



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

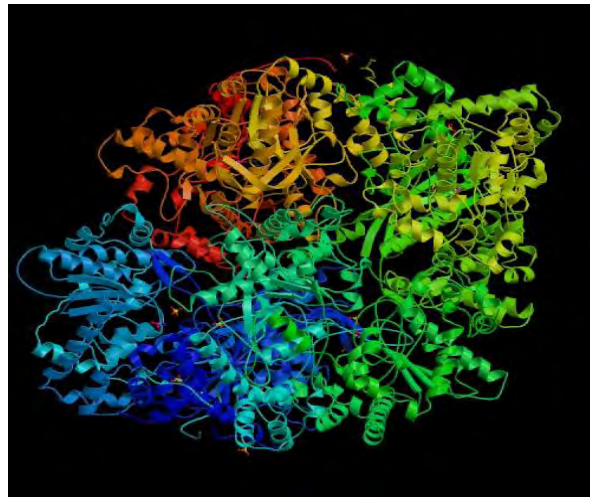
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

<< Βιοτεχνολογία- Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος >>

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ**



ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

***Αξιολόγηση της υπογλυκαιμικής δράσης επεξεργασίας
πολυφαινολικών εκχυλισμάτων φυτικών προϊόντων με
βιοχημικές διαδικασίες***

***Assessment of hypoglycaemic activity in polyphenolic
extracts processing plant products by biochemical methods***

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- **Δρ. Λεωνίδα Δ. Δημήτριος (επιβλέπων)**

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

- **Δρ. Κοντού Μαρία**

Επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του **τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**

- **Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία**

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του **τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**

**«Κοίτα βαθιά μέσα στη φύση και θα
καταλάβεις τα πάντα καλύτερα..»**

A. Einstein

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τις θερμές μου ευχαριστίες αποδίδω στον Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο, καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και την συνεργασία που είχαμε σε άριστο επίπεδο καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του και την διάθεση που έχει πάντα να βοηθά σε ερευνητικό επίπεδο καθώς και σε θέματα επαγγελματικού προσανατολισμού.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου *δομικής και λειτουργικής βιοχημείας*. Την υποψήφια διδάκτορα Καντσάδη Αναστασία η οποία με βοήθησε στην κατανόηση του θεωρητικού και πειραματικού μέρους της εργασίας, έχοντας πάντα το αίσθημα της αυτοδιάθεσης ώστε να βοηθήσει στις απορίες όλων μας και φυσικά τον Γεώργιο Στραβοδήμο για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια εκτέλεσης του πειραματικού μέρους και κατά την συγγραφή της εργασίας, καθώς και για την άμεση επικοινωνία και τον διδακτικό ζήλο που τον διέπει.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους γονείς μου, οι οποίοι σαν μια ήρεμη δύναμη είναι πάντα δίπλα μου και στηρίζουν τις επιλογές μου, όπως επίσης ευχαριστώ την αδερφή μου Κατερίνα, η οποία πάντα με βοηθά στοχευμένα με τις πολύτιμες γνώσεις της σε θέματα επιστημονικού ενδιαφέροντος και με την αφιέρωση του προσωπικού της χρόνου, μου δείχνει τα σωστά βήματα που πρέπει να ακολουθώ.

Ένα τελευταίο ευχαριστώ αποδίδω στον Ιάσονα για την ένθερμη παρότρυνσή του στην συμμετοχή μου για την απόκτηση μεταπτυχιακού τίτλου και την διαρκή πίστη του στις δυνατότητές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....8

Abstract.....9

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ.....12

1.1. Γενικά.....12

1.2. Τύποι σακχαρώδους διαβήτη.....14

1.2.1. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I.....14

1.2.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.....16

1.2.3. Διαβήτης κύησης.....17

1.2.4. Γενετικές μορφές σακχαρώδους διαβήτη.....17

1.3. Διαγνωστικά κριτήρια για τον σακχαρώδη διαβήτη.....18

1.4. Ομοίωση της γλυκόζης.....19

1.4.1. Το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης-ινσουλίνης.....20

1.5. Ινσουλίνη.....22

1.5.1. Γενικά.....23

1.5.2. Ο ρόλος της ινσουλίνης24

1.5.3. Δράση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό.....25

1.6. Γλυκαγόνη.....26

1.6.1. Γενικά.....26

1.6.2 Δράση της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό.....27

1.7. Γενικός μηχανισμός δράσης των ορμονών στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα.....29

