



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
« Βιοτεχνολογία-Ποιότητα Διατροφής & Περιβάλλοντος »

Βιοχημική αξιολόγηση της υπογλυκαιμικής δράσης εκχυλισμάτων
υποπροϊόντων επεξεργασίας ροδιών



ΚΙΣΣΑ ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ-ΒΑΪΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

*Βιοχημική αξιολόγηση της υπογλυκαιμικής δράσης εκχυλισμάτων
υποπροϊόντων επεξεργασίας ροδιών*

*Biochemical evaluation of the hypoglycemic action of extracts from
pomegranate by-products processing*

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος (επιβλέπων)

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δρ. Στάγκος Δημήτριος

Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*Η επιστήμη συγκεντρώνει γνώση πολύ πιο
γρήγορα από ό, τι η κοινωνία αποκτά σοφία.*

Isaac Asimov, 1920-1992

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Ιανουαρίου–Σεπτεμβρίου 2013, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αν. Καθηγητή Δημήτριο Δ. Λεωνίδα για την ανάθεση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, μέσω της οποίας κατάφερα να διευρύνω τις γνώσεις μου σε πολλαπλά επίπεδα.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω: την υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Καντσάδη και τον συμφοιτητή μου και πλέον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Στραβοδότη, για την καθοδήγηση τους στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω σε όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος, για τις γνώσεις που κατάφεραν να μεταδώσουν στους συμφοιτητές μου και σε μένα, καθ' όλη τη διάρκεια των μαθημάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	9
Abstract.....	10

ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... 11

1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	11
1.1. Γενικά.....	11
1.2. Τύποι σακχαρώδους διαβήτη.....	13
1.2.1. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι.....	13
1.2.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου ΙΙ.....	14
1.2.3. Διαβήτης κύησης.....	15
1.2.4. Άλλοι τύποι διαβήτη.....	16
1.3. Διαγνωστικά κριτήρια για το σακχαρώδη διαβήτη.....	17
1.4. Αντιμετώπιση του διαβήτη.....	17
1.5. Ομοιοστασία της γλυκόζης.....	19
1.6. Ινσουλίνη.....	20
1.6.1. Γενικά.....	20
1.6.2. Ο ρόλος της ινσουλίνης στον ενεργειακό μεταβολισμό.....	22
1.6.2.i. Δράση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό.....	23
1.6.2.ii. Δέσμευση της γλυκόζης και σηματοδότηση.....	24
1.6.2.iii. Μεταφορείς της γλυκόζης.....	26
1.7. Γλυκαγόνη.....	28
1.7.1. Γενικά.....	28
1.7.2 Δράση της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό.....	29
2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ	31
2.1. Γλυκόζη.....	31
2.1.1. Γενικά.....	31
2.1.2. Εμπλοκή της γλυκόζης στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου.....	32
2.2. Γλυκογόνο.....	33
2.2.1. Γενικά.....	33

2.2.2. Σύνθεση του γλυκογόνου.....	35
2.2.3. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	38
2.2.4. Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης.....	40
2.2.5. Ο ρόλος του ενζύμου αποδιακλάδωσης.....	42
2.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	43
2.3.1. Γενικά.....	43
2.3.2. Δομή.....	44
2.3.2. Αλλοστερική και ορμονική ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	46
2.3.3. Κέντρα σύνδεσης της GP.....	49
2.4. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	52
3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ.....	53
3.1. Αρχές ενζυμικής κινητικής.....	53
3.2. Αναστολείς ενζυμικών αντιδράσεων.....	55
3.2.1. Συναγωνιστική αναστολή.....	56
4. ΡΟΔΙΑ.....	58
4.1. Γενικά.....	58
4.2. Παραπροϊόντα χυμοποίησης ροδιού.....	59
4.3. Ποικιλία ροδιών Wonderful.....	60
4.3. Φαρμακευτική δράση του ροδιού.....	63
<u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</u>	68
6.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης <i>b</i> του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	68
6.2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης <i>b</i> του γλυκογόνου. Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου.....	72
6.2.1. Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) της φωσφορυλάσης <i>b</i> του γλυκογόνου.....	74
6.3. Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέα.....	76
6.4. Παρασκευή τυφλών.....	78
6.5. Προσδιορισμός φωσφόρου.....	78
6.5.1. Μέθοδος Ασκορβικού οξέος.....	78

6.5.2. Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit.....	79
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	82
7.1. Σκοπός της εργασίας.....	82
7.2. Αποτελέσματα απομόνωσης της <i>GPb</i>	82
7.3. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....	83
7.3.1 Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	83
7.3.2. Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων ροδιών-Wonderful.....	85
<u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	88
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	89

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μεταβολικές διαταραχές που απασχολούν την ανθρωπότητα και χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Κύριος στόχος της θεραπείας κατά του διαβήτη αποτελεί η σταθεροποίηση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Για το σκοπό αυτό, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την εύρεση φυσικών μορίων που εκλεκτικά θα τα ενεργοποιούν ή θα τα απενεργοποιούν. Μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο της ηπατικής *φωσφορυλάσης του γλυκογόνου* αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, η *μυϊκή φωσφορυλάση b του γλυκογόνου* (GPb) χρησιμοποιήθηκε για την κινητική μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων υποπροϊόντων επεξεργασίας ροδιών (ποικιλίας Wonderful), στην ενζυμική δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, η κινητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου έδειξε ότι τα εκχυλίσματα που προέρχονται από: α) επισπέρματα-φλούδες με $IC_{50} = 13.85 \pm 0.38 \mu\text{g/mL}$ και β) φλούδες με $IC_{50} = 12.78 \pm 0.54 \mu\text{g/mL}$ παρουσιάζουν μεγαλύτερη αναστολή του ενζύμου σε σχέση με το εκχύλισμα που δεν έχει υποστεί επεξεργασία και που έχει $IC_{50} = 25.38 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$.

Abstract

Diabetes mellitus is one of the most common metabolic diseases that occupy the mankind and is characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia) and glucose metabolism imbalance. The main goal against diabetes treatment is to stabilize the levels of plasma glucose in normal levels. For that reason, enzymes and substrates involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets in order to discover natural molecules, which activate or inactivate them. Studies showed evidence that hepatic *glycogen phosphorylase* is considered to be one of the most promising therapeutic targets for the design of new hypoglycaemic drugs.

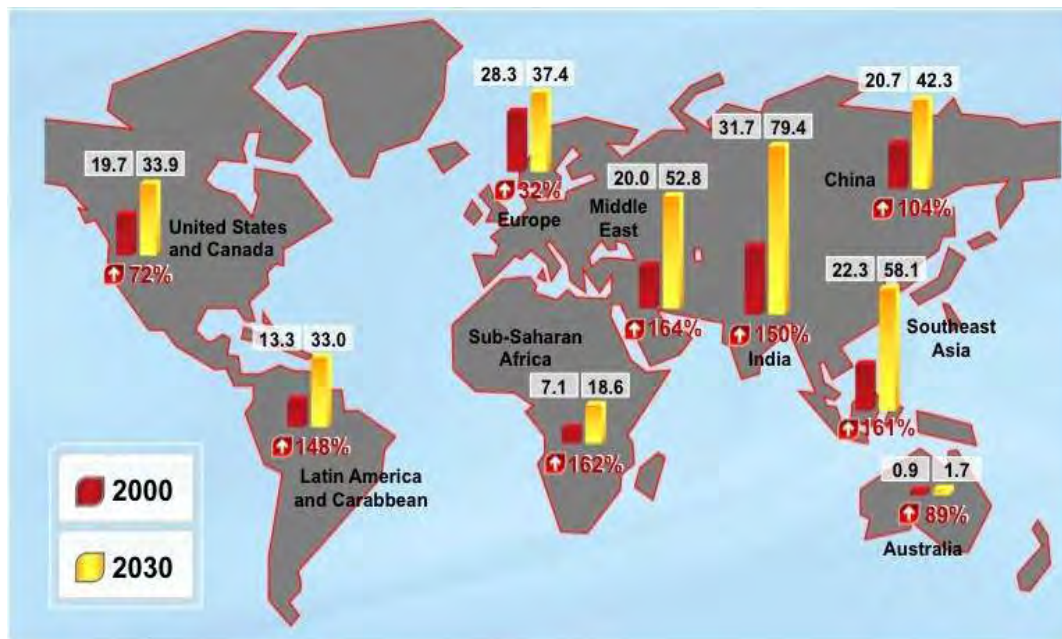
In the present study, *glycogen phosphorylase b* from rabbit muscle (GPb), was used for kinetic experiments in order to find out the effect that have the extracts from pomegranate by-products processing (Wonderful variety), on enzymatic activity. More specifically, the kinetic experiment, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that the extracts that have been derived from: a) seeds-peel with **IC₅₀ = 13.85 ± 0.38 µg/mL** and b) peel with **IC₅₀ = 12.78 ± 0.54 µg/mL** display stronger inhibition of the enzyme compared to the extract that has not been processed and which has **IC₅₀ = 25.38 ± 0.23 µg/mL**.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

1.1. Γενικά

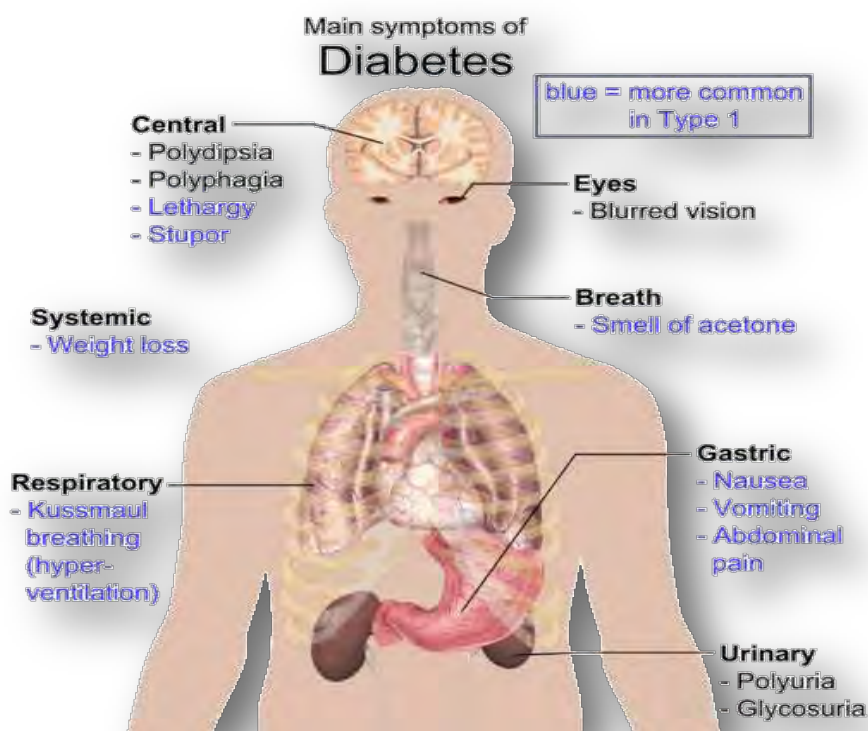
Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μεταβολικές διαταραχές που απασχολούν την ανθρωπότητα. Σήμερα, υπολογίζεται ότι περίπου 347 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από την ασθένεια αυτή [WHO, 2013]. Οι θάνατοι που οφείλονται σε διαβήτη, αντιπροσωπεύουν πάνω από το 8% των θανάτων σε χώρες όπως οι ΗΠΑ και ο Καναδάς και το 2-3% των θανάτων στις αναπτυσσόμενες χώρες [Roglic *et al.*, 2005]. Στο **Σχήμα 1**, παρατηρούμε τις μεγάλες διαστάσεις που είχε λάβει η ασθένεια του διαβήτη σε πολλά μέρη του κόσμου το 2000, ενώ αναμένεται αύξηση των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη το 2030 [Wild *et al.*, 2004].



Σχήμα 1 : Ποσοστά των ασθενών που έπασχαν από διαβήτη, σε παγκόσμιο επίπεδο για το 2000, καθώς και εκτίμηση για το 2030. Για παράδειγμα, ο αριθμός των διαβητικών ατόμων στην Ινδία, αναμένεται να τριπλασιαστεί μέχρι το 2030 [Wild *et al.*, 2004].

Ο οργανισμός των ατόμων που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, δεν είναι ικανός να εκκρίνει ινσουλίνη ή η ινσουλίνη είναι αδρανοποιημένη (αντίσταση στην ινσουλίνη). Έτσι, αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία), χωρίς όμως να μπορεί να αξιοποιηθεί από τους ιστούς.

Η χρόνια υπεργλυκαιμία, που παρατηρείται στην ασθένεια του διαβήτη, συνδέεται με μακροπρόθεσμες βλάβες και δυσλειτουργίες σε διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, και ειδικότερα στα μάτια, τα νεφρά, τα νεύρα, την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία. Η υψηλή συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα των διαβητικών (υπεργλυκαιμία), προκαλεί συμπτώματα όπως : η γλυκοζουρία, η πολυουρία, η πολυδιψία, η πολυφαγία, η απώλεια σωματικού βάρους, ναυτίες, η θολή όραση, αναπνοή με οσμή ακετόνης κ.α (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1 : Τα συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη.

[<http://www.medicalnewstoday.com/info/diabetes/diabetessymptoms.php>]

Οι μακροχρόνιες επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη περιλαμβάνουν :

A) τη διαβητική μικροαγγειοπάθεια :

- την αμφιβληστροειδοπάθεια, με πιθανή απώλεια της όρασης

- νεφροπάθεια, που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια
- περιφερική νευροπάθεια, ο κίνδυνος ανάπτυξης έλκους στα πόδια είναι ιδιαίτερα αυξημένος, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει τον ασθενή ακόμα και σε ακρωτηριασμό
- νευροπάθεια, που προκαλεί γαστροεντερικά, ουρογεννητικά και καρδιαγγειακά συμπτώματα καθώς και σεξουαλικά προβλήματα

B) τη διαβητική μακροαγγειοπάθεια :

- αρτηριοσκλήρυνση, νωρίτερα και σοβαρότερης μορφής από ότι σε μη διαβητικούς
- αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια
- στεφανιαία νόσο, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε στηθάγχη ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

1.2. Τύποι σακχαρώδους διαβήτη

1.2.1. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης, *Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, IDDM*)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I ή αλλιώς ο « νεανικός διαβήτης » (όρος που αποδόθηκε, επειδή προσβάλλει νεαρά άτομα ηλικίας κάτω των 30 ετών και κυρίως μεταξύ των 5 έως 15 ετών), χαρακτηρίζεται από την αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος. Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης, με αποτέλεσμα την ολική έλλειψη ή την ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης.

Τα «αυτοαντισώματα έναντι των νησιδιακών κυττάρων», λειτουργούν ως δείκτες της αυτοάνοσης διαδικασίας του διαβήτη τύπου I. Με τον παραπάνω όρο, ουσιαστικά αναφερόμαστε σε ένα σύνολο πολλών διαφορετικών αντισωμάτων τα οποία κατευθύνονται έναντι διαφορετικών μορίων των παγκρεατικών κυττάρων. Ο έλεγχος αυτοαντισωμάτων των νησιδιακών κυττάρων είναι πολύ χρήσιμος για την κατάταξη του διαβήτη ως τύπου I, όπως επίσης και για την αναγνώριση μη διαβητικών ατόμων τα οποία έχουν μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου.

Σε αυτή τη μορφή του διαβήτη, ο ρυθμός της καταστροφής των β-κυττάρων ποικίλλει από περίπτωση σε περίπτωση. Πιο συγκεκριμένα, σε ορισμένα άτομα όπως τα βρέφη και τα παιδιά είναι ταχεία, ενώ είναι αργή σε άλλες κατηγορίες (κυρίως

στους ενήλικες). Μερικοί ασθενείς, όπως τα παιδιά και οι έφηβοι μπορεί να παρουσιάσουν κετοξέωση, ως πρώτη εκδήλωση της ασθένειας. Άλλοι, σε καταστάσεις νηστείας έχουν μέτρια υπεργλυκαιμία, η οποία μπορεί να αλλάξει γρήγορα σε σοβαρή υπεργλυκαιμία και / ή κετοοξέωση, παρουσία λοίμωξης ή στρες.

Η αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος είναι ουσιαστικά το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης γενετικών, περιβαλλοντολογικών και ανοσολογικών παραγόντων. Αν και οι ασθενείς που πάσχουν από αυτή τη μορφή του διαβήτη, είναι σπάνια παχύσαρκοι, αξίζει να σημειωθεί ότι η παχυσαρκία δεν είναι ασύμβατη με τη διάγνωση. Επίσης, αυτοί οι ασθενείς είναι επιρρεπείς και σε άλλες αυτοάνοσες διαταραχές, όπως Νόσος του Graves, η θυρεοειδίτιδα του Hashimoto, η νόσος του Addison, η λεύκη, η αυτοάνοση ηπατίτιδα, η βαρεία μυασθένεια και η κακοήθης αναιμία.

Ιδιοπαθής σακχαρώδης διαβήτης. Ορισμένες μορφές του διαβήτη τύπου I, δεν έχουν γνωστές αιτίες. Μερικοί από τους ασθενείς έχουν μόνιμη ινσουλινοπενία και είναι επιρρεπείς στην κετοξέωση, αλλά δεν ανιχνεύονται σε αυτούς αυτοαντισώματα. Ο αριθμός των ασθενών που ανήκει σε αυτήν την κατηγορία είναι ιδιαίτερα μικρός. Τα άτομα με αυτή τη μορφή διαβήτη, υποφέρουν από επεισοδιακή κετοξέωση (episodic ketoacidosis), ενώ η ανεπάρκεια ινσουλίνης ποικίλλει μεταξύ των επεισοδίων. Αυτός ο τύπος διαβήτη, είναι έντονα κληρονομήσιμος και δεν υπάρχουν ανοσολογικές αποδείξεις για την αυτοανοσία των β-κυττάρων.

1.2.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II (μη ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης, Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, είναι η πιο συχνή μορφή του διαβήτη και συναντάται σε ποσοστό 90-95% των ασθενών, οι οποίοι είναι κατά κύριο λόγο άνω των 40 ετών. Βέβαια δεν αποκλείεται η εμφάνιση αυτής της μορφής διαβήτη σε άτομα νεαρότερης ηλικίας. Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου I, στον οποίο η ινσουλίνη απουσιάζει, ο διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινσουλίνης.

Στο διαβήτη τύπου II, η ινσουλίνη η οποία παράγεται από το πάγκρεας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να μην

χρησιμοποιείται η γλυκόζη σαν κύρια πηγή ενέργειας. Η αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα των ιστών να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη και τα επαγόμενα αποτελέσματα της δράσης της. Η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται –σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου I - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου II ονομάζεται και "**μη ινσουλινοεξαρτώμενος**".

Στα πρώτα στάδια της νόσου, η ελαττωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη είναι η κύρια διαταραχή, ενώ τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα είναι αυξημένα. Τα αίτια αυτής της μορφής είναι άγνωστα. Ο κίνδυνος ανάπτυξης αυτής της μορφής διαβήτη αυξάνεται με την ηλικία, την παχυσαρκία, την έλλειψη σωματικής δραστηριότητας και εμφανίζεται πιο συχνά σε άτομα με υπέρταση ή δυσλιπιδαιμία. Επιπλέον, συνδέεται συχνά με μια γενετική προδιάθεση, περισσότερο από ότι είναι η αυτοάνοση μορφή του διαβήτη, τύπου I. Το σπουδαιότερο παράγοντα όμως τον αποτελεί η παχυσαρκία. Οι περισσότεροι ασθενείς που πάσχουν από αυτή τη μορφή διαβήτη είναι παχύσαρκοι, έτσι η ίδια η παχυσαρκία προκαλεί σε κάποιο βαθμό την αντίσταση στην ινσουλίνη. Η παχυσαρκία προδιαθέτει την ανάπτυξη της ινσουλινοαντοχής, πιθανώς λόγω της παραγωγής από το λιπώδη ιστό ουσιών που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Ωστόσο, ασθενείς που δεν είναι παχύσαρκοι, αλλά έχουν αυξημένο ποσοστό σωματικού λίπους, κυρίως στην κοιλιακή περιοχή μπορεί να παρουσιάσουν κετοξέωση. Συνήθως, η κετοξέωση εμφανίζεται σε σύνδεση με στρεσογόνες καταστάσεις, όπως για παράδειγμα η λοίμωξη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, αυτή η μορφή του διαβήτη μπορεί να παραμένει αδιάγνωστη για πολλά χρόνια, ενώ η υπεργλυκαιμία αναπτύσσεται σταδιακά και χωρίς να εμφανίζονται στον ασθενή τα κλασικά συμπτώματα του διαβήτη ή είναι πιο ήπια σε σχέση με το διαβήτη τύπου I. Παρόλα αυτά, οι ασθενείς αυτοί διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν μακροαγγειακές και μικροαγγειακές επιπλοκές.

1.2.3. Διαβήτης κύησης (*Gestational Diabetes Mellitus, GDM*)

Αυτή η μορφή του σακχαρώδους διαβήτη, εμφανίζεται για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και συναντάται περίπου στο 3-5% των κυήσεων. Ο τύπος αυτός μοιάζει με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, ως προς το ότι χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης και ελαττωμένη ευαισθησία των

κυττάρων στην ινσουλίνη. Οι παχύσαρκες γυναίκες διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του GDM, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από επιπλοκές μεταξύ των οποίων είναι: η εμφάνιση υπερτασικής νόσου στην μητέρα, το υδράμνιο, ο ενδομήτριος θάνατος του εμβρύου, η εμφάνιση συγγενών ανωμαλιών και η μακροσωμία του εμβρύου. Μετά τον τοκετό το έμβρυο διατρέχει υψηλό κίνδυνο εμφάνισης: υπογλυκαιμίας, υπασβεστιαμίας ή εμφάνισης του συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας.

Επιπλέον, ο GDM αυξάνει τον κίνδυνο για μία σειρά επιπλοκών ή βεβαρημένων καταστάσεων τόσο στο τεκνό όσο και στην μητέρα στο απώτερο μέλλον. Υπάρχει πιθανότητα διαταραγμένης ανοχής γλυκόζης στο τέκνο, το οποίο μπορεί να είναι παχύσαρκο, ενώ η πιθανότητα εμφάνισης διαβήτη τύπου II στην μητέρα υπολογίζεται στο 40% περίπου στα επόμενα 10 χρόνια.

1.2.4. Άλλοι τύποι διαβήτη

Διαβήτης που οφείλεται σε :

- δυσλειτουργία των β-κυττάρων, που οφείλονται σε γενετικές διαταραχές (Τύπου MODY, Maturity Onset Diabetes in the Young)
- δυσλειτουργία της δράσης της ινσουλίνης, εξαιτίας γενετικών διαταραχών (αντίσταση στην ινσουλίνη τύπου A, σύνδρομο Rabson-Mendenhall κ.α)
- παθήσεις του παγκρέατος (παγκρεατίτιδα, τραύμα παγκρέατος, νεόπλασμα, αιμοχρωμάτωση κ.α)
- ενδοκρινοπάθειες (φαιοχρωματοκύττωμα, σύνδρομο Cushing, υπερθυροειδισμός κ.α)
- φάρμακα (διουρητικά, γλυκοκορτικοειδή, ορμόνες του θυρεοειδούς, β-αδρενεργικοί αγωνιστές, γ-ιντεφερόνη κ.α.)
- λοιμώξεις (μεγαλοκυτταροϊός, συγγενή ερυθρά κ.α.)
- διαβήτης που συνδυάζεται με γενετικά σύνδρομα (όπως είναι το σύνδρομο Down, Klinefelter, Turner, Wolfram κ.α.) [American Diabetes Association, 2012].

