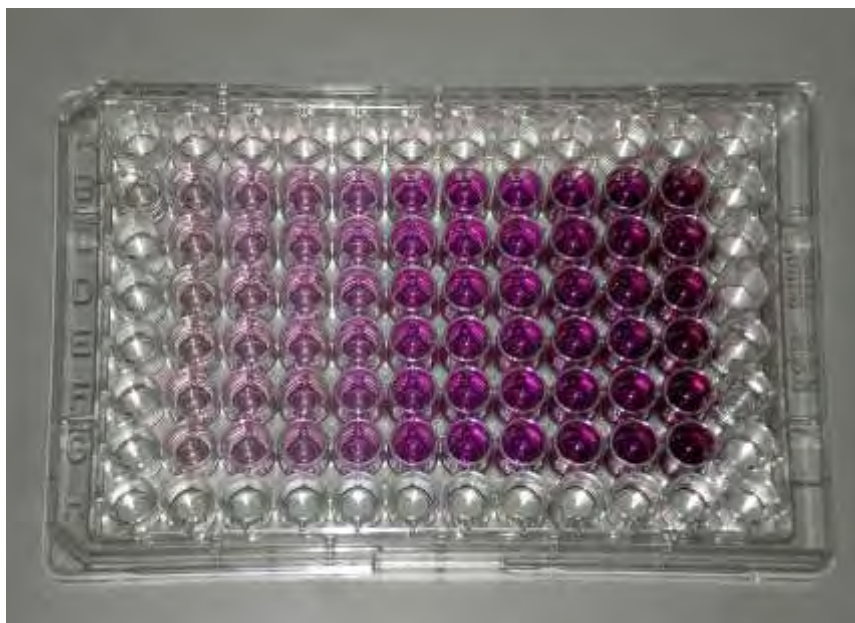
Μετά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και της μέτρησης με το αιμοκυτταρόμετρο (όπως περιγράφεται παραπάνω), πραγματοποιούνται οι απαραίτητοι υπολογισμοί προκειμένου τα κύτταρα HepG2, να επιστρωθούν σε τρυβλίο θέσεων ανάπτυξης των κυττάρων (96-wellplate), ώστε σε κάθε well να περιέχονται 15000 κύτταρα (όγκοι $0,0053 \text{ ml}$ και $200 \mu\text{l}$ κυτταρικού εναιωρήματος/well, αντίστοιχα). Σύμφωνα με τους υπολογισμούς αυτούς, το σύνολο των κυττάρων που μετράται με το αιμοκυτταρόμετρο διαιρείται με 4 κι εν συνεχεία, πολλαπλασιάζεται με 10^4 προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος. Έπειτα, υπολογίζεται ο όγκος του εναιωρήματος που απαιτείται για το διαμοιρασμό του στα 96 wells. Τελικά, υπολογίζεται ο όγκος του θρεπτικού μέσου DMEM που πρέπει να συμπληρωθεί.

4.8 Προετοιμασία κυττάρων για το πείραμα ελέγχου κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων σταφυλιού (Δοκιμή MTT)[Mosmann T.].

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η δοκιμή MTT είναι μια μέθοδος μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων και χρησιμοποιείται είτε για έλεγχο του πολλαπλασιασμού είτε για δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην διάσπαση της ουσίας MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), η οποία αποτελεί ένα άλας κίτρινου χρώματος, από τα μιτοχονδριακά ένζυμα μεταβολικά ενεργών κυττάρων (ηλεκτρική αφυδρογονάση). Η

διάσπαση του MTT έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κρυστάλλων φορμαζάνης, μωβ χρώματος. Η διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης και ο προσδιορισμός της οπτική πυκνότητας του διαλύματος συμβάλλει α. άμεσα, στον προσδιορισμό της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων και β. έμμεσα, στον προσδιορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η τιμή της οπτικής απορρόφησης του διαλύματος των κρυστάλλων φορμαζάνης είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων (η ένταση του χρώματος σε κάθε βοθρίο είναι ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που είναι παρόντα) [Mosmann T. 1983]



Εικόνα 36: Τρυβλίο 96 βοθρίων μετά την προσθήκη ισοπροπανόλης. Το έντονο χρώμα στο εκάστοτε βοθρίο αντιστοιχεί σε δραστικότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων και άρα

σε ζώντα κύτταρα. Η εξασθένιση του χρώματος αντιστοιχεί στην αύξηση κυτταροτοξικότητας. (πάνω). Η αντίδραση της διάσπασης της ουσίας MTT από τα μιτοχονδριακά ένζυμα μεταβολικά ενεργών κυττάρων και το προϊόν αυτής (κάτω).

Ακολουθεί η περιγραφή της πειραματικής εφαρμογής της μεθόδου MTT για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων σταφυλιού που χρησιμοποιούμε στα πειράματα ελέγχου δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

ΥΛΙΚΑ

- Εκχυλίσματα από στελέχη σταφυλιού
- Αιθανόλη 70 %
- Απιονισμένο νερό
- Καρκινικά ηπατοκύτταρα HepG2
- Διάλυμα MTT
- Ισοπροπανόλη

ΟΡΓΑΝΑ

- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Πεχαμετρικό χαρτί
- Τρυβλίο 96 θέσεων ανάπτυξης των κυττάρων
- Επωαστήρας κυττάρων
- Ειδικό Φασματοφωτόμετρο

ΠΟΡΕΙΑ

Αρχικά παρασκευάζονται τα διαλύματα των εκχυλισμάτων σταφυλιού: ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας τα εκχυλίσματα και προστίθεται ddH₂O ώσπου η τελική συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος να είναι 1mg/ml. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH σε κάθε διάλυμα εκχυλίσματος με NaOH 1M ώστε να φτάσει ~7.

Στη συνέχεια, όταν μεταβαίνουμε στον ειδικό χώρο των κυτταροκαλλιεργειών όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου οι συνθήκες πρέπει να είναι στείρες.

Ακολουθως:

1. Σε τρυβλίο 96 βοθρίων (θέσεων) ανάπτυξης των κυττάρων (96-wellplate) επιστρώνονται 15000 κύτταρα ανά well, σε τελικό όγκο θρεπτικού μέσου 200μl. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο DMEM(w/o glucose) στο οποίο προστίθενται 25 mM γλυκόζη, 5% FB5, 2 mM L-γλουταμίνη, και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.-
2. Την επόμενη ημέρα, αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο και προστίθεται ίσος όγκος θρεπτικού μέσου, το οποίο περιέχει και το εκάστοτε εκχύλισμα σταφυλιού, στις επιθυμητές συγκεντρώσεις.
3. Έπειτα από α) 24 ώρες και β) 1 ώρα συνολικής επώασης με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα , προστίθεται ποσότητα διαλύματος MTT (5 mg/ml σε 1X PBS) ίση με το 1/10 του συνολικού όγκου του θρεπτικού μέσου (τελική συγκέντρωση MTT 0,5 mg/ml) και τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες, στον επωαστήρα, στους 37°C, απουσία φωτός σε σκοτεινό σημείο.
4. Μετά το πέρας των 3ωρών, έχουν σχηματιστεί οι κρύσταλλοι φορμαζάνης. Στη συνέχεια αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό ώστε να μην αφαιρεθεί και ποσότητα κρυστάλλων και προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης σε κάθε βοθρίο. Η ισοπροπανόλη προστίθεται για να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης.

5. Μετά την διαλυτοποίηση πραγματοποιείται μέτρηση της οπτική πυκνότητας σε μήκος κύματος 540nm και 690, σε ειδικό φασματοφωτόμετρο [Mosmann T.].

Τα εκχυλίσματα που εξετάζονται για πιθανή κυτταροτοξικότητα είναι:

A) Ασύρτικο Σαντορίνη Βόστρυχοι 2008

B) Ασύρτικο Σαντορίνη Στέμφυλα

Γ) Μαυροτράγανο Γίγαρτα

Δ) Μαυροτράγανο Βόστρυχοι

Κατά την επώαση των κυττάρων με τις υπό εξέταση ουσίες παρατηρήθηκαν, με χρήση μικροσκοπίου, αλλαγές της φυσιολογικής μορφολογία τους. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι κατά την επαναδιαλυτοποίηση των ουσιών σε υδατικό περιβάλλον παρέμενε μεγάλο ποσοστό αδιάλυτων ουσιών μας ώθησε να επαναλάβουμε τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας, όμως αυτή τη φορά με φιλτραρισμένα από φίλτρα των 0.2 μm εκχυλίσματα και πλήρη απομάκρυνση των μη υδατοδιαλυτών συστατικών των υπό εξέταση εκχυλισμάτων.

4.9 Φιλτράρισμα των υδατικών διαλυμάτων των εκχυλισμάτων σταφυλιού

ΥΛΙΚΑ

- Αιθανόλη 70 %
- Υδατικά διαλύματα των εκχυλισμάτων σταφυλιού

ΟΡΓΑΝΑ

- Αποστειρωμένα φίλτρα διαμέτρου 20μm
- Σύριγγα 10 ml

ΠΟΡΕΙΑ

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας φιλτραρίσματος όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου οι συνθήκες είναι στείρες. Αρχικά το φίλτρο τοποθετείται στο στόμιο ενός σωλήνα 50 ml με τη βοήθεια της σύριγγας που εισχωρεί σε κατάλληλη θέση πάνω στο φίλτρο. (εικόνα 37)



Εικόνα 37: Το φίλτρο το οποίο χρησιμοποιήθηκε με διάμετρο 20μm(αριστερά). Τρόπος χρήσης σύριγγας και φίλτρου ώστε να φιλτραριστούν τα εκχυλίσματα σταφυλιού(δεξιά).

Στη συνέχεια λαμβάνεται με τη σύριγγα κάθε φορά 5ml από το διάλυμα εκχυλίσματος και φιλτράρεται με προσοχή μέσω του φίλτρου ώστε να μη συσσωρευτεί αέρας και το φίλτρο καταστραφεί. Παρατηρήσαμε πως τα εκχυλίσματα μετά το φιλτράρισμα ήταν αρκετά πιο διαυγή και αποτελούσαν πλέον ομοιογενή μίγματα σε αντίθεση με τα μη φιλτραρισμένα υδατικά διαλύματα.

Μετά τη διαδικασία του φιλτραρίσματος σε στείρες συνθήκες προχωράμε ακριβώς στην ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας των αφιλτράριστων εκχυλισμάτων.

4.10 Προετοιμασία κυττάρων για το πείραμα ελέγχου δραστικότητας του ενζύμου GPb.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Για τον έλεγχο της δραστικότητας του ενζύμου GPb επιθυμούμε να επιτύχουμε αρχικά τη μέγιστη ενεργοποίηση της σύνθεσης γλυκογόνου στα κύτταρα. Για το σκοπό αυτό αρχικά καλλιεργούμε τα κύτταρα παρουσία εξωγενούς ινσουλίνης, δεξαμεθαζόνης και υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης ώστε η περίσσειά της, σε συνδυασμό με την παρουσία των κατάλληλων ορμονών να ενεργοποιήσει τη σύνθεση γλυκογόνου στα κύτταρα. Στη συνέχεια, μετά από 24 ώρες ανάπτυξης των κυττάρων, μειώνουμε τη συγκέντρωση της εξωγενούς γλυκόζης και προσθέτουμε μόνο δεξαμεθαζόνη και όχι ινσουλίνη ώστε να ενεργοποιηθεί η γλυκογονόλυση, ως μόνη πηγή γλυκόζης για το κύτταρο, δεδομένου τόσο της ανεπαρκούς ποσότητας γλυκόζης στο εξωκυττάριο υγρό όσο και της απουσίας ινσουλίνης, η οποία επάγει την είσοδο γλυκόζης στο κύτταρο, και προάγει τη σύνθεση γλυκογόνου, μέσω ενεργοποίησης της συνθάσης του γλυκογόνου και αναστολή της αναστολής της συνθάσης του γλυκογόνου. Υπό τις συνθήκες αυτές ενεργοποιείται η γλυκογονόλυση, μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου GPb, για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου.

ΥΛΙΚΑ

- HepG2 κύτταρα ηπατοκαρκινώματος
- Αιθανόλη 70 %
- DMEM (w/o FBS, w/o glyucose)

- DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομικίνη, 2mM L-γλουταμίνη
- Δεξαμεθαζόνη 10^{-8} M
- Ινσουλίνη 10 nM
- Γλυκόζη 25 nM
- Γλυκόζη 5 nM

ΟΡΓΑΝΑ

- Επωαστήρας κυττάρων
- Τρυβλία διαμέτρου 10cm

ΠΟΡΕΙΑ

Αρχικά, όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου οι συνθήκες είναι στείρες. Για την αξιολόγηση της δραστηριότητας της GPb ex vivo, HepG2 κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία (plates) 10 cm σε μια πυκνότητα 1×10^6 κύτταρα ανά τρυβλίο. Μετά την κυτταρική προσκόλληση στα τρυβλία και την επαρκή τους ανάπτυξη (~3-4 ημέρες) ώστε να καλύψουν το μεγαλύτερο τμήμα (70%) του ταπητίου των plates το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό απουσία ορού (serum free DMEM (w/o FBS) εμπλουτισμένου με 10^{-8} M δεξαμεθαζόνη, 10 nM ινσουλίνη και 25 mM γλυκόζη και τα κύτταρα επώάζονται περαιτέρω για 24 ώρες ώστε να παραχθεί γλυκογόνο λόγω περίσσειας γλυκόζης ως αποθηκευτική μορφή ενέργειας.