2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

2.1. Γλυκόζη.....30

2.2. Γλυκογόνο.....32

2.2.1. Αποικοδόμηση γλυκογόνου32

2.2.2. Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....34

2.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....36

2.3.1.Γενικά.....36

2.3.2. Αλλοστερικές Αλληλεπιδράσεις.....37

2.3.3.Κρυσταλλική δομή της GP.....43

2.3.4. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....45

3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

3.1. Αρχές ενζυμικής κινητικής.....46

3.2. Αναστολείς ενζυμικών αντιδράσεων.....48

3.2.1. Συναγωνιστική αναστολή.....49

4. Pygous spinosa.....52

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού.....54

5.2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου.....	57
5.2.1. Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (Km) της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου.....	58
5.3. Προσδιορισμός IC50 αναστολέα.....	59
5.3.1. Παρασκευή διαλύματος GP-b-γλυκογόνου.....	61
5.3.2. Παρασκευή διαλύματος υποστρωμάτων.....	61
5.3.3. Εκτέλεση του Πειράματος.....	62
5.4. Προσδιορισμός φωσφόρου	63
5.4.1. Μέθοδος Ασκορβικού οξέος	63
5.5. Παρασκευή τυφλών	64
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
6.1. Σκοπός της εργασίας.....	66
6.2. Αποτελέσματα απομόνωσης της GPb.....	67
6.3. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....	67
6.3.1 Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	67
6.3.2. Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων επεξεργασίας φυτικών εκχυλισμάτων του <i>Rygos spinosa</i>	68
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης χαρακτηρίζεται ως μία σύγχρονη επιδημία και είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες μεταβολικές διαταραχές σε παγκόσμια κλίμακα. Χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης- είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης, είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. 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, απομονώθηκε το ένζυμο *μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου* (GPb) από σκελετικούς μύες κουνελιού και χρησιμοποιήθηκε για την κινητική μελέτη της επίδρασης των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων φυτικών προϊόντων επεξεργασίας (*Pygeus spinosa*), στην ενζυμική δραστηριότητα.

Abstract

Diabetes mellitus is characterized as a modern epidemic and it constitutes one of the most widespread metabolic diseases in global level. The disease is characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia) and glucose metabolism imbalance- either as a result of decreased insulin secretion or decrease in body cells sensitivity to insulin. The main goal against diabetes treatment is to stabilize the levels of plasma glucose in physiological 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, the enzyme *glycogen phosphorylase b* (GPb) was isolated and purified from rabbit muscle and was used for kinetic experiments in order to find out the effect of polyphenolic extracts from *Pyrous spinosa* on its enzymatic activity.

1^ο ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Προέλευση της ονομασίας *Diabetes Mellitus*

Η ονομασία της νόσου του προέρχεται από το ρήμα διαβαίνω, αφού η τροφή που καταναλώνει ο ασθενής "διαβαίνει" από μέσα του, αλλά δεν κατακρατείται για αυτό και ο ασθενής αδυνατίζει. Το mellitus προέρχεται από τη γλυκιά (σαν μέλι) γεύση των ούρων του. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα των διαβητικών είναι σύμπτωμα της νόσου (από μόνο του και αυτό σίγουρα βλαπτικό για την υγεία), αλλά η ουσία της νόσου έγκειται στην αδυναμία του οργανισμού να μεταβολίσει την τροφή που τρώει, για να θρέψει και να ανανεώσει έτσι τους ιστούς του. Η "ειρωνεία" της νόσου είναι ότι ενώ ο διαβητικός ασθενής μπορεί να τρώει κανονικά, στην πραγματικότητα ο οργανισμός του λιμοκτονεί!

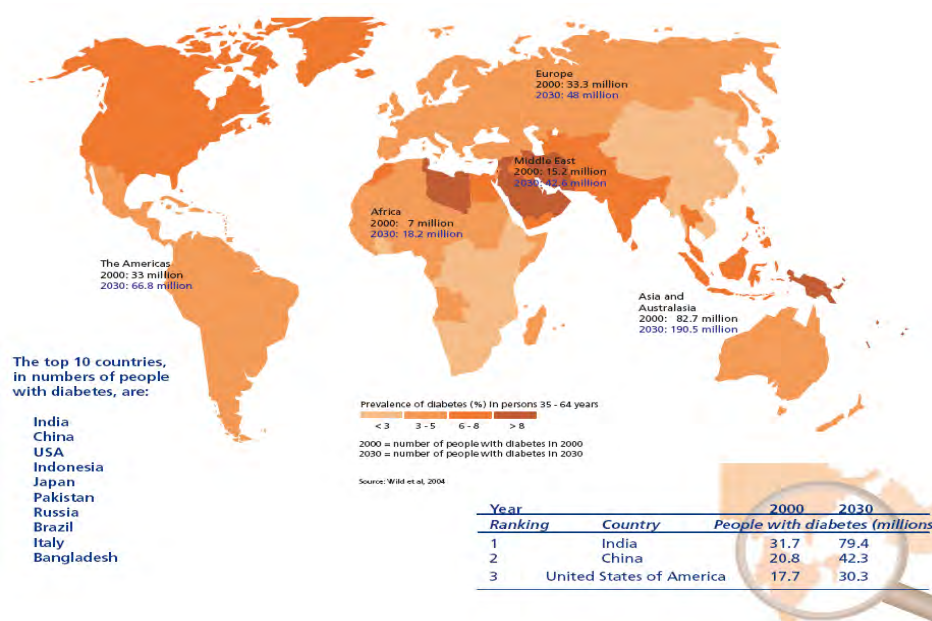
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

Ο Σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα υγείας και μια από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας ανά την υφήλιο, μετά τις καρδιαγγειακές νόσους και τον καρκίνο. Πρόκειται για μεταβολική πάθηση πολύπλοκης αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από διαταραχή στο μεταβολισμό της γλυκόζης, των λιπών, των πρωτεϊνών, καθώς και άλλων υδατανθράκων στον οργανισμό, με συνέπεια τη χρόνια αυξημένη τιμή γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία).