1.3. Διαγνωστικά κριτήρια για το σακχαρώδη διαβήτη

Η διάγνωση του διαβήτη είναι εύκολη όταν υπάρχουν τα κλασικά συμπτώματα και αρκεί η επιβεβαίωση με τη μέτρηση της γλυκόζης του αίματος. Τα διαγνωστικά κριτήρια που έχουν θεσπιστεί για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη είναι τα ακόλουθα :

- Μέτρηση της τιμής της γλυκόζης πλάσματος $> 200\text{mg/dl}$ (11.1mmol/l) μετά το πέρας των 2 ωρών από την λήψη δια στόματος 75g άνυδρης γλυκόζης διαλυμένης στο νερό
- Σε ασθενή με κλασικά συμπτώματα υπεργλυκαιμίας ή υπεργλυκαιμικής κρίσης γίνεται μέτρηση της γλυκόζης πλάσματος, σε οποιαδήποτε στιγμή $> 200\text{mg/dl}$ (11.1mmol/l)
- Μέτρηση της τιμής της γλυκόζης πλάσματος $> 126\text{mg/dl}$, ύστερα από 8 ώρες νηστείας (χωρίς πρόσληψη τροφής)
- Μέτρηση της τιμής της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) $> 6.5\%$. Είναι ένας ιδιαίτερα χρήσιμος δείκτης για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη αλλά και για την παρακολούθηση της ρύθμισης του σακχάρου αίματος, αφού αντικατοπτρίζει τη μέση τιμή σακχάρου αίματος τους τελευταίους 3 μήνες πριν την εξέταση. **Τιμές HbA1c $< 6\%$ είναι ενδεικτικές ενός καλού γλυκαιμικού ελέγχου** [American Diabetes Association, 2012].

1.4. Αντιμετώπιση του διαβήτη

Η αντιμετώπιση του διαβήτη περιλαμβάνει τρεις βασικούς άξονες: την ισορροπημένη διατροφή, τη φυσική άσκηση καθώς και τη φαρμακευτική αγωγή.

- ✓ Σωστή διατροφή : Η διατροφή του διαβητικού ουσιαστικά δεν πρέπει να διαφέρει από τη σωστή διαίτα του μη διαβητικού. Πρέπει να έχει ποικιλία τροφών, να είναι χαμηλή σε ζωικά λίπη, χοληστερόλη, αλάτι και οινόπνευμα και να περιέχει άφθονες φυτικές ίνες. Οι υδατάνθρακες πρέπει να προέρχονται κατά κύριο λόγο από τροφές πλούσιες σε φυτικές ίνες, όπως φρούτα, λαχανικά, όσπρια, ψωμί ολικής άλεσης, δημητριακά κ.λπ. Οι τροφές αυτές απελευθερώνονται αργά στο αίμα και ο διαβητικός ασθενής αισθάνεται χορτάτος για περισσότερο χρόνο. Από τη διατροφή του διαβητικού, θα πρέπει

να αποφεύγονται η ζάχαρη, το μέλι, η γλυκόζη, τα παγωτά, οι καραμέλες, η σοκολάτα, οι γλυκές κομπόστες, το σακχαρούχο γάλα, τα αναψυκτικά και οι χυμοί φρούτων με ζάχαρη, τα γλυκά οينوπνευματώδη ποτά (λικέρ, γλυκά κρασιά) κ.λπ.

- ✓ Φυσική Άσκηση : Με τη σωματική άσκηση ο διαβητικός ασθενής καταναλώνει γλυκόζη, που είναι η κύρια πηγή ενέργειας στον άνθρωπο, ρυθμίζοντας έμμεσα τα επίπεδα της στο αίμα, ενώ από την άλλη πλευρά διευκολύνει την πρόσληψη της από τους σκελετικούς μύες. Επιπλέον, η μυϊκή άσκηση συντελεί στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ο τύπος και η ένταση της μυϊκής άσκησης για κάθε διαβητικό ασθενή καθορίζεται βάσει της ηλικίας, της γενικής κατάστασής του και από την ύπαρξη τυχόν επιπλοκών.

- ✓ Φαρμακευτική αγωγή : Η θεραπεία του διαβήτη (δεν είναι μόνιμη) έγκειται στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα μέσω κατάλληλης διατροφής και χορήγησης ινσουλίνης. Η θεραπεία με ινσουλίνη ενδείκνυται στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου I και στο διαβήτη κύησης. Σήμερα κυκλοφορούν στο εμπόριο πολλά είδη ινσουλίνης. Τα ανάλογα ινσουλίνης προκύπτουν από τροποποιήσεις του μορίου της ανθρώπινης ινσουλίνης και διακρίνονται σε βραχείας (Insulin Lispro, Insulin Aspart) και παρατεταμένης δράσης (Insulin Glargin, Insulin Detemir). Η φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας, χαρακτηρίζεται από μία σταθερή χαμηλή έκκριση ινσουλίνης καθ' όλη τη διάρκεια του 24ωρου για την κάλυψη των βασικών αναγκών του οργανισμού και από μεγαλύτερη έκκριση ινσουλίνης μετά τη λήψη γευμάτων, διατηρώντας έτσι τα επίπεδα σακχάρου σε φυσιολογικά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του 24ωρου. Το σχήμα ινσουλινοθεραπείας λοιπόν που θα εφαρμοστεί σε ένα διαβητικό ασθενή, πρέπει να μιμείται όσο το δυνατό περισσότερο τη φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης, κατά τη διάρκεια της ημέρας, ούτως ώστε να διατηρούνται τα επίπεδα σακχάρου σχεδόν σε φυσιολογικά επίπεδα. Οι διάφορες μορφές ινσουλίνης διακρίνονται ανάλογα με την ταχύτητα με την οποία η ινσουλίνη που χορηγείται απορροφάται στο αίμα μέσω του υποδόριου ιστού (έναρξη δράσης) και από το χρόνο που χρειάζεται η συνολική ποσότητα της χορηγούμενης ινσουλίνης να απορροφηθεί (διάρκεια δράσης). Η έναρξη και η διάρκεια δράσης των

διαφόρων μορφών ινσουλίνης ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ασθενών και είναι απαραίτητο να προσδιορίζεται για τον κάθε ασθενή ξεχωριστά. Εκτός από την ινσουλίνη, υπάρχουν και άλλες φαρμακολογικές θεραπευτικές επιλογές, οι περισσότερες από τις οποίες είναι σε μορφή δισκίων και αφορούν κυρίως ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II. Οι βασικότερες κατηγορίες αντιδιαβητικών δισκίων που κυκλοφορούν σήμερα είναι: α) τα δισκία, τα οποία επάγουν την έκκριση μεγαλύτερης ποσότητας ινσουλίνης από το πάγκρεας (σουλφονουλουρίες και οι μεγλιτινίδες), β) τα φάρμακα που μειώνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη και έτσι έμμεσα διευκολύνουν τη δράση της στους ιστούς (οι διγουανίδες-(μετφορμίνη) και οι γλιταζόνες). Πρόσφατα κυκλοφόρησαν και δυο νέες κατηγορίες φαρμάκων οι γλυπτίνες και τα ινκρετινομιμητικά (εξανετίδη). Τα πρώτα δίνουν σήμα στα β-κύτταρα του παγκρέατος να αυξήσουν την έκκριση της ινσουλίνης ειδικά μετά την λήψη της τροφής, και στα α-κύτταρα του παγκρέατος να μειώσουν την έκκριση της γλυκαγόνης [<http://www.kentriki-kliniki.gr/el/symboyleytiko-ekpaideytiko-ereynitiko-kentro-sakharodi-diaiviti/farmakevtikh-agwgh/insoulini/>].

1.5. Ομοιοστασία της γλυκόζης

Φυσιολογικά η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα κατά τις περιόδους νηστείας και μεταγευματικά διατηρείται σε στενό σχετικά εύρος ορίων μεταξύ 60-120 mg/dL. Η ομοιοστασία της γλυκόζης εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ και της χρησιμοποίησής της, τόσο από ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο λιπώδης και ο μυϊκός ιστός, όσο και από μη ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος και ο νεφρικός ιστός [Σωτήριος Α. Ράπτης, 1998].

Οι κυριότερες ορμόνες που ρυθμίζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης του αίματος, έτσι ώστε η συγκέντρωσή της να είναι περίπου (~ 4,5 mM), είναι η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη αλλά και η επινεφρίνη και η κορτιζόλη. Οι μεταβολικές διεργασίες πραγματοποιούνται σε πολλούς ιστούς του σώματος αλλά κυρίως στο ήπαρ, στους μυς και στο λιπώδη ιστό [Lehninger, 2008].

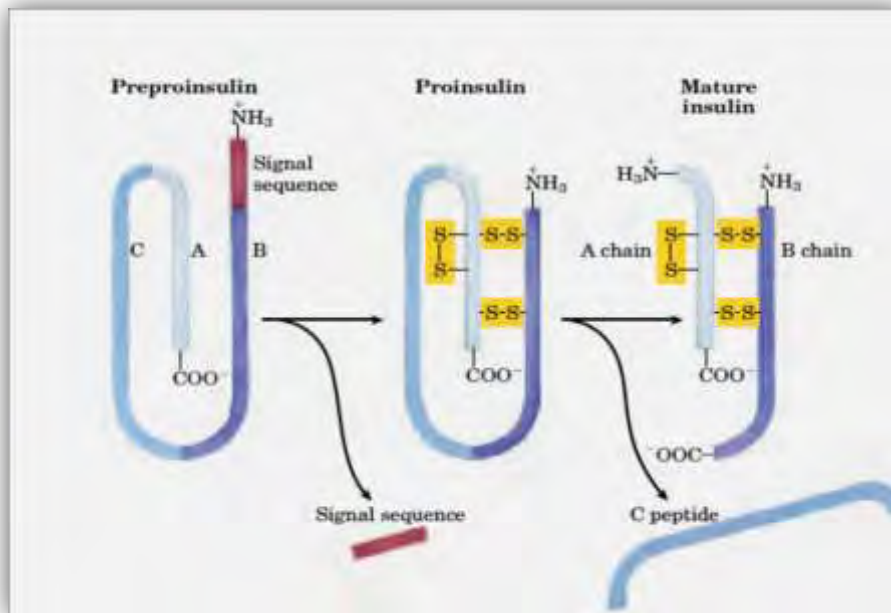
Η ινσουλίνη είναι η βασική ρυθμιστική ορμόνη σε φυσιολογικά εύρη των τιμών της γλυκόζης. Η ομοιοστασία μεταξύ της παραγωγής και της κατανάλωσης της γλυκόζης επιτυγχάνεται μέσω τριών μηχανισμών:

1. Την ικανότητα του παγκρέατος να εκκρίνει ινσουλίνη, τόσο οξέος, όσο και σε συνεχόμενο ρυθμό.
2. Την ικανότητα της ινσουλίνης να αναστέλλει την έξοδο της ηπατικής γλυκόζης και να προωθεί την εναπόθεση της γλυκόζης στο ήπαρ (ευαισθησία ινσουλίνης).
3. Την ικανότητα της γλυκόζης να εισέρχεται στα κύτταρα απουσία ινσουλίνης (ευαισθησία γλυκόζης ή αποτελεσματικότητα γλυκόζης [Σωτήριος Α. Ράπτης, 1998]).

1.6. Ινσουλίνη

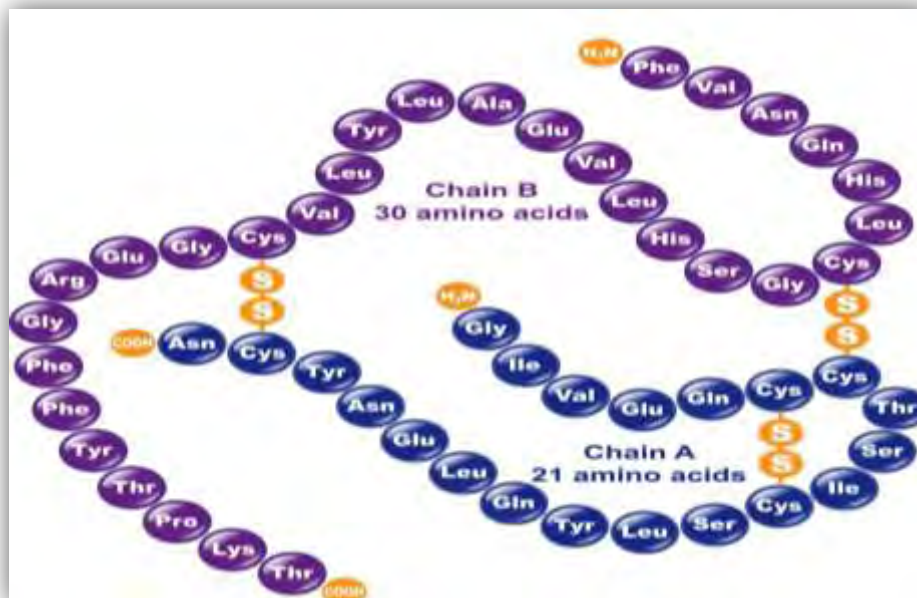
1.6.1. Γενικά

Η ινσουλίνη είναι μία μικρή πρωτεΐνη ($M_r = 5800$) με δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες Α και Β, οι οποίες συνδέονται με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Συντίθεται στα νησίδια Langerhans του παγκρέατος και συγκεκριμένα από τα β-κύτταρα, σαν ένα ανενεργό πρόδρομο πολυπεπίδιο, μιας αλυσίδας, το οποίο ονομάζεται προ-προϊνσουλίνη (**Εικόνα 2**). Η προ-προϊνσουλίνη διαθέτει μια αμινο-τελική ακολουθία, αποτελούμενη από 23 αμινοξέα, που ονομάζεται αλληλουχία σήματος (signal sequence). Η πρωτεολυτική απομάκρυνση της αλληλουχίας σήματος (signal sequence) καθώς και ο σχηματισμός τριών δισουλφιδικών δεσμών έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία της προ-ινσουλίνης, η οποία αποθηκεύεται στα κοκκία των β-παγκρεατικών κυττάρων.



Εικόνα 2 : Η ώριμη ινσουλίνη σχηματίζεται από το μεγαλύτερο πρόδρομο μόριο της προ-προϊνσουλίνης, ύστερα από πρωτεολυτική διάσπαση. Η απομάκρυνση της αλληλουχίας σήματος (signal sequence), από το αμινο-τελικό άκρο της προ-προϊνσουλίνης και ο σχηματισμός τριών δισουλφιδικών δεσμών οδηγούν στην παραγωγή της προ-ινσουλίνης. Περαιτέρω πρωτεολυτική διάσπαση έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του πεπτιδίου C από την προ-ινσουλίνη. Έτσι, σχηματίζεται η ώριμη ινσουλίνη, η οποία αποτελείται από τις αλυσίδες A και B [Lehninger, 2008].

Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης έχει αυξηθεί επαρκώς, στο αίμα, δηλαδή η συγκέντρωσή της είναι τέτοια που μπορεί να επάγει την έκκριση της ινσουλίνης, η προ-ινσουλίνη μετατρέπεται στην ενεργή ινσουλίνη από ειδικές πρωτεάσες. Οι πρωτεάσες αυτές διασπούν τους δυο πεπτιδικούς δεσμούς, προκειμένου να σχηματιστεί το ώριμο πλέον μόριο της ινσουλίνης. Η ώριμη πλέον ινσουλίνη, είναι ένα πολυπεπίδιο περίπου 6 kDa, αποτελούμενη από 51 αμινοξέα, 21 αμινοξέα στην A αλυσίδα και 30 στη B (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3 : Η αμινοξική ακολουθία της ανθρώπινης ινσουλίνης. Οι δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η Α αλυσίδα αποτελείται από 21 αμινοξέα και είναι πανομοιότυπη με την ινσουλίνη του ανθρώπου, του γουρουνιού, του σκυλιού και του λαγού. Η αλυσίδα Β αποτελείται από 30 αμινοξέα και είναι πανομοιότυπη στην αγελάδα, το γουρούνι, το σκύλο, την κατσίκα και το άλογο [<http://www.interactive-biology.com/3730/the-basics-of-protein-structure-and-function/>].

1.6.2. Ο ρόλος της ινσουλίνης στον ενεργειακό μεταβολισμό

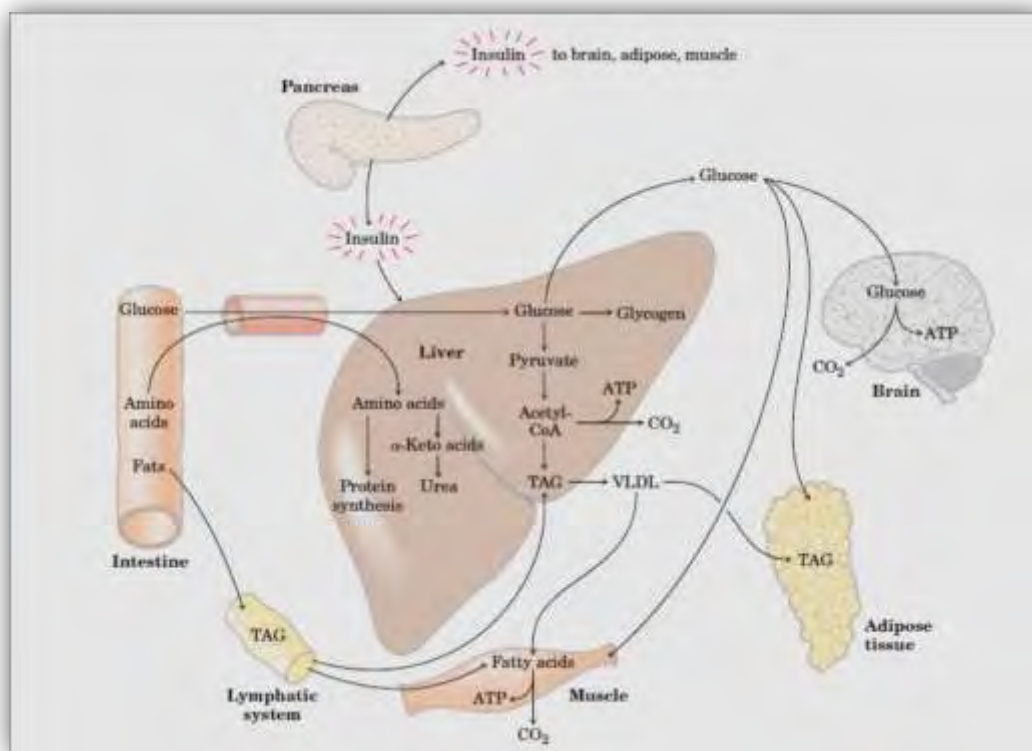
Η διατήρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα είναι υψίστης σημασίας για ένα οργανισμό και ένα πλήθος ρυθμιστικών μηχανισμών έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή ισορροπία. Η ινσουλίνη αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ρυθμιστικό μόριο, το οποίο έχει καθοριστικό ρόλο στην χρησιμοποίηση και αποθήκευση της γλυκόζης.

Πιο συγκεκριμένα, η ινσουλίνη είναι η ορμόνη που ενημερώνει μέσω σήματος τόσο το μυϊκό όσο και το λιπώδη ιστό, ότι η γλυκόζη του αίματος είναι μεγαλύτερη απ' ό,τι χρειάζεται. Έτσι, τα κύτταρα αναλαμβάνουν να απομακρύνουν τη γλυκόζη από το αίμα και τη μετατρέπουν σε γλυκογόνο (γλυκονογένεση) και τριακυλογλυκερόλες, έτσι ώστε να προκύψουν οι αποθηκευμένες μορφές της γλυκόζης [Lehninger, 2008].

1.6.2.i. Δράση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό

Μετά από ένα θερμιδικά πλούσιο γεύμα η γλυκόζη, τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα εισέρχονται στο ήπαρ. Η ινσουλίνη απελευθερώνεται ως απόκριση της υψηλής συγκέντρωσης της γλυκόζης και διεγείρει τους ιστούς, προκειμένου αυτοί να ξεκινήσουν την πρόσληψη της γλυκόζης. Ένα μέρος της γλυκόζης προωθείται στον εγκέφαλο, προκειμένου να καλυφθούν οι ενεργειακές του ανάγκες, και η υπόλοιπη καταλήγει στο μυϊκό και στο λιπώδη ιστό. Στο ήπαρ, η ινσουλίνη ενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου και απενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, προκειμένου η 6-φωσφορική-γλυκόζη να μετατραπεί σε γλυκογόνο. Επιπλέον, η ινσουλίνη ενεργοποιεί την οξείδωση της 6-φωσφορικής-γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ (όταν υπάρχει περίσσεια γλυκόζης) δια μέσου της γλυκόλυσης αλλά και την οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος σε ακέτυλο-CoA. Το ακέτυλο-CoA χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, τα οποία απομακρύνονται από το ήπαρ με κατεύθυνση το μυϊκό και λιπώδη ιστό, με τη μορφή των τριακυλογλυκερολών (TAGs) των λιποπρωτεϊνών VLDLs. Η περίσσεια των αμινοξέων μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και ακέτυλο-CoA, τα οποία χρησιμοποιούνται στη λιπιδική σύνθεση. Τα διαιτητικά λίπη (dietary fats), με τη μορφή χυλόμικρων, προχωρούν μέσω του λεμφικού συστήματος από το έντερο στο μυϊκό και στο λιπώδη ιστό (**Εικόνα 4**) [Lehninger, 2008].

Η ινσουλίνη ευνοεί την πρωτεϊνοσύνθεση και ταυτόχρονα αναστέλλει τη διάσπαση των πρωτεϊνών. Έτσι, τα άτομα που πάσχουν από διαβήτη τύπου I παρουσιάζουν αξιόλογη απώλεια πρωτεϊνών. Είναι γνωστό ότι η στοματική χορήγηση αμινοξέων διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης [Porksen *et al.*, 2002]. Η απόκριση της αργινίνης στην ινσουλίνη είναι χαρακτηριστική. Η αργινίνη προκαλεί την έκκρισή της στο βασικό στάδιο (νηστείας) 2-10min μετά την απορρόφησή της [Kahn *et al.*, 1997].

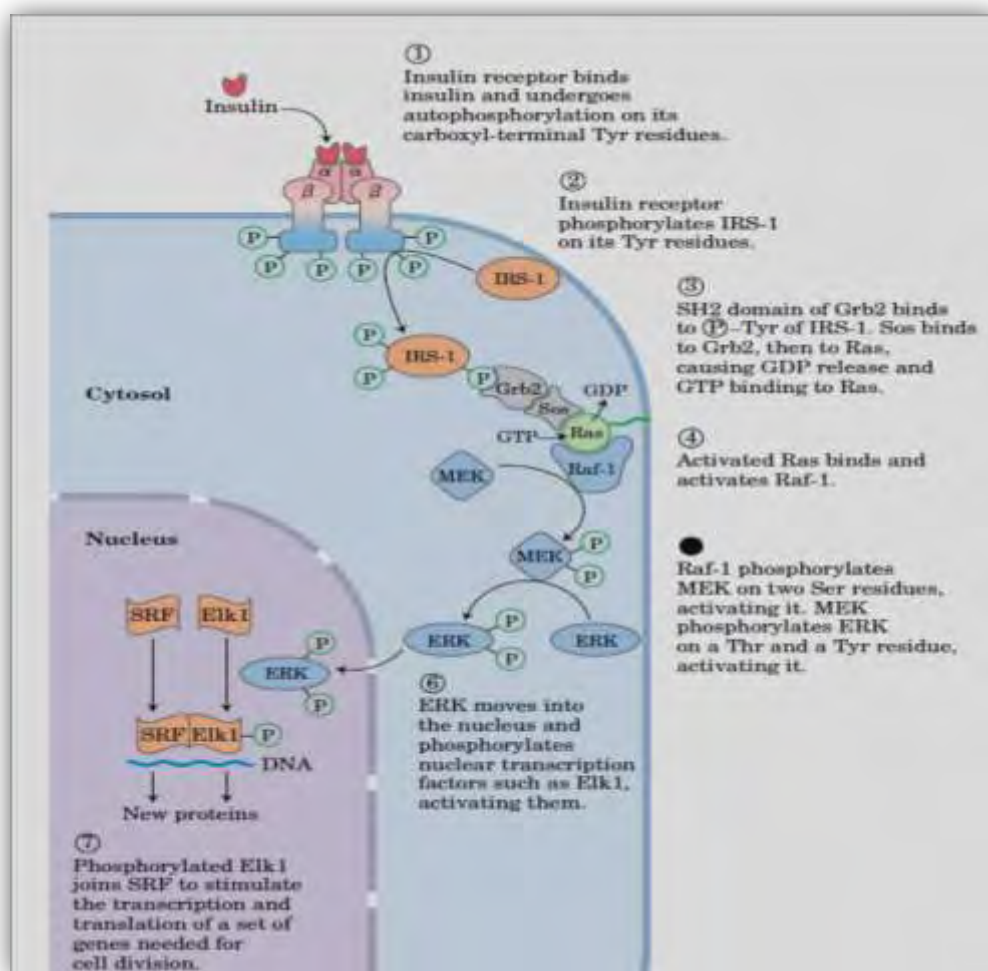


Εικόνα 4 : Σύντομη περιγραφή της δράσης της ινσουλίνης στο μεταβολισμό, ύστερα από την κατανάλωση ενός πλούσιου γεύματος [Lehninger, 2008].