Μετά την 24ωρη επώαση, το παραπάνω θρεπτικό μέσω αντικαθίσταται με serum free (w/o FBS) θρεπτικό που περιέχει 10^{-8}

Μ δεξαμεθαζόνη και 5 mM γλυκόζη, στο οποίο επίσης προστίθεται και το εκχύλισμα που εξετάζουμε σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις.

Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα και 30'.

	Ημέρα 1	Ημέρα 2
Δεξαμεθαζόνη	+	+
Ινσουλίνη	+	-
Γλυκόζη	+	+
Διάρκεια επώασης	24h	1h30s
Σκοπός	Παραγωγή γλυκογόνου που προκαλείται από την περίσσεια γλυκόζης και την παρουσία ινσουλίνης.	Γλυκογονόλυση που προκαλείται από την, α) την ανεπαρκή ποσότητα γλυκόζης στο εξωκυττάριο υγρό και β) την έλλειψη ινσουλίνης και κατ' επέκταση μη είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα → έλλειψη γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων → διάσπαση γλυκογόνου μέσω του ενζύμου GPb

Πίνακας 5: Συνοπτικός πίνακας που απεικονίζει κατά τη διάρκεια των 2 ημερών τα περιεχόμενα στο θρεπτικό υλικό αντιδραστήρια και τον στόχο κάθε προσθήκης.

4.11 Συλλογή και αποθήκευση κυττάρων που έχουν επωαστεί με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Για τη συλλογή και αποθήκευση των κυττάρων που έχουν επωαστεί με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα χρησιμοποιούμε ρυθμιστικά διαλύματα ώστε να απομακρύνουμε εντελώς το θρεπτικό υλικό στο οποίο βρίσκονται, διατηρώντας όμως την κατάλληλη ωσμωμοριακότητα και το κατάλληλο pH. Λαμβάνοντας υπό όψιν ότι από το τελικό παρασκεύασμα κυττάρων πρέπει να απουσιάζουν τα φωσφορικά, το τελικό διάλυμα έκπλυσης είναι ρυθμιστικό διάλυμα από όπου απουσιάζουν φωσφορικά ιόντα. Συγκεκριμένα για την έκπλυση και συλλογή των κυττάρων χρησιμοποιούμε 2 είδη διαλυμάτων έκπλυσης:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS)

Είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/άλατος που χρησιμοποιείται συνήθως στη βιολογική έρευνα. Οι κατάλληλες συγκεντρώσεις φωσφορικών αλάτων που περιέχουν εξασφαλίζουν τη ρυθμιστική ικανότητα του διαλύματος στις επιθυμητές τιμές του pH. Τόσο οι συγκεντρώσεις ιόντων όσο και η ωσμωμοριακότητα του διαλύματος αντιστοιχούν συνήθως στις τιμές του ανθρώπινου σώματος (ισότονο, 320 mOsm/l, pH: 7.5).

Το διάλυμα PBS έχει πολλές χρήσεις, επειδή είναι ισοτονικό και μη τοξικό για τα κύτταρα. Ανάμεσα στις χρήσεις αυτές συμπεριλαμβάνεται το ξέπλυμα των κυττάρων σε καλλιέργεια. Επίσης, σε συνδυασμό με το EDTA, το διάλυμα PBS χρησιμοποιείται για τη διαλυτοποίηση και αποκόλληση των κυτταρικών

συσσωματωμάτων. Ωστόσο, δισθενή μέταλλα, όπως ο ψευδάργυρος, δεν μπορούν να προστεθούν, καθώς θα οδηγήσουν σε καθίζηση. Η σύσταση του διαλύματος PBS απεικονίζεται ακολούθως:

-137 mM NaCl
-2,7 mM KCl
-4,3 mM Na₂HPO₄
-1,47 mM KH₂PO₄

- **Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα 150 mM NaCl + 20 mM Tris pH 7.5**

Το διάλυμα αυτό αποτελείται από το άλας NaCl που διατηρεί την ωσμωμοριακότητα και το ρυθμιστικό διάλυμα Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane] με τη συμβολή του οποίου προσαρμόζεται το pH στις κατάλληλες τιμές. Το χρησιμοποιούμε για την τελευταία έκπλυση καθώς και για τη συλλογή ώστε να αποφευχθεί η αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων του διαλύματος PBS καθώς επηρεάζουν τις συνθήκες των κινητικών πειραμάτων που θα ακολουθήσουν.

ΥΛΙΚΑ

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS) (1x)
- Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα NaCl (150mM) + Tris (20mM, pH:7,5)

ΟΡΓΑΝΑ

- Αντλία νερού για απορρόφηση των διαλυμάτων έκπλυσης
- Ειδικό πλαστικό ξύστρο (scraper)
- Μικροφυγόκεντρος

ΠΟΡΕΙΑ

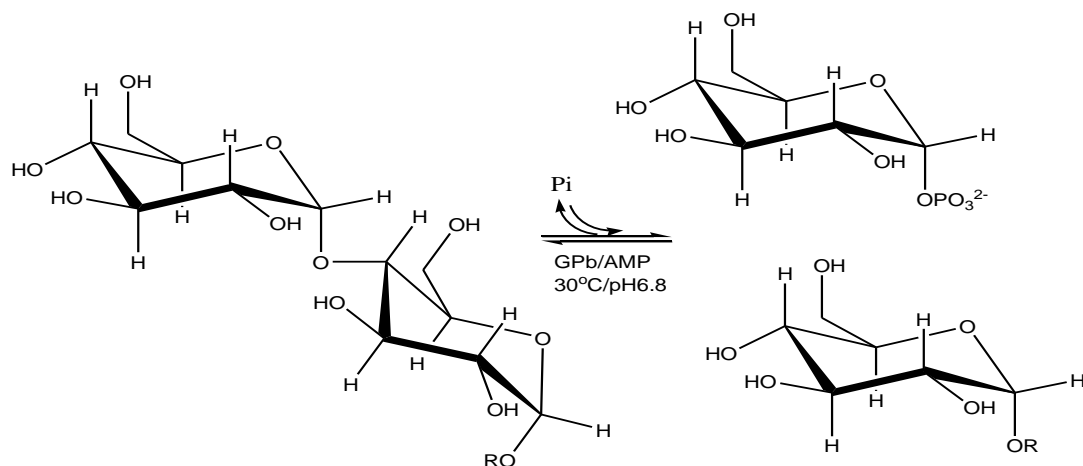
Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα δεν αποτελεί επιτακτική ανάγκη να βρίσκονται πλέον σε στείρες συνθήκες. Αφού τα plates τοποθετηθούν σε πάγο πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS 1x) Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για δύο φορές με προσθήκη, έκπλυση και απόρριψη 3 ml διαλύματος PBS. Στη συνέχεια, προχωρούμε σε έκπλυση με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα NaCl (150mM) + Tris (20mM, pH:7,5) για μία μόνο φορά.

Η απομάκρυνση των διαλυμάτων πραγματοποιείται με ήπια άντληση μέσω της αντλίας που συνδέεται σε πηγή νερού (βρύση). Μετά το πέρας των εκπλύσεων, προστίθεται 1 ml διαλύματος NaCl (150mM) + Tris (20mM, pH:7,5) ανά plate και τα κύτταρα συλλέγονται προσεκτικά με τη βοήθεια ενός ειδικού πλαστικού ξύστρου (scraper). Η συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος πραγματοποιείται σε πλαστικά φυαλίδια erpendorfs όγκου V = 1,5 ml, τα οποία φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά σε 1x1000 στροφές σε μικροφυγόκεντρο στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το ίζημα με τα περιεχόμενα κύτταρα φυλάσσεται στους -80 °C. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας συλλογής, τα κύτταρα όπως και το διάλυμα PBS διατηρούνται σε πάγο.

4.12 Πείραμα δραστηριότητας του ενζύμου GPb

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (GPb) βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση:

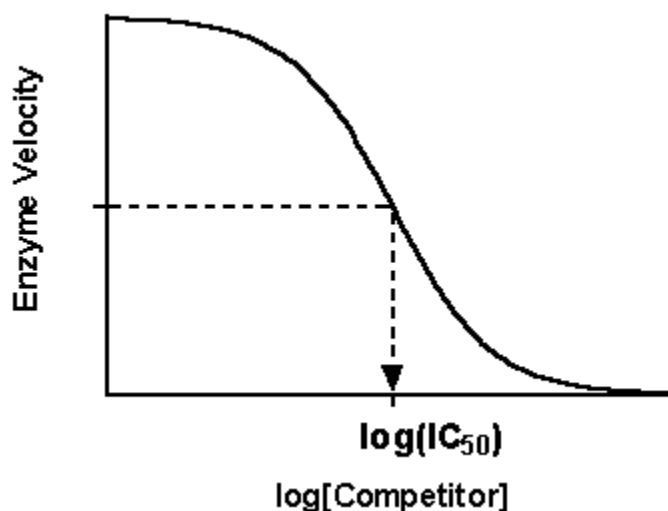


Εικόνα 38 : Σχηματική παρουσίαση της αντίδρασης στην οποία βασίζεται η κινητική μελέτη της GPb.

Στην αντίδραση αυτή η λιγότερο ενεργή μορφή του ενζύμου (T διαμόρφωση), μετά από ενεργοποίηση, δρα αντίστροφα, προς σχηματισμό γλυκογόνου, παρουσία G-1-P (α-D-1-φωσφορικής γλυκόζης), και ελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi).

Μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας να παρεμποδίζει τη βιολογική ή βιοχημική δράση, αποτελεί εκτός της K_i και η μέση ανασταλτική συγκέντρωση IC_{50} (half maximal inhibitory concentration), η οποία εκφράζει τη συγκέντρωση του αναστολέα με την οποία μειώνεται κατά 50% η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης (50% IC, ή IC_{50}). Οι τιμές της παραμέτρου αυτής εξαρτώνται από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες έχουν λάβει χώρα οι μετρήσεις, καθώς και από το είδος του αναστολέα. Κατά γενικό κανόνα, όσο υψηλότερη είναι η IC_{50} , τόσο χαμηλότερη θα είναι η ανταγωνιστική δραστηριότητα. Οι τιμές της τιμής της IC_{50} αυξάνουν με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου. Συνήθως χρησιμοποιείται ως ένα μέτρο της ισχύος του φαρμάκου-ανταγωνιστή σε φαρμακολογική έρευνα [Zifa et al. 2007].

Η δραστικότητα ενός δεδομένου αναστολέα μπορεί να προσδιοριστεί και να συγκριθεί με άλλους αναστολείς εξετάζοντας την IC_{50} του που λαμβάνεται από την ακόλουθη καμπύλη:



Εικόνα 39: Η καμπύλη από την οποία λαμβάνεται η τιμή της παραμέτρου IC_{50} .

ΥΛΙΚΑ

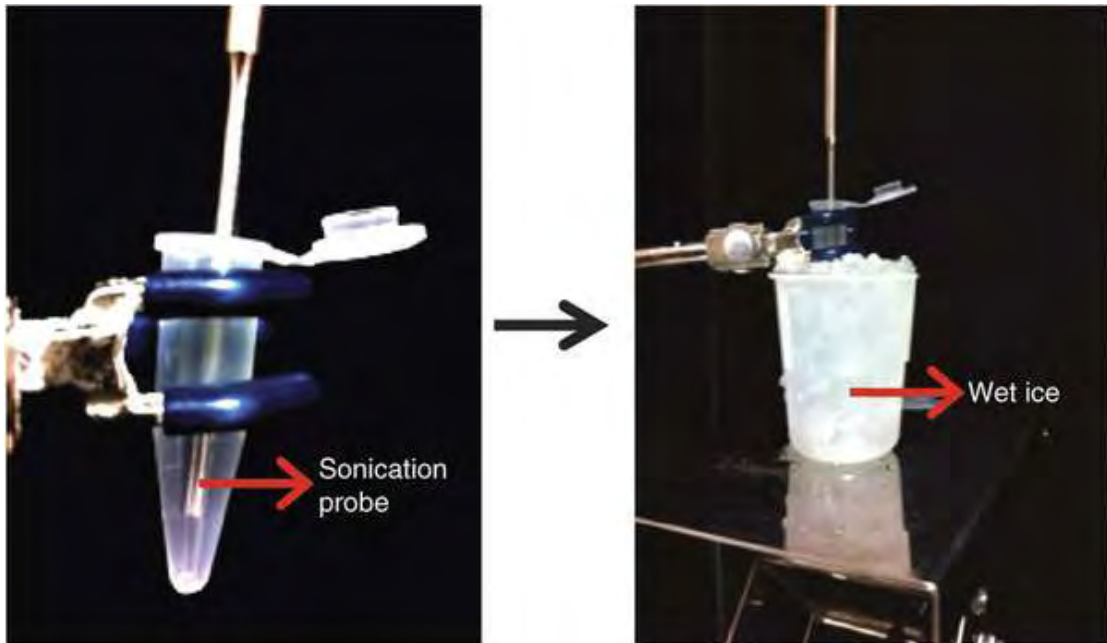
- Κυτταρικά εκχυλίσματα
- Lysis Buffer (20 mM Tris (pH:7,5), 0,05% Triton και 1 mM PMSF) για τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών.
- Απιονισμένο νερό
- Διάλυμα α -D-Glc-1-P
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1, pH6.8 (50 mM β -φωσφογλυκερόλης (β - GP), 50 mM β -μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Γλυκογόνο 10% (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων Pi 1mM pH 6,8

ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή παραγωγή υπερήχων (sonicator)
- Φασματοφωτόμετρο
- Υδατόλουτρο
- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Πιπέτες
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Συσκευή Vortex
- Χρονόμετρο
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- Χρονόμετρο

ΠΟΡΕΙΑ

Την ημέρα του πειράματος κάθε κυτταρικό εκχύλισμα επαναιωρείται σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (lysis buffer) που περιέχει 20 mM Tris (pH:7,5), 0,05% Triton και 1 mM PMSF και ομογενοποιείται μέσω της συσκευής παραγωγής υπερήχων (sonicator) στον πάγο 15 φορές x 15' με σκοπό τη διάσπαση των μεμβρανών και τη λύση των κυττάρων (Εικόνα). Το προκύπτον διάλυμα που παράγεται μετά τη λύση τους, φυγοκεντρείται για 40' σε 13,6x1000 στροφές σε μικροφυγόκεντρο στους 4°C.