Ως ανοσολογική οντότητα, έχει αναγνωρισθεί από την αρχαιότητα. Οι πρώτες ιστορικές αναφορές έρχονται από τους αρχαίους χρόνους (Αίγυπτο, Μ. Ασία, Κίνα, Ινδία), όπου σε ευρεθέντα κείμενα της εποχής καταγράφονται περιστατικά ασθενών με συμπτώματα πολυδιψίας, απώλεια βάρους, καθώς και φαινόμενα προσέλκυσης μυρμηγκιών σε ούρα ατόμων. Αν και η πρώτη γνωστή κλινική περιγραφή της νόσου φαίνεται πως ήρθε στο φώς περίπου το 50 π.χ. από το Κέλσιο Κορνήλιο, εντούτοις ο Αρεταίος από την Καππαδοκία ήταν εκείνος που πρώτος έδωσε το 200μ.Χ. έναν ακριβή ορισμό της νόσου και εισήγαγε την έννοια “διαβήτης”, από την παρατήρηση ότι η νόσος ομοιάζει “με την διέλευση νερού μέσα από σιφώνιο”(C. Savona-Ventura, 2002). Ωστόσο ενώ μέχρι τις απαρχές του 17ου αιώνα ο διαβήτης στηριζόταν απλά και μόνο στην παρατήρηση, στα τέλη του ίδιου αιώνα, ο Johan Conrad Brunner (1653-1727) επέδειξε για πρώτη φορά ότι ο διαβήτης συνδέεται άμεσα με τη λειτουργία του παγκρέατος. Αυτό αποτέλεσε έναυσμα για σχολαστικότερη έρευνα γύρω από το πάγκρεας, καθώς και την προσπάθεια εξεύρεσης εκείνης της ουσίας η έλλειψη της οποίας συνεπάγεται με εμφάνιση των παραπάνω συμπτωμάτων. Η απάντηση ήρθε πολύ αργότερα όταν το 1922 οι Frederick Banting και Charles Best ανακάλυψαν την ουσία αυτή την οποία και αποκάλεσαν ινσουλίνη. Ωστόσο οι επιστήμονες παρατήρησαν ότι η χορήγηση ινσουλίνης δεν είχε το ίδιο επιθυμητό αποτέλεσμα σε όλους τους διαβητικούς ασθενείς. Αυτό αυτομάτως οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ινσουλίνη δεν ήταν πανάκεια για την αντιμετώπιση της νόσου. Έτσι λοιπόν, περίπου στις αρχές τις δεκαετίας του 1950, και μετά από εκτεταμένες μελέτες διαπιστώθηκε ότι υπάρχει

μορφή διαβήτη, η οποία μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση σκευασμάτων τα οποία επέτρεπαν την ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.

Ενενήντα χρόνια μετά την ανακάλυψη της ινσουλίνης και τη χρήση υπογλυκαιμικών φαρμάκων, ο σακχαρώδης διαβήτης συνεχίζει να παρουσιάζει παγκοσμίως αλματώδη ρυθμό αύξησης. Είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό το γεγονός ότι την τελευταία δεκαετία ο αριθμός των πασχόντων έχει διπλασιαστεί. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), το 2000 τα άτομα με διαβήτη διεθνώς ανέρχονταν σε 171 εκατομμύρια, ενώ ο αριθμός αυτός αναμένεται να ανέλθει στα 366 μέχρι το 2030 (Εικόνα 1) (Wild Et al., 2004). Ιδιαίτερα ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, που χαρακτηρίζεται από τους ειδικούς ως <<ύπουλος>>, καθώς τα πρώτα χρόνια μπορεί να δρα κρυφά, χωρίς να εκδηλώνει συμπτώματα, αποτελεί τη βασική αιτία θανάτου για περίπου 7.000.000 άτομα ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο και συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων, νεφρικής ανεπάρκειας, νευροπάθειας μόνιμων βλαβών του αμφιβληστροειδούς και άλλων σοβαρών επιπλοκών.



Εικόνα 1: Συχνότητα εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη ανά ήπειρο (Hossain et al., 2007).

Η νόσος έχει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στο δυτικό κόσμο, ιδιαίτερα ο διαβήτης τύπου II, και αυτό αποτελεί μια σαφή ένδειξη για την συσχέτισή της με το σύγχρονο τρόπο ζωής, τις κακές διατροφικές συνήθειες, την παχυσαρκία και την έλλειψη σωματικής άσκησης.