1.6.2.ii. Δέσμευση της γλυκόζης και σηματοδότηση

Η ινσουλίνη δρα μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα της INS-R (INSulin-Receptor), χωρίς ωστόσο η ίδια να εισέλθει μέσα στο κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, η ινσουλίνη συνδέεται στις εξοκυττάρια α υπομονάδα του INS-R προκαλώντας έτσι εκείνη την αλλαγή που επιτρέπει στο ATP να δεσμευτεί στην ενδοκυττάρια β υπομονάδα του INS-R [Wolever *et al.*, 1990]. Το δεσμευόμενο ATP προκαλεί φωσφορυλίωση της β υπομονάδας μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης της τυροσίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας του ATP σε κατάλοιπα Tyr άλλων πρωτεϊνών, όπως η IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1). Τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα Tyr της IRS-1 λειτουργούν ως σημεία σύνδεσης για πρωτεΐνες με SH2 τομείς. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες, όπως η Grb2, διαθέτουν δύο ή περισσότερους τομείς για πρωτεϊνική σύνδεση και έτσι μπορούν να φέρουν δυο πρωτεΐνες πιο κοντά. Οι πρωτεΐνες Sos συνδέονται με την Grb2 και έτσι καταλύουν την μετατροπή του GDP σε GTP πάνω στην Ras (μια μικρή G-πρωτεΐνη), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον καταρράκτη MAPK (Mitogen Activated

Protein Kinases). Ο MAPK καταρράκτης (**Εικόνα 5**) τελειώνει με τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών στόχων στο κυττόςολιο και τον πυρήνα. Αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας αυτής είναι οι ειδικές μεταβολικές αλλαγές καθώς και αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση (**Εικόνα 5**) [Lehninger, 2008].

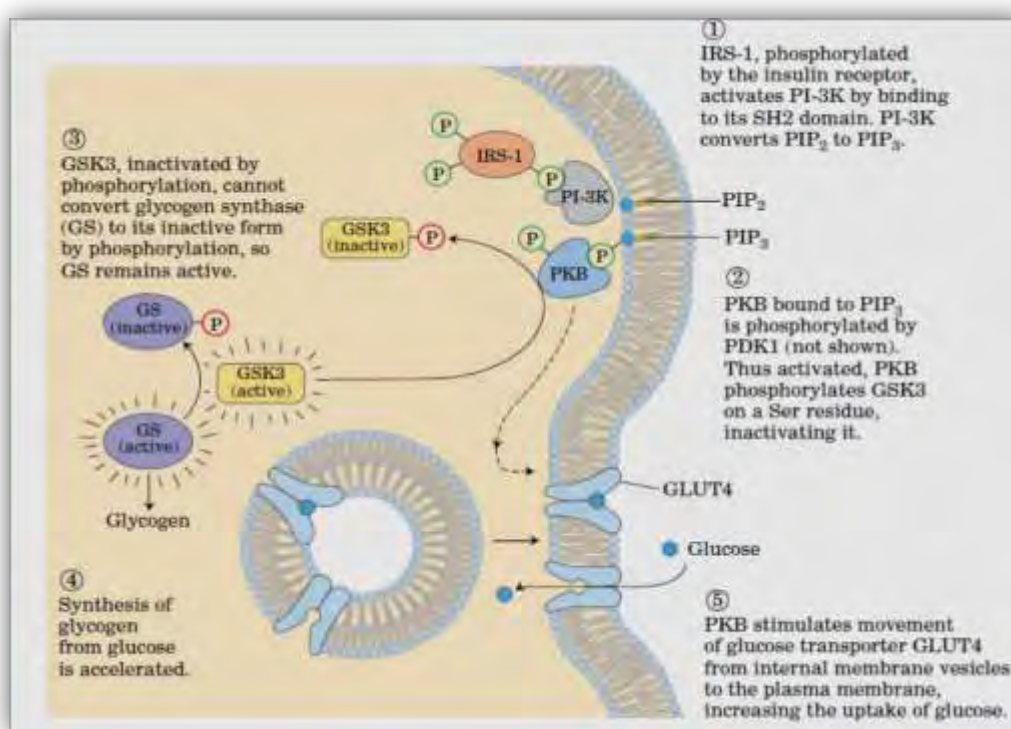


Εικόνα 5 : Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από την ινσουλίνη [Lehninger, 2008].

Η Grb2 δεν είναι η μόνη πρωτεΐνη που συνδέεται με την φωσφορυλιωμένη IRS-1. Το ένζυμο *PI-3K* (*Phosphoinositide 3-kinase*) συνδέεται με την φωσφορυλιωμένη IRS-1 διαμέσου του SH2 τομέα που διαθέτει. Έτσι, το ενεργοποιημένο πλέον ένζυμο *PI-3K* μετατρέπει το μεμβρανικό λιπίδιο PIP_2 στο PIP_3 . Η PIP_3 αποτελεί το εναρκτήριο μόριο για μία δεύτερη σηματοδότηση, η οποία περιλαμβάνει έναν άλλο καταρράκτη κινασών. Πιο συγκεκριμένα, η PKB (*Protein Kinase B*) συνδέεται στην PIP_3 και φωσφορυλιώνεται από την PDK1, μία άλλη πρωτεϊνική κινάση. Η ενεργοποιημένη πλέον PKB φωσφορυλιώνει στη συνέχεια κατάλοιπα Ser ή Thr σε πρωτεΐνες στόχους, μία απ' τις οποίες είναι η κινάση της

συνθάσης του γλυκογόνου 3(GSK 3) με αποτέλεσμα να την απενεργοποιεί. Η απενεργοποιημένη πλέον GSK 3 δεν μπορεί να μετατρέψει τη συνθάση του γλυκογόνου (GS) στην ανενεργή της μορφή, (μέσω φωσφορυλίωσης), με αποτέλεσμα η GS να παραμένει ενεργή (**Εικόνα 6**). Με άλλα λόγια η σύνθεση του γλυκογόνου από τη γλυκόζη επιταχύνεται [Lehninger, 2008].

Σε μια τρίτη σηματοδότηση στο μυ και στο λιπώδη ιστό η PKB διεγείρει τη κίνηση των μεταφορέων της γλυκόζης GLUT-4 από το εσωτερικό του κυττάρου στο πλάσμα της μεμβράνης, προκειμένου να αυξηθεί η πρόσληψη της γλυκόζης (**Εικόνα 6**) [Lehninger, 2008].



Εικόνα 6 : Ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου από την ινσουλίνη [Lehninger, 2008].

1.6.2.iii. Μεταφορείς της γλυκόζης

Η είσοδος της γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων δε μπορεί να πραγματοποιηθεί με απλή διάχυση, λόγω της υψηλής πολικότητας του μορίου της γλυκόζης και την παρεπόμενη αδυναμία αυτής να διαλυθεί στη μη-πολική λιποειδική διπλοστοιβάδα. Σε ορισμένα απορροφητικά κύτταρα, όπως του εντερικού επιθηλίου και των νεφρικών σωληναρίων, η μεταφορά της γλυκόζης πραγματοποιείται με τη διαδικασία της ενεργητικής μεταφοράς μέσω της αντλίας Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης (η οποία

δεν απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας). Η πλειοψηφία των υπολοίπων κυττάρων προσλαμβάνουν τη γλυκόζη με παθητικό μηχανισμό μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων, μια διαδικασία που δεν απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας. Οι πρωτεΐνες-μεταφορείς που μετέχουν στην παραπάνω διαδικασία ονομάζονται μεταφορείς γλυκόζης (glucose transporters, GLUT) και πρόκειται για εγκάρσιες πρωτεΐνες που διαπερνούν τη λιποειδική στοιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Ο συνολικός αριθμός υποδοχέων γλυκόζης είναι έξι (GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3, GLUT-4, GLUT-5 GLUT-7) και η κατανομή αυτών στους διάφορους ιστούς ποικίλλει (**Πίνακας 1**). Σημαντική είναι η ομοιότητα της λειτουργίας όλων των ισόμορφων καθώς στόχος των παραπάνω μεταφορέων είναι η απομάκρυνση της γλυκόζης από την κυκλοφορία του αίματος και η είσοδος της στο εσωτερικό των κυττάρων [Gropper *et al.*, 2007].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η δημιουργία των πρωτεϊνών-μεταφορέων είναι αποτέλεσμα της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων, μέσω της μεταγραφής σε mRNA και μετάφρασης αυτού στα ριβοσώματα. Μετά το πέρας της μετάφρασης ακολουθεί η είσοδος των μεταφορέων στο σύμπλεγμα Golgi, όπου και στοιβάζονται σε κυστιδικές δομές στις οποίες και παραμένουν όταν το κύτταρο βρίσκεται σε φάση μη διέγερσης, δηλαδή απουσία ινσουλίνης. Ωστόσο, όταν σημειωθεί διέγερση του κυττάρου από την παραπάνω αναβολική ορμόνη, τα κυστίδια μετατοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, με σκοπό την αποκατάσταση των επιπέδων γλυκόζης αίματος μέσω της εισόδου αυτής στο κύτταρο [Gropper *et al.*, 2007].

ΜΕΤΑΦΟΡΕΑΣ	K_m^I (mM)*	ΙΣΤΟΙ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ**	ΡΟΛΟΣ**
GLUT-1	3-7	πανταχού παρών	Βασική πρόσληψη γλυκόζης
GLUT-2	17	ήπαρ, παγκρεατικά νησίδια, έντερο, νεφρά	Στο ήπαρ, αφαίρεση της περίσσειας γλυκόζης από το αίμα Στο πάγκρεας, ρύθμιση της απελευθέρωσης της ινσουλίνης
GLUT-3	1-5	εγκέφαλος και νευρικά κύτταρα	Βασική πρόσληψη γλυκόζης
GLUT-4	5-6	μυς, καρδιά και λιπώδη ιστός	Δραστηριότητα του αυξάνεται από την ινσουλίνη

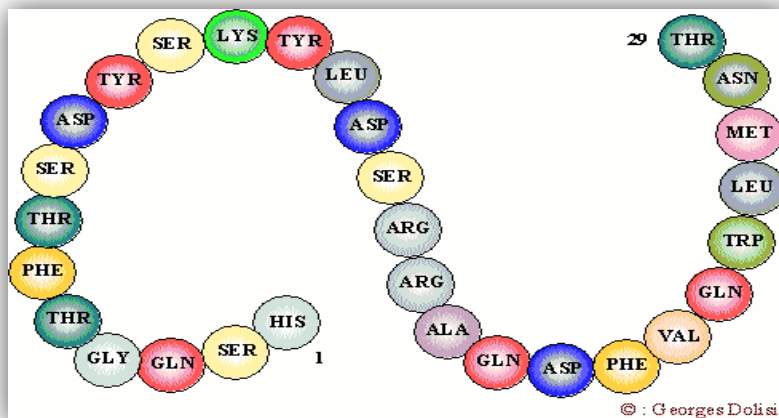
Πίνακας 1 : Περίληψη των ιδιοτήτων των κυριότερων μεταφορέων γλυκόζης [* Feng-Qi Zhao *et al.*, 2007, ** Lehninger, 2008]

^I = η ελάχιστη συγκέντρωση γλυκόζης που απαιτείται για την ενεργοποίηση του μεταφορέα

1.7. Γλυκαγόνη

1.7.1. Γενικά

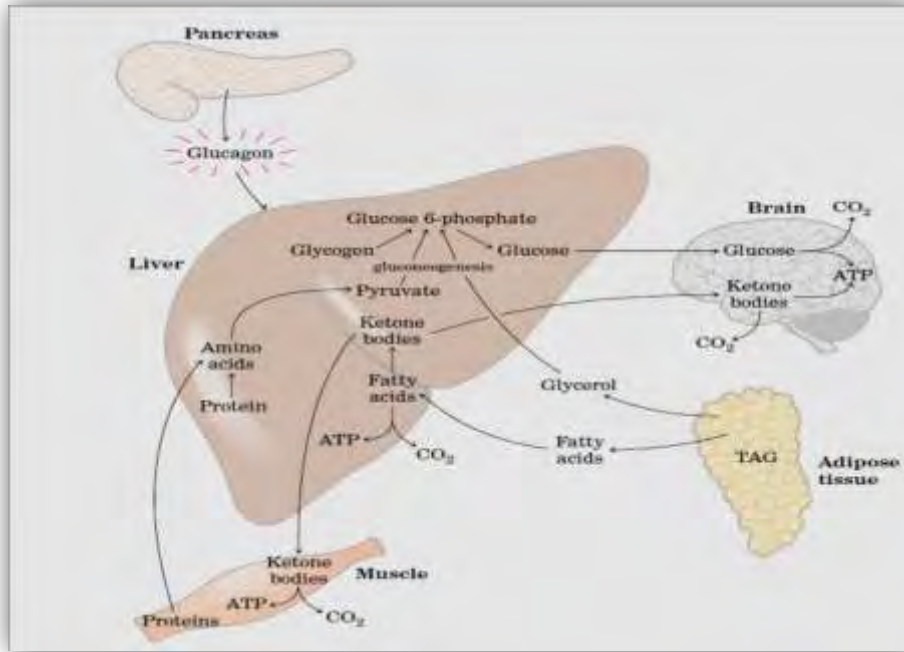
Η γλυκαγόνη είναι μία πεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται από το πάγκρεας με σκοπό να αυξήσει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, δηλαδή έχει αντίθετη δράση από αυτήν της ινσουλίνης [Reece *et al.*, 2010]. Παράγεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans που βρίσκονται στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος. Προέρχεται από τη διάσπαση της προ-γλυκαγόνης. Η ώριμη γλυκαγόνη αποτελείται από 29 αμινοξέα, με μοριακό βάρος 3485 daltons (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7 : Η δομή της γλυκαγόνης [<http://www.medicopedia.net/term/11082,1,xhtmln>]

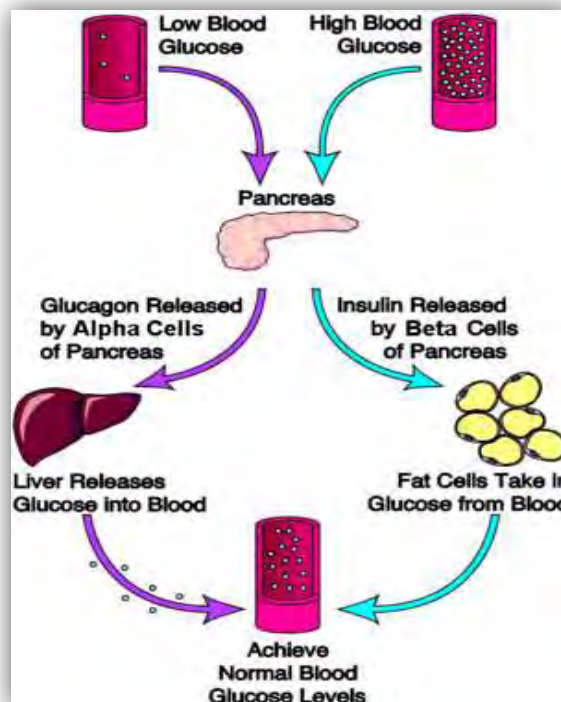
1.7.2 Δράση της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό

Όπως, έχει ήδη αναφερθεί τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα προκαλούν την έκκριση της γλυκαγόνης και τη μείωση της ινσουλίνης. Μετά από μερικές ώρες χωρίς γεύμα, το ήπαρ γίνεται η βασική πηγή γλυκόζης για τον εγκέφαλο. Η γλυκαγόνη διεγείρει τη διάσπαση του γλυκογόνου του ήπατος ενεργοποιώντας τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και απενεργοποιώντας τη συνθάση του γλυκογόνου. Έτσι, το γλυκογόνο του ήπατος διασπάται και η 1-φωσφορική-γλυκόζη που παράγεται μετατρέπεται σε 6-φωσφορική-γλυκόζη και έπειτα σε ελεύθερη γλυκόζη, η οποία απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Τα αμινοξέα, τα οποία απελευθερώνονται από τη διάσπαση των πρωτεϊνών στο ήπαρ και στους μυς καθώς και η γλυκερόλη από τη διάσπαση των τριάκυλογλυκερολών από το λιπώδη ιστό, χρησιμοποιούνται για τη γλυκονεογένεση. Το ήπαρ χρησιμοποιεί τα λιπαρά οξέα σαν πρωταρχικό καύσιμο και η περίσσεια του ακέτυλο-CoA μετατρέπεται σε κετονικά σώματα (ketone bodies), για εξαγωγή σε άλλους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος (Εικόνα 8)[Lehninger, 2008].



Εικόνα 8 : Σύντομη περιγραφή της δράσης της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό, σε κατάσταση νηστείας [Lehninger, 2008].

Τόσο η ινσουλίνη όσο και η γλυκαγόνη αποτελούν μέρος ενός συστήματος ανατροφοδότησης που κρατά τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα σε ένα σταθερό επίπεδο. Στην **Εικόνα 9** παρουσιάζεται ο γενικός μηχανισμός δράσης των εν λόγω ορμονών στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος.



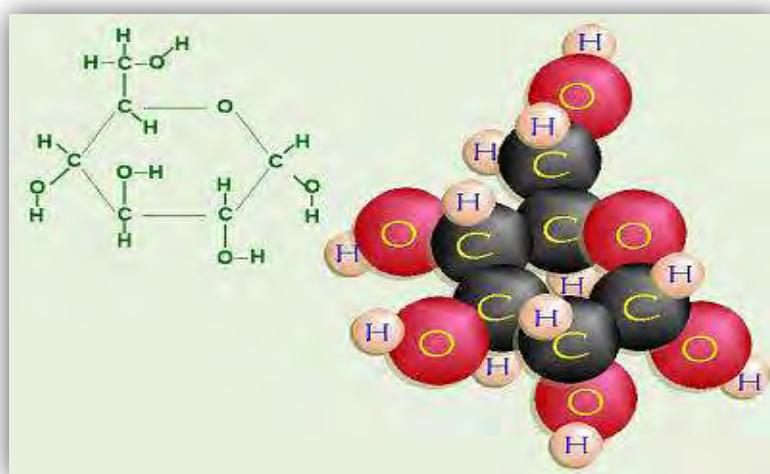
Εικόνα 9 : Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί στην απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Αυτή, στο ήπαρ, προκαλεί τη σύνθεση γλυκογόνου με επακόλουθο, τη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης από το πάγκρεας και προσλαμβάνεται από το ήπαρ. Εκεί η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης. Και οι δύο ορμόνες, στόχο έχουν να επαναφέρουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο φυσιολογικό [<http://www.daviddarling.info/encyclopedia/G/glucagon.html>].

2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

2.1. Γλυκόζη

2.1.1. Γενικά

Η γλυκόζη, η οποία ονομάζεται επίσης και δεξτρόζη ή σάκχαρο του αίματος, είναι ένας από τους κυριότερους μονοσακχαρίτες. Αποτελείται από μια αλυσίδα έξι ατόμων άνθρακα, συνδεδεμένων με δώδεκα άτομα υδρογόνου και έξι άτομα οξυγόνου με βάση τον χημικό τύπο $C_6H_{12}O_6$ (**Εικόνα 10**), [McArdle *et al.*, 2000]. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η γλυκόζη κυκλοποιείται αντιστρεπτά σε υδατικό διάλυμα, σχηματίζοντας μίγμα δύο ανωμερών σε αναλογία 36:64 (α -D-γλυκοκυρανόζη: β -D-γλυκοκυρανόζη) [McMurry, 2006].



Εικόνα 10 : Κυκλική και τρισδιάστατη απεικόνιση ενός απλού μορίου γλυκόζης [Stryer, 1997].

Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές, ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων, αλλά και από μη υδατανθρακικές ενώσεις όπως για παράδειγμα από το γαλακτικό οξύ [McArdle *et al.*, 2000]. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, αφού αποτελεί το προτιμώμενο καύσιμο τόσο για το κεντρικό νευρικό σύστημα όσο και για τα ερυθροκύτταρα. 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. 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 60 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, 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 διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη [Martin *et al.*, 1998]. Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων [McArdle *et al.*, 2000].

2.1.2. Εμπλοκή της γλυκόζης στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου

Η γλυκόζη αποτελεί τον φυσιολογικό ρυθμιστή του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ, εφόσον αδρανοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου και δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη [Stalmans *et al.*, 1974]. Η γλυκόζη σαν αλλοστερικός μεταβολίτης σταθεροποιεί την T διαμόρφωση της φωσφορυλάσης a (λιγότερο δραστηκή), γεγονός που εκθέτει την φωσφορική ομάδα της σερίνης (Ser) 14

στην υδρολυτική δράση της φωσφατάσης (PP-1G), η οποία μετατρέπει την GPα (φωσφορυλιωμένη GP) σε GPβ (μη φωσφορυλιωμένη) [Madsen *et al.*, 1978, Sprang *et al.*, 1982]. Η μετατροπή της GPα σε GPβ συνοδεύεται από την απελευθέρωση της PP-1G, η οποία έχει πλέον την δυνατότητα να ενεργοποιήσει την συνθάση του γλυκογόνου [Bollen *et al.*, 1992]. Επομένως, η ισορροπία μεταξύ της αποικοδόμησης και της σύνθεσης του γλυκογόνου ρυθμίζεται από αντιδράσεις φωσφορύλιωσης-αποφωσφορύλιωσης με κύριο ρυθμιστή την γλυκόζη.

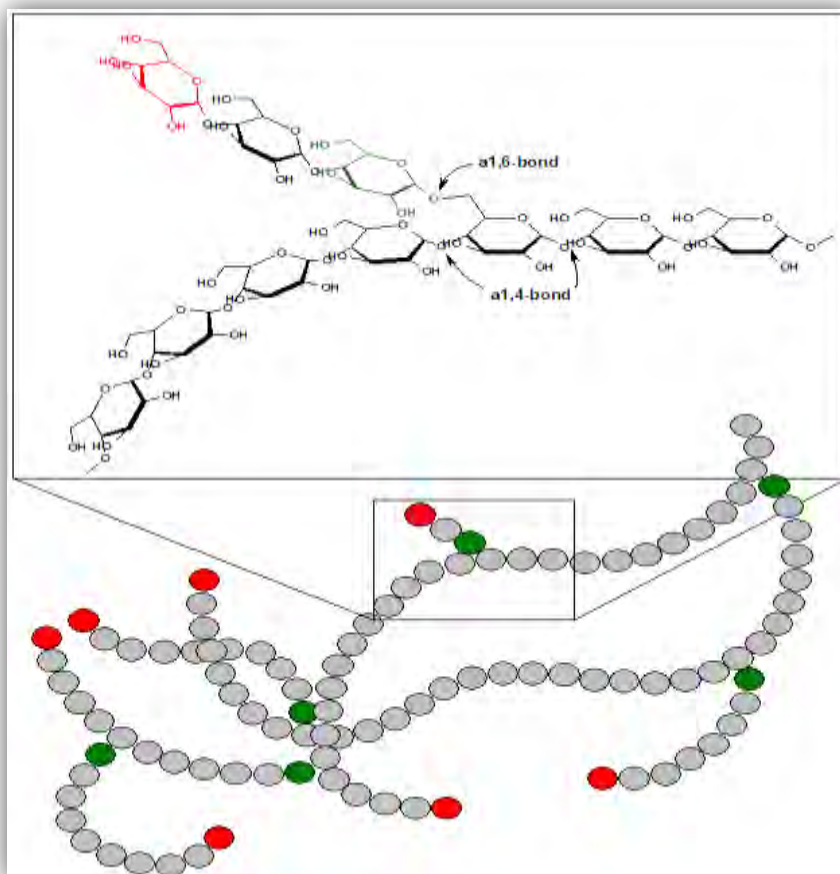
Η γλυκόζη ως αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου συναγωνιστικά με το υπόστρωμα, σταθεροποιώντας παράλληλα την T διαμόρφωση η οποία είναι λιγότερο ενεργή, δίνοντας εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις με το βρόγχο της αλυσίδας 282-287 (280s), που παρεμποδίζει την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο [Oikonomakos *et al.*, 1987]

2.2. Γλυκογόνο

2.2.1. Γενικά

Το γλυκογόνο είναι ένας ζωικός πολυσακχαρίτης που έχει τον ίδιο ρόλο με το άμυλο στα φυτά : αποθηκεύει ενέργεια. Οι υδατάνθρακες που δε χρησιμοποιούνται άμεσα για τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού μετατρέπονται στο σώμα σε γλυκογόνο, για μακροχρόνια αποθήκευση [McMurry, 2006].