Εικόνα 40: Απεικόνιση διαδικασίας της λύσης των κυττάρων μέσω της συσκευής παραγωγής υπερήχων (sonicator). Η διαδικασία πρέπει απαραίτητως να διεξάγεται στον πάγο.

Τόσο η πρωτεϊνική συγκέντρωση του κάθε δείγματος (μέθοδος Bradford) όσο και η δραστηρότητα του ενζύμου προσδιορίζονται στο υπερκείμενο, που προκύπτει από την φυγοκέντρηση των δειγμάτων.

4.12.1 Παρασκευή τυφλών-δειγμάτων αναφοράς

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC_{50} του ενζύμου βασίζεται στο προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb, γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση φωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου αλλά είναι παρόντα στο μίγμα αντίδρασης ως ενδογενή φωσφορικά των κυτταρικών εκχυλισμάτων, τα οποία αντιπροσωπεύονται από την τιμή απορρόφησης, προσδιορισμού φωσφορικών, σε χρόνο 0.

Επίσης για τον έλεγχο των συνθηκών του πειράματος παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά:

- Τυφλό νερού για τη ρύθμιση του μηδενός, και έλεγχο της πιθανής παρουσίας φωσφορικών στο απεσταγμένο νερό
- Τυφλό γνωστού πρότυπου διαλύματος φωσφορικών από όπου προσδιορίζεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$
- Τυφλό G1P, για τον έλεγχο της πιθανής υδρόλυσης της G1P.

Παρασκευάζονται από δύο τυφλά εκτός του νερού και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεών τους, ενώ αν η χρονική διάρκεια ενός πειράματος (όπως σε περιπτώσεις που εξετάζεται κάποιος αναστολέας) κρίνεται μεγάλη, τότε φτιάχνονται δύο σειρές τυφλών από τουλάχιστο δύο δείγματα η κάθε μία, οι οποίες μετριοούνται η μία στην αρχή του πειράματος και η άλλη στο τέλος από όπου λαμβάνεται και πάλι ο μέσος όρος των τιμών.

4.12.2 Παρασκευή ενζυμικών διαλυμάτων

Ο αριθμός των ενζυμικών διαλυμάτων εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις αναστολέα που θέλουμε να ελέγξουμε και που καλλιεργήσαμε τα κύτταρά μας. Σε κάθε ένα από τα ενζυμικά διαλύματα προστίθεται συγκεκριμένος όγκος κυτταρικού εκχυλίσματος που περιέχει τον αναστολέα, ίση ποσότητα γλυκογόνου 10% (w/v), ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1, pH6.8 (50mM β -φωσφογλυκερόλης (β - GP), 50mM β -μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA) ώστε ο τελικός όγκος κάθε διαλύματος να είναι ίδιος με

των υπολοίπων. Οι αναλογίες των διαλυμάτων εξαρτώνται στην εκάστοτε περίπτωση από την ποσότητα των κυτταρικών εκχυλισμάτων. Στο μίγμα αντίδρασης η τελική συγκέντρωση γλυκογόνου είναι 1%. Ταυτόχρονα με την παρασκευή των ενζυμικών διαλυμάτων παρασκευάζουμε κι ένα δείγμα-ελέγχου(τυφλό G1P, για τον έλεγχο της πιθανής υδρόλυσης της G1P)το οποίο αποτελείται από ίσες ποσότητες γλυκογόνου 10% (w/v), ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1, pH6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλης (β- GP), 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA)ώστε ο τελικός του όγκος να είναι ίδιος με αυτόν των ενζυμικών με τη διαφορά ότι σε αυτό αντικαθίσταται η ποσότητα του κυτταρικού εκχυλίσματος με ddH₂O στο οποίο φυσιολογικά δεν θα πραγματοποιηθεί αντίδραση αφού δεν υπάρχει ένζυμο.

4.12.3 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος

Το διάλυμα υποστρώματος αποτελείται από Glc-1-P και ddH₂O. Ο τελικός του όγκος υπολογίζεται με βάση τον αριθμό των συγκεντρώσεων εκχυλίσματος που εξετάζουμε εφόσον προστίθεται ποσότητα 330 μl σε κάθε ενζυμικό και την τελική επιθυμητή συγκέντρωση της Glc-1-P (30 μM) που θέλουμε να υπάρχει μέσα σε κάθε ενζυμικό διάλυμα αφού προστεθεί και το διάλυμα υποστρώματος ώστε ο τελικός όγκος να είναι 550μl (330μl διαλύματος υποστρώματος + 220 μl ενζυμικού διαλύματος). Η συγκέντρωση αυτή ισούται με 30 μM. Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C για να αποφευχθεί υδρόλυση της Glc-1-P.

ΠΟΡΕΙΑ:

Για να προσδιοριστεί η πιθανή αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, αρχικά παρασκευάζουμε το διάλυμα υποστρώματος όπως έχει περιγράψει πιο πάνω. Στη συνέχεια παρασκευάζουμε τα ενζυμικά διαλύματα. Κάθε ενζυμικό διάλυμα θα πρέπει κατά προτίμηση να έχει τελικό όγκο 220 μL . Να σημειωθεί ότι σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζουμε και ένα πείραμα ελέγχου χωρίς αναστολέα. Τα ενζυμικά διαλύματα τοποθετούνται επίσης στο υδατόλουτρο, ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το διάλυμα υποστρώματος, πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει αναλυτικά την παρασκευή των ενζυμικών διαλυμάτων.

	Σωλήνας 1	Σωλήνα ς 2	Σωλήνας 3	Σωλήνας 4	Σωλήνας 5	G1P
Κυτταρικό εκχύλισμα	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	120 μL	- (120 μL ddH ₂ O)
Γλυκογόνο 10 % (w/v)	66,6 μL	66,6 μL	66,6 μL	66,6 μL	66,6 μL	66,6 μL
Διάλυμα 50:50:1	33,3 μL	33,3 μL	33,3 μL	33,3 μL	33,3 μL	33,3 μL
Τελικός όγκος	220 μL	220 μL	220 μL	220 μL	220 μL	220 μL

Πίνακας 6: Σχηματική απεικόνιση του περιεχομένου κάθε ενζυμικού διαλύματος.

Στη συνέχεια του πειράματος μεταφέρονται 330 μL από το διάλυμα υποστρώματος σε κάθε ενζυμικό διάλυμα (και στο δείγμα ελέγχου G1P) με τη σειρά, έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση που

καταλύεται από το ένζυμο GPb . Στη συνέχεια ανά 4 λεπτά και σε χρόνους 0, 4, 8, και 12 και 16 λεπτών λαμβάνονται και μεταφέρονται 100 μ L από το διάλυμα της αντίδρασης σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιέχουν από 12,5 μ L SDS 10% και η αντίδραση σταματά, λόγω της αδρανοποιητικής-μετουσιωτικής δράσης του SDS. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος σταφυλιού που περιέχεται σε κάθε ένα από τα κυτταρικά εκχυλίσματα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί, προστίθενται από 625 μ L διάλυμα ασκορβικού οξέος- διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα(υποκεφάλαιο 3.12.5).

4.12.4 Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστηριότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου οδήγησε σε μια συνεχή τροποποίηση και βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου που προτάθηκε από τους Fiske και Subbarow (1925).

4.12.5 Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης 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 φωσφορικά ιόντα Pi πρέπει να είναι μεταξύ 0,05-0,4 μM , προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο [Saheki et al, 1985].

ΥΛΙΚΑ

- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου, με ρύθμιση pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). 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 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N.

Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία όγκων 4:1, δηλ 4 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινικού και έναν όγκο ασκορβικού (τελικοί όγκοι: 80ml και 20ml αντίστοιχα).

Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15 min μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

ΠΟΡΕΙΑ:

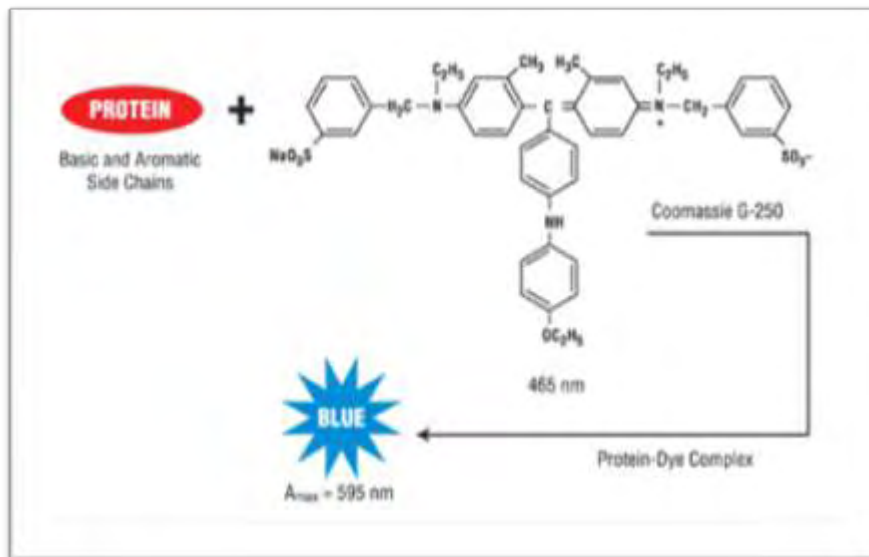
Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 625 μl από το παραπάνω αντιδραστήριο χρώσης σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Μετά από ισχυρή ανάδευση οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15min. Από τα αποτελέσματα της

φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των φωσφορικών ιόντων (Pi), που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα, από τις οποίες θα προκύψουν και αλλά πειραματικά δεδομένα για την δημιουργία της καμπύλης για τον υπολογισμό της IC₅₀. Στη συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα GraFit, προκειμένου να προσδιοριστεί η IC₅₀.

4.13 Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης σε κάθε κυτταρικό εκχύλισμα με τη μέθοδο Bradford.

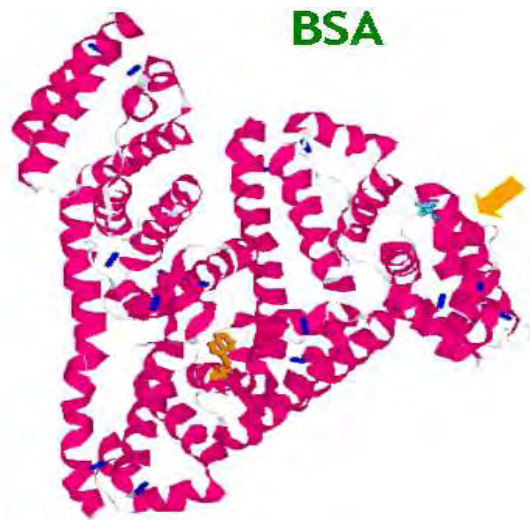
ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Αυτό οδηγεί σε μια φασματική μετατόπιση από την κοκκινωπή / καφέ μορφή της χρωστικής ουσίας (μέγιστη απορρόφηση στα 465 nm) στη μπλε μορφή της χρωστικής (μέγιστη απορρόφηση στα 610 nm) (εικόνα 15). Η διαφορά μεταξύ των δύο μορφών της χρωστικής είναι μεγαλύτερη στα 595 nm, κι έτσι αυτό είναι το βέλτιστο μήκος κύματος για τη μέτρηση του μπλε χρώματος από το σύμπλοκο της χρωστικής με την πρωτεΐνη. Το μπλε χρώμα μπορεί, επίσης, να μετρηθεί σε οποιοδήποτε μήκος κύματος μεταξύ των 575 nm και 615 nm. Στις δύο ακραίες συνθήκες (575 nm και 615 nm), υπάρχει μια απώλεια της τάξης του 10% στην μετρούμενη ποσότητα του χρώματος (απορρόφηση) σε σύγκριση με εκείνη που λαμβάνεται στα 595 nm [Bradford 1976].



Εικόνα 41: Σχηματική αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με την πρωτεΐνη.