1.2 ΜΟΡΦΕΣ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ

Οι μορφές σακχαρώδη διαβήτη κατατάσσονται σε δύο βασικές κατηγορίες: στο **διαβήτη τύπου I**, που χαρακτηρίζεται από απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης, και στο **διαβήτη τύπου II**, πολύ συχνότερη, που οφείλεται σε συνδυασμό διαταραχών που συσχετίζονται με αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης με μια ανεπαρκή αντισταθμιστική έκκριση ινσουλίνης.

Ταξινόμηση των διαφόρων μορφών σακχαρώδη διαβήτη.	
Διαβήτης τύπου 1	- Αυτοάνοσος - Ιδιοπαθής
Διαβήτης τύπου 2	
Άλλες μορφές	- Γενετικές ανωμαλίες των κυττάρων β - Γενετικές διαταραχές της δράσης της ινσουλίνης - Παθήσεις του εξωκρινούς παγκρέατος: Ενδοκρinoπάθειες Φάρμακα Σύνδρομα ή νόσοι που συνοδεύονται από διαβήτη
Διαβήτης της κνήσεως	

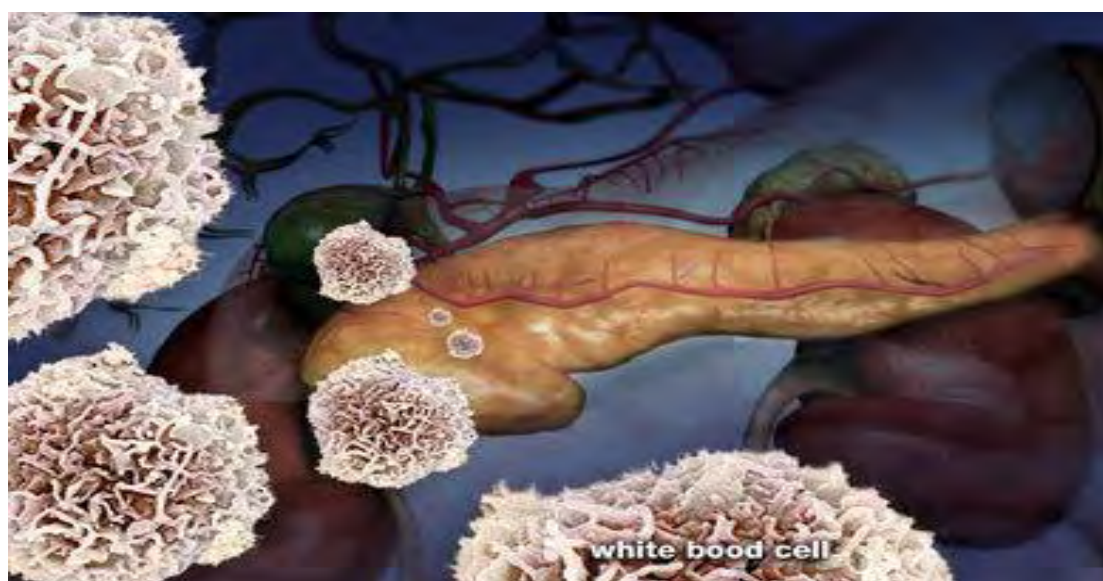
Πίνακας 1: Ταξινόμηση των διαφόρων μορφών σακχαρώδη διαβήτη.

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

Εμφανίζεται κυρίως στην παιδική ή εφηβική ηλικία και σπανιότερα σε ενήλικες και οφείλεται στη μερική ή πλήρη καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος με αυτοάνοσο μηχανισμό, με συνέπεια τη μερική ή ολική ανεπάρκεια ινσουλίνης. Τα άτομα που πάσχουν είναι άμεσα εξαρτημένα από εξωγενή χορήγηση της, ώστε να διατηρούνται τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα τους σε φυσιολογικά επίπεδα. Ο ρόλος της ινσουλίνης είναι πολύ σημαντικός γενικά καθώς αυξάνεται η πρόσληψη γλυκόζης από τους μύες και τον λιπώδη ιστό, μέσω της μεταφοράς της από τον GLUT4 (μεταφορέας γλυκόζης) από το εσωτερικό του κυττάρου στη

κυτταρική μεμβράνη έτσι ώστε να παρατηρείται την ελάττωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ (Stryer L., 2005) (Εικόνα 2). Ακόμη προάγει τη σύνθεση γλυκογόνου και πρωτεϊνών και παρεμποδίζει τη λιπόλυση, τη γλυκογονόλυση και τη πρωτεϊνική αποικοδόμηση. Συνεπώς, έλλειψη ή μη-φυσιολογική δράση της ινσουλίνης οδηγεί σε πολλές διαταραχές, μεταξύ αυτών και αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και των λιπιδίων στο αίμα. (Saltiel, A.R. & Kahn, C.R., 2001).

Επίσης, υπάρχουν περιπτώσεις διαβητικών Αφρικανικής και Ασιατικής καταγωγής, οι οποίοι βρέθηκαν να παρουσιάζουν μόνιμη ινσουλινοπενία και να είναι επιρρεπείς σε φαινόμενα κετοξέωσης. Πρόκειται για ιδιοπαθής μορφή Τύπου I άγνωστης μέχρι στιγμής αιτιολογίας, όπου οι ασθενείς δεν εμφανίζουν αντισώματα εναντίων των β-κυττάρων των νησίδων Langerhans του παγκρέατος (Mc Larty et al., 1990; Pinero- Pilona et al., 2001).