Το γλυκογόνο, χαρακτηρίζεται από μια περίπλοκη δομή : αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μόρια α-D-γλυκόζης, τα οποία ενώνονται με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται ανά δέκα περίπου μόρια γλυκόζης (**Εικόνα 11**) [Stryer, 1997].



Εικόνα 11 : Δομή του γλυκογόνου

[\[http://www.absoluteastronomy.com/topics/Branching_%28chemistry%29\]](http://www.absoluteastronomy.com/topics/Branching_%28chemistry%29)

Το γλυκογόνο είναι άφθονο στο ήπαρ, όπου απαρτίζει το 7% του καθαρού βάρους, ενώ είναι επίσης παρών και στους σκελετικούς μυς [Lehninger, 2008]. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό τι στους μυς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο [Κλεισούρας, 1997].

Στα ηπατικά κύτταρα, το γλυκογόνο υπάρχει σε μεγάλους κόκκους. Τέτοιοι κόκκοι γλυκογόνου περιέχουν σε στενά συνδεδεμένη μορφή τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και τη διάσπαση του γλυκογόνου [Lehninger, 2008]. Παρ' όλα αυτά, ένας κόκκος γλυκογόνου διαφέρει από ένα πολυενζυμικό σύμπλεγμα στο γεγονός ότι τα συνδεδεμένα ένζυμα στους κόκκους του γλυκογόνου δεν υπάρχουν σε καθορισμένες μοριακές αναλογίες. Ακόμη ένας κόκκος γλυκογόνου δομικά, είναι λιγότερο οργανωμένος από ένα πολυενζυμικό σύμπλεγμα [Stryer, 1997].

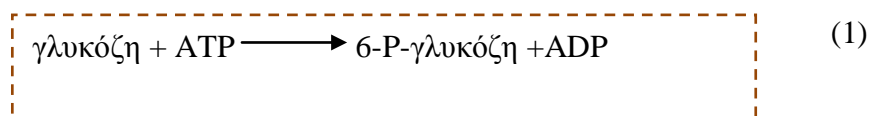
Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται αντίρροπα από τον ορμονικά διεγερόμενο καταρράκτη της κυκλικής AMP (μονοφωσφορικής αδενοσίνης), ο οποίος δρα μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A. Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης εμποδίζει την σύνθεση του γλυκογόνου ταυτόχρονα με την αποικοδόμηση του και επιτρέπει στον μεταβολισμό του γλυκογόνου να προσαρμόζεται στις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού [Stryer, 2007].

Έτσι, η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι δυο πάρα πολύ σημαντικές διαδικασίες γιατί:

- ✓ Ρυθμίζουν το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα
- ✓ Παρέχουν αποθέματα γλυκόζης στην περίπτωση κοπιαστικής εργασίας
- ✓ Συμβαίνουν με διαφορετικές μεταβολικές πορείες, γεγονός που απεικονίζει μια βασική αρχή της βιοχημείας
- ✓ Μηχανισμοί γενικότερης σημασίας μεσολαβούν για τη ρύθμιση του μεταβολισμού του
- ✓ Ένας μεγάλος αριθμός κληρονομούμενων ενζυμικών βλαβών, μερικές από τις οποίες είναι θανατηφόρες στην παιδική ηλικία, έχει χαρακτηριστεί ότι οφείλεται στον ελαττωματικό μεταβολισμό του γλυκογόνου [Stryer, 1997]

2.2.2. Σύνθεση του γλυκογόνου

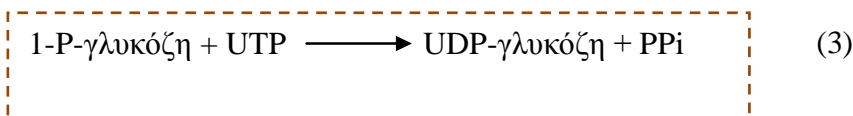
Για να ξεκινήσει η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτείται 6-φωσφορική-γλυκόζη (6-P-γλυκόζη). Η 6-P-γλυκόζη μπορεί να προκύψει από την ελεύθερη γλυκόζη, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:



Η (1) καταλύεται από τα ισοένζυμα : *εξοκινάση I* και *II* στο μυ και από την *εξοκινάση IV* στο ήπαρ. Στη συνέχεια, η 6-φωσφορική-γλυκόζη μετατρέπεται στην 1-φωσφορική-γλυκόζη, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

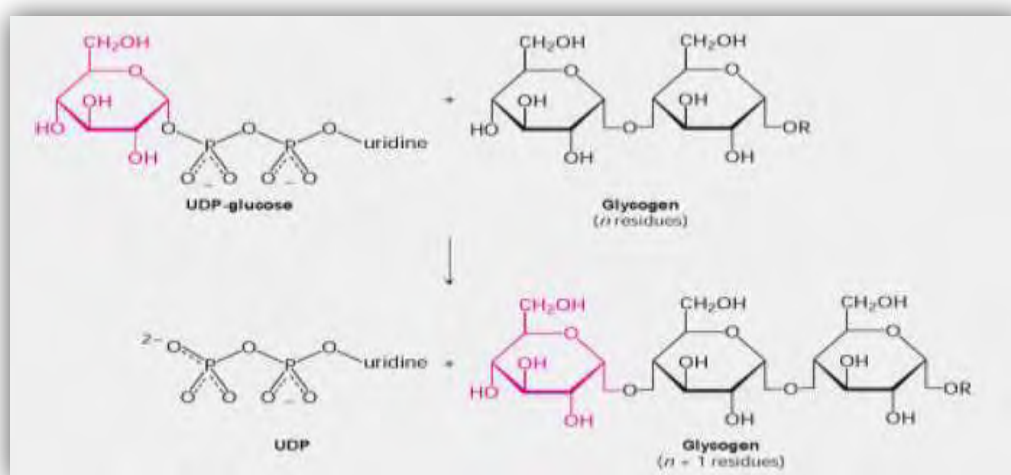
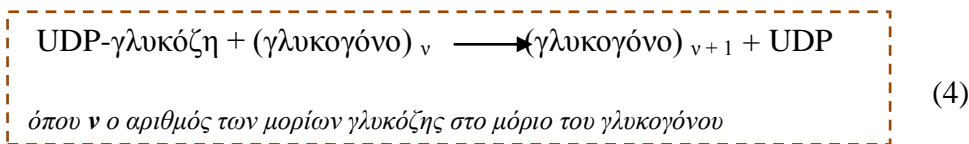


Το προϊόν της (2) μετατρέπεται στην UDP-γλυκόζη, παρουσία του ενζύμου *πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης* :



Η (3) αποτελεί ένα στάδιο «κλειδί» για τη βιοσύνθεση του γλυκογόνου [Lehninger, 2008].

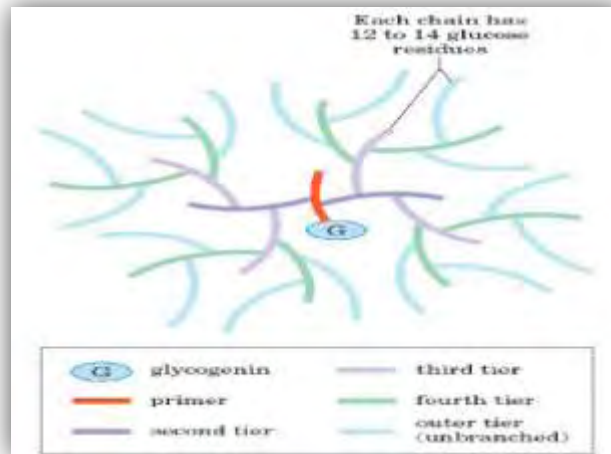
Η UDP-γλυκόζη προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο των μορίων γλυκογόνου, όπου τα μόρια θα πρέπει να ανακατασκευαστούν για να συνεχιστεί η σύνθεση. Η ρύθμιση των διεργασιών αυτών είναι αρκετά πολύπλοκη και τα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου αποκρίνονται αλλοστερικά σε μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου [Stryer, 2007]. Η UDP-γλυκόζη είναι ο ενδιάμεσος δότης της γλυκόζης στην αντίδραση που καταλύεται από τη *συνθάση του γλυκογόνου (Glycogen Synthase, GS)*. Το ένζυμο αυτό προωθεί τη μεταφορά ενός καταλοίπου γλυκόζης από την UDP-γλυκόζη σε ένα μη αναγωγικό άκρο του διακλαδισμένου μορίου του γλυκογόνου (Αντίδραση (4), **Σχήμα 2**), προκειμένου να σχηματίσει ένα νέο δεσμό (α1→4) [Lehninger, 2008].



Σχήμα 2 : Σύνθεση του γλυκογόνου [Stryer, 1997]

Η GS δεν μπορεί να σχηματίσει ($\alpha 1 \rightarrow 6$) δεσμούς, τους οποίους συναντάμε στα σημεία διακλάδωσης του γλυκογόνου. Οι διακλαδώσεις αυτές σχηματίζονται από την άμυλο $1,4 \rightarrow 1,6$ τρανσγλυκοσυλάση [Lehninger, 2008]. Το ένζυμο διακλάδωσης του μεταφέρει τις 6-7 τελευταίες γλυκόζες (σαν έξα-ή επτασακχαρίτη) μιας αλυσίδας γλυκογόνου, που επιμηκύνεται στην 6-υδροξυλομάδα μιας γλυκόζης στην ίδια ή διαφορετική αλυσίδα. Έτσι, δημιουργείται ένας ($\alpha 1 \rightarrow 6$) δεσμός και μια νέα διακλάδωση στο γλυκογόνο. Από εκεί και πέρα η GS συνεχίζει να επιμηκύνει τις αλυσίδες μέχρις ότου φθάσουν σε μήκος 10-12 γλυκοζών, οπότε επεμβαίνει και πάλι το ένζυμο που διακλαδίζει κ.ο.κ. [Γεωργάτσος, 2005]. Η διακλάδωση στο μόριο του γλυκογόνου έχει βιολογική δράση, καθώς το καθιστά περισσότερο διαλυτό, ενώ παράλληλα αυξάνει και τον αριθμό των μη αναγωγικών του άκρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το μόριο του γλυκογόνου να είναι προσβάσιμο σε ένζυμα όπως : η φωσφορυλάση του γλυκογόνου και η συνθάση του γλυκογόνου, καθώς και τα δυο αυτά ένζυμα δρουν μόνο στα μη αναγωγικά άκρα [Lehninger, 2008].

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η GS δεν μπορεί να ξεκινήσει τη σύνθεση μια αλυσίδας γλυκογόνου *de novo*. Απαιτεί την παρουσία ενός εκκινήτη, όπου είναι συνήθως μία προσχηματισμένη αλυσίδα ($\alpha 1 \rightarrow 4$) πολυγλυκοζών, η οποία διαθέτει 8 τουλάχιστον κατάλοιπα γλυκόζης. Το ρόλο του εκκινήτη, αναλαμβάνει μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 37 kDa (στα θηλαστικά) η γλυκογενίνη. Το πρώτο βήμα για να συντεθεί ένα καινούργιο μόριο γλυκογόνου είναι η μεταφορά ενός καταλοίπου γλυκόζης από την UDP-γλυκόζη στην OH-της Tyr¹⁹⁴ της γλυκογενίνης. Η μεταφορά αυτή πραγματοποιείται με ένα εγγενή ένζυμο της πρωτεΐνης τη γλυκοσυλτρανσφεράση. Η εν τη γενέσει αλυσίδα επεκτείνεται από τη διαδοχική προσθήκη των υπολοίπων επτά μορίων γλυκόζης, όπου προκύπτουν από την UDP-γλυκόζη. Σε αυτό το σημείο η GS αναλαμβάνει την περαιτέρω επέκταση της αλυσίδας του γλυκογόνου. Η γλυκογενίνη παραμένει θαμμένη (**Εικόνα 11**) και είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το μοναδικό αναγωγικό άκρο του μορίου του γλυκογόνου [Lehninger, 2008].

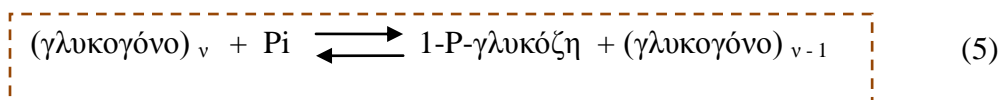


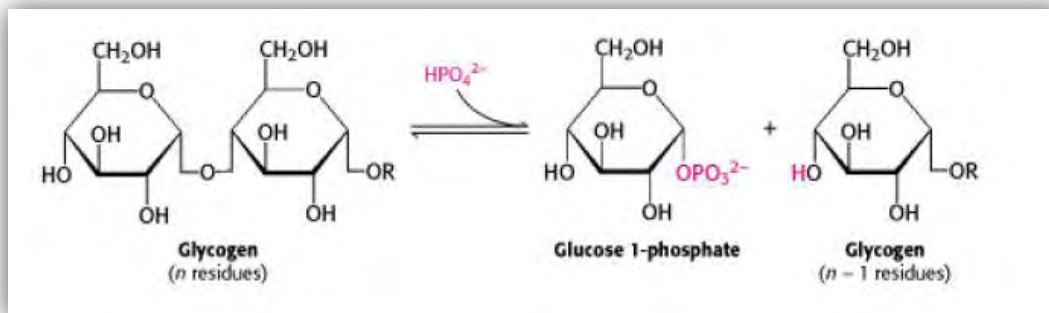
Εικόνα 11 : Δομή ενός μορίου του γλυκογόνου. Ξεκινώντας από ένα κεντρικό μόριο γλυκογενίνης, οι αλυσίδες γλυκογόνου (12 έως 14 κατάλοιπα γλυκόζης) εκτείνονται σε διάφορες βαθμίδες. Κάθε μία από τις εσωτερικές διαθέτει από δύο διακλαδώσεις α(1→6). Οι αλυσίδες στην εξωτερική βαθμίδα είναι μη διακλαδισμένες. Σε ένα ώριμο μόριο γλυκογόνου υπάρχουν 12 βαθμίδες (μόνο 5 φαίνονται εδώ) [Lehninger, 2008].

2.2.3. Αποικοδόμηση του 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 και μία να μετατρέπει το προϊόν καταβολισμού του γλυκογόνου σε μια μορφή κατάλληλη για περαιτέρω μεταβολισμό.

Το κύριο ένζυμο στη διαδικασία της αποικοδόμησης του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*Glycogen Phosphorylase, GP*). Η *GP* διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (P_i), προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού ιόντος αναφέρεται ως φωσφορόλυση. Η αντίδραση που πραγματοποιείται φαίνεται στην αντίδραση (5) καθώς και στο **Σχήμα 3** :





Σχήμα 3 : Αποικοδόμηση του γλυκογόνου [Stryer, 1997].

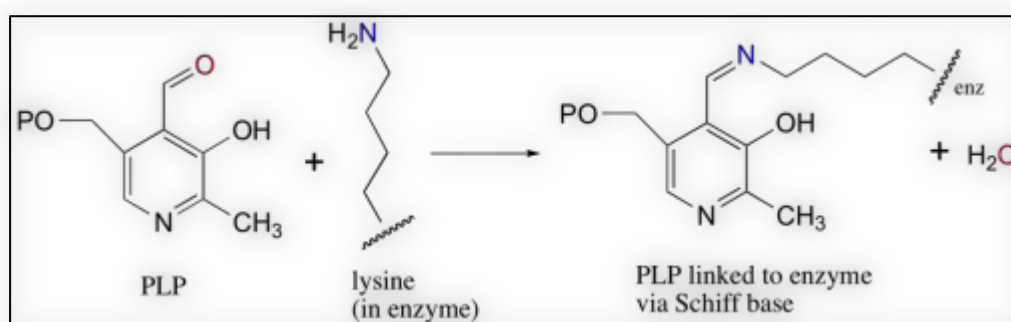
Η *GP* καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται [Stryer, 1997].

Η αντίδραση καταλύεται από την *GP* και είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας του ορθοφωσφορικού προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3,6. Η ΔG° της αντίδρασης είναι μικρή, γιατί ένας γλυκοζιτικός δεσμός αντικαθίσταται από έναν δεσμό φωσφορικού εστέρα, ο οποίος έχει περίπου το ίδιο δυναμικό μεταφοράς. Ωστόσο, η φωσφορόλυση προχωρεί κυρίως προς την κατεύθυνση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου *in vivo*, επειδή ο λόγος [Pi]/[1-φωσφορική γλυκόζη] είναι συνήθως μεγαλύτερος του 100. Επίσης, οι ορμόνες που οδηγούν σε αύξηση της δραστηριότητας της *GP*, πάντα προκαλούν αποικοδόμηση του γλυκογόνου [Stryer, 1997].

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη [Stryer, 1997].

2.2.4. Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP, φωσφορική-5-πυριδοξάλη, P5P) αποτελεί μια προσθετική ομάδα ορισμένων ενζύμων. Είναι η δραστική μορφή της βιταμίνης Β6, η οποία αποτελείται από τρεις φυσικές οργανικές ενώσεις, πυριδοξάλη, πυριδοξίνη και την πυριδοξαμίνη. Η PLP δρα ως συνένζυμο σε όλες τις αντιδράσεις τρανσαμίνωσης, και σε ορισμένες αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης και απαμίνωσης των αμινοξέων. Η αλδεϋδική ομάδα του PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με την ε-αμινομάδα μιας συγκεκριμένης πλευρικής αλυσίδας λυσίνης στο εκάστοτε ένζυμο (Σχήμα 4).

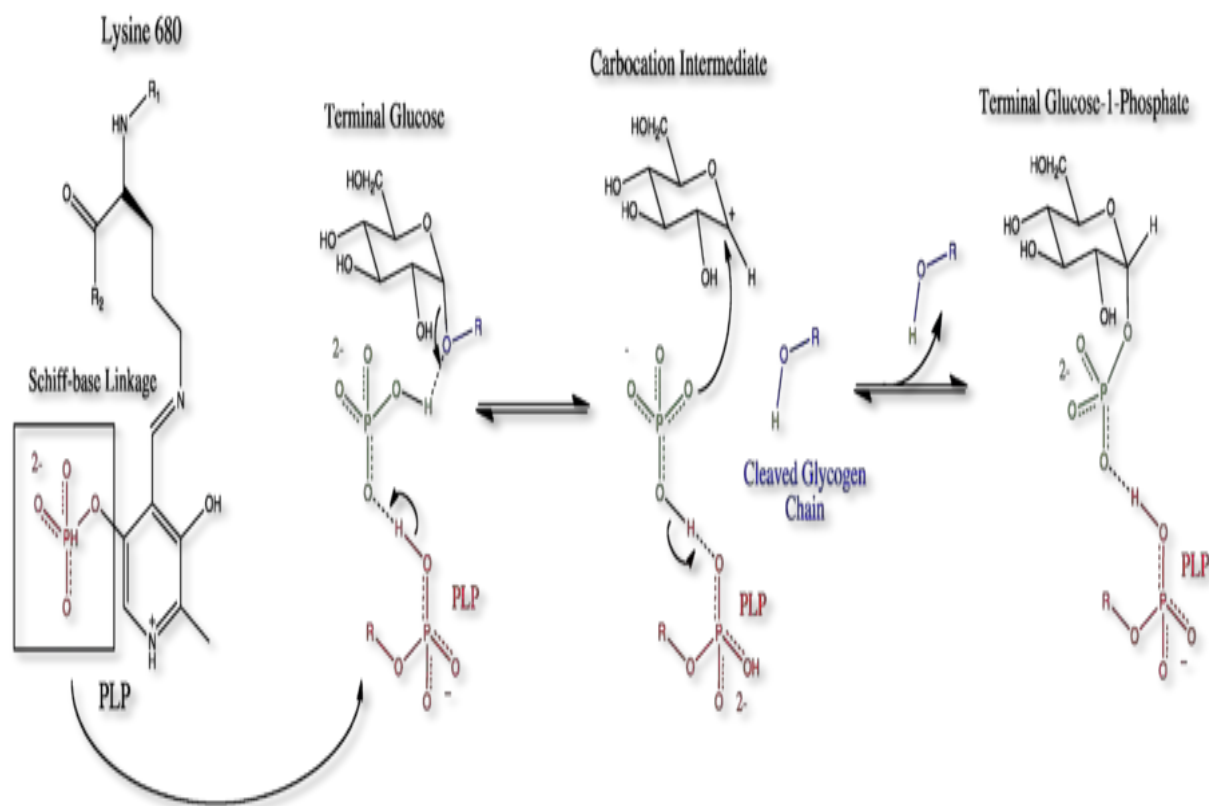


Σχήμα 4 : Η φωσφορική πυριδοξάλη σχηματίζει μία βάση του Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης του ενζύμου.

[http://chemwiki.ucdavis.edu/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis/Chapter_11%3A_Nucleophilic_carbonyl_addition_reactions/Section_11.6%3A_Imines_%28Schiff_base%29_formation]

Είναι γνωστό ότι, η *GS* διασπά το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά, έτσι ώστε να εξοικονομήσει ATP για τη φωσφορλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή απαιτεί 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 καρβοκατίον, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη [Stryer, 1997].

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της *GP*, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου. Περιθλασιγράμματα ακτίνων X και μελέτες με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό 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. 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 (**Σχήμα 5**). Η μεγαλύτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η *GP* είναι να διασπάσει φωσφορολυτικά το γλυκογόνο, παρά υδρολυτικά με κέρδος ένα ~ P. Αυτό απαιτεί παντελή αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο, κάτι που δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP ως γενικού οξεοβασικού καταλύτη [Stryer, 1997]



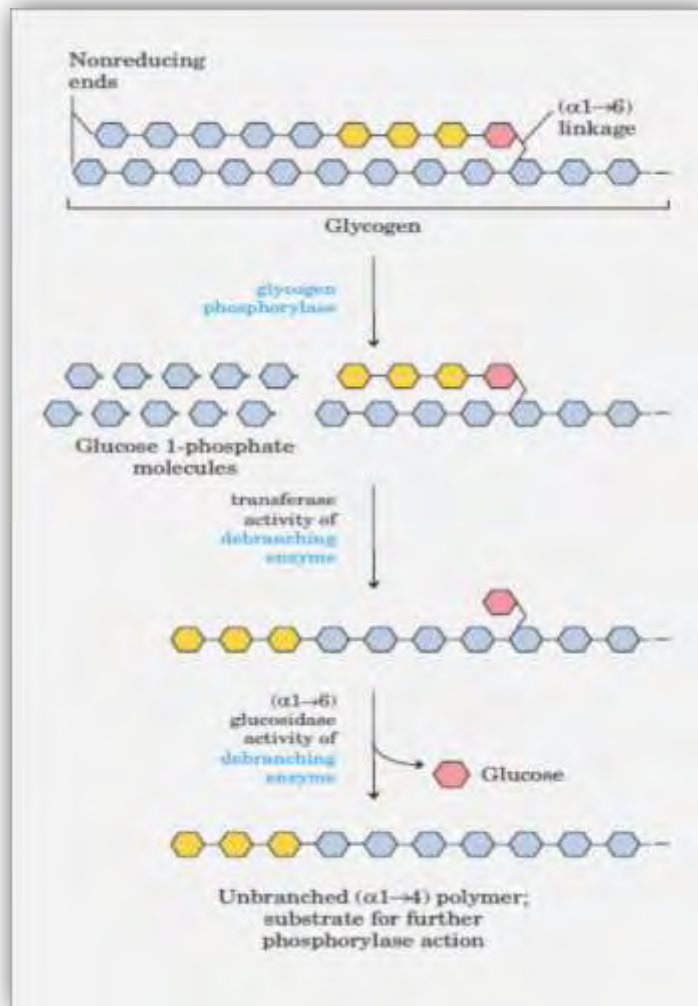
Σχήμα 5 : Μηχανισμός φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την *GP*. Τα προϊόντα είναι 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο

[\[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/62/GlycogenPhosphorylaseMechanism.png\]](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/62/GlycogenPhosphorylaseMechanism.png).

2.2.5. Ο ρόλος του ενζύμου αποδιακλάδωσης

Το γλυκογόνο αποικοδομείται ως έναν ορισμένο βαθμό από τη *GP* και μόνο. Η *GP* δρα επαναλαμβανόμενα στα μη αναγωγικά άκρα των διακλαδώσεων του γλυκογόνου μέχρι να φτάσει σε ένα σημείο τεσσάρων καταλοίπων γλυκόζης πριν το σημείο $\alpha(1\rightarrow6)$ όπου υπάρχει η διακλάδωση και η δράση της *GP* σταματά [Lehninger, 2008].