Η ανάπτυξη του χρώματος στη συγκεκριμένη μέθοδο έχει συσχετιστεί με την παρουσία ορισμένων βασικών αμινοξέων (κυρίως αργινίνη, ιστιδίνη και λυσίνη) στην πρωτεΐνη. Οι δεσμοί Van der Waals και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν, επίσης, στη σύνδεση της χρωστικής με τις πρωτεΐνες. Ο αριθμός των μορίων της χρωστικής που συνδέονται με κάθε μόριο πρωτεΐνης είναι σχεδόν ανάλογος με τον αριθμό των θετικών φορτίων που φέρει η πρωτεΐνη. Ελεύθερα αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους δεν παράγουν χρώμα με τη χρήση του αντιδραστηρίου αυτού. Σε γενικές γραμμές, η μάζα ενός πεπτιδίου ή μιας πρωτεΐνης πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 kDa, προκειμένου να αναλυθεί με αυτή τη μέθοδο. Για τη χρήση της μεθόδου κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης (BSA) [Bradford 1976].



Εικόνα 42: Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της πρότυπης πρωτεΐνης βόειου αλβουμίνης ορού (BSA).

Η γραμμικότητα της ανάλυσης κυμαίνεται από 0,2-3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ πρωτεΐνης, ως προς BSA. Η μέθοδος Bradford παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- είναι απλή, γιατί η μέτρηση γίνεται από ανάμειξη του διαλύματος της πρωτεΐνης με ένα μόνο διάλυμα χρωστικής,
- είναι πολύ γρήγορη,
- είναι πολύ ευαίσθητη γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό μέχρι και 1 mg πρωτεΐνης,
- οι παράγοντες που την παρεμποδίζουν είναι πολύ λιγότεροι και
- πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς να απαιτείται ειδικός εξοπλισμός.

ΥΛΙΚΑ

- Lysis Buffer (20 mM Tris (pH:7,5), 0,05% Triton και 1 mM PMSF) για τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών.

- Διάλυμα βόειου αλβουμίνης ορού (BSA) σε απιονισμένο νερό σε συγκέντρωση 10 μg/μL
- Αντιδραστήριο Bradford
- Κυτταρικά εκχυλίσματα που αρχικά εξετάστηκαν κινητικά.

ΟΡΓΑΝΑ

- Φασματοφωτόμετρο

ΠΟΡΕΙΑ

Πριν από την έναρξη του ενζυμικού πειράματος διαχωρίζουμε 5μl από κάθε κυτταρικό εκχύλισμα που θα χρησιμοποιηθούν στην μέθοδο ποσοτικοποίησης πρωτεΐνης κάθε κυτταρικού εκχυλίσματος. Αρχικά παρασκευάζουμε τα πρωτεϊνικά διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Οι ποσότητες και τα διαλύματα δίδονται στον παρακάτω πίνακα:

Διαλύματα	Lysis Buffer	BSA (0,25μg/μl)	Αντιδραστήριο Bradford
0	20,0 μl	0 μl	980 μl
0,2	19,6 μl	0,4 μl	980 μl
0,4	19,2 μl	0,8 μl	980 μl
0,6	18,8 μl	1,2 μl	980 μl
0,8	18,4 μl	1,6 μl	980 μl
1	18,0 μl	2,0 μl	980 μl
1,2	17,6 μl	2,4 μl	980 μl

Πίνακας 7: Σχηματική απεικόνιση του περιεχομένου κάθε πρότυπου διαλύματος για τον σχηματισμό της πρότυπης καμπύλης.

Στη συνέχεια παρασκευάζουμε τα διαλύματα με τα κυτταρικά εκχυλίσματα και το αντιδραστήριο Bradford. Αρχικά πραγματοποιούμε αραιώση 1/10 του κάθε εκχυλίσματος (5μl από κάθε κυτταρικό εκχύλισμα +50 μl lysis buffer). Στη συνέχεια από τα διαλύματα που θα προκύψουν προσθέτουμε από το κάθε ένα 20 μl σε 980 μl αντιδραστηρίου Bradford. Τόσο τα διαλύματα της πρότυπης καμπύλης όσο και τα διαλύματα των δειγμάτων επωάζονται σε σκοτεινό σημείο για ~20 λεπτά. Σε αυτόν το χρόνο προετοιμάζουμε το φωτόμετρο και μετά το πέρας του χρόνου αυτού φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 595nm.

Με τις μετρήσεις των πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια του προγράμματος excel office, στην οποία αντιστοιχεί εξίσωση της μορφής $y=ax + b$. Κάθε φωτομετρική μέτρηση κυτταρικού εκχυλίσματος αντιστοιχεί στην παράμετρο y της εξίσωσης και με τη βοήθεια αυτού βρίσκεται για κάθε δείγμα η παράμετρος x που χρησιμοποιείται σε περαιτέρω υπολογισμούς που αναλύονται παρακάτω.

4.14 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων - πρόγραμμα GraFit 4.0

ΜΕΘΟΔΟΣ

Προσδιορισμός των constants αναστολής διεξήχθη με ανάλυση μη-γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας GraFit 4.0 πλωτάροντας την αναλογία των ανεσταλμένων και μη ανεσταλμένων ενζυμικών δραστηριοτήτων έναντι των συγκεντρώσεων του αναστολέα. Στην περίπτωση σχετικά ήπιας

αναστολής τιμές της παραμέτρου IC50 λαμβάνονται από διαγράμματα της σχετικής δραστικότητας έναντι $-\log[I]$ και υπολογίζονται με GraFit4.0

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ενζυμικής κινητικής έγινε χρήση του προγράμματος GraFit 4.0. Για την εισαγωγή των τιμών που αντιστοιχούν σε κάθε εκχύλισμα στο πρόγραμμα GraFit και τον υπολογισμό του ποσοστού αναστολής πρέπει να προηγηθεί ο υπολογισμός των constants:

Limit : $0,78^* \times [G1P] \times \text{Assay volume (ml)}^{**}$

$$f = \frac{\text{limit}}{\text{assay volume} \times [\text{C πρωτεΐνης στον τελικό όγκο αντίδρασης}]}$$

*κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της αντίδρασης όταν έχει παραχθεί το 78% των φωσφορικών, τότε σταματά η αντίδραση λόγω ισορροπίας (0,78)

**η ποσότητα που παίρνουμε για να σταματήσουμε την αντίδραση

Δεδομένου ότι:

-η συγκέντρωση της G1P στο ενζυμικό διάλυμα ισούται με 30 mM,

-Η ποσότητα που παίρνουμε για να σταματήσουμε την αντίδραση είναι 100 μl,

η παράμετρος limit είναι γνωστή (2,34) επομένως στο παραπάνω κλάσμα για την εύρεση του f ο μόνος άγνωστος αποτελεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στον τελικό όγκο της αντίδρασης (στο

εκχύλισμα). Για την εύρεση του αγνώστου αρχικά εφαρμόζουμε τον Νόμο αραίωσης του Ostwald όπου:

C1: η τιμή της παραμέτρου x που βρίσκεται από την εξίσωση Bradford για κάθε κυτταρικό εκχύλισμα.

C2: Η συγκέντρωση πρωτεΐνης στον τελικό όγκο αντίδρασης (άγνωστο)

V1: Ο όγκος του κυτταρικού εκχυλίσματος που προσθέτουμε σε κάθε ενζυμικό διάλυμα στην αρχή του κινητικού πειράματος (120μl)

V2: Ο όγκος του ενζυμικού διαλύματος μετά την προσθήκη του υποστρώματος (550 μl)

Με τη λύση της εξίσωσης βρίσκεται για κάθε κυτταρικό εκχύλισμα συγκέντρωση πρωτεΐνης στον τελικό όγκο αντίδρασης και τελικά η παράμετρος f .

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

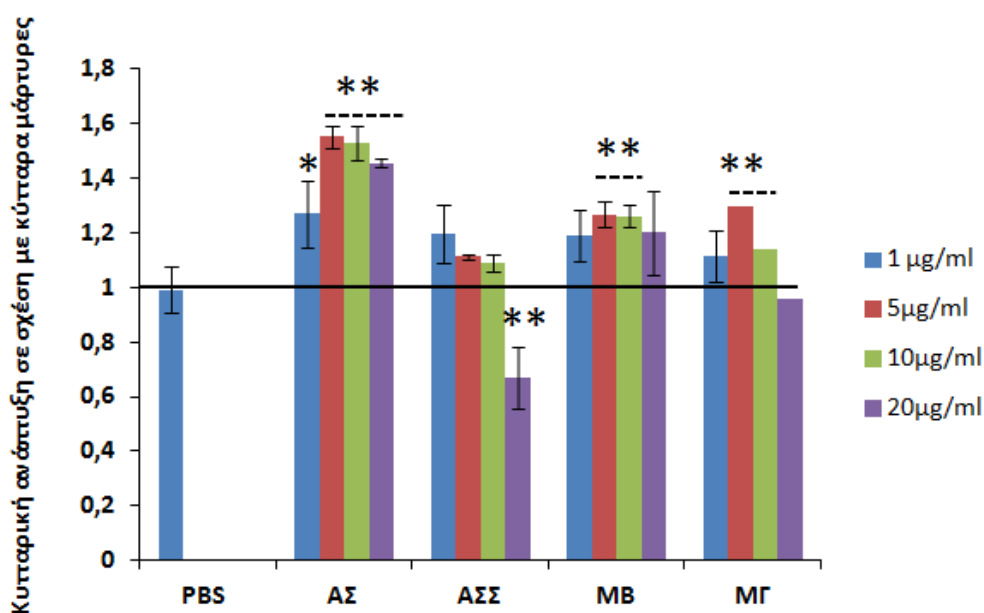
5.1. Επίδραση των υδατικών διαλυμάτων των εκχυλισμάτων σταφυλιού στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.

Για τον έλεγχο της επίδρασης των συστατικών σταφυλιού στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2, κύτταρα HepG2 σε καλλιέργεια επώαστηκαν με τα υπό μελέτη συστατικά μετά την επαναδιαλυτοποίησή τους σε απεσταγμένο νερό και την προσθήκη τους στο μέσο ανάπτυξης των κυττάρων σε εύρος συγκεντρώσεων από 0 $\mu\text{g/ml}$ έως 20 $\mu\text{g/ml}$. Ο συνολικός χρόνος επώασης ήταν 1 και 24 ώρες. Για τον έλεγχο της επίδρασης των ουσιών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εφαρμόστηκε η μέθοδος MTT. Στην συνέχεια αναφέρονται τα υδατικά διαλύματα των συστατικών των σταφυλιών που μελετήθηκαν και οι αντίστοιχες ποικιλίες τους.

1. Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008
2. Ασύρτικο Σαντορίνης Στέμφυλα
3. Μαυροτράγανο Βόστρυχοι
4. Μαυροτράγανο Γίγαρτα

Μετά το πέρας της επώασης κυρίως του 24ώρου παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα που ελέγχθηκαν επηρέασαν σημαντικά τα κυτταρικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, παρατήρηση σε μικροσκόπιο ορατού έδειξε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκάστοτε εκχυλίσματος τόσο περισσότερο τα κύτταρα συρρικνώνονται. Παρ' όλα αυτά όμως, πρέπει να υπογραμμιστεί πως δεν παρατηρήθηκε κυτταροτοξικότητα καθώς τα κύτταρα συνέχισαν να είναι ζώντα και να πολλαπλασιάζονται, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου MTT.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου MTT, αμέσως μετά την επώαση των υδατικών μη φιλτραρισμένων εκχυλισμάτων σταφυλιού με τα κύτταρα HerG2 και την κατεργασία τους σύμφωνα με τη δοκιμή MTT, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 450 nm και 690 nm (για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων) με χρήση ειδικού μετρητή Elisa. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί (εικόνα 43).



Εικόνα 43: Επίδραση μη φιλτραρισμένων υδατικών εκχυλισμάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ηπατοκαρκινικών κυττάρων HerG2 μετά από 24 ώρες επώαση (*, $p \leq 0.05$, **, $p \leq 0.001$, Ο έλεγχος στατιστικά σημαντικών διαφορών έγινε σε σχέση με το δείγμα αναφοράς, PBS).