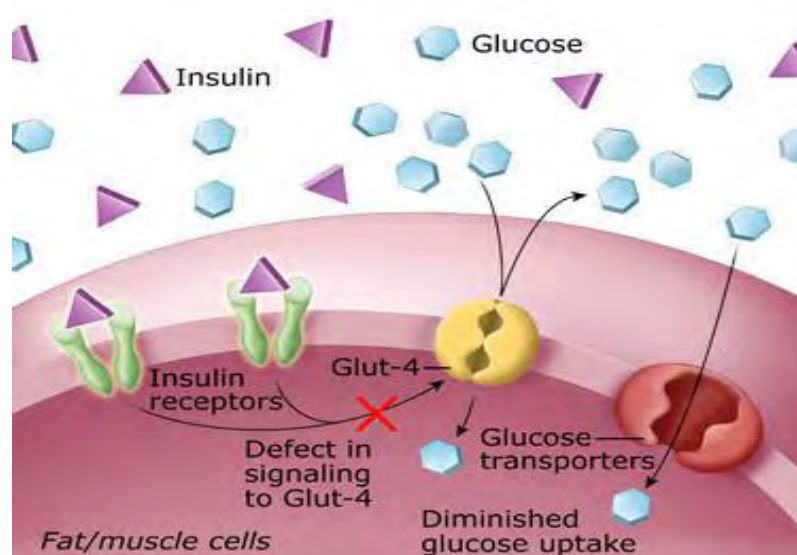
Εικόνα 2: Στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου I, κύτταρα του αίματος παράγουν αντισώματα τα οποία επιτίθενται στα κύτταρα του παγκρέατος που εκκρίνουν την ινσουλίνη (β- κύτταρα) και τα καταστρέφουν.

1.2.2 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου II (μη ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης, *Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM*):

Αποτελεί την πιο συχνά εμφανιζόμενη μορφή διαβήτη. Είναι πιο περίπλοκος και χαρακτηρίζεται από μη-φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης και ελάττωση της

ευαισθησίας των κυττάρων σε αυτή (ινσουλινοαντοχή), και συνεπακόλουθη μη επαρκή “δράση” της ινσουλίνης (Εικόνα 4) (Stryer, L., 2005; Zimmet, P. Et al., 2001; Alberti, K.G.et al., 2001; Devlin, T.M., 2005).

Η αρχική αντίδραση του οργανισμού είναι η αύξηση της μάζας των παγκρεατικών β-κυττάρων και της ποσότητας ινσουλίνης που εκκρίνεται για να υπερνικηθεί η ινσουλινοαντοχή. Λόγω όμως της βαθμιαίας αύξησης της τελευταίας φτάνει σε σημείο, όπου η ποσότητα ινσουλίνης δεν επαρκεί και εμφανίζεται η ασθένεια σε πλήρη εξέλιξη. (DeFronzo R.A., 1992). Το 90% των διαβητικών παγκοσμίως πάσχουν από διαβήτη τύπου II, με εξαίρεση τα βρέφη και τα παιδιά όπου επικρατεί ο διαβήτης τύπου I, τουλάχιστον μέχρι πρόσφατα, δεδομένου ότι αυξάνεται το ποσοστό εμφάνισης διαβήτη τύπου II ακόμα και σε αυτές τις πληθυσμιακές ομάδες (Stryer L., 2005; Zimmet, P. et al., 2001).



Εικόνα 3: Μονοπάτι σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και ινσουλινοαντοχή

Επίσης, η προδιάθεση για εμφάνιση διαβήτη είναι μεν κληρονομική, σπουδαίο ρόλο όμως παίζει και το περιβάλλον καθώς και ο τρόπος ζωής. Η έλλειψη φυσικής άσκησης και η παχυσαρκία φαίνεται ότι επιδρούν σημαντικά στην εκδήλωση της ασθένειας (Zimmet, P.; Alberti; K.G. & Shaw J., 2001). Επειδή όμως τα συμπτώματά της εμφανίζονται βραδέως, πολλές φορές δε γίνεται αντιληπτή, με αποτέλεσμα πολλά άτομα να πάσχουν χωρίς να το γνωρίζουν. Ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση διαβήτη τύπου II, τόσο σε ενήλικες όσο και παιδιά, είναι η παχυσαρκία.