Η περαιτέρω αποικοδόμηση του γλυκογόνου από την *GP*, συμβαίνει μόνο όταν η *μεταφοράση* (transferase) καθώς και το ένζυμο αποδιακλάδωσης, γνωστό και ως *γλυκοζιτάση $\alpha(1\rightarrow6)$* [$\alpha(1\rightarrow6)$ glucosidase] μετατρέπουν τη διακλαδωμένη δομή σε γραμμική. Η *μεταφοράση* μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη, αφήνοντας εκτεθειμένο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό $\alpha(1\rightarrow6)$. Έτσι, ανοίγει πλέον ο δρόμος για περαιτέρω διάσπαση από την *GP* (**Σχήμα 6**). Η *γλυκοζιτάση $\alpha(1\rightarrow6)$* υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό $\alpha(1\rightarrow6)$ με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης. Ένα πολύ ενδιαφέρον σημείο αποτελεί το γεγονός ότι η *μεταφοράση* και η *γλυκοζιτάση $\alpha(1\rightarrow6)$* αποτελούν μέρη του ίδιου ενζύμου [Stryer, 1997].



Σχήμα 6 : Βήματα αποικοδόμησης γλυκογόνου [Lehninger, 2008].

2.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

2.3.1. Γενικά

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα από τα κυριότερα φωσφορολυτικά ένζυμα. Η GP ήταν το πρώτο αλλοστερικό ένζυμο που ανακαλύφθηκε από τους Carl & Gerty Cori. Το 1943 με τη βοήθεια του Arda Green, το ζευγάρι έδειξε πως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει σε δύο μορφές : την *a* και τη *b*, που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση του ενζύμου, καθώς και στις καταστάσεις R και T που βασίζονται στην παρουσία του AMP.

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

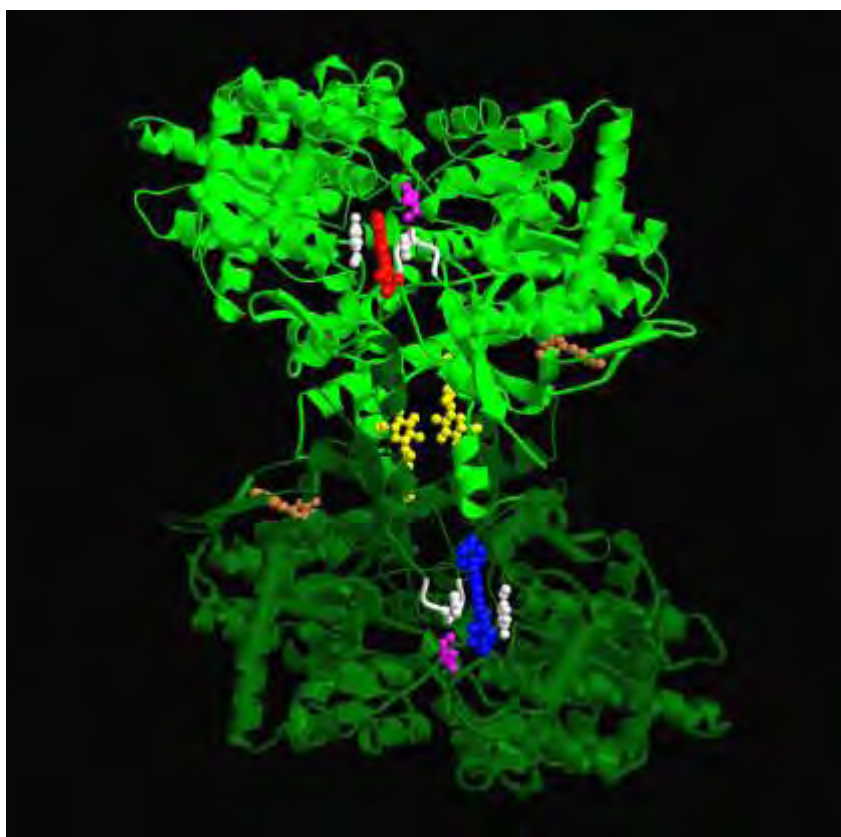
μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η *φωσφορυλάση* των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει 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 [Strayer, 2007].

2.3.2. Δομή

Η *GP* (απουσία τροποποιητών) είναι ένα διμερές αποτελούμενο από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kDa (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' ό,τι 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 δραστηριότητα του ενζύμου [Oikonomakos *et al.*, 1992].

Η *GP* είναι μια κλασική αλλοστερική πρωτεΐνη, η οποία υφίσταται σε δυο (ή τουλάχιστον δυο) τεταρτοταγείς διαμορφώσεις : T (μη ενεργός) και R (ενεργός). Η δομή της διμερούς *GPb* με τις 2 υπομονάδες και τα 5 αλλοστερικά κέντρα σύνδεσης φαίνεται στην **Εικόνα 12**. Το **καταλυτικό κέντρο** (κέντρο σύνδεσης του υποστρώματος-Glc-1-P και του αναστολέα-γλυκόζης) βρίσκεται στο κέντρο του μορίου. Στην T-διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση γίνεται μέσω ενός καναλιού πλάτους ~5 Å και μήκους ~15 Å, αλλά περιορίζεται (κυρίως) από το βρόχο 280s (αμινοξικής αλληλουχίας 282-287 (άσπρο). Το **κέντρο αναστολής** βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου (~12 Å) και απαρτίζεται από αμινοξέα με υδροφοβικά χαρακτηριστικά (Phe285 από το βρόχο 282-286 και Tyr613) (εδώ π.χ. συνδέεται η φλαβοπιριδόλη-επιστοιβάζεται μεταξύ των 2 αρωματικών αμινοξέων). Το **κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου** (μέσω του οποίου η *φωσφορυλάση* συνδέεται στα σωμάτια γλυκογόνου *in vivo*), βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, ~30 Å από το καταλυτικό και ~40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Το **νέο αλλοστερικό κέντρο** ή

κέντρο σύνδεσης indole-2-carboxamides βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς και απέχει ~15 Å από το αλλοστερικό, ~33 Å από το καταλυτικό και ~37 Å από το κέντρο αναστολής. Το **αλλοστερικό κέντρο** (κέντρο σύνδεσης του AMP), εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων και απέχει από το καταλυτικό κέντρο ~30 Å. Υπάρχουν λοιπόν 5 διαφορετικά κέντρα σύνδεσης, προσφέροντας έτσι πολλαπλές ευκαιρίες ρύθμισης του ενζύμου.

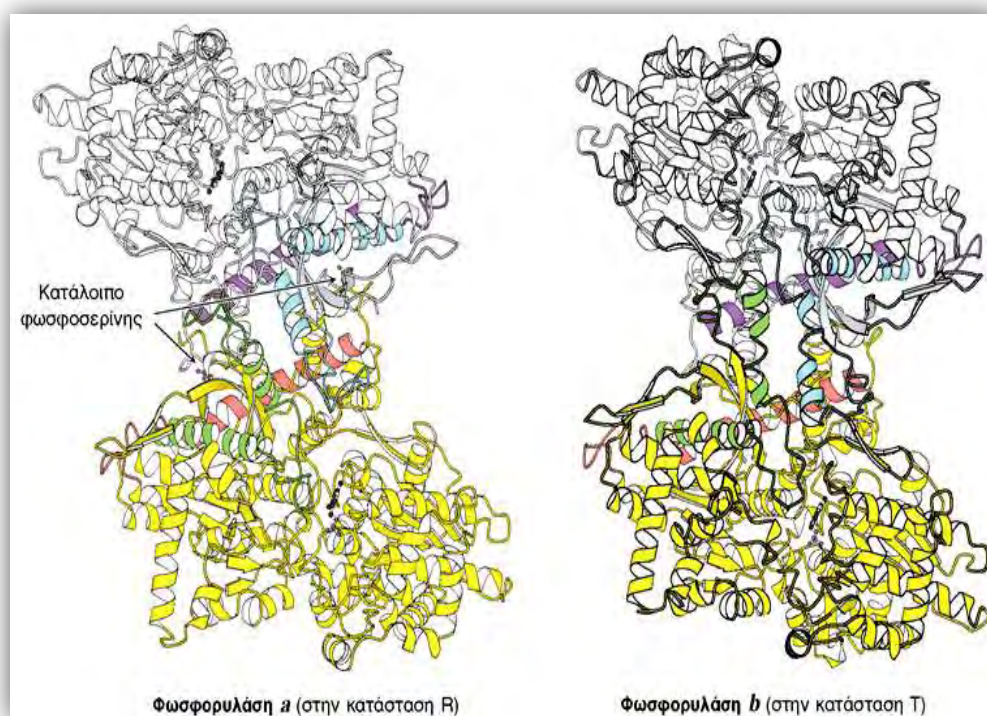


Εικόνα 12 : Απεικόνιση της δομής της φωσφορυλάσης γλυκογόνου, που αποτελεί στόχο για το σχεδιασμό αντι-υπογλυκαιμικών φαρμάκων, ως προς τον άξονα συμμετρίας 2ης τάξης. Η μία υπομονάδα απεικονίζεται με χρώμα ανοιχτό πράσινο και η άλλη με σκούρο πράσινο. Σημειώνονται οι θέσεις των επί μέρους κέντρων σύνδεσης του ενζύμου (καταλυτικού, αλλοστερικού, ανασταλτικού και νέου αλλοστερικού). Το καταλυτικό κέντρο, στο οποίο συνδέεται το υποστρώμα 1-φωσφορική γλυκόζη, το γλυκογόνο και τα φωσφορικά ιόντα ή ο αναστολέας γλυκόζη (χρώμα ματζέντα) βρίσκεται στο κέντρο της κάθε υπομονάδας. Στην ανενεργό διαμόρφωση του ενζύμου (T-διαμόρφωση) η πρόσβαση του υποστρώματος γλυκογόνου, από τον περιβάλλοντα διαλύτη, προς το καταλυτικό κέντρο γίνεται μέσω ενός καναλιού πλάτους ~5 Å και μήκους περίπου ~15 Å, αλλά η πρόσβαση περιορίζεται (κυρίως) από το βρόχο 280s (αμινοξικής αλληλουχίας 282-286) (χρώμα άσπρο). Το αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης του ενεργοποιητή AMP-χρώμα καφέ ή του αναστολέα aventis#21),

εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων και απέχει από το καταλυτικό κέντρο περίπου 30 Å. Το ανασταλτικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης είτε ενός παραγώγου της ινδουβίνης (χρώμα κόκκινο) στη μια υπομονάδα είτε ενός παραγώγου του ινδικού (χρώμα μπλε) εντοπίζεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου και σχηματίζεται από δυο αρωματικά αμινοξέα (Phe285-χρώμα άσπρο και Tyr613-χρώμα άσπρο). Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς και συνδέει ενώσεις όπως τα indole-2-carboxamides και η benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl urea (χρώμα κίτρινο). Η εικόνα σχεδιάστηκε με τα προγράμματα μοριακών γραφικών MolScript [Kraulis, 1991], BobScript [Esnouf, 1997] και Raster3D [Merritt and Bacon, 1997], [Oikonomakos *et al.*, 2006].

2.3.2. Αλλοστερική και ορμονική ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η GP των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b (Εικόνα 13). Μελέτες του Earl Sutherland έδειξαν ότι η GPb υπερισχύει στο μυ, σε κατάσταση ηρεμίας. Αλλά σε κατάσταση έντονης μυϊκής δραστηριότητας, η επινεφρίνη προκαλεί τη φωσφορυλίωση ενός ειδικού καταλοίπου Ser της GPb μετατρέποντάς την στην GPa [Lehninger, 2008].



Εικόνα 13 : Δομή της φωσφορυλάσης **a** και **b**. Η φωσφορυλάση **a** φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο Ser14 κάθε υπομονάδας. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη δομή της περισσότερο ενεργής R διαμόρφωσης. 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 υπάρχει κυρίως στην T διαμόρφωση.

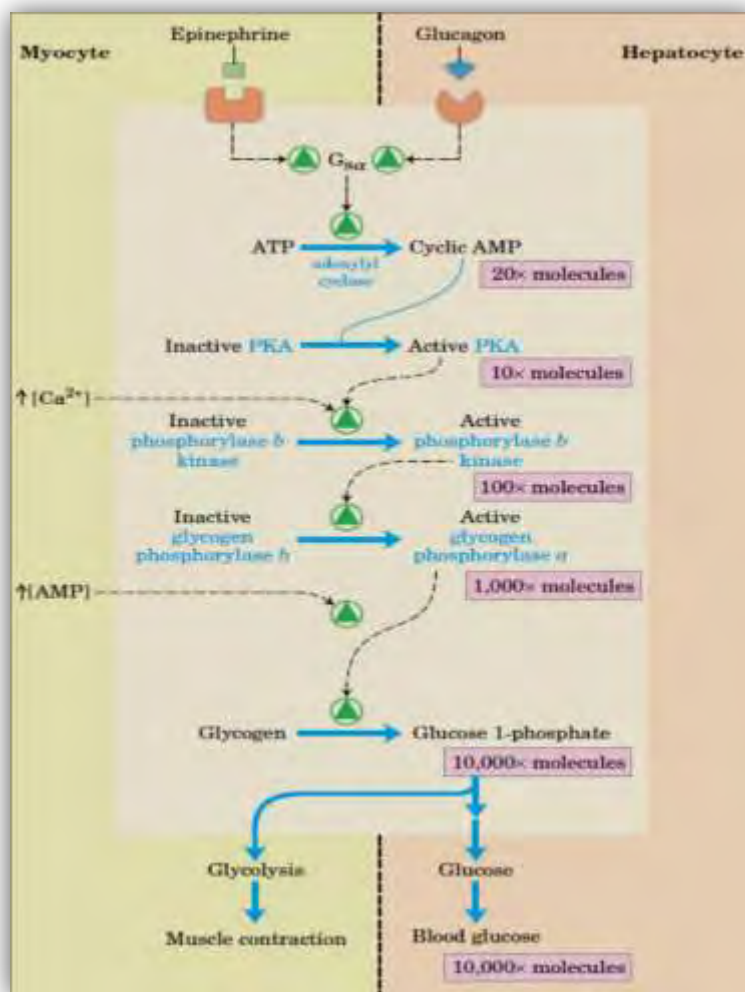
[http://www.chusa.jussieu.fr/disc/bio_cell/docs_Anim/P1%20Documents%20M%E9tabolisme/]

Το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης **b** είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της **GP** μέσω μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας στο κατάλοιπο της Ser, ενώ η ενεργοποίηση του ίδιου ενζύμου γίνεται από την επινεφρίνη ή την γλυκαγόνη (**Εικόνα 14**). Επιπλέον, ο Sutherland ανακάλυψε ότι η συγκέντρωση του δευτερογενούς μηνύματος, cAMP, αυξάνει ως απόκριση στη διέγερση της επινεφρίνης (στο μυ) ή της γλυκαγόνης (στο ήπαρ). Η υψηλή συγκέντρωση του cAMP σηματοδοτεί έναν ενζυμικό καταρράκτη. Πιο συγκεκριμένα, ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση **A** (**PKA**), η οποία είναι εξαρτώμενη από το cAMP. Η **PKA** έπειτα φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης **b**, που καταλύει τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων της Ser σε καθεμία από τις δύο ταυτόσημες υπομονάδες της **GP**. Η συγκεκριμένη διεργασία θα έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του γλυκογόνου προκειμένου να καλυφθούν οι ενεργειακές ανάγκες για τη σύσπαση του μυ. Στο ήπαρ, η χαμηλή συγκέντρωση της γλυκόζης του αίματος διεγείρει τη γλυκαγόνη που είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του γλυκογόνου και κατά συνέπεια για την απελευθέρωση της γλυκόζης. Η **GP** του μυ και του ήπατος είναι ισόενζυμα, δηλαδή κωδικοποιούνται από ίδια γονίδια, αλλά διαφέρουν στις ρυθμιστικές τους ιδιότητες. Στο μυ, στη ρύθμιση της φωσφορυλάσης με ομοιοπολική τροποποίηση, συμμετέχουν δύο αλλοστερικοί μηχανισμοί : **1)** Το Ca^{2+} αποτελεί σήμα για τη μυϊκή σύσπαση, συνδέεται στην κινάση της φωσφορυλάσης **b** και προωθεί τη μετατροπή της διάσπασης του ATP, **2)** Το AMP συνδέεται και ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση επιταχύνοντας έτσι την απελευθέρωση της G-1-P από το γλυκογόνο. Όταν τα επίπεδα του ATP είναι επαρκή το ATP μπλοκάρει την αλλοστερική θέση που συνδέεται το AMP απενεργοποιώντας έτσι τη φωσφορυλάση [Lehninger, 2008].

Όταν ο μυς επιστρέφει στην ηρεμία, ένα δεύτερο ένζυμο η φωσφατάση της φωσφοπρωτεΐνης **1** (**PPI**) αφαιρεί φωσφορικές ομάδες από την **GPa** μετατρέποντας

την στην ανενεργή μορφή της την *GPb*. Όπως στο μυ, έτσι και η φωσφορυλάση του ήπατος ρυθμίζεται τόσο ορμονικά (φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση) όσο και αλλοστερικά. Η αποφωσφορυλιωμένη μορφή είναι βασικά ανενεργή. Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης είναι χαμηλά στο αίμα, η γλυκαγόνη ενεργοποιεί την *κινάση της φωσφορυλάσης b*, η οποία με τη σειρά της μετατρέπει την *GPb* στην ενεργή της μορφή την *GPa* ξεκινώντας έτσι την απελευθέρωση της γλυκόζης στο αίμα.

Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος επιστρέψουν στα φυσιολογικά, η γλυκόζη εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα και συνδέεται στο ανασταλτικό (inhibitory), αλλοστερικό μέρος πάνω στην *GPa*. Αυτή η σύνδεση παράγει επίσης και μία αλλαγή στη διαμόρφωση καθώς εκθέτει τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα της Ser στην *PPI*, η οποία καταλύει την αποφωσφορυλίωσή τους και απενεργοποιεί τη φωσφορυλάση (**Εικόνα 14**). Το αλλοστερικό μέρος της γλυκόζης επιτρέπει στην *GP* του ήπατος να λειτουργεί σαν δικός της αισθητήρας γλυκόζης και να ανταποκρίνεται κατάλληλα στις αλλαγές της γλυκόζης και του αίματος [Lehninger, 2008].



Εικόνα 14 : Μηχανισμός δράσης της επινεφρίνης και της γλυκαγόνης. Με τη σύνδεση της επινεφρίνης και της γλυκαγόνης στους ειδικούς επιφανειακούς υποδοχείς των μυϊκών και ηπατικών κυττάρων αντιστοίχα, ενεργοποιείται η δέσμευση του GTP στην πρωτεΐνη G_{sa} . Η ενεργοποιημένη G_{sa} προκαλεί την αύξηση του cAMP που ενεργοποιεί την PKA. Η ενεργοποίηση της PKA έχει ως αποτέλεσμα ένα καταρράκτη φωσφορυλίωσης, όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα [Lehninger, 2008].

2.3.3. Κέντρα σύνδεσης της GP

Η GP έχει έξι κέντρα σύνδεσης :

1) Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

Το κέντρο αυτό είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή a στη μορφή b. Εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων. Κεντρικό ρόλο έχει η Ser 14, η οποία φωσφορυλιώνεται και 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 αλλά αμινοξέα και των 2 υπομονάδων. [Stryer, 2007]

2) 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 αποτελείται από 3 υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

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

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο, είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, G1P, Pi, SO₄²⁻), 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]

3) 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 *et al.*, 1992]

4) 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 μια σχισμή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας. Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί και ως κέντρο ρύθμισης, μιας και η κατάληψη του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

5) Το κέντρο αναστολής

Πρόκειται για ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου, σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (13-484 αα), καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (485-842 αα). Στην T διαμόρφωση, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού, που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχθεί ότι: πουρίνες όπως η αδενίνη, νουκλεοσίδια όπως η αδενοσίνη και η ινoσίνη, φωσφονουκλεοτίδια όπως το AMP, το IMP και το ATP, το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σωματίδια, συνδέονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής *GPa* και *GPb*, όχι όμως και στη ηπατική *GPa*, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

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. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

Η σύνδεση των αναστολέων με την πρωτεΐνη δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι, η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων [Sprang *et al.*, 1982].

6) Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δύο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της *GPb*. Σε αυτό συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδα καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοκυρανοζυλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της *GPb*. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της *GPa* [Oikonomakos *et al.*, 2002].

2.4. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Ο διαβήτης τύπου II, όπως έχει ήδη αναφερθεί, χαρακτηρίζεται από τη μη φυσιολογική έκκριση της ινσουλίνης και / ή την αντίσταση στην ινσουλίνη. Ανεπαρκής δράση της ινσουλίνης στο ήπαρ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής της ηπατικής γλυκόζης, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα [Oikonomakos *et al.*, 2008]. Ο έλεγχος των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος είναι βασικός στόχος για τους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και αυτός είναι και ο λόγος που συνταμογραφούνται σε αυτούς υπογλυκαιμικά δισκία. Παρά την αφθονία, όμως, των υπογλυκαιμικών φαρμάκων (σουλφονουλουρίες, διγουανιδίνες, θειαζολιδινεδιόνες και αναστολείς της α- γλυκοσιδάσης), οι θεραπείες που ακολουθούνται αποδεικνύονται ανίκανες να επιτύχουν την αποτελεσματική μείωση των διαβητικών επιπλοκών, ενώ σε μερικούς ασθενείς μπορεί να παρουσιαστούν και παρενέργειες [Treadway *et al.*, 2001]. Έτσι, επιτακτική είναι η ανάγκη αναζήτησης νέων θεραπευτικών μηχανισμών, όπως για παράδειγμα η μελέτη αναστολέων της παραγωγής της ηπατικής γλυκόζης.

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II καθώς είναι ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Μια μοριακή προσέγγιση στοχεύει στη μείωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ με αναστολή της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP). Καθώς η *GP* είναι ένα ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση της γλυκόζης χρησιμοποιείται ως 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 της φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos *et al.*, 2002].

Μια άλλη προσέγγιση για τη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα είναι τα διάφορα φυσικά εκχυλίσματα (π.χ. εκχυλίσματα ροδιού, σταφυλιού). Ευρύτερος στόχος αυτής της προσέγγισης είναι η δημιουργία βιολειτουργικών προϊόντων, με φυσικά συστατικά, ώστε οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II να μπορούν να ελέγξουν τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματός τους με διάφορες τροφές, αποφεύγοντας την επίπονη διαδικασία της χορήγησης ενέσιμης ινσουλίνης.

Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της *GP* του οργανισμού (ηπατικής, μυϊκής, του εγκεφάλου), 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].

3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

3.1. Αργές ενζυμικής κινητικής

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, όπως διατυπώθηκε κυρίως από τους Michaelis-Menten, ασχολείται με τη μέτρηση χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου: V_{\max} , K_m και με την μέτρηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι: η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεων, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

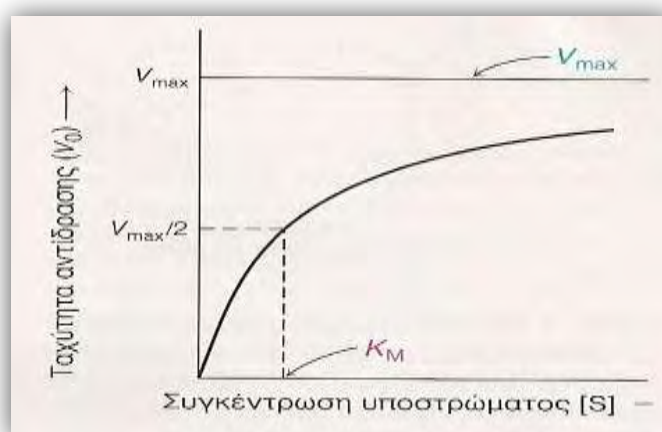
Η ενεργότητα ενός ενζύμου, E , εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, η ταχύτητα, V , ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος, S , που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων, P , που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου και υπολογίζεται από την **εξίσωση Michaelis-Menten**:

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

Όπου V_0 η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{max} η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε και K_m η σταθερά Michaelis :

$$K_m (\text{σταθερά Michaelis}) = k_1 + k_3/k_2$$

Από την εξίσωση **Michaelis-Menten** προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας, V_0 , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, είναι μια ορθογώνια υπερβολή (**Εικόνα 15**). Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, $V_0=k[S]$), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητικής μηδενικής τάξεως, $V_0=k$) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας, V_{max} . Η **σταθερά Michaelis** είναι η συγκέντρωση υποστρώματος, στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Έτσι έχουμε μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.