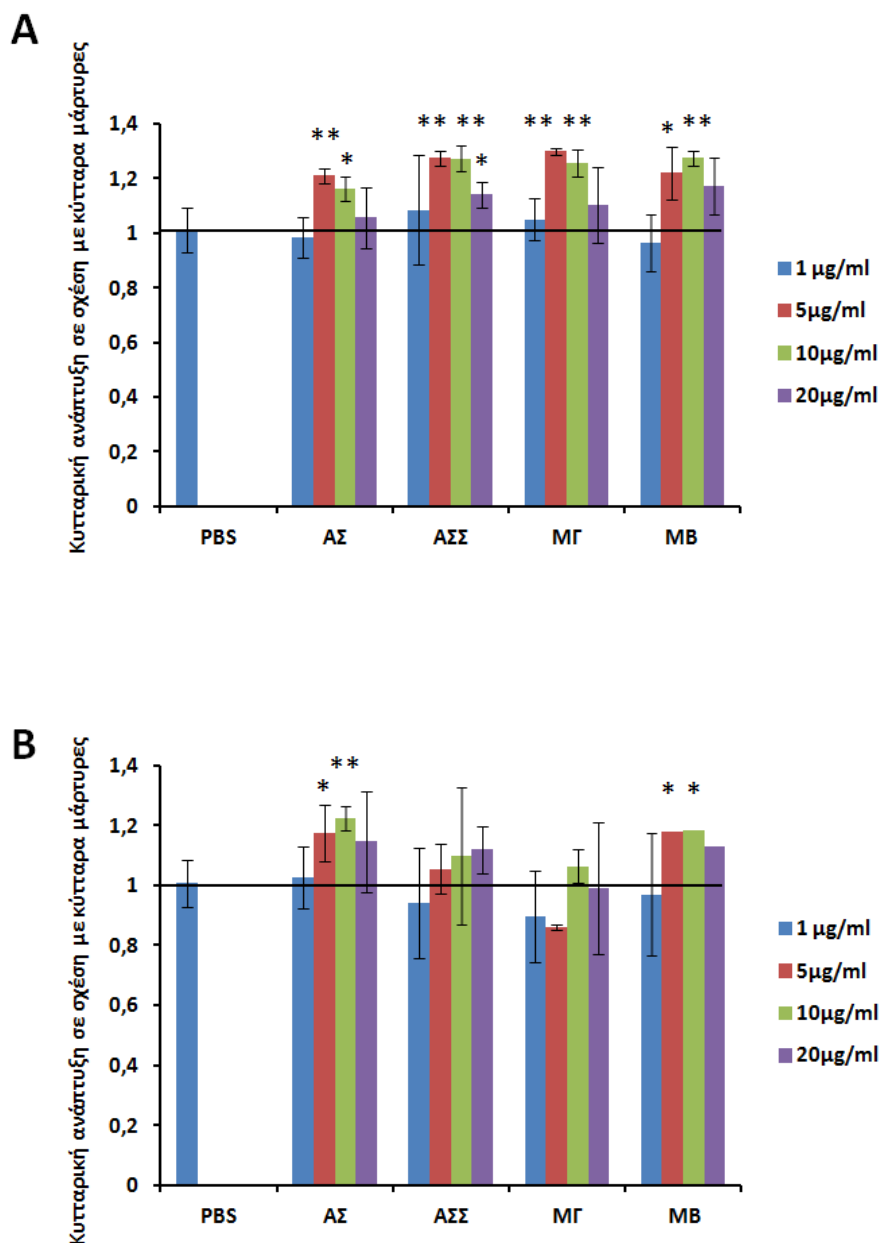
Τα αποτελέσματα της δοκιμής MTT υποδεικνύουν στατικώς σημαντική επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, σε ποσοστό από 20-50%, για τα περισσότερα δείγματα που μελετήθηκαν, με μοναδική εξαίρεση το δείγμα Ασύρτικο Σαντορίνης στέμφυλα, το οποίο σε συγκέντρωση 20 µg/ml παρουσίασε κυτταροτοξικότητα σε

ποσοστό περίπου 40%. Παρόλα αυτά, η παρουσία μεγάλου ποσοστού αδιάλυτων, μη υδατοδιαλυτών συστατικών στα εκχυλίσματα, σε συνδυασμό με τις παρατηρούμενες αλλαγές στη μορφολογία τους καθιστά τα παραπάνω αποτελέσματα μη αξιόπιστα.

Όπως προαναφέρθηκε, λόγω των αδιάλυτων συστατικών των υδατικών διαλυμάτων των εκχυλισμάτων, ήταν αναπόφευκτο να εξετάσουμε ένα μη ομοιογενές μίγμα. Προχωρήσαμε, λοιπόν, στη διαδικασία φιλτραρίσματος αυτών των διαλυμάτων σε στείρες συνθήκες με στόχο το διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών συστατικών από τα μη υδατοδιαλυτά συστατικά, τα όποια, όπως αποδεικνύεται από τη χημική ανάλυση των ουσιών αυτών, συνιστούν σημαντικό ποσοστό της σύστασης τους με ιδιαίτερη διατροφική αξία.

Ο διαχωρισμός των υδατοδιαλυτών συστατικών από τα μη μας επέτρεψε να εκτελέσουμε μία συστηματική μελέτη της επίδρασης των υδατοδιαλυτών συστατικών τόσο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και στη δραστικότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των υδατοδιαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων των συστατικών των ποικιλιών σταφυλιών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί (εικόνα 44).



Εικόνα 44: Επίδραση φιλτραρισμένων υδατικών εκχυλισμάτων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2 μετά από A) 48 ώρες επώαση, B) 1 ώρα επώαση (*, $p \leq 0.05$, **, $p \leq 0.001$, Ο έλεγχος στατιστικά σημαντικών διαφορών έγινε σε σχέση με το δείγμα αναφοράς, PBS).

Όπως φαίνεται στα παραπάνω διαγράμματα, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι τόσο στο χρόνο επώασης μίας ώρας όσο και στο 24ώρου, καμία από τις ουσίες που μελετήθηκαν δεν είναι κυτταροξικές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η κυτταροτοξικότητα που πιθανόν να επαγόταν από το μη

φιλτραρισμένο δείγμα Ασύρτικο Σαντορίνης στέμφυλα πιθανόν να οφειλόταν σε μη υδατοδιαλυτά συστατικά. Η σε μικρό ποσοστό επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, παρουσία των υπολοίπων δειγμάτων που μελετήθηκαν, διατηρήθηκε και στην περίπτωση των καθαρά υδατοδιαλυτών συστατικών.

5.2 Επίδραση των εκχυλισμάτων σταφυλιού στη δραστικότητα της ενδογενούς φωσφορυλάσης γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η δράση εκχυλισμάτων βοστρύχων και γιγάρτων διαφόρων ποικιλιών σταφυλιού του γένους *Vitis Vinifera*, ως εν δυνάμει αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της παραμέτρου IC_{50} . Όπως προαναφέρθηκε, η IC_{50} είναι η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστικότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P (1-φωσφορικής γλυκόζης). Όσο πιο μικρή είναι η τιμή, τόσο πιο ισχυρά συνδέεται ο αναστολέας με το ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης και προκαλεί μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης φωσφορικών ιόντων 'εκτοπίζοντας' το φυσιολογικό υπόστρωμα Glc-1-P.

Τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ως προς την ανασταλτική τους δράση στην GPb ηπατικών κυττάρων αναφέρονται παρακάτω:

1. Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008
2. Ασύρτικο Σαντορίνης Στέμφυλα
3. Μαυροτράγανο Βόστρυχοι
4. Μαυροτράγανο Γίγαρτα
5. Βοηδόματο Σαντορίνης Βόστρυχοι
6. Μοσχόμαυρο γίγαρτα

Για τον έλεγχο της ανασταλτικής δράσης των ανωτέρω εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες επαναδιαλυτοποίησης των εκχυλισμάτων: 1) διπλά απεσταγμένο νερό και διήθηση του προκύπτων μίγματος προς απομάκρυνση αδιάλυτων συστατικών και 2) διαλύτης DMSO για την κατά το δυνατόν πλήρη διαλυτοποίηση των υδρόφοβης φύσης συστατικών των εκχυλισμάτων. Στην περίπτωση χρήσης του DMSO ως διαλύτη επαναδιαλυτοποίησης των συστατικών των δειγμάτων που εξετάστηκαν, περιοριστικός παράγοντας ήταν η τελική συγκέντρωση του DMSO στο καλλιεργητικό μέσο των κυττάρων, η οποία δεν υπερέβαινε το 0,2 %, προς αποφυγή επαγωγής κυτταροτοξικότητας λόγω του διαλύτη. Επιλέχθηκαν έτσι με ακρίβεια οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων των εκχυλισμάτων ώστε η ποσότητα του DMSO που προστέθηκε να μην είναι κυτταροτοξική αλλά να είναι και η υψηλότερη δυνατή για την πλήρη διάλυση όλων των συστατικών. Η αναστολή της δραστηριότητας της φωσφορυλάσης στα υπό εξέταση δείγματα εξετάστηκε σε σχέση με τη δραστηριότητα του ενζύμου σε κύτταρα μάρτυρες, τα οποία επωάστηκαν με την αντίστοιχη συγκέντρωση διαλύτη, ίδια με αυτήν υπό εξέταση δειγμάτων.

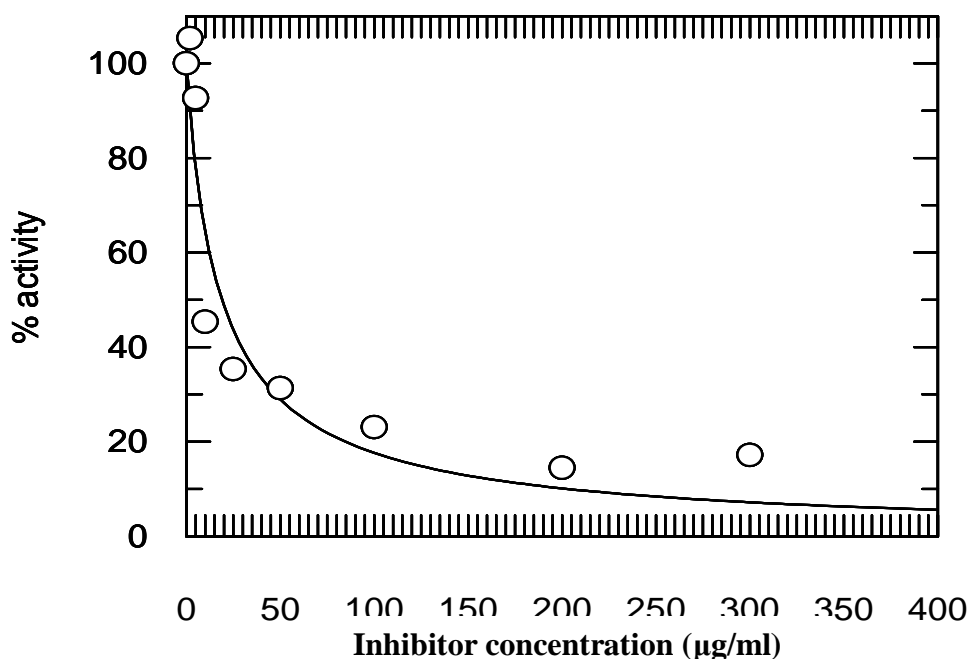
5.2.1 Επίδραση των υδατοδιαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων σταφυλιού στη δραστικότητα της ενδογενούς φωσφορυλάσης γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.

Ο έλεγχος της εν δυνάμει ανασταλτικής δράσης των υδατοδιαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων σταφυλιού στη δραστικότητα της ενδογενούς φωσφορυλάσης γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2 μελετήθηκε στα δείγματα που ακολουθούν.

- Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008
- Ασύρτικο Σαντορίνης Στέμφυλα
- Μαυροτράγανο Βόστρυχοι
- Μαυροτράγανο Γίγαρτα
- Βοηδόματο Σαντορίνης Βόστρυχοι

Από τα παραπάνω εκχυλίσματα αναστολή του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου προκάλεσε σε εύρος συγκεντρώσεων το εκχύλισμα Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008 και σε μεγάλες συγκεντρώσεις το εκχύλισμα Ασύρτικο Σαντορίνης Στέμφυλα.

Ακολουθεί η γραφική παράσταση που προέκυψε από το πρόγραμμα GrafFit για τον υπολογισμό της IC_{50} του εκχυλίσματος Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008 (εικόνα 45).



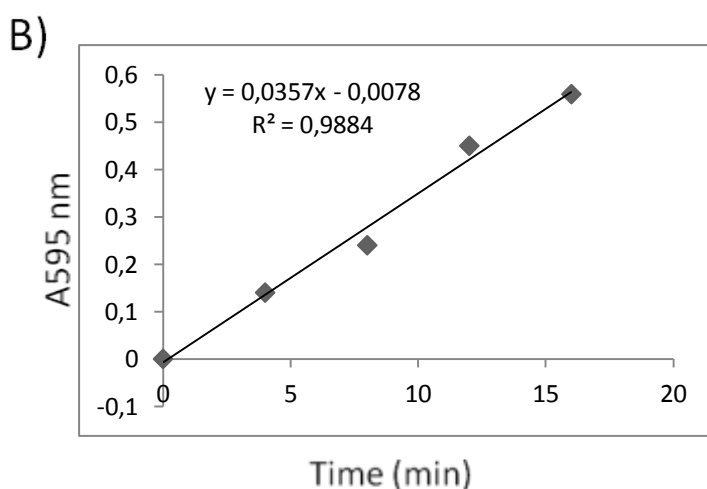
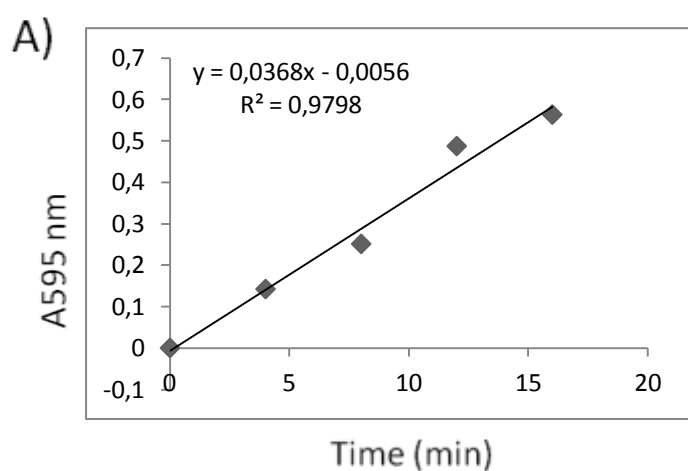
Εικόνα 45: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008 . Η IC₅₀ υπολογίστηκε στα 18,977 µg/ml (Std error 5,527).