1.2.3 Διαβήτης Κύησης (*Gestational Diabetes Mellitus, GDM*)

Πρόκειται για διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη που εμφανίζεται κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης (24^η-28^η εβδομάδα), συνήθως όταν η μητέρα είναι παχύσαρκη, ή υπάρχει οικογενειακό ιστορικό διαβήτη. Στη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το έμβρυο τρέφεται δια μέσου του πλακούντα. Ο πλακούντας με τη σειρά του παράγει ορισμένες ορμόνες, που βοηθούν στην ανάπτυξη του εμβρύου. Αυτές οι ορμόνες, οι οποίες βρίσκονται στα υψηλότερα επίπεδα κατά την 24^η-28^η εβδομάδα της εγκυμοσύνης, εμποδίζουν τη δράση της ινσουλίνης στο σώμα της εγκύου, μειώνοντας την αποτελεσματικότητά της με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Τα επίπεδα γλυκόζης συχνά ομαλοποιούνται μετά τον τοκετό (Buchanan et al., 2007).

1.2.4 Γενετικές μορφές σακχαρώδη διαβήτη

Υπάρχουν πολλές άλλες μορφές διαβήτη, με κοινό αποτέλεσμα την υπεργλυκαιμία.

Γενετικές ανωμαλίες των β κυττάρων του παγκρέατος

Ορισμένες μορφές διαβήτη σχετίζονται με μονογονιδιακές ανωμαλίες σημαντικών για τη λειτουργία των β κυττάρων. Αυτές οι μορφές, που διεθνώς αναφέρονται ως MODY, χαρακτηρίζονται από ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης χωρίς αντίσταση σε αυτήν, και μεταβιβάζονται με αυτοσωματικό επικρατή χαρακτήρα. Τουλάχιστον 6 γονίδια έχουν ενοχοποιηθεί. Ανάλογα με το υπεύθυνο γονίδιο, η υπεργλυκαιμία είναι περισσότερο ή λιγότερο σοβαρή, αλλά γενικά εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 25 ετών (Fajans et al., 2001). Σημειακές μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα έχουν συσχετιστεί με σακχαρώδη διαβήτη και κώφωση. Η πιο συχνή μετάλλαξη ανευρίσκεται στη θέση 3243 του γονιδίου tRNA που κωδικοποιεί λευκίνη. Η ίδια βλάβη ανευρίσκεται στο σύνδρομο MELAS (μυοπάθεια, εγκεφαλοπάθεια, γαλακτική οξέωση και αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια).

1.3 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

<i>Διαγνωστικά κριτήρια σακχαρώδη διαβήτη.</i>		
	Τιμή σακχάρου φλεβικού αίματος	
	Σε νηστεία	2 ώρες μετά από φόρτιση με γλυκόζη
Διαβήτης	≥ 7 mmol/l (≥ 126 mg/dl)	$\geq 11,1$ mmol/l (≥ 200 mg/dl)
Μη ανοχή στη γλυκόζη μετά από φόρτιση	< 7 mmol/l (< 126 mg/dl)	$\geq 7,8$ mmol/l και $< 11,1$ mmol/l (≥ 140 mg/dl και < 200 mg/dl)
Μη ανοχή στη γλυκόζη σε νηστεία	$\geq 5,6$ mmol/l και < 7 mmol/l (≥ 100 mg/dl και < 126 mg/dl)	$< 7,8$ mmol/l (< 140 mg/dl)

Πίνακας 2: Διαγνωστικά κριτήρια σακχαρώδη διαβήτη.

Με εξαίρεση τους διαβητικούς ασθενείς τύπου I, μεγάλο ποσοστό των διαβητικών τύπου II δε γνωρίζουν ότι έχουν διαβήτη. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι πολλά άτομα είναι ασυμπτωματικά ή έχουν μόνο ήπια συμπτώματα. Πολυδιψία, πολουρία, νυκτουρία, ανεπιθύμητη απώλεια βάρους, θολερότητα όρασης και αίσθημα κόπωσης είναι ορισμένα από τα συμπτώματα εκείνα τα οποία προϋδεάζουν στην ύπαρξη διαβήτη και τα οποία αιτιολογούνται από τα παρακάτω στοιχεία.

Ακόμη το άτομο λαμβάνει κανονικά την τροφή του και η γλυκόζη εισέρχεται στον οργανισμό (αίμα) αλλά, οι ιστοί αδυνατούν να την χρησιμοποιήσουν, με αποτέλεσμα η γλυκόζη να αποβάλλεται από τους νεφρούς και να έχουμε γλυκοζουρία. Η ωσμωτική πίεση στα ουροφόρα σωληνάρια αυξάνει και τελικά παρατηρείται πολουρία. Το νερό μπορεί να επαναρροφηθεί και ο οργανισμός προσπαθεί να αντισταθμίσει την απώλεια αυτή, αυξάνοντας την πρόσληψη υγρών από το στόμα, οπότε έχουμε το φαινόμενο της πολυδιψίας. Το αίσθημα κόπωσης και αδυναμίας, καθώς και η απώλεια βάρους αιτιολογούνται από το γεγονός ότι ο διαβητικός χρησιμοποιεί κυρίως τις πρωτεΐνες και τα ληφθέντα εκ της διατροφής