Εικόνα 15 : Κινητική Michaelis-Menten. Ένα διάγραμμα της ταχύτητας (V_0) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$, για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα (V_{max})

προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά Michaelis (K_m) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με $V_{max}/2$ [Stryer, 2007].

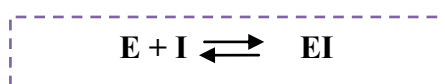
Οι καταλυτικές σταθερές K_m και V_{max} είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή K_m είναι σταθερά για ένα ένζυμο με ένα ορισμένο υπόστρωμα κάτω από καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, εκφράζεται ως συγκέντρωση και συνήθως κυμαίνεται σε 10^{-1} με 10^{-7} M. Αντίθετα η V_{max} εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και γι αυτό εκφράζεται ως ταχύτητα σχηματισμού P ανά μονάδες ενζύμου (π.χ. $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ πρωτεΐνης).

Μια πολύ χρήσιμη σταθερά είναι ο αριθμός ανακύκλωσης δηλαδή η k_{cat} , που ορίζεται ως $k_{cat}=V_{max}/[E_T]$. Η k_{cat} αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό moles υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου σε συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε sec^{-1} . Η $k_{cat} = k_3$ όταν $[S] \gg K_m$ και έχει τιμές που κυμαίνονται ανάμεσα στο $1-10^7$. Τέλος η σταθερά εξειδίκευσης, k_{cat}/K_m ο λόγος δύο σταθερών, εκφράζεται σε $M^{-1} \text{sec}^{-1}$ και είναι ενδεικτική της αποδοτικότητας του ενζύμου.

3.2. Αναστολείς ενζυμικών αντιδράσεων

Όταν μια ουσία προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζεται αναστολέας. Ένας αναστολέας μπορεί να είναι αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός. Αντιστρεπτός είναι ο αναστολέας που μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα (με διαπίδυση λ.χ.) και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά την δραστηριότητά του. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο ενεργού, και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Ο αναστολέας σε αυτή την περίπτωση δεσμεύεται συνήθως με ομοιοπολικό δεσμό και δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπια μέσα όπως είναι η διαπίδυση.

Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, έτσι, ώστε να αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας όπως στη σχέση:



I είναι ο αναστολέας και *EI* το σύμπλοκο ενζύμου αναστολέα.

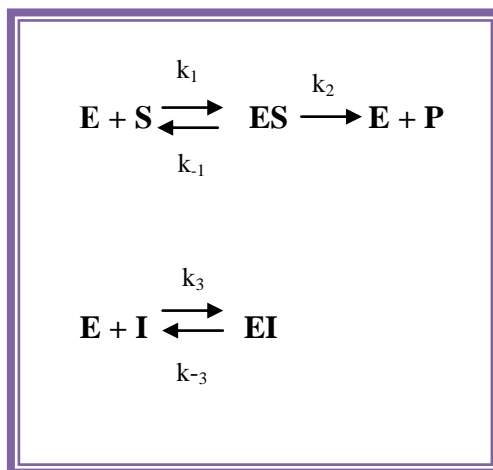
Η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου *EI* ή με άλλα λόγια, η σταθερά της αμφίδρομης πιο πάνω αντίδρασης, δίνει την σχέση:

$$K_i = \frac{[EI]}{[E][I]}$$

Η σταθερά Michaelis K_m αποτελεί μέτρο της αγχιστείας ή της συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα, η σταθερά K_i είναι το αντίστροφο της αγχιστείας του ενζύμου αναστολέα.

3.2.1. Συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition)

Εάν ο αναστολέας *I* δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση στο υπόστρωμα *S*, τότε τα *I* και *S* συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός. Το σχήμα των αντιδράσεων στο σύστημα θα έχει ως εξής:



Σχήμα 7: Τρόποι δράσης αναστολέων

Από την σχέση $[E] = [E]_t - [ES]$ βλέπουμε ότι η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου $[E]$ είναι ίση με τη συγκέντρωση του ολικού ενζύμου $[E]_t$ μείον τη συγκέντρωση του ενζύμου που είναι δεσμευμένο με το υπόστρωμα $[ES]$. Στην περίπτωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα θα αναγκαστούμε να ελαττώσουμε τη

συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου και κατά το ποσό που είναι ενωμένο με τον αναστολέα I, δηλαδή

$$[E] = [E]_t - [ES] - [EI]$$

Η εξίσωση **Michaelis - Menten** στο σύστημα με συναγωνιστική αναστολή είναι της μορφής :

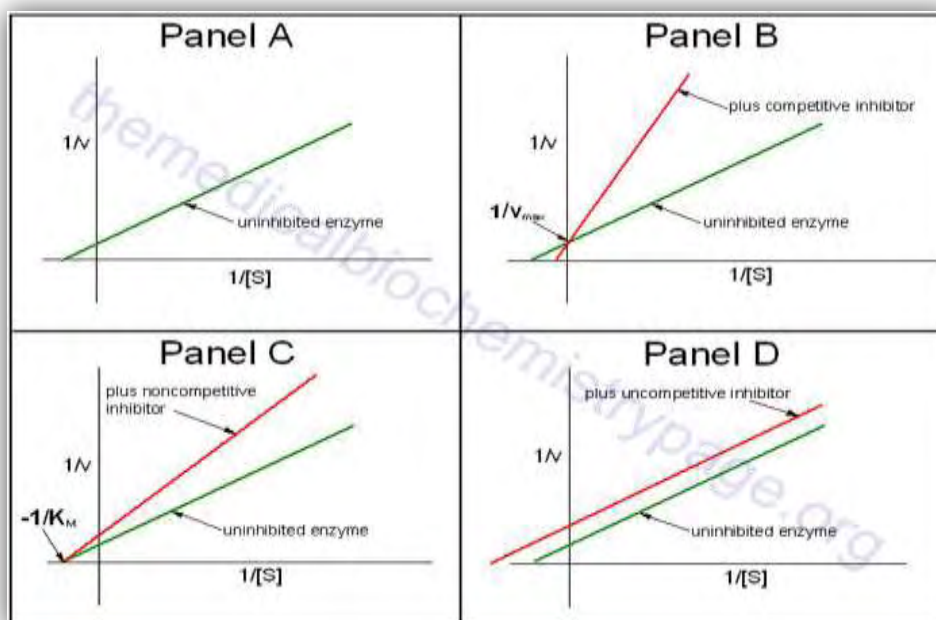
$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m([I]K_i + 1)}$$

Παρατηρούμε ότι η μέγιστη ταχύτητα V_{max} δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της **σταθεράς Michaelis** μεγαλώνει κατά το ποσό $([I]K_i + 1)$. Όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι μηδέν, ή όταν η σταθερά K_i που ορίζεται ως η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI, είναι πολύ μικρή, δηλαδή υπάρχει μικρή αγκιστεία μεταξύ ενζύμου και αναστολέα, δεν φανερώνεται η αναστολή, με αποτέλεσμα η K_m να είναι φυσιολογική. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι τόσο μεγάλη, δηλαδή η $[S]$ πάει να πάρει την τιμή που μας δίνει η μέγιστη ταχύτητα, ώστε ο όρος K_i να γίνεται πάλι μηδαμινός, με αποτέλεσμα η φυσιολογική V_{max} να μη μεταβάλλεται. Λόγω λοιπόν της μορφής του παρονομαστή στην εξίσωση, η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα, δηλαδή η τιμή της $[I]$, είναι ψηλή ή όταν η τιμή της $[S]$ είναι χαμηλή. Αντίθετα, η αναστολή εξαφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι πολύ χαμηλή ή όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ ψηλή [Γεωργάτσος Ι. Γ. 2001].

Εκτός από την συναγωνιστική αναστολή υπάρχουν:

1. **Μη συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition)** στην οποία αντί ο αναστολέας να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ένζυμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή.
2. **Μικτή αναστολή (mixed inhibition)** σε αυτούς τους αναστολείς οι σταθερές **διαστάσεως** του S από το ES διαφέρουν με εκείνη του S από το EIS. Έτσι οι K_m και η V_{max} μεταβάλλονται.

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



Εικόνα 16 : Οι συναγωνιστικοί αναστολείς αυξάνουν την κλίση της καμπύλης σε ψηλότερες τιμές $1/v$ χωρίς όμως να μεταθέτουν το σημείο τομής στην τεταγμένη. Για αυτό η μεν V_{max} παραμένει σταθερή ενώ η K_m αυξάνεται.

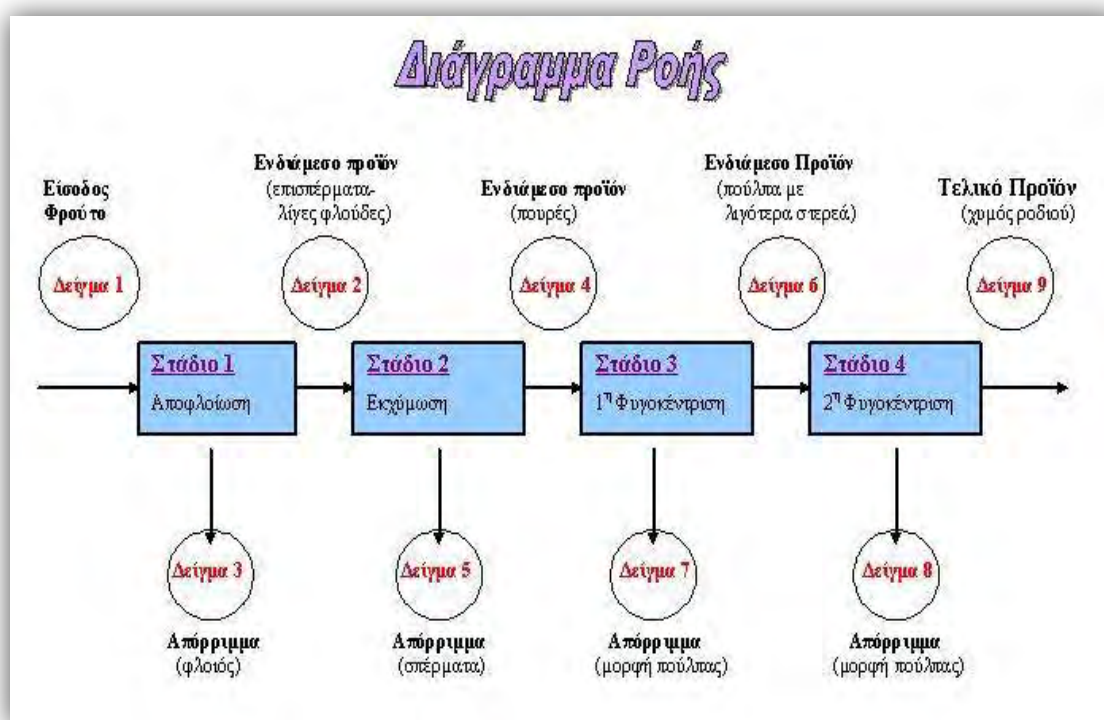
4. ΡΟΔΙΑ

4.1. Γενικά

Η ροδιά (*Punica granatum*) ανήκει στην οικογένεια των Punicaceae και είναι ένα ελκυστικό δέντρο που μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 5 μέτρα. Ο καρπός της ροδιάς έχει ένα σκληρό δερματώδες περίβλημα που αναφέρεται ως φλοιός ή περικάρπιο και το μέσο βάρος των καρπών της είναι 200-400 gr. Το εσωτερικό του καρπού είναι χωρισμένο σε διαμερίσματα, από μεμβρανώδη τοιχώματα (carpels) και λευκή σπογγώδη ψίχα. Οι προκύπτουσες κοιλότητες συσκευάζονται με 600 έως 800 σάκους ή arils, καθένα από τα οποία περιέχει ένα σπόρο και ζουμερό πολτό. Συμβατικοί χυμοί ροδιού προέρχονται συνήθως από 45 έως 65% ενός ροδιού [El-Nemr *et al.*, 1990].

4.2. Παραπροϊόντα γυμοποίησης ροδιού

Για να δώσει ο καρπός υψηλής ποιότητας χυμό θα πρέπει να συλλεχθεί στο κατάλληλο στάδιο ωρίμασης. 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 φυγοκεντρούνται 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 [Nagy *et al.*, 1993].



Εικόνα 17 : Διαδικασία παραγωγής εκχυλισμάτων ροδιού

4.3. Ποικιλία ροδιών Wonderful

Η ποικιλία ροδιών Wonderful καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στην Καλιφόρνια το 1896, αλλά πλέον είναι μια από τις πιο διαδεδομένες ποικιλίες ροδιών και καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο. Η ποικιλία Wonderful φέρει μεγάλους μωβ και κόκκινους καρπούς μεσαίου πάχους, διαθέτει σκληρό δέρμα και μία σάρκα χρώματος βυσσινί που χαρακτηρίζεται για την πολύ ζουμερή και οξύ γεύση της [McCutcheon *et al.*, 2008].

Όσον αφορά την ωρίμαση, η συγκεκριμένη ποικιλία ωριμάζει στα τέλη Σεπτεμβρίου – με αρχές Οκτώβριου σε περιοχές με ήπιο κλίμα. Σε βόρειες περιοχές η ωρίμαση είναι πιο όψιμη και μπορεί να κυμανθεί από αρχές Οκτωβρίου έως αρχές Νοεμβρίου, ενώ μπορεί και προσαρμόζεται σε διάφορα περιβάλλοντα. Δυστυχώς, σε περιοχές με ψυχρό κλίμα ο καρπός δεν προλαβαίνει να ωριμάσει εγκαίρως και με τους πρώιμους παγετούς του χειμώνα εμφανίζεται έντονο σκάσιμο στους καρπούς κάτι που τους κάνει μη εμπορεύσιμους για νωπή κατανάλωση, παρά μόνο για μεταποίηση.

Σήμερα, η καλλιέργεια της ροδιάς στην Ελλάδα έχει φτάσει τα 20.000 στρέμματα. Τα τελευταία χρόνια σε πολλούς νομούς της Ελλάδας (Αργολίδας, Ξάνθης, Ηλείας, Λακωνίας Μεσσηνίας, Πέλλας, Λάρισα, Σέρρες) έγιναν αρκετές φυτεύσεις νέων φυτειών ροδιάς της ποικιλίας Wonderful, που είναι κατάλληλη για παραγωγή χυμών.



Εικόνα 18 : Καρποφορία της ποικιλίας Wonderful στο στάδιο ωρίμασης. Ξάνθη, 10 Οκτωβρίου 2012.

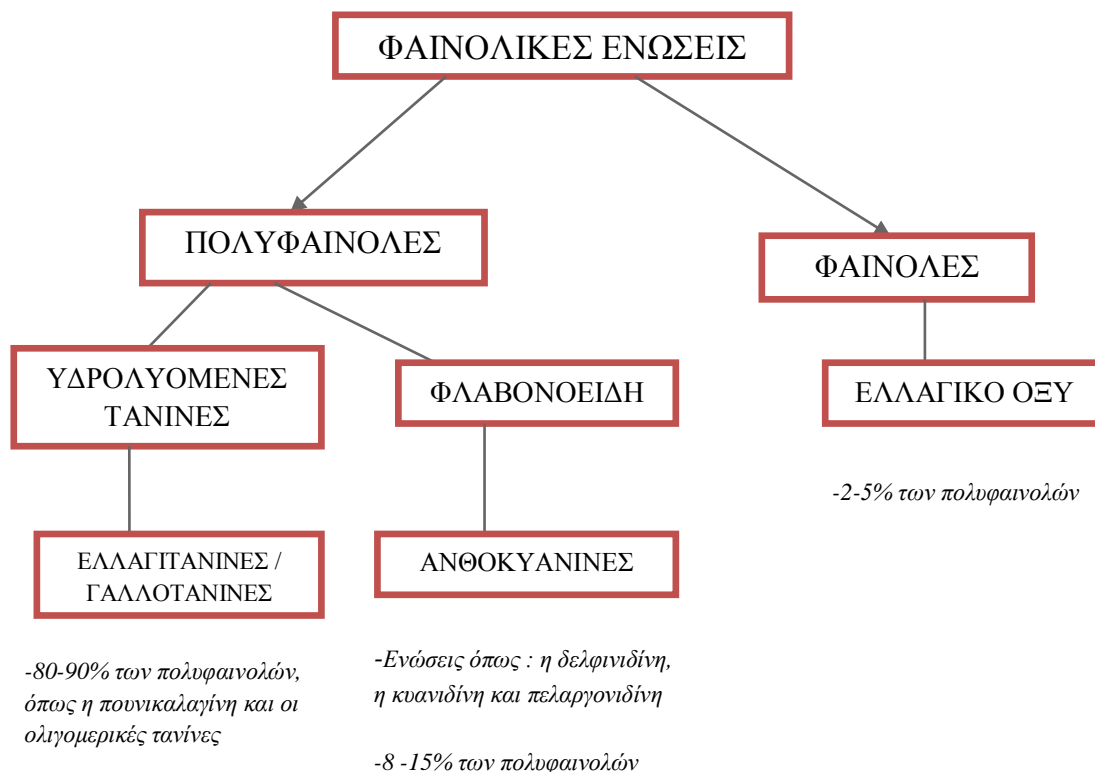
Διατροφικές πληροφορίες και σύσταση της ποικιλίας Wonderful : 240ml χυμό αυτής της ποικιλίας καλύπτει το 6% της Συνιστώμενης Ημερήσιας Πρόσληψης (ΣΗΠ) της βιταμίνης Β6 και ριβοφλαβίνης, 4% ΣΗΠ για βιοτίνη, νιασίνη, παντοθενικό οξύ και 2% ΣΗΠ για θειαμίνη. Αποτελεί πολύ καλή πηγή ανόργανων στοιχείων και κυρίως του καλίου (15% ΣΗΠ) αλλά και των : μαγγάνιο (8% ΣΗΠ), μαγνήσιο (4% ΣΗΠ), ασβέστιο, σίδηρο, ψευδάργυρο (2% ΣΗΠ) [αδημοσίευτα δεδομένα της POM Wonderful, 2007]. Επίσης, βρέθηκε ότι ο χυμός των Wonderful αποτελείται από νερό 85,4%, 10,6% συνολικά σάκχαρα, 1,4% πηκτίνη, 0,2-1,0% πολυφαινόλες και οργανικά οξέα. Άλλες δευτερεύουσες ενώσεις που έχουν βρεθεί είναι : λιπαρά οξέα, στερόλες, τριτερπενοειδή και α-τοκοφερόλη.

Nutrition Facts	
Serving Size 8 fl oz (240 mL)	
Servings Per Container _____	
Amount Per Serving	
Calories 150	Calories from Fat 0
% Daily Value *	
Total Fat 0g	0%
Saturated Fat 0g	0%
Trans Fat 0g	
Cholesterol 0mg	0%
Sodium 0mg	0%
Potassium 520mg	15%
Total Carbohydrate 40g	13%
Dietary Fiber 0g	0%
Sugars 32g	
Protein < 1g	
Vitamin A 0%	• Vitamin C 0%
Calcium 2%	• Iron 2%
Thiamin 2%	• Riboflavin 6%
Niacin 4%	• Vitamin B6 6%
Biotin 4%	• Pantothenic Acid 4%
Phosphorus 2%	• Magnesium 4%
Zinc 2%	• Manganese 8%
* Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet. Your calorie needs may be higher or lower depending on your calorie needs:	
	Calories: 2,000 2,500
Total Fat	Less than 65g 80g
Sat Fat	Less than 20g 25g
Cholesterol	Less than 300mg 300mg
Sodium	Less than 2,400mg 2,400mg
Potassium	3,500mg 3,500mg
Total Carbohydrate	300g 375g
Dietary Fiber	25g 30g

Είκονα 19 : Συνοπτική παρουσίαση της διατροφικής αξίας του χυμού της ποικιλίας Wonderful [McCutcheon *et al.*, 2008].

Οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για την ποιότητα του χυμού του ροδιού, ενώ αποτελούν από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά της φύσης. Προστατεύουν τον

οργανισμό από τις “ελεύθερες ρίζες”, οι οποίες συνδέονται με καρδιαγγειακές ασθένειες, τον καρκίνο καθώς και με τη γήρανση. Η σύσταση σε φαινολικές ουσίες φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 8 :



Σχήμα 8 : Περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις σε 100% χυμό ρόδι [McCutcheon *et al.*, 2008].

Αν και όλα τα μέρη του φρούτου περιέχουν πολυφαινόλες, το περικάρπιο (φλούδες και μεμβράνη) φαίνεται να περιέχει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, σε ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε ρόδια της ποικιλίας Wonderful, σε όλα τα στάδια παραγωγής των εκχυλισμάτων αυτής της ποικιλίας, βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα για τη συγκέντρωση των πολυφαινολών (βλ.Πίνακα 3,Εικόνα 17).

Μονομερείς Πολυφαινόλες	Συγκέντρωση Μονομερών Πολυφαινόλων (mg/ξηρού βάρους εκχυλίσματος)								
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Δείγμα 7	Δείγμα 8	Δείγμα 9
Π-κουμαρικό οξύ - Ελλαγικό οξύ	98,37	298,98	167,74	253,08	238,52	434,90	189,82	269,04	494,12
Χλωρογενικό οξύ	48,99	49,25	48,76	47,69	48,43	48,11	47,73	47,86	47,67
Κατεχίνη	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ								
Κερκετίνη	33,61	37,25	35,76	34,42	40,53	36,91	34,24	35,58	34,67
Επικατεχίνη	65,41	38,21	36,38	47,99	58,42	66,65	58,24	40,74	42,96
Τρανσ-ρεσβερατρόλη	44,94	44,99	44,76	44,77	44,79	45,47	44,94	45,15	45,77
Φλοριζίν (phlorizin)	36,94	40,78	33,59	32,98	33,84	34,19	33,30	32,58	33,32
Προτοκατεχικό οξύ	75,84	62,18	52,40	66,05	47,28	48,65	40,42	64,29	44,04
Γαλλικό οξύ	181,76	149,47	150,02	143,76	135,47	148,80	134,52	136,96	138,79
Κορεϊκό οξύ	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ								
Φερουλικό οξύ	45,96	46,93	45,89	45,84	48,63	46,15	45,91	45,61	46,20
Ρουτίνη	93,78	101,76	117,54	91,33	124,29	97,016	93,12	88,92	95,05

Πίνακας 2 : Συγκεντρώσεις μονομερών πολυφαινόλων (mg/ξηρού βάρους εκχυλίσματος) που απαντώνται στα διάφορα παραπροϊόντα χυμοποίησης της ποικιλίας Wonderful (βλ. Εικόνα 17).

4.4. Φαρμακευτική δράση του ροδιού

Οι καρποί της ροδιάς, αλλά και οι σπόροι της, ο φλοιός και τα άνθη της χρησιμοποιούνται για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Παραδοσιακά η ροδιά χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των γαστρεντερικών παθήσεων και προσβολών από τα παράσιτα. Τα τελευταία χρόνια η ροδιά είναι το αντικείμενο της επιστημονικής έρευνας, επειδή θεωρείται σαν ένας προστατευτικός παράγοντας έναντι διαφόρων ασθενειών.

Επιπλέον, πολλά στοιχεία καταδεικνύουν τα εκχυλίσματα του ροδιού έχουν αντι-μικροβιακές, αντι-παρασιτικές, αντι-ικές και αντι-καρκινικές ιδιότητες. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως [Li *et al.*, 2005]. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι το ρόδι παρουσιάζει:

✓ Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες και ιδιαίτερα στην πουνικαλαγίνη (βλ. **Σχήμα 8**). Σε αυτό το μόριο, που

υπάρχει σε αφθονία στο ρόδι, οφείλεται > 50% της αντιοξειδωτικής δράσης, ενώ ξεπερνά τα επίπεδα του 2 g/L του χυμού [Gil *et al.*, 2000]. Ο χυμός του ροδιού περιέχει μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο και κατά συνέπεια μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με άλλους χυμούς φρούτων όπως: σταφύλι, cranberry, πορτοκάλι και μήλο κ.α. [Rosenblat *et al.*, 2006], ενώ ο χυμός της ποικιλίας Wonderful αποδείχθηκε ότι είναι 100 φορές πιο αντιοξειδωτικός από το χυμό βατόμουρου και 300 φορές πιο ισχυρό από το χυμό σταφυλιών.