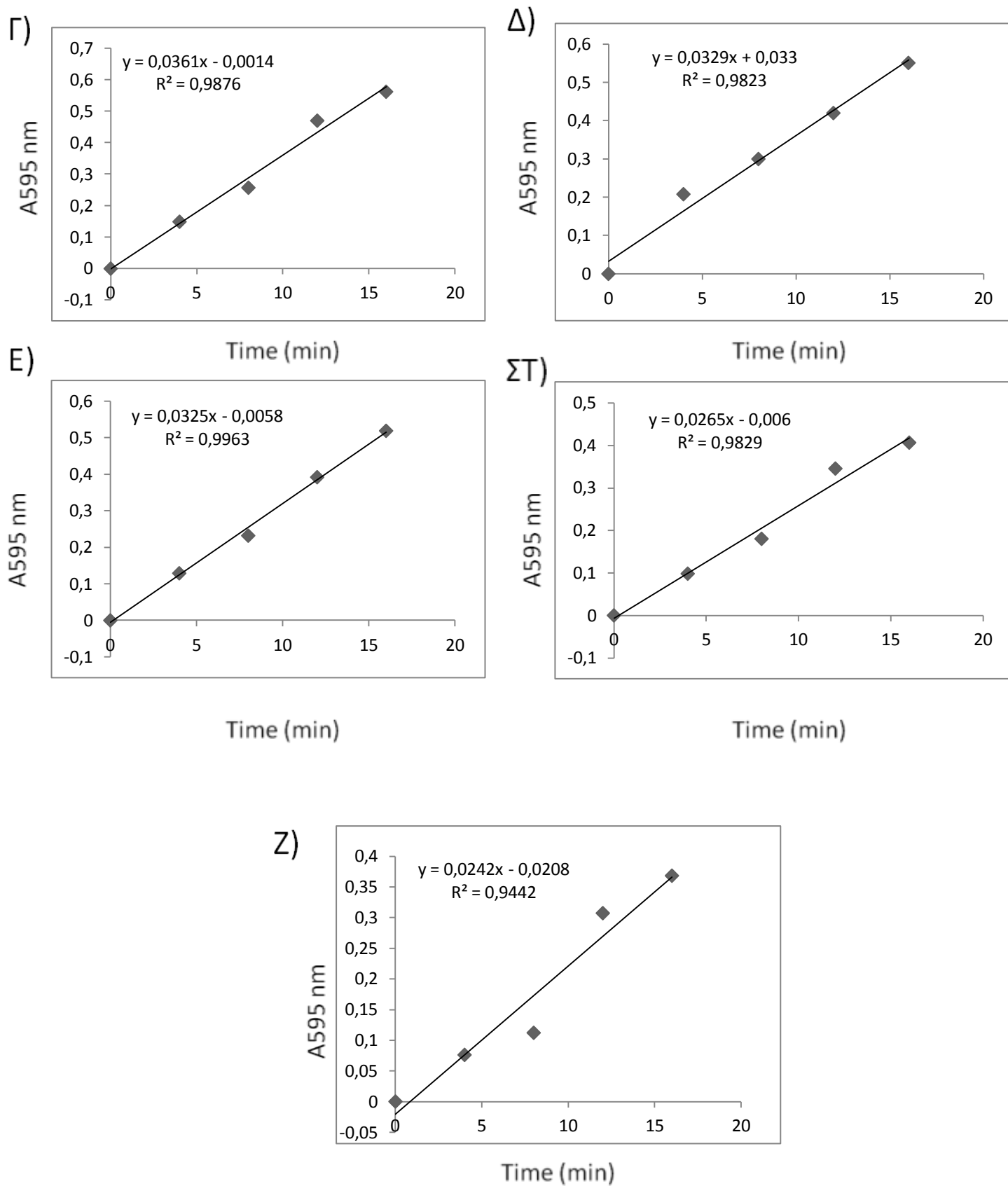
Η δημιουργία της καμπύλης αυτής έγινε μετά τη διεξαγωγή 2 πειραμάτων καθώς αρχικά δοκιμάσαμε μεγάλες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος (25µg/ml,50µg/ml,100µg/ml,200µg/ml,300µg/ml), οι οποίες προκάλεσαν μεγάλη αναστολή, που έφτανε το 80% . Η υψηλή αναστολή που παρατηρήθηκε, ακόμα και στην χαμηλή συγκέντρωση των 25µg/ml μας ώθησε να μελετήσουμε την ανασταλτική δράση του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος Ασύρτικου Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008 σε εύρος συγκεντρώσεων που κυμαίνεται σε πολύ χαμηλότερες τιμές. Όπως μπορούμε να διακρίνουμε το εκχύλισμα αυτό δρα ως αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 25 µg/ml ενώ σε μικρότερες δεν φαίνεται να προκαλεί αναστολή.

Έτσι στη συνέχεια προχωρήσαμε σε επόμενο πείραμα στη δοκιμή του αναστολέα σε μικρές συγκεντρώσεις (2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml) καλύπτοντας έτσι ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων από 2 µg/ml σε 300 µg/ml για τον προσδιορισμό της IC₅₀ του εκχυλίσματος Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008 η οποί τελικά βρέθηκε να είναι IC₅₀ = 18,977 µg/ml .

Τα αποτελέσματα του πειράματος ελέγχου του εκχυλίσματος Ασύρτικο Σαντορίνης Στέμφυλα από την άλλη έδειξαν πως το εκχύλισμα προκαλεί αναστολή του ενζύμου αλλά μόνο στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις οποίες δοκιμάστηκε (100 µg/ml, 200 µg/ml).

Αξίζει να σημειωθεί ότι έγινε έλεγχος, ώστε η εξαγωγή του παραπάνω αποτελέσματος να προκύψει από τιμές ενζυμικής δραστηριότητας εντός γραμμικότητας (V₀). Παρακάτω δίνονται τα σχετικά διαγράμματα που απεικονίζουν τη συσχέτιση του δείγματος ελέγχου (control) με τα υπόλοιπα σε ό, τι αφορά την κλίση κάθε ευθείας (σε όλα τα διαγράμματα παρατηρείται γραμμικότητα-γραμμική συσχέτιση μεταξύ των σημείων)(εικόνα 46):

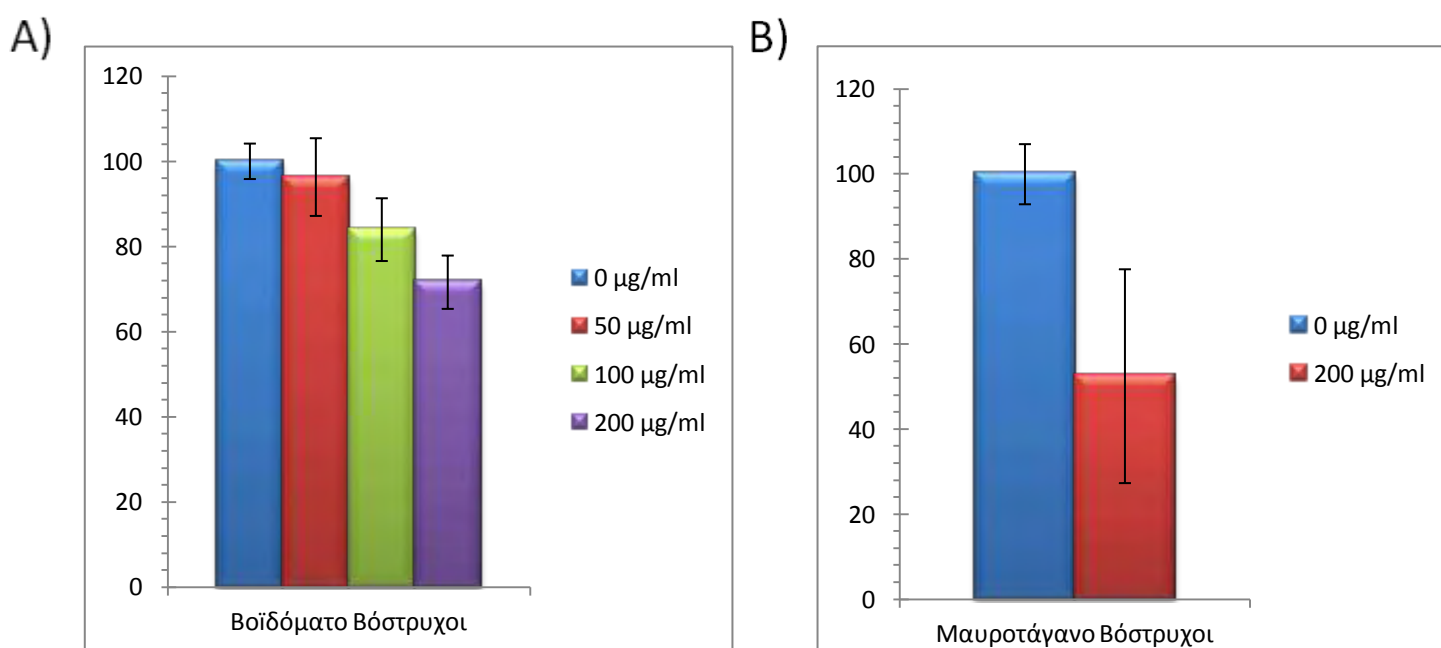




Εικόνα 46: Α) Δείγμα αναφοράς, Β) 5 $\mu\text{g/ml}$, Γ) 10 $\mu\text{g/ml}$, Δ) 25 $\mu\text{g/ml}$, Ε) 50 $\mu\text{g/ml}$, ΣΤ) 100 $\mu\text{g/ml}$, Ζ) 200 $\mu\text{g/ml}$. Στα παραπάνω 7 διαγράμματα παρακολουθούμε τη γραμμικότητα κάθε καμπύλης και εξετάζουμε την κλίση της ευθείας (γραμμής τάσης) σε

σχέση με αυτήν του δείγματος ελέγχου. Παρατηρούμε πως η κλίση στις 2 πρώτες συγκεντρώσεις (5μg/ml,10μg/ml) δεν παρουσιάζει σχεδόν καμία διαφορά (0,970109, 0,980978 αντίστοιχα). Στις δύο επόμενες συγκεντρώσεις (25μg/ml,50μg/ml) η κλίση ξεκινά να μειώνεται κάπως από αυτή του control (0,894022, 0,883152 αντίστοιχα). Τέλος, η αναστολή αναδεικνύεται στα 2 τελευταία διαγράμματα (100μg/ml,200μg/ml) καθώς η κλίση της ευθεία διαφοροποιείται σημαντικά απ' ότι στα προηγούμενα (0,720109 , 0,657609 αντίστοιχα).

Τα υπόλοιπα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν (Μαυροτράγανο Βόστρυχοι, Μαυροτράγανο Γίγαρτα, Βοηδόματο Σαντορίνης Βόστρυχοι, Μοσχόμαυρο γίγαρτα) στην πλειοψηφία τους δεν έδειξαν πως αναστέλλουν στατιστικώς σημαντικά τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Παρ' όλα αυτά, τα εκχυλίσματα των βοστρύχων (Μαυροτράγανο Βόστρυχοι, Βοηδόματο Σαντορίνη Βόστρυχοι) έδειξαν μια στατιστικώς σημαντική αναστολή σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 μg/ml που δοκιμάστηκαν. Ακολουθεί διάγραμμα που απεικονίζει τα σχετικά αποτελέσματα.



Εικόνα 47 : Απεικόνιση της αναστολής που προκαλεί Α)το εκχύλισμα Βοηδόματο Σαντορίνης Βόστρυχοι Σαντορίνης σε εύρος συγκεντρώσεων 0-200 μg/ml. Παρατηρούμε πως σε συγκέντρωση 100 μg/ml και 200 μg/ml προκαλεί μια στατιστικώς σημαντική αναστολή της τάξεως του 15% και 25% αντίστοιχα. Β)το εκχύλισμα Μαυροτράγανο βόστρυχοι σε συγκέντρωση (200 μg/ml). Παρατηρούμε πως στην συγκέντρωση αυτή το εκχύλισμα προκαλεί μια στατιστικώς σημαντική αναστολή της τάξεως του 40%. (*t-test* $P < 0.05$).

5.2.2 Επίδραση των σε DMSO διαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων σταφυλιού στη δραστικότητα της ενδογενούς φωσφορυλάσης γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.

Τα εκχυλίσματα που επανεξετάστηκαν και σε DMSO αναφέρονται παρακάτω:

1. Βοηδόματο Σαντορίνης Βόστρυχοι
2. Μοσχόμαυρο γίγαρτα

Αφού και αυτά τα εκχυλίσματα επωάστηκαν σε κύτταρα HepG2 και δοκιμάστηκαν σε κινητικά πειράματα παρατηρήθηκε πως ακόμη και τα υδρόφοβα μόρια που σε αυτήν την περίπτωση διαλύονται και δεν απομακρύνονται μέσω φιλτραρίσματος, δεν φέρουν καμία επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου που μελετήσαμε.

Το εκχύλισμα Βοηδόματο Σαντορίνης Βόστρυχοι δοκιμάστηκε τόσο σε υδατικό διάλυμα όσο και σε διάλυμα με DMSO. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν παρατηρήθηκε κάποια αναβολή σε καμία από τις δύο περιπτώσεις.