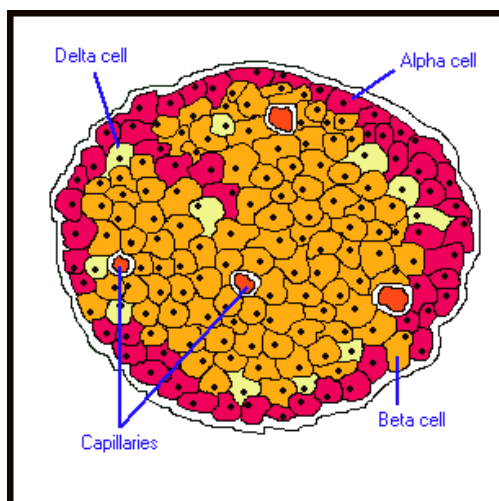
λιπαρά για την κάλυψη των θερμιδικών του αναγκών σε αντίθεση με τους μη πάσχοντες οι οποίοι χρησιμοποιούν τη γλυκόζη.

1.4 ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Για να διατηρηθεί το σωματικό βάρος σε σταθερά επίπεδα στο χρόνο, η εισαγωγή (intake) ενέργειας (κατανάλωση φαγητού) θα πρέπει να αντιστοιχεί στην κατανάλωση ενέργειας (το άθροισμα της εκκρινόμενης ενέργειας, των θερμικών απωλειών και της φυσικής άσκησης). Οποιαδήποτε απόκλιση από αυτή την ισορροπία οδηγεί σε αύξηση ή απώλεια βάρους. Οι άνθρωποι και τα περισσότερα θηλαστικά λαμβάνουν ενέργεια μέσα από διακριτά επεισόδια (discrete episodes) ή γεύματα. Η κύρια πηγή ενέργειας είναι η γλυκόζη. Οι περισσότεροι υδατάνθρακες περιέχουν γλυκόζη είτε ως δομική μονάδα, όπως στο άμυλο, είτε σε συνδυασμό με άλλους μονοσακχαρίτες, όπως στη λακτόζη. Μετά τη διάσπαση των υδατανθράκων στο λεπτό έντερο, η γλυκόζη απορροφάται από τα κύτταρα του εντέρου και οδηγείται στο αίμα. Μέσω του αίματος μεταφέρεται στα κύτταρα όπου και χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας. Ωστόσο, η γλυκόζη δε μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα χωρίς την παρουσία της ορμόνης ινσουλίνης. Αν δεν υπάρχει η ινσουλίνη, τα κύτταρα δε λαμβάνουν γλυκόζη και άρα ενέργεια, παρά το γεγονός ότι αυτή βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο αίμα. Η «κίνηση» της γλυκόζης στον οργανισμό και η ταυτόχρονη διατήρηση της συγκέντρωσής της στο αίμα σε δεδομένα επιθυμητά επίπεδα (ομοιόσταση της γλυκόζης) είναι μια περίπλοκη διαδικασία που ελέγχεται από το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης –ινσουλίνης (S. C. Woods et al., 2006); (Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009).

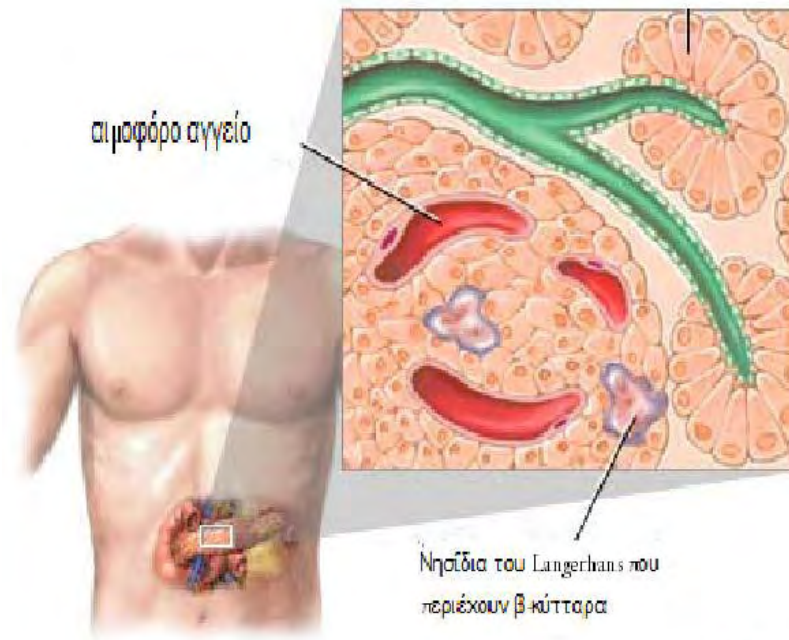
1.4.1 Το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης- ινσουλίνης

Η ενδοκρινής μούρα του παγκρέατος αποτελείται από απομονωμένα νησίδια που ονομάζονται νησίδια του Langerhans (Εικόνα 4).