✓ Αντικαρκινική δράση

Έχει αποδειχθεί ότι τα εκχυλίσματα του ροδιού και ιδιαίτερα οι ελλαγιτανίνες (ETs) που περιέχουν αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ενός καρκινικού κυττάρου και την απόπτωσή του, μέσω της διαφοροποίησης των κυτταρικών παραγόντων μεταγραφής και σηματοδότησης των πρωτεϊνών. Η κατανάλωση του χυμού του ροδιού:

- επιβραδύνει την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη [Seeram *et al.*, 2007]
- αναστέλλει των πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου και του προστάτη (in vitro μελέτες) [Seeram *et al.*, 2005].

Ενώ τα εκχυλίσματα του ροδιού παρουσιάζουν :

- προστατευτική δράση ενάντια στις ακτίνες UVA και UVB [Adhami *et al.*, 2010]
- αναστολή της καρκινογένεσης στους πνεύμονες σε ποντίκια, ενώ παρουσιάζουν χημειοπροστατευτική δράση όσον αφορά τον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα [Khan *et al.*, 2007]

✓ Προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών ασθενειών

Η κατανάλωση χυμού ροδιού μπορεί να μειώσει τη συστολική πίεση του αίματος, έτσι παρεμποδίζεται η ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και κατά συνέπεια μειώνεται ο κίνδυνος ανάπτυξης της στεφανιαίας νόσου [Stowe, 2011].

Ο χυμός ροδιού της ποικιλίας Wonderful καθώς και των εκχυλισμάτων έχει σημαντική αντιθηρωματική δράση σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II.

Αυτό εκδηλώνεται από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές του στον ορό και στα μακροφάγα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην καθυστέρηση εμφάνισης της αθηροσκλήρωσης [Rosenblat *et al.*, 2006].

✓ Αντι-διαβητική δράση

Πολλές έρευνες αποκαλύπτουν ότι ο χυμός ροδιού καθώς και τα εκχύλισμα του (φλούδες, άνθη και σπόροι) είναι δυνατόν να αποτελέσουν θεραπεία για το διαβήτη τύπου II [Banihani *et al.*, 2013]. Είναι αλήθεια ότι συμβατικά οι διαβητικοί ασθενείς αποφεύγουν τους χυμούς που περιέχουν ζάχαρη, διότι η κατανάλωσή τους επιδεινώνει τα συμπτώματά τους. Παρ' όλα αυτά, ο χυμός του ροδιού δεν αυξάνει τη γλυκόζη του ορού, σε διαβητικούς ασθενείς, ούτε τα επίπεδα της HbA1c, αν και έχει παρόμοιο γλυκαιμικό δείκτη με άλλους χυμούς φρούτων [Rosenblat *et al.*, 2006].

Το οξειδωτικό στρες, η αλλαγή στα επίπεδα των λιπιδίων και οι διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη αλλά και καρδιαγγειακών ασθενειών, καρκίνο κτλ. Η αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στο διαβήτη θα μπορούσε να οφείλεται σε αύξηση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, η οποία κατά την αυτοοξείδωση της παράγει ελεύθερες ρίζες [Yadav *et al.*, 1997]. Τα εκχύλισμα του ροδιού καθώς και τα ενεργά συστατικά του μπορούν να επηρεάσουν το διαβήτη τύπου II κυρίως με το να ανταγωνίζονται τις βλαβερές συνέπειες των ROS (Reactive oxygen species). Ένας τέτοιος μηχανισμός μπορεί να συμβεί άμεσα ή έμμεσα, με την αύξηση της δραστηριότητας ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων [Banihani *et al.*, 2013].

Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια και αρουραίους αποδείχθηκε ότι τα διάφορα κλάσματα του ροδιού παρουσιάζουν διαφορετικές αντιδιαβητικές δράσεις. Ας μελετήσουμε τις δράσεις κάθε κλάσματος του ροδιού ξεχωριστά:

○ **Εκχύλισμα από άνθη ροδιάς (Extract of Pomegranate Flowers, PEF)**

Η θεραπεία με PEF επηρεάζει κάποιους μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων [Huang *et al.*, 2005]. Οι ενεργοποιητές του μεταγραφικού παράγοντα PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor) χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II, επειδή αυξάνουν την ευαισθησία της ινσουλίνης με τους υποδοχείς της. Παρομοίως,

τα PEF παρουσιάζουν αντιδιαβητική δράση λόγω της αυξημένης δραστηριότητας του PPAR- γ και κατά συνέπεια μειώνονται τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος [Banihani *et al.*, 2013]. Η ενεργοποίηση του PPAR- γ μπορεί να οφείλεται στη παρουσία του γαλλικού οξέος στο PEF [Sanae *et al.*, 2003]. Το γαλλικό οξύ είναι ένα φαινολικό οξύ, που είναι άφθονο στα φυτά και είναι γνωστό για τον αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδη χαρακτήρα του [Kroes *et al.*, 1992].

Επιπροσθέτως, η χορήγηση PEF σε ποντίκια βελτίωσε, εν μέρει, τη μεταγευματική υπεργλυκαιμία στο διαβήτη τύπου II καθώς και την παχυσαρκία, δράση που οφείλεται στην απενεργοποίηση της α -γλυκοσιδάσης. Η α -γλυκοσιδάση, που βρίσκεται στο έντερο, αποτελεί ένα ένζυμο κλειδί για την πέψη των υδατανθράκων. Οι αναστολείς της α -γλυκοσιδάσης μπλοκάρουν τη δράση του ενζύμου στο λεπτό έντερο, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση των ολιγοσακχαριτών και δισακχαριτών σε μονοσακχαρίτες. Τα οφέλη που παρουσιάζουν οι αναστολείς της α -γλυκοσιδάσης σχετίζονται με μειώσεις τόσο στα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης όσο και στο συνολικό φάσμα των μεταγευματικών επιπέδων της γλυκόζης [Li *et al.*, 2005].

- ***Εκχυλίσματα σπορίων του ροδιού***

Τα εκχυλίσματα σπορίων του ροδιού μελετήθηκαν για την υπογλυκαιμική τους δράση. Χορήγηση τέτοιων εκχυλισμάτων (300 και 600 mg/kg) σε αρουραίους έδειξε ότι υπάρχει μείωση του επιπέδου της γλυκόζης του αίματος από 47% και 42%, αντίστοιχα, μετά από 12 ώρες [Das *et al.*, 2001].

- ***Υδατικό εκχύλισμα του φλοιού του ροδιού***

Το υδατικό εκχύλισμα του φλοιού του ροδιού (200mg/kg) μειώνει τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης στον ορό καθώς και την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Lipid Peroxidation, LPO) στους ιστούς της καρδιάς, του ήπατος και των νεφρών [Parmar *et al.*, 2008].

- ***Έλαιο από σπόρους ροδιού (Pomegranate Seed Oil ,PSO)***

Η κατανάλωση του PSO (πλούσια σε λινολενικό οξύ) μείωσε το σωματικό βάρος των ποντικών, με βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Επιπλέον, η ίδια μελέτη έδειξε ότι οι ποντικοί που ήταν παχύσαρκοι και στους οποίους χορηγήθηκε

PSO, είχαν υψηλότερα επίπεδα της λεπτίνης και χαμηλότερα επίπεδα της αδιπονεκτίνης¹ συγκριτικά με τα ποντίκια που δεν τους χορηγήθηκε PSO [McFarlin *et al.*, 2009].

Τέλος, τα *εκχυλίσματα του ροδιού καθώς και το ελλαγικό οξύ* ήταν ικανά να μειώσουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της ρεζιστίνης², πιθανώς ενισχύοντας την αποικοδόμηση της ρεζιστίνης σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

¹ ορμόνη που εμπλέκεται στον καταβολισμό και στη ρύθμιση της γλυκόζης

² ένα πεπτιδικό μόριο σηματοδότησης, εκκρίνεται από αδιποκύτταρα και η σύνθεσή της επάγεται κατά τη διάρκεια της αδιπογένεσης (η διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα). Μελέτες έδειξαν ότι πιθανότατα υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και της συγκέντρωσης της ρεζιστίνης. Έτσι, η ρεζιστίνη θεωρήθηκε ως ο συνδετικός κρίκος μεταξύ παχυσαρκίας και διαβήτη τύπου II.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού

Για την απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού χρησιμοποιείται τροποποιημένη η μέθοδος Fischer & Krebs (1962). Συγκεκριμένα, αντί L-κυστεΐνης χρησιμοποιείται 2-μερκαπτο-αιθανόλη ως αναγωγικός παράγοντας σε όλα τα στάδια της πορείας καθαρισμού.

ΥΛΙΚΑ

- 3 κουνέλια
- Απιονισμένο H₂O
- Οξινο ανθρακικό κάλιο, MB=100.12
- 2-μερκαπτο-αιθανόλη, MB=78.3
- EDTA, MB=372.24
- Οξικό οξύ 99-100%, MB=60.05
- β-γλυκερινοφωσφορικό νάτριο 0.005M, MB=306.12
- 5'-φωσφορική αδενοσίνη, MB=367.2
- Τρίς-(υδροξυμεθύλο)-αμινομεθέριο, MB=121.1
- Οξικό μαγνήσιο, MB=214.46
- Θεϊκό αμμώνιο, MB=132.14
- C₃H₈O₃ - Γλυκερόλη 100%
- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης. Πριν από τη χρήση τους υφίστανται κατεργασία με 1% Na₂CO₃ και 10mM EDTA στους 100°C (30 min) και στη συνέχεια έκπλυση με απεσταγμένο ύδωρ 100°C (30 min).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου, 50:50:1, pH=6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃),
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N (CH₃COOH)
- Διάλυμα θεϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% (NH₄)₂SO₄

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρεις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH 7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH 7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH 7.0
- Διάλυμα οξικού μαγνησίου 1.0M ((CH₃COO)₂Mg)

ΟΡΓΑΝΑ

- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο
- Πεχάμετρο
- Αναλυτικός ζυγός
- Χρονόμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Αντλία κενού Buchner
- Συσκευή Vortex
- Χειροκίνητη κρεατομηχανή

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Βήμα 1^ο → Παραλαβή μυϊκού εκχυλίσματος

Αρχικά, αφαιρούνται οι σκελετικοί μύς από 3 κουνέλια, αλέθονται με χειροκίνητη κρεατομηχανή και ζυγίζονται. Ο κιμάς που προκύπτει εκχυλίζεται 3 φορές με απιονισμένο ύδωρ και συλλέγεται εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες εκχυλίσεις πραγματοποιούνται με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Τέλος, το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2^ο → Όξινη καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Στη συνέχεια, ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Παρατηρείται αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C με χρήση μεγάλης κεφαλής. Το υπερκείμενο συλλέγεται και διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Το διάλυμα ογκομετρείται και ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο KHCO_3 .

Βήμα 3^ο → **Καταβύθιση του ενζύμου με θειϊκό αμμώνιο (90%)**

Το ένζυμο καταβυθίζεται με διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L πρωτεϊνικού διαλύματος. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, ο μεγαλύτερος όγκος του υπερκείμενου αποχύνεται με χρήση αντλίας και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C, με χρήση μεγάλης κεφαλής, για συλλογή του ίζηματος. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001M, pH 7.5 για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο → **Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH**

Το διάλυμα συλλέγεται από τα σακουλάκια διαπίδυσης και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 17000 rpm για 10 min στους 20-25°C με χρήση μικρής κεφαλής. Το υπερκείμενο ογκομετρείται και προστίθενται:

- ✓ διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M pH 7.0 όγκου ίσο με τα 3/27 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος
- ✓ διάλυμα EDTA 0.1 M pH 7.0 ίσο με τα 5/1000 του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης
- ✓ αλκαλικό διάλυμα Tris 2 M για ρύθμιση του pH στο 8.8

Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου όπου προστίθεται διάλυμα CH_3COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 17000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20-25°C με μικρή κεφαλή και ογκομετρείται το υπερκείμενο. Αξίζει να σημειωθεί ότι το EDTA και η

μερκαπτοαιθανόλη προστίθενται για να προστατέψουν την πρωτεΐνη από μετουσίωση.

Βήμα 5^ο → Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση του ενζύμου

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη AMP 0.1M (pH 7.0) και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M (pH 7.0), τα οποία διευκολύνουν την διαδικασία της κρυστάλλωσης, σε όγκο ίσο με το 1/100 του πρωτεϊνικού διαλύματος. Το μίγμα τοποθετείται σε σωλίνες φυγοκέντρησης και αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της *φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου*. Ακολούθως, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (β -GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8). Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20-25°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων. Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 3h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

Βήμα 6^ο → Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της *φωσφορυλάσης του γλυκογόνου* μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C σε ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Η ενζυμική συγκέντρωση προσδιορίζεται με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$C_{\text{ενζύμου}} = OD_{280} / 1,32$$

Τέλος, προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

6.2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου. Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου. Ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την παρακάτω αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου:



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

ΥΛΙΚΑ

- Ρυθμιστικό διαλύμα αραίωσης ενζύμου 50 :50: 1 : β -φωσφογλυκερόλης [50 mM], β -μερκαπτοαιθανόλη πυκνή [50 mM], EDTA [1mM] pH 6.8.
- Ρυθμιστικό διαλύμα : ιμιδαζόλιο [200mM], KCl [400mM], EDTA [4mM], DTT [4mM] pH 6.8
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (α -D-G-1-P) 400mM
- Διάλυμα γλυκογόνου 10% w/v, Φυλάσσεται στους -20°C .
- Διάλυμα AMP 50mM pH 6.8
- Διάλυμα SDS 1% w/v
- Διάλυμα ενζύμου GPb
- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου pH 5.0
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% w/v, pH 5.0
- Απιονισμένο νερό

ΟΡΓΑΝΑ

- Φωτόμετρο, Ορατού-υπεριώδους
- Φασματοφωτόμετρο

- Υδατόλουτρο (ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία στους 30° C.)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Χρονόμετρο
- Πιπέτες
- Συσκευή vortex

α) Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης

Παρασκευή 2 ρυθμιστικών διαλυμάτων :

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

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

Σημείωση: μετά την παρασκευή τους τα ρυθμιστικά διαλύματα φυλάσσονται στους 4 ° C.

Από το πυκνό διάλυμα της G1P [400 mM] το ρυθμιστικό διάλυμα 1 και νερό, αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι ώστε να προκύψει διάλυμα : G1P [90 mM], ιμιδαζόλιο [135 mM], KCl [270 mM], EDTA [2,7 mM], DTT [2,7 mM] με pH 6.8. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της G1P προκύπτουν με αραιώση του διαλύματος της G-1-P [90 mM] με το ρυθμιστικό διάλυμα 2 και νερό.

Συνολικά προκύπτουν τα παρακάτω διαλύματα:

- **Glc-1-P [90mM]**, Ιμιδαζόλιο [135mM], KCl [270mM], EDTA [2,7mM], DTT [2,7mM] και pH=6.8
- **Glc-1-P [45mM]**, Ιμιδαζόλιο [135mM], KCl [270mM], EDTA [2,7mM], DTT [2,7mM] και pH=6.8
- **Glc-1-P [27mM]**, Ιμιδαζόλιο [135mM], KCl [270mM], EDTA [2,7mM], DTT [2,7mM] και pH=6.8
- **Glc-1-P [18mM]**, Ιμιδαζόλιο [135mM], KCl [270mM], EDTA [2,7mM], DTT [2,7mM] και pH=6.8
- **Glc-1-P [9mM]**, Ιμιδαζόλιο [135mM], KCl [270mM], EDTA [2,7mM], DTT [2,7mM] και pH=6.8

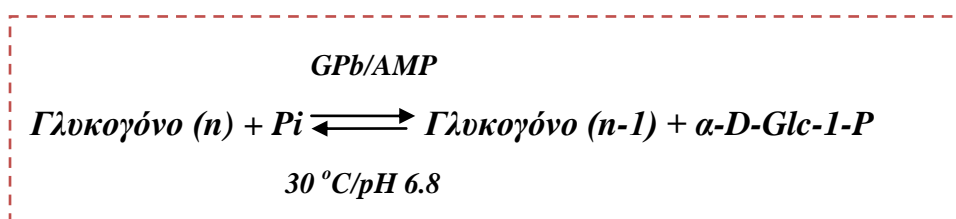
Σημείωση: μετά την παρασκευή τους τα παραπάνω διαλύματα φυλάσσονται στους -20 ° C, προκειμένου να αποφευχθεί η υδρόλυση της Glc-1-P.

β) Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης *b*

Το ένζυμο φυλάσσεται σε εναιώρημα γλυκερόλης στους -20 °C. Από αυτό το εναιώρημα παίρνουμε 10 μL και το αραιώνουμε σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Το διάλυμα φωτομετρείται στα 280 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου, με χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Στη συνέχεια, σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα. Περιέχει το ένζυμο σε συγκέντρωση 25 μg/mL, γλυκογόνο 1% (w/v), ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσεως ενζύμου : β-GP 2,5 mM, β-Merc 2,5 mM, EDTA 0,05mM και νερό. Το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C για 15 λεπτά.

6.2.1. Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) της φωσφορυλάσης *b* του γλυκογόνου

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α -D-Glc-1-P). Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* (GP*b*) βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση:



Στην αντίδραση αυτή η λιγότερο ενεργή μορφή του ενζύμου (T διαμόρφωση), μετά από ενεργοποίηση με AMP, δρα αντίστροφα προς σχηματισμό γλυκογόνου, παρουσία G-1-P (α -D-1-φωσφορικής γλυκόζης), και ελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi). Η καταλυόμενη αντίδραση σε συνθήκες κορεσμού σε AMP 1.0 mM και γλυκογόνο 0.2 % w/v, ακολουθεί μία κινητική κατά Michaelis-Menten, σύμφωνα με την οποία η καμπύλη της ταχύτητας ως προς το υπόστρωμα, την 1-φωσφορική γλυκόζη, αποτελεί τμήμα υπερβολής. Σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος, η ταχύτητα εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση του υποστρώματος όσο και την ποσότητα του ενζύμου. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, όπου επέρχεται

κορεσμός, η ταχύτητα εξαρτάται αποκλειστικά από την ποσότητα του ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ

K_m

Παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα τελικής συγκέντρωσης *GPb* 5μg/ml, γλυκογόνου 0.2%, ρυθμιστικού διαλύματος βGP-Merc-EDTA 2.5:2.5:0.05 mM. Οι τελικές συγκεντρώσεις έχουν υπολογιστεί στον όγκο της αντίδρασης, δηλ. 900μL.

Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D-Glc-1-P από 2, 4, 6, 10, 20 mM. Η παρασκευή τους προκύπτει από την προσθήκη 200μL α-D-Glc-1-P διαφορετικών συγκεντρώσεων όπως φαίνονται στο **6.2.α** καθώς και από την προσθήκη 18μL AMP 50mM και 502μL H₂O σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Οι πέντε δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται στους 30°C για 2-3 λεπτά. Μετά την επώαση τους προστίθενται 180μL από το ενζυμικό μείγμα στον σωλήνα του υποστρώματος, ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες:

- 5.0 μg ενζύμου ανά mL
- 1 mM AMP
- 0.2 % w/v γλυκογόνο
- υποστρώματα α-D-Glc-1-P από 2 mM έως 20 mM
- η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH= 6.8

Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1,2,3,4) λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1.0% w/v. Το SDS είναι απορρυπαντικό και προκαλεί την αποδιάταξη και την αδρανοποίηση του ενζύμου.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρησή τους στα 850nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται τα P_i που έχουν απελευθερωθεί στην αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit προκειμένου να προσδιοριστεί η K_m.

6.3. Προσδιορισμός IC₅₀ αναστολέα

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

Η σταθερά IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC₅₀ και για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P (1-φωσφορικής γλυκόζης). Συνήθως, οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών δεν είναι μεγάλες και αυτό περιορίζει την δυνατότητα για μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων για την ανίχνευση της επίδρασης του αναστολέα στο ένζυμο, όσο και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Σκοπός του ερευνητή είναι να μπορέσει να προσεγγίσει όσο το δυνατό καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IC₅₀ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC₅₀, σε σταθερή συγκέντρωση α-D- Glc-1-P [9 mM] και AMP [50 mM], ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180 μL) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P να είναι 2 mM και της AMP 1 mM. Επίσης, συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL. Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα, όπως φαίνεται στον παρακάτω **Πίνακα**.

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D- Glc-1-P	200 μ L	200 μ L
AMP (50mM)	18 μ L	18 μ L
Αναστολέας	-	X μ L
H₂O	502 μ L	720-(200+18+X) μ L
Τελικός όγκος	720 μ L	720 μ L

Πίνακας 3 : Συνοπτική περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό της IC₅₀.

Το κινητικό πείραμα που ακολουθεί είναι παρόμοιο με τον προσδιορισμό δραστηριότητας της φωσφορυλάσης *b*. Το κινητικό πείραμα παρουσία αναστολέα πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που γίνεται ο προσδιορισμός δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b*.

Ακολουθεί η περιγραφή των συνθηκών των κινητικών πειραμάτων που έγιναν για την ένωση που περιλαμβάνεται στην παρούσα εργασία:

- G1P: 2 mM
- AMP: 1 mM
- Γλυκογόνο: 0.2% w/v

Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν προήλθαν από κατάλληλες αραιώσεις των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Wonderful, αφού είχε προηγηθεί διαλυτοποίηση αυτών σε διαλύτη DMSO. Κάθε δείγμα μελετήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον παρακάτω **Πίνακα** :

ΔΕΙΓΜΑ 1 C (mg/mL)	ΔΕΙΓΜΑ 2 C (mg/mL)	ΔΕΙΓΜΑ 3 C (mg/mL)
0.010	0.004	0.005
0.015	0.008	0.008
0.025	0.010	0.010
0.030	0.020	0.012
0.040		0.015
0.050		
0.055		

Πίνακας 4 : Τα δείγματα των εκχυλισμάτων των ροδιών της ποικιλίας Wonderful (**βλ. Εικόνα 17**) και οι συγκεντρώσεις του αναστολέα, που εξετάστηκαν για κάθε δείγμα.

6.4. Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC_{50} του ενζύμου βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb, γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις, λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι, παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά :

- ❖ Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός
- ❖ Τυφλό με την συγκέντρωση της α -D-Glc-1-P, που χρησιμοποιείται στην IC_{50} ή με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της G1P στην περίπτωση της Km, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της
- ❖ Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος), λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών
- ❖ Τυφλό διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$.

Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού, και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους.

6.5. Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στη 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.

6.5.1. Μέθοδος Ασκορβικού οξέος

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου, αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε

φωσφορικά ιόντα P_i πρέπει να είναι μεταξύ 0,05-0,4 μM , προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

ΥΛΙΚΑ

- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου, με ρύθμιση pH 5.0. Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με HCl 10N.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), με ρύθμιση pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N

Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία όγκων 4:1 (4 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινικού και 1 όγκο ασκορβικού). Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15 λεπτά μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2.5mL από το παραπάνω αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ανάδευση οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

6.5.2. Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της G1P και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό διάλυμα) μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

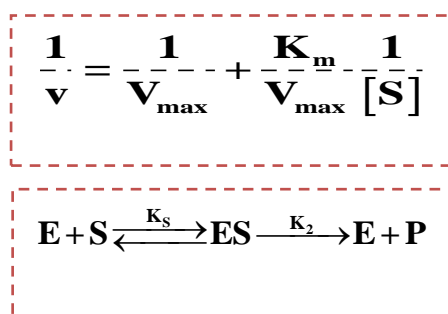
Η ειδική δραστηριότητα (specific activity) αποτελεί έκφραση της ποσότητας αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου και ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος ή παραγωγή 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό κάτω από ορισμένες συνθήκες. Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών

δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Graft, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα ‘simple weighting’). Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

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

όπου v : είναι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, t : ο χρόνος της αντίδρασης, **όριο**: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της GIP που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του δείγματος επί την μέγιστη υδρόλυση της GIP στην ισορροπία της αντίδρασης (78%).

Οι αρχικές ταχύτητες που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα ‘explicit weighting’). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους V_{\max} και K_m και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten με την προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος:



όπου v : η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης, V_{\max} : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, $[S]$: η συγκέντρωση του υποστρώματος, E : το ένζυμο, S : το υπόστρωμα, ES : το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος, P : το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten, $v = V_{\max}[S]/K_m + [S]$. Γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η

οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{max} .

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

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

όπου: $s.a._{control}$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα, $s.a._i$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

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

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

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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1. Σκοπός της εργασίας

Τα σημερινά αντιδιαβητικά φάρμακα για το διαβήτη τύπου II είναι ανεπαρκή και υπάρχει ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP, Liver GP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν από τους κύριους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών [Agius *et al.*, 2001].