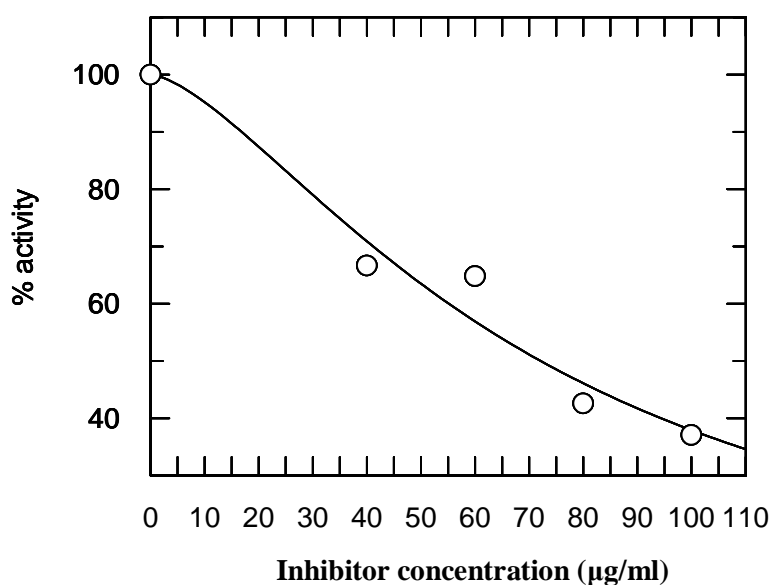
Στα αρχικά μας κινητικά πειράματα σταματούσαμε την ενζυμική αντίδραση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (με 12,5μl SDS 10%) σε χρόνους 0',10',15',20',25'. Επειδή παρατηρήθηκε πως στους τελευταίους χρόνους η δράση του ενζύμου εξασθενεί σχετικά στα δείγματα ελέγχου και τα αποτελέσματα δεν ήταν ξεκάθαρα προχωρήσαμε στην αλλαγή των χρόνων στους οποίους σταματούσε η αντίδραση σε 0',4',8',12',16'. Έτσι το ένζυμο μέχρι και τα 16 λεπτά εμφανιζόταν απόλυτα δραστικό.

5.2.3 Επίδραση των σε DMSO διαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων ροδιού στη δραστικότητα της ενδογενούς φωσφορυλάσης γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε επίσης η ανασταλτική επίδραση εκχυλισμάτων από προϊόντα και παραπροϊόντα των σταδίων παραγωγής χυμού από καρπούς του φυτού ροδιά (*Punica Granatum*). Εξετάστηκαν τα εκχυλίσματα:

1. No 07
2. No 11

Τα εκχυλίσματα αυτά εξετάστηκαν αφού πρώτα διαλύθηκαν σε συγκεντρώσεις DMSO μη κυτταροτοξικές για τα κύτταρα ώστε να αποτελούν ομοιογενή διαλύματα. Τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων για το εκχύλισμα 11 έδειξαν να αναστέλλει την φωσφορυλάση του γλυκογόνου σε συγκεντρώσεις 40μg/ml, 60 μg/ml, 80μg/ml, 100μg/ml. Η τιμή της IC_{50} του εκχυλίσματος βρέθηκε ότι είναι $IC_{50} = 72,102 \mu\text{g/ml}$. Παρακάτω παρουσιάζεται το σχετικό διάγραμμα που το αποδεικνύει.



Εικόνα 48: Καμπύλη της % αναστολής της δραστικότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος 11. Η τιμή της IC_{50} του εκχυλίσματος ισούται με: 72,102 μg/ml (Std error 5,770).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή υπογλυκαιμική δράση τόσο των υποπροϊόντων αμπελοκομίας όσο και των εκχυλισμάτων από προϊόντα και παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού σε ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2. Η μελέτη μας έγινε σε εκχυλίσματα τα οποία προηγουμένως εξετάστηκαν σε *in vitro* πειράματα και έδειξαν πως αναστέλλουν σημαντικά την σκελετική GPb.

Αρχικά μελετήσαμε την επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων παραπροϊόντων αμπελοκομίας από ελληνικές ποικιλίες σταφυλιού στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό - βιωσιμότητα και διατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία των υπό μελέτη ουσιών αν και δεν επηρεάζεται η βιωσιμότητα και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, επέρχεται αλλοίωση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών, τύπου συρρίκνωσης των κυττάρων, κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις του εκάστοτε εκχυλίσματος. Η επίδραση αυτή των ουσιών στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία μεγάλου ποσοστού μη υδατοδιαλυτών συστατικών στα εκχυλίσματα, τα οποία τα καθιστούν πιθανώς μη ομοιογενή ως προς τη σύσταση τους και κατά συνέπεια μη κατάλληλα για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε στη διαδικασία φιλτραρίσματος αυτών των διαλυμάτων σε στείρες συνθήκες με στόχο το διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών συστατικών από τα μη υδατοδιαλυτά, τα οποία όπως αποδεικνύεται από τη χημική ανάλυση των ουσιών αυτών, συνιστούν σημαντικό ποσοστό της

σύστασης τους, με ιδιαίτερη διατροφική αξία. Η διαδικασία του φιλτραρίσματος μας επέτρεψε να πετύχουμε το διαχωρισμό των συστατικών των υπό μελέτη εκχυλισμάτων σε δύο κλάσματα, τα υδατοδιαλυτά και μη. Η περαιτέρω μελέτη των υδατοδιαλυτών συστατικών έχει ιδιαίτερη σημασία αφενός λόγω της εύκολης, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις, απορρόφησής τους από τον οργανισμό και αφετέρου λόγω της υψηλής διατροφικής τους αξίας. Επιπλέον από πειραματικής άποψης, η χρήση υδατικών διαλυμάτων, ως μέσο επαναιώρησης των ουσιών, εξαλείφει περιοριστικούς παράγοντες, όπως η χρήση οργανικών διαλυτών με υψηλή κυτταροτοξικότητα, η οποία περιορίζει και το εύρος των συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων που μπορούν να μελετηθούν.

Μελέτη κυτταροτοξικότητας – επαγωγής κυτταρικού πολλαπλασιασμού των υδατοδιαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν έδειξε μη κυτταροτοξική δράση των ουσιών αυτών, στους χρόνους επώασης (24 ώρες επώασης) που εξετάστηκαν. Μάλιστα, η συγκεκριμένη μελέτη ανέδειξε ότι η παρουσία ορισμένων υδατοδιαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων, όπως αυτή του Ασύρτικου Σαντορίνης, μπορεί να επάγει ενεργοποίηση της ανάπτυξης και κυτταρικού πολλαπλασιασμό των κυττάρων, γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία και καθιστά σημαντική την περαιτέρω μελέτη της δράσης αυτής σε μελλοντικό χρόνο.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η πιθανή ανασταλτική δράση των υδατοδιαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων στη δραστικότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση υδατοδιαλυτών συστατικών εκχυλισμάτων σταφυλιού από παραπροϊόντα

οινοποιίας Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008, Ασύρτικο Σαντορίνης Στέμφυλα, Μαυροτράγανο Βόστρυχοι, Μαυροτράγανο Γίγαρτα, Βοηδόματο Σαντορίνης Βόστρυχοι. Από τα εκχυλίσματα αυτά που εξετάστηκαν το Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008 έδειξε να συνδέεται στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου σε εύρος συγκεντρώσεων και να αποτελεί έναν ισχυρό συναγωνιστικό αναστολέα με $IC_{50}=18,977 \mu\text{g/ml}$ (Std error 5,527).

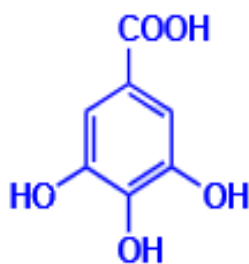
Τα υπόλοιπα από τα παραπάνω εκχυλίσματα δεν έδειξαν να προκαλούν στατιστικώς σημαντική αναστολή της GPb με εξαίρεση τα εκχυλίσματα βοστρύχων από τις ποικιλίες Βοηδόματο Σαντορίνης και Μαυροτράγανο που προκάλεσαν αναστολή του ενζύμου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των $100\mu\text{g/ml}$ που δοκιμάστηκαν με το ποσοστό να φτάνει έως και 40% στην περίπτωση του Μαυροτράγανου.

Με σκοπό να διερευνήσουμε την επίδραση και των υδρόφοβων, μη υδατοδιαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων στη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ηπατικών κυττάρων HepG2 πραγματοποιήσαμε όμοια μελέτη μετά από διαλυτοποίηση των λυοφιλοποιημένων συστατικών των εκχυλισμάτων Βοηδόματο Σαντορίνης Βόστρυχοι και Μοσχόμαυρο γίγαρτα σε οργανικό διαλύτη DMSO. Ο διαλύτης DMSO ως πολικός απρωτικός διαλύτης ενδείκνυται για την διαλυτοποίηση τόσο πολικών όσο και μη πολικών συστατικών.

Αφού και αυτά τα εκχυλίσματα επώαστηκαν με κύτταρα HepG2 και ελέχθησαν σε κινητικές μελέτες παρατηρήθηκε ότι ακόμη και στη μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση των $50 \mu\text{g/ml}$, λόγω της κυτταροτοξικότητας του διαλύτη, δεν παρατηρήθηκε αναστολή της δραστηριότητας της GPb των ηπατικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό

πιθανόν να οφείλεται είτε στην χαμηλή συγκέντρωση των δραστικών ουσιών, όπως για παράδειγμα της περίπτωσης του εκχυλίσματος Βοηδόματο Σαντορίνης βόστρυχοι, είτε στην παρουσία άλλων μη πολικών συστατικών, τα οποία αίρουν την ανασταλτική δράση των υδατοδιαλυτών συστατικών των εκχυλισμάτων. Συνάγεται λοιπόν το συμπέρασμα, πως η διαδικασία φιλτραρίσματος στην περίπτωσή μας όχι μόνο δεν απομάκρυνε μόρια που έχουν καθοριστική επίδραση στην αναστολή της GPb αλλά ίσως επέτρεψε και την εκδήλωση της δράσης τους.

Επίσης, λόγω της μη ύπαρξης στατιστικώς σημαντικής αναστολής στη δράση της GPb των εκχυλισμάτων σταφυλιού, σε χαμηλές συγκεντρώσεις (<20mg/ml) τις οποίες εξετάσαμε, με μοναδική εξαίρεση το εκχύλισμα Ασύρτικο Σαντορίνης Βόστρυχοι 2008, θεωρούμε πως το εκχύλισμα αυτό χρήζει περισσότερο ενδιαφέρον για μελέτη της σύστασης του σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, ώστε να χαρακτηριστούν τα συστατικά που του προσδίδουν αυτήν την ιδιότητα. Πρωταρχικές μελέτες ανάλυσης της σύστασης των εκχυλισμάτων [Apostolou et al 2013, και αδημοσίευτες μελέτες] αποκαλύπτουν την παρουσία υδατοδιαλυτών συστατικών όπως το γαλλικό οξύ (ανήκει στην κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων και είναι ευρέως διαδεδομένο σε φρούτα και λαχανικά) το οποίο παρουσιάζεται σε υψηλή περιεκτικότητα στα εκχυλίσματα που παρουσιάζουν ανασταλτική δράση στην GPb, και πιθανόν σε αυτό να αποδίδεται, τουλάχιστον μερικώς, η παρατηρούμενη ανασταλτική δράση του εκχυλίσματος.



Εικόνα 49: Δομή του γαλλικού οξέως

Τέλος, πολλά υποσχόμενη είναι και η μελέτη εκχυλισμάτων από προϊόντα και παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού καθώς οι δοκιμές εκχυλίσματος παραπροϊόντων παραγωγής χυμού ροδιού με αριθμό 11 (ποικιλία Wonderful) έδειξαν στατιστικώς σημαντική αναστολή στη δράση της GPb ηπατικών κυττάρων. Ειδικότερα, το εκχύλισμα μελετήθηκε σε διαλύτη DMSO και σε συγκεντρώσεις 40μg/ml, 60μg/ml, 80μg/ml, 100μg/ml, έδειξε πως προκαλεί στατιστικώς σημαντική αναστολή της GPb με σταθερά αναστολής $IC_{50}=72,102 \mu\text{g/ml}$ (Std error 5,770) και τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με κρυσταλλογραφικές μελέτες που αναδεικνύουν τη δυνατότητα πρόσδεσης του γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής του μορίου της φωσφορυλάσης, καθώς επίσης και του εστέρα γλυκόζης του πρωτοκατεχικού με δυνατότητα σύνδεσης στο καταλυτικό κέντρο της GPb, Τόσο το γαλλικό οξύ όσο και ο εστέρα γλυκόζης του πρωτοκατεχικού αποτελούν συστατικά του συγκεκριμένου εκχυλίσματος ροδιού.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν τη σημασία των προϊόντων και παραπροϊόντων αμπελοκομίας και χυμοποίησης ροδιού ως πηγές εν δυνάμει αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και κατά συνέπεια περιορισμού των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα μετά από απενεργοποίηση της ηπατικής γλυκογονόλυσης. Συμβάλλοντας έτσι

στην αξιοποίηση φυτικής προέλευσης προϊόντων και παραπροϊόντων στη φαρμακευτική θεραπεία του διαβήτη, ο οποίος αποτελεί μια μεταβολική 'επιδημία' των σύγχρονων καιρών μπορούμε να επιτύχουμε την μείωση των παρενεργειών των φαρμακευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της νόσου.

Επίσης, μελέτες έχουν δείξει πως παραπροϊόντα αμπελοκομίας χρησιμοποιούνται συνήθως για εκτροφή των ζώων και για παρασκευή φυσικών οργανικών λιπασμάτων (κομποστοποίηση) που αποτελούν διαδικασίες περιορισμένου οικονομικού ενδιαφέροντος [Arvanitoyannis et al., 2006]. Ακόμη τόσο τα εκχυλίσματα σταφυλιού από παραπροϊόντα αμπελοκομίας όσο και αυτά της χυμοποίησης ροδιού προκαλούν περιβαλλοντικά προβλήματα με αποτέλεσμα η ενδεχόμενη εκμετάλλευσή τους για την παραγωγή προϊόντων θεραπευτικής αξίας της νόσου να είναι ιδιαίτερος ενδιαφέρουσα καθώς συντελεί στο συνδυασμό της αντιμετώπισης της ασθένειας με φυτικά προϊόντα και της καταπολέμησης της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος από τα απόβλητα των παραπάνω διαδικασιών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agius L. *'Physiological control of liver glycogen metabolism: lessons from novel glycogen phosphorylase inhibitors.'* Mini Rev Med Chem. 10(12):1175-87., October 2010.

Aiston S, Andersen B, Agius L. *'Glucose 6-phosphate regulates hepatic glycogenolysis through inactivation of phosphorylase.'* Diabetes. 2003

Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM, Kouretas D, *'Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts.'* , Food Chem Toxicol. 2013.

Arvanitoyannis, I.S., Ladas, D., Mavromatis, A., *'Potential uses and applications of treated wine waste'*. Int. J. Food Sci. Technol. 41: 475–487, 2006.

Banihani S, Swedan S, Alguraan Z. *'Pomegranate and type 2 diabetes'*. Nutr Res 33(5):341-8, May 2013.

Barford, D., Johnson, L.N. *'The allosteric transition of glycogen phosphorylase.'* Nature 340:609–616, 1989.

Barford, D., Hu, S.H., Johnson, L.N. *'Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP.'*J. Mol. Biol. 218:233–260,1991.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 7;72:248-54, May 1976

Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L. *Βιοχημεία*, ΤΟΜΟΣ Ι (2007)

Browner MF, Fletterick RJ *"Phosphorylase: a biological transducer"*. Trends in Biochemical Science 17(2):66-71 February 1992.

Caldwell W., Gary; Yan, Zhengyin; Lang, Wensheng; A. Masucci, JohnCurrent *'The IC50 Concept Revisited Topics in Medicinal Chemistry'*, 12(11): 1282-1299, June 2012.

Chamandari E., Korakaki E, Margari K.M, Siahaniidou T., *'Glucocorticoids'*, Paediatrici, 72 (3):161-189, May-June 2009.

-Cheng H.C., *'The power issue: determination of K_B or K_i from IC_{50} . A closer look at the Cheng-Prusoff equation, the Schild plot and related power equations'*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 46(2):61-71, 2001.

Cohen, P.' *The subunit structure of rabbit-skeletal-muscle phosphorylase kinase, and the molecular basis of its activation reactions.'* Eur. J. Biochem.34, 1-14, 1973

Cori, C.F., and Cori, G.T. *'Mechanism of formation of hexosemono-phosphate in muscle and isolation of a new phosphate ester.'* Proc. Soc. Exp. Biol. Med.34, 702-705, 1936.

Dahlquist G. , *'MD Environmental Factors and Type 1 Diabetes'*, Diabetes Care 24 (1) 180-181, January 2001.

Exton JH, *Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism.* Diabetes Metab Rev. 3(1):163-83. Review January 1989.

Fischer, E.H., and Krebs, E.G. *'Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts'*. J. Biol. Chem.216, 121-132, 1955.

Gatsios K., *Η Ροδιά: Καλλιέργεια, Χρήσεις, Φαρμακευτικές ιδιότητες* ΑγροΤύπος 2010

Georgatsos I. G. , Gioupsanis T. A., Kiriakidis D. *Ενζυμολογία: Κεφάλαιο 11, 12, Ζήτη* 2001

Georgatsos I. G. , Giannakidou Th., G, *Έλεγχος του Μεταβολισμού στο Μοριακό Επίπεδο, Κεφάλαιο 5-6, Εκδόσεις Γιαχούδη* 2005

Hajdu J., Acharya K.R. , Stuart D.I., McLaughlin P.J., Barford D., Oikonomakos N.G., Klein H., Johnson L.N. EMBO J. *'Catalysis in the crystal: synchrotron radiation studies with glycogen phosphorylase b.'* 6(2): 539-546, February 1987.

Hargreaves M. , *'Muscle glycogen and metabolic regulation'*, Proceedings of the Nutrition Society, Volume 63(2): 217-220, May 2004.

Harris MI. *'Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues.'* Diabetes Care; 16 :642-652, 1993.

Hue L. *'Gluconeogenesis and its regulation.'* Diabetes Metab Rev. 3(1):111-26, Review, January 1987.

Johnson LN. Hajdu J, Acharya KR, Stuart DI, McLaughlin PJ, Oikonomakos NG, Barford D. *'Glycogen phosphorylase b. Herve G, ed., Allo- steric enzymes'*. Boca Raton, FL: CRC Press: 81-127, 1989.

Johnson L.N. *'Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors'*, The FASEB Journal vol. 6 (6): 2274-2282, March 1992.

Kantsadi AL, Hayes JM, Manta S, Skamnaki VT, Kiritsis C, Psarra AM, Koutsogiannis Z, Dimopoulou A, Theofanous S, Nikoleousakos N, Zoumpoulakis P, Kontou M, Papadopoulos G, Zographos SE, Komiotis D, Leonidas DD, *'The σ -Hole Phenomenon of Halogen Atoms Forms the Structural Basis of the Strong Inhibitory Potency of C5 Halogen Substituted Glucopyranosyl Nucleosides towards Glycogen Phosphorylase b.'* ChemMedChem. 7(4): 722-732, April 2012.

Larner J, Roach PJ, Huang LC, Brooker G, Murad F, Hazen R. *'Hormonal control of glycogen metabolism'*. Adv Exp Med Biol. 111:103-23. Review. 1979.

Larner J. *'Insulin and the stimulation of glycogen synthesis. The road from glycogen structure to glycogen synthase to cyclic AMP-dependent protein kinase to insulin mediators.'* Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 63:173-231, 1990.

Levene St., Donnelly R., *Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2* Ιατρικές Εκδόσεις Βήτα 2011.

Marshall William *Κλινική Βιοχημεία*, Κεφάλαιο 11, σελίδα 219-235, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας 2000.

Martin S., Schneider B., Heinemann L., . Lodwig V., Kurth H.-J., Kolb H., Scherbaum W. *'A.Self-monitoring of blood glucose in type 2 diabetes and long-term outcome: an epidemiological cohort study.'* Diabetologia.;49(2):271-278, February 2006

Melidonis A. , Σακχαρώδης διαβήτης 2010: Σύγχρονες προσεγγίσεις σε θέματα αιχμής, Ιατρικές Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος

Monod J. Changeux JP. Jacob F *'Allosteric proteins and cellular control systems'*. J Mol Biol 6306-6329, 1963.

Morrall N., *'Novel targets and therapeutic strategies for type 2 diabetes'* Trends in Endocrinology & Metabolism, Volume 14(4): 169-175, 1 May 2003.

Mosmann T., *'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays'* J. Immunol. Methods 65 55-63, 1983.

Oikonomakos NG, Acharya KR, Melpidou AE, Stuart DI, Johnson LN. *'The binding of glycerol 2-P to glycogen phosphorylase b in the crystal.'* Archives of Biochemistry and Biophysics 270 (1):62-68, April, 1989.

Oikonomakos NG, Johnson LN, Achatya KR, Stuart DI, Barford D, Hajdu J, Varvill KM, Melpidou AE, Papageorgiou AC, Graves DJ, Palm D. *' Pyridoxal phosphate site in glycogen phosphorylase'* Biochemistry, 26 (25):8381-8389, 1987.

Oikonomakos NG, Kontou M, Zographos SE, Tsitoura HS, Johnson LN, Watson KA, Mitchell EP, Fleet GW, Son JC, Bichard CJ, et al. . *"The design of potential antidiabetic drugs: experimental investigation of a number of beta-D-glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase"*. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacology 19 (3): 185-92, July 1994.

Oikonomakos N.G. *'Glycogen Phosphorylase as a Molecular Target for Type 2 Diabetes Therapy'* Current Protein and Peptide Science, 3(6):561-86, December 2002.

Palm D, Klein HW, Schinzel R, Buehner M, Helmreich, EJM. *"The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis"*. Biochemistry 29 (5): 1099–1107, February 1990.

Panzram, G., *'Mortality and survival in type2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus.'* Diabetologia, 30 (3):123-31, 1987.

Papazoglou N. , Μητρώο Εργασιών Ελλήνων ερευνητών και συγγραφέων με γνωστικό αντικείμενο του σακχαρώδη διαβήτη. Γ' έκδ. (2009)

Psarra AM, Sekeris CE. Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. Biochim Biophys Acta.;1783(1):1-11, January 2008.

Psarra AM, Sekeris CE. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. IUBMB Life.60(4):210-223, April 2008.

Rath, V.L., Ammirati, M., LeMotte, P.K., Fennell, K.F., Mansour, M.N., Danley, D.E., Hynes, T.R., Schulte, G.K., Wasilko, D.J., and Pandit, J. *'Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core.'* Mol Cell.1:139–148, 2000.

Shuichi Saheki, Akira Takeda, Takashi Shimazu *'Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity'* Analytical Biochemistry 148 (2): 277–281, August 1985

Smokovitis A., Φυσιολογία, Αφοί Κυριακίδη 2004

Tengfei Zhang, Shiwen Wang, Yan Lin, Wei Xu, Dan Ye, Yue Xiong, Shimin Zhao, and Kun-Liang Guan, *'Cell Acetylation Negatively Regulates Glycogen Phosphorylase by Recruiting Protein Phosphatase 1'*, Metabolism 15(1):75-87, January 2012.

Tzouramani E., Lontakis A., Sintori A., Navrouzoglou P., Papaethymiou M., Karanikolas P., Alexopoulos G. *Δενδροκομία-Ροδιά* Ι.Γ.Ε.Κ.Ε- ΕΘ.Ι.Α.Γ.Ε 2008.

William D McArdle, Bs, M.Ed, PhD, Frank Katch, Victor L *'Essentials of Exercise Physiology'* -Diabetology Volume 63(2): 217-220, May 2004.

Yuhao Li; Suping Wen; Kota Bp; Peng Gang; Li George; Yamahara Johji; Roufogalis Basil 'Punica granatum flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats', Journal of Ethnopharmacology 99(2) : 239-244 June 2005.

Zifa A., Kouretas D., Balatsos N. , Στοιχεία Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Κεφάλαιο 4, σελίδα 116-118, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Θεσσαλίας 2007

Επίσης, προστέθηκαν πληροφορίες από τις παρακάτω διπλωματικές εργασίες:

- Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα, Καντσάδη Αναστασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα Βιοχημείας& Βιοτεχνολογίας (2011).
- Ρόλος του μιτοχondριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2, Κλήμου Ζωή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα Βιοχημείας& Βιοτεχνολογίας (2012).
- Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με στόχο τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών ενώσεων, Αδάμου Ευαγγελία- Ηλιάννα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα Βιοχημείας& Βιοτεχνολογίας (2012).
- Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα, Θεοφάνους Σταυρούλα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα Βιοχημείας& Βιοτεχνολογίας (2012).
- Αξιολόγηση της υπογλυκαιμικής δράσης φυσικών προϊόντων, Λίγγρη Παναγιώτα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα Βιοχημείας& Βιοτεχνολογίας (2013).
- Προσομοίωση μεταβολισμού γλυκόζης-ινσουλίνης σε παιδιά με Διαβήτη τύπου 1 με χρήση αιτιατών πιθανοτικών δικτύων, Αριστείδη Σώτηρα, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών
- Ο ρόλος της άσκησης και της διατροφής στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, Κεχαγιά Ιωάννα, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας (2007)
- Μελέτη της επίδρασης της θερμικής επεξεργασίας και της επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση στην αντιοξειδωτική δράση

- χυμού από ρόδι, Κοντόζογλου Χρυσάνθη, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, τμήμα Χημικών Μηχανικών (2011)
- Αλλαγές σε δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες ύστερα από καθυστερημένο μυϊκό πόνο, Χασάπη Ιωάννα, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας (2010)
 - Μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από προϊόντα και παραπροϊόντα των σταδίων παραγωγής χυμού από καρπούς του φυτού ροδιά (*Punica Granatum*), στην κυτταρική αύξηση και την απόπτωση καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF7, Μοσχοβίδη Γεωργία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας (2013).
 - Διερεύνηση των βοστρύχων της αμπέλου *Vitis vinifera* ως πλούσιας πηγή βιοδραστικών πολυφαινολών και μελέτη της βιολογικής δράσης των εκχυλισμάτων τους, Αποστόλου Άννα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (2011).