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού για τον προσδιορισμό της IC_{50} έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.

Παρόλο που ο πρωταρχικός στόχος είναι η ηπατική GP, το κρυσταλλογραφικό πρότυπο στο οποίο στηρίζεται ο σχεδιασμός ενώσεων στην παρούσα εργασία είναι η μυϊκή GP. Η ηπατική GP είναι 80 % ομόλογη (ως προς την αμινοξική ακολουθία) με την μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

7.2. Αποτελέσματα απομόνωσης της GPb

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο παραπάνω (βλ.πειραματικό μέρος).



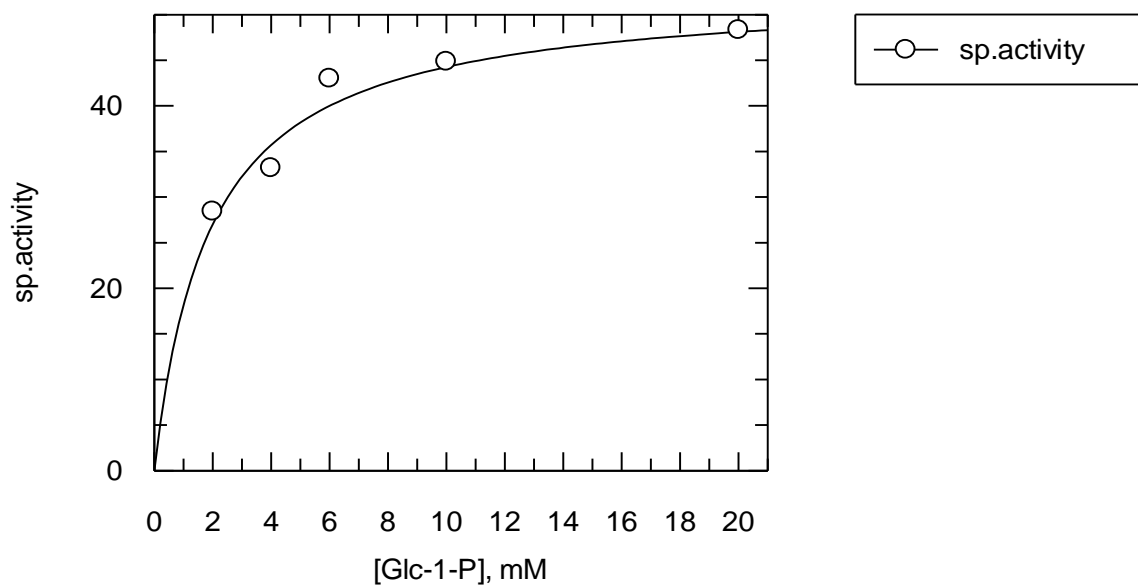
Εικόνα 23 : Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της *GPb*. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην έκτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

7.3. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

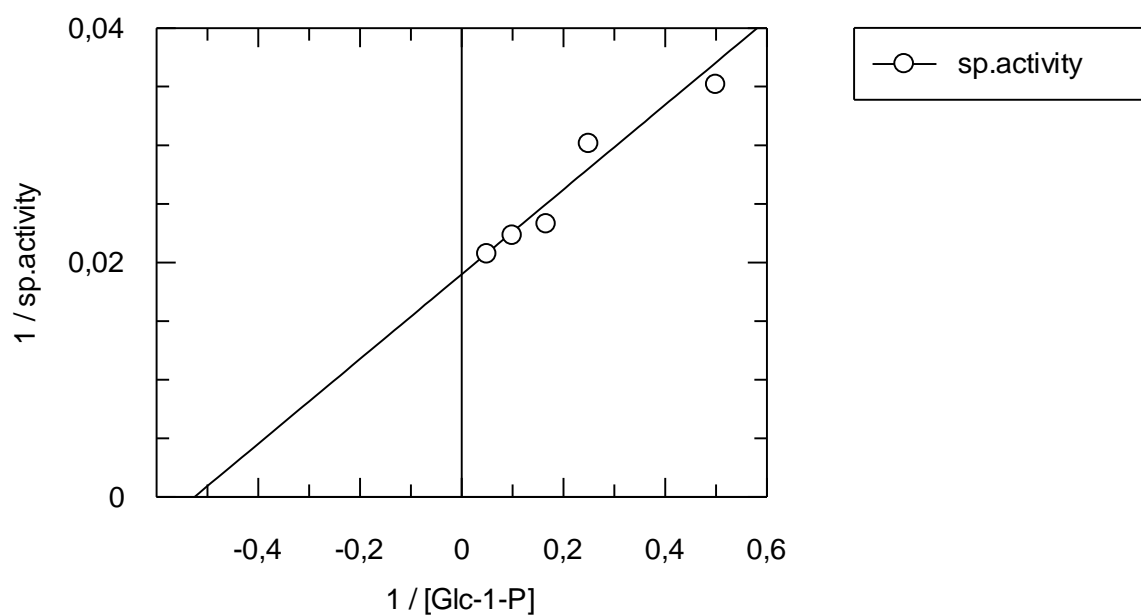
7.3.1 Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

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

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m = 1.90 \pm 0.48 \text{ mM}$, και $V_{max} = 52.68 \pm 4.02 \text{ } \mu\text{mol Pi/mg/min}$.



Σχήμα 17 : Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος G-1-P [2.0, 4.0, 6.0, 10.0, 20.0 mM], στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP [1.0mM] και γλυκογόνου 0.2% w/v. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.



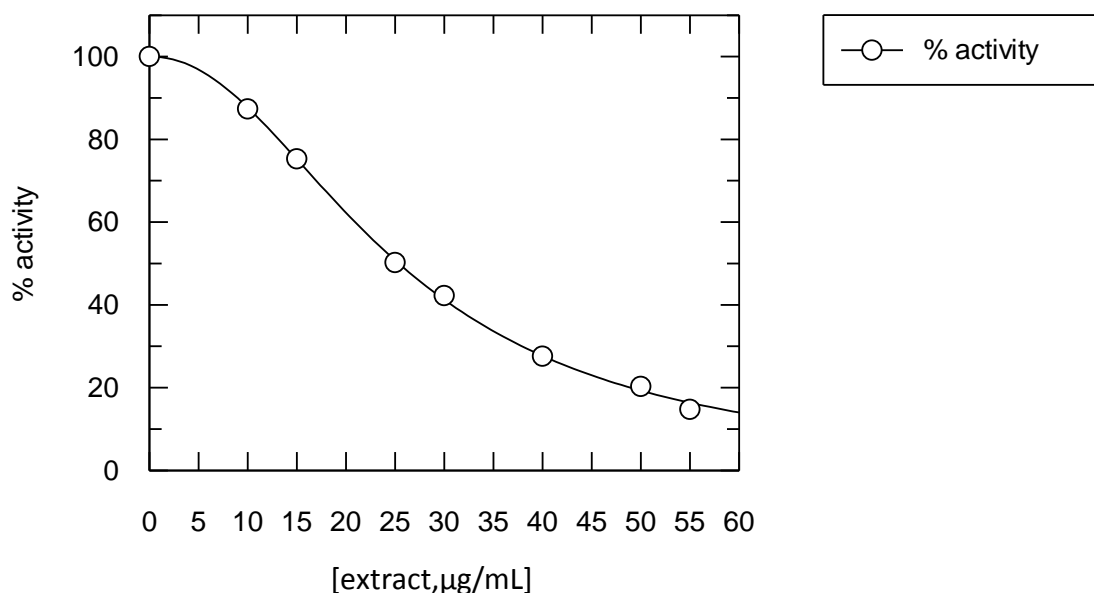
Σχήμα 18 : Αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης, από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max}

7.3.2. Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων ροδιών-Wonderful

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν τα εκχυλίσματα υποπροϊόντων βιομηχανικής χυμοποίησης ροδιών, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της *φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου*. Τα διάφορα δείγματα των ροδιών παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο του κ. Σ. Χαρουτιάν (Εργαστήριο Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).

Ακολουθούν οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Grafit για τον υπολογισμό της IC_{50} , για τα διάφορα δείγματα. Έτσι, για το ΔΕΙΓΜΑ 1,2 και 3 (βλ. **Εικόνα 17**) έχουν προκύψει οι παρακάτω καμπύλες:

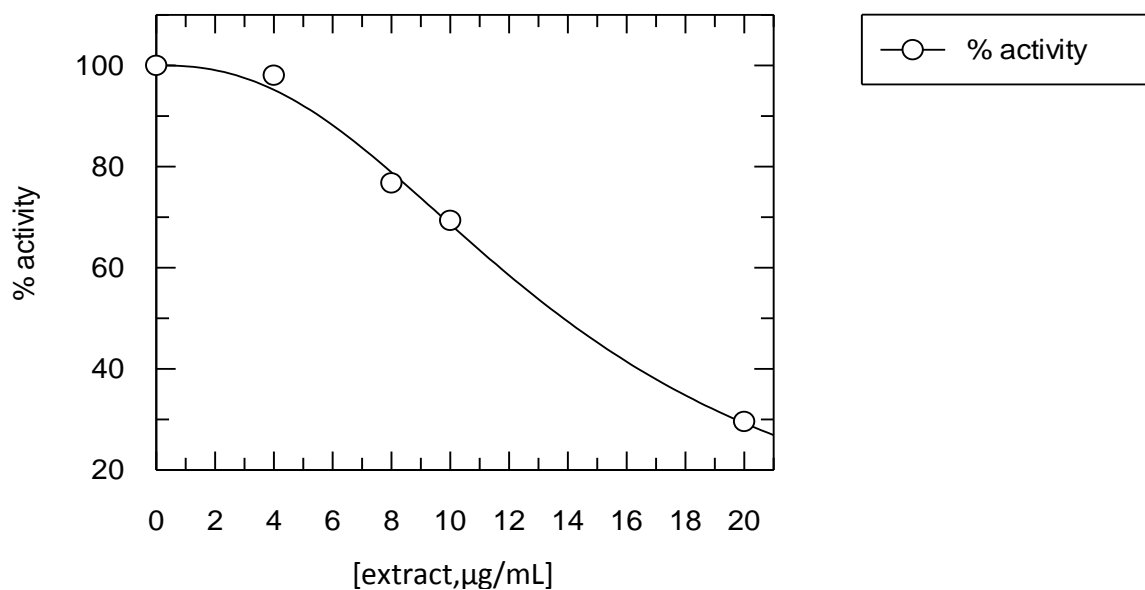
Για το ΔΕΙΓΜΑ 1 (βλ. **Εικόνα 17**):



$IC_{50} = 25.38 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$

Σχήμα 19 : Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος του δείγματος 1. Η IC_{50} υπολογίστηκε στα $25.38 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$. Η τελική συγκέντρωση των επί μέρους συστατικών της αντίδρασης ήταν G1P 2 mM, AMP 1 mM και γλυκογόνο 0.2% w/v. Ο αναστολέας διαλυτοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα 2 % v/v DMSO. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν: 10, 15, 25, 30, 40, 50, 55 $\mu\text{g/mL}$.

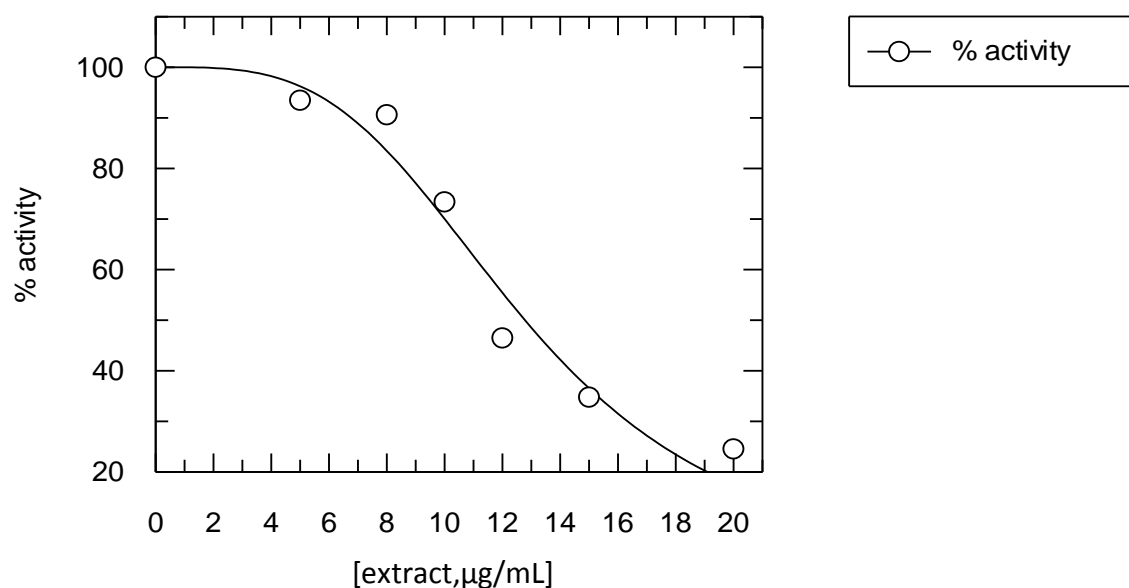
Για το ΔΕΙΓΜΑ 2 (βλ. **Εικόνα 17**):



IC₅₀ = 13.85 ± 0.38 μg/mL

Σχήμα 20 : Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος του δείγματος 2. Η IC₅₀ υπολογίστηκε στα 13.85 ± 0.38 μg/mL. Η τελική συγκέντρωση των επί μέρους συστατικών της αντίδρασης ήταν G1P 2 mM, AMP 1 mM και γλυκογόνο 0.2% w/v. Ο αναστολέας διαλυτοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα 2 % v/v DMSO. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν: 4, 8, 10, 20 μg/mL.

Για το ΔΕΙΓΜΑ 3 (βλ. **Εικόνα 17**):



IC₅₀ = 12.78 ± 0.54 µg/mL

Σχήμα 21 : Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος του δείγματος 3. Η IC₅₀ υπολογίστηκε στα $IC_{50} = 12.78 \pm 0.54 \mu\text{g/mL}$. Η τελική συγκέντρωση των επί μέρους συστατικών της αντίδρασης ήταν G1P 2 mM, AMP 1 mM και γλυκογόνο 0.2% w/v. Ο αναστολέας διαλυτοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα 2 % v/v DMSO. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν: 5, 8, 10, 12, 15 µg/mL.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας ως προς την ανασταλτική επίδραση των εκχυλισμάτων υποπροϊόντων της επεξεργασίας ροδιών της ποικιλίας Wonderful έναντι της *φωσφορυλάσης του γλυκογόνου*, ένα ένζυμο που αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II.

Αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων έδειξαν ότι το Δείγμα 1, που ουσιαστικά αποτελεί εκχύλισμα ολόκληρου του φρούτου (βλ. **Εικόνα 17**), παρουσιάζει αναστολή με την τιμή της IC_{50} να είναι : **25.38 ± 0.23 μg/mL**. Το Δείγμα 2, εκχύλισμα από επισπέρματα και λίγες φλούδες του ροδιού (βλ. **Εικόνα 17**), έχει IC_{50} : **13.85 ± 0.38 μg/mL**, ενώ το Δείγμα 3, που αποτελείται από το φλοιό του ροδιού και είναι απόρριμα (βλ. **Εικόνα 17**) παρουσιάζει **IC₅₀ : 12.78 ± 0.54 μg/mL**. Έτσι, συμπεραίνουμε ότι τα επεξεργασμένα εκχυλίσματα, υποπροϊόντα της επεξεργασίας των ροδιών της ποικιλίας Wonderful Δείγμα 2 και 3 παρουσιάζουν μεγαλύτερη αναστολή της *φωσφορυλάσης του γλυκογόνου* από ότι το Δείγμα 1, που αποτελεί εκχύλισμα που δεν έχει υποστεί επεξεργασία.

Περαιτέρω κρυσταλλογραφικές μελέτες, των παραπάνω εκχυλισμάτων, θα μας βοηθήσουν να ανακαλύψουμε τη δραστική ουσία καθώς και το κέντρο σύνδεσης της στο ένζυμο. Αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης είναι η αναστολή του ενζύμου. Τέλος, με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας θα μπορέσουμε να μελετήσουμε το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσεται μεταξύ της πρωτεΐνης και της ουσίας έτσι ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adhami V.M., Khan N., Mukhtar H.** (2010) Cancer Chemoprevention by Pomegranate: Laboratory and Clinical Evidence. *Nutr. Cancer.* **61 (6)**: 811–815.
- Agius L., Aiston S., Hampson L., Gomez-Foix A.M., Guinovart J.J.** (2001) Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis. *J Biol Chem* **276**:23858–23866
- American Diabetes Association.** (2012) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care.* **35**, supplement 1.
- Banihani S., Swedan S., Alguraan Z.** (2013) Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutrition Research.* **13**: 341-348
- Bollen M., Stalmans W.** (1992) The structure, role and regulation of type I protein phosphatases. *Crit. Rev. Biochem., Mol. Biol.* **27**: 227-281.
- Γεωργάτσος Ι.Γ.** (2005) Εισαγωγή στη Βιοχημεία, 6^η Έκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη.
- Γεωργάτσος Ι.Γ., Γιουψάνης Τ.Α., Κυριακίδης Δ.Α.** (2001) Ενζυμολογία. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
- Das A.K., Mandal S.C., Banerjee S.K., Sinha S., Saha B.P., Pal M.** (2001) Studies on the hypoglycaemic activity of Punica granatum seed in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytother Res.* **15**:628–9.
- El-Nemr S.E., Ismail I.A., Ragab M.** (1990) Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Nahrung.***34**:601–606.
- Esnouf R.M.** (1997) An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J Mol Graph Model.* **15(2)**:132-4, 112-3.
- Feng-Qi Zhao and Aileen F.Keating** (2007) Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Curr Genomics.* **8(2)**: 113–128.
- Gil M., Tomas-Barberan F., Hess-Pierce B., et al.** (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* **48**:4581–4589.
- Gropper S.S., Smith J.L. Groff, J.** (2007) Διατροφή & Μεταβολισμός Τόμοι 1 & 2, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.

Huang T. et al. (2005) Anti-diabetic action of Punica granatum flower extract: Activation of PPAR-g and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**:160– 169

Kahn S.E., McCulloch D.K., Porte D. (1997) Insulin secretion in the normal and diabetic human. International Textbook of Diabetes Mellitus. 2th Edition. John Wiley & Sons, New York.

Khan N., Afaq F., Kweon M.H., Kim K., Mukhtar H. (2007) Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. *Cancer Res.* **67(7)**:3475-82

Kraulis, P.J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950.

Kroes B.H., van den Berg A.J., Quarles van Ufford H.C., van Dijk H., Labadie R.P. (1992). Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Med.* **58**:499– 504.

Lehninger. (2008) Principles of Biochemistry, Nelson D.L., Cox M.M., 5th Edition, W.H. Freeman and Company, New York.

Li Y. et al. (2005) Punica granatum flower extract, a potent a-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology.* **99**:239–244.

Madsen N.B., Kasvinsky P.J., Fletterick R.J. (1978) Allosteric transitions of phosphorylase a and the regulation of glycogen metabolism. *J Biol Chem.* **253(24)**: 9097-101.

Martin W.H., Hoover D.J., Armento S.J., Stock I.A., McPherson R.K., Danley D.E., et al. (1998) Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:1776–1781.

McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L. (2000) Essentials of Exercise Physiology, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.

McCutcheon A., Udani J., Donald J., Brown D. (2008) Scientific and Clinical Monograph for POM WONDERFUL[®] POMEGRANATE JUICE[®] American Botanical Council.

McFarlin B.K., Strohacker K.A., Kueht M.L. (2009) Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice. *Br J Nutr.* **102**:54–9.

McMurry J. (2006) Οργανική Χημεία, Τόμος ΙΙ, 5^η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

Merritt, E.A. & Bacon, D.J. (1997) Raster3D Photorealistic Molecular Graphics. *Methods in Enzymology* **277**, 505-524.

Oikonomakos N. G., Leonidas D. D., Papageorgiou A. C., Sotiroidis T. G. (1992) Kinetic properties of tetrameric glycogen phosphorylase *b* in solution and in the crystalline state. *Protein Sci.* **1(9)**: 1123–1132.

Oikonomakos N.G, et al. (2002) Binding of N-acetyl-N'-beta-D-glucopyranosyl urea and N-benzoyl-N'-beta-D-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase *b*: kinetic and crystallographic studies. *Eur J Biochem.* **269(6)**:1684-96

Oikonomakos N.G. et al. (1987) Pyridoxal phosphate site in glycogen phosphorylase *b*: structure in native enzyme and in three derivatives with modified cofactors. *Biochemistry.* **26**: 8381–8389.

Oikonomakos, N. G., Somsak L. (2008) Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr. Opin. Invest. Drugs.* **9(4)**: 379-395

Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M.N., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., C. Tiraidis, Bischler, N., Tsitsanou, K.E., Zographos, S.E., Kostas, I.D. and Eisenbrand, G. (2006) Indirubin and indigo analogues, as potential inhibitors of glycogenolysis: structural basis of glycogen phosphorylase inhibition. In *Indirubin, the red shade of indigo*, Edited by L. Meijer, N. Guyard, L. Skaltsounis and G. Eisenbrand, Editions “Life in Progress”, Station Biologique, Roscoff, France, Chapter **18**, pp. 177-189.

Parmar H.S., Kar A. (2008) Medicinal values of fruit peels from *Citrus sinensis*, *Punica granatum*, and *Musa paradisiaca* with respect to alterations in tissue lipid peroxidation and serum concentration of glucose, insulin, and thyroid hormones. *J Med Food.* **11**:376–81.

Porksen N., Hollingdal M., Juhl C., Butler P., Veldhuis J.D., Schmitz O. (2002) Pulsatile insulin secretion: detection, regulation and the role in diabetes. *Diabetes.* **51 Suppl.** 1:S245-54.

Reece J., Campbell N. (2010) *Biology*. 9th edition. Publisher :Pearson ,San Francisco.

Roglic G., Unwin N., Bennett P.H. et al. (2005) The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care.* **28**: 2130-5.

Rosenblat M, Aviram M. (2006) Antioxidative properties of pomegranate: In vitro studies. In: Seeram N, Schulman R, Heber D, eds. *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*. Boca Raton: *CRC Press*; 31-43.

- Rosenblat M., Hayek T., Aviram M.** (2006) Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis* **187**:363–371
- Sanae F., Miyaichi Y., Hayashi H.** (2003) Endothelium-dependent contraction of rat thoracic aorta induced by gallic acid. *Phytother. Res.* **17**:187–189.
- Seeram et al.** (2005) In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **16** :360–367
- Seeram et al.** (2007) Pomegranate Ellagitannin-Derived Metabolites Inhibit Prostate Cancer Growth and Localize to the Mouse Prostate Gland. *J. Agric. Food Chem.***55**:7732–7737
- Sprang S.R., Goldsmith E.J., Fletterick R. J., Withers S.G. & Madsen N.B.** (1982) Catalytic site of glycogen phosphorylase: structure of the T state and specificity for α -D-glucose. *Biochemistry.* **21**: 5364–5371
- Stalmans W., Laloux M., Hers H-G.** (1974) The interaction of liver phosphorylase *a* with glucose and AMP. *Eur J Biochem.* **49**:415–427.
- Stowe C.B.** (2011) The effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and cardiovascular health. *Complementary Therapies in Clinical Practice* **17**: 113-115
- Stryer L.** (1997) Βιοχημεία, Τόμος I, 3^η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Stryer L.** (2007) Βιοχημεία, Τόμος I, 5^η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Σωτήριος Α. Ράπτης.** (1998) Εσωτερική Παθολογία, Τόμος IV, Επιστημονικές Εκδόσεις «Γρηγόριος Παρισιανός», Μαρία Γρ. Παρισιανού, Αθήνα.
- Treadway J.D., Mendys P., Hoover D.J.** (2001) Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* **10(3)**:439-454
- Unpublished document from POM Wonderful.** (2007) Chemical analysis of the polyphenolic compounds in POM Wonderful pomegranate juice—cumulative data from 2002–2007 (Based on in-house data and data from the University of Wisconsin [Madison] and Brunswick Labs, Norton, MA).
- Wild S., Roglic G., Green A. et al.** (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* **27**:1047-53.

Wolever T.M. (1990) The glycemic index. *World Rev. Ntr. Diet.* **62**:120-85.

Yadav P., Sarkar S., Bhatnager D. (1997) Action of Capparis deciduas against alloxan induced oxidative stress and diabetes in rat tissue. *Pharmacol. Res.* **36**:221–228.