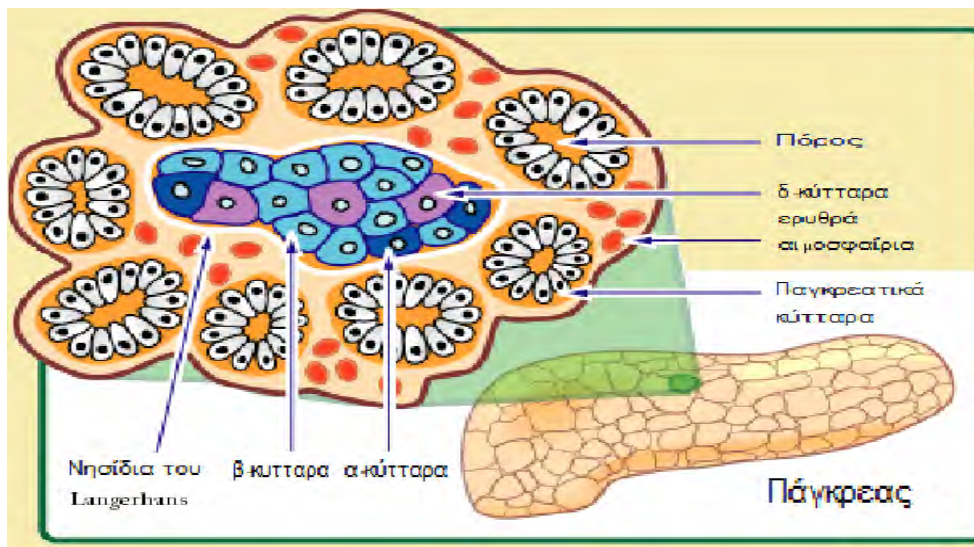


Εικόνα 4. Νησίδια του Langerhans.

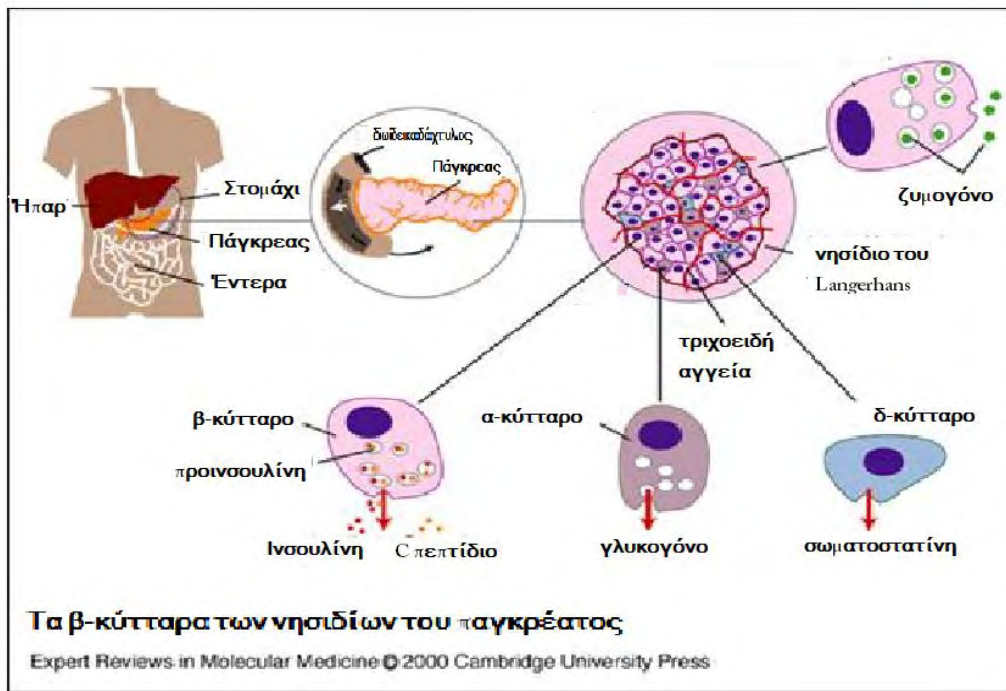
Στον ανθρώπινο οργανισμό τα νησίδια αυτά αριθμούν περίπου στο ένα εκατομμύριο, με συνολικό βάρος ιστού ένα γραμμάριο (Εικόνα 6). Τα περισσότερα νησίδια περιέχουν τουλάχιστον τρεις τύπους κυττάρων: α-κύτταρα που εκκρίνουν γλυκογόνο, β-κύτταρα που εκκρίνουν ινσουλίνη και δ-κύτταρα που εκκρίνουν σωματοστατίνη (Εικόνα 6). Τα β-κύτταρα αποτελούν το 80% του συνόλου των κυττάρων και βρίσκονται στο εσωτερικό των νησιδίων. Η περιφέρεια αποτελείται από α-κύτταρα, ενώ στο εσωτερικό βρίσκεται κι ένας μικρός αριθμός δ-κυττάρων. Οι ορμόνες που παράγονται από τα κύτταρα των νησιδίων του Langerhans έχουν πολυάριθμες λειτουργίες, η κυριότερη ωστόσο είναι κατά γενική ομολογία η ομοιόσταση της γλυκόζης (S. C. Woods et al., 2006); (Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009).



Εικόνα 5. Νησίδια του Langerhans στο ανθρώπινο πάγκρεας (Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009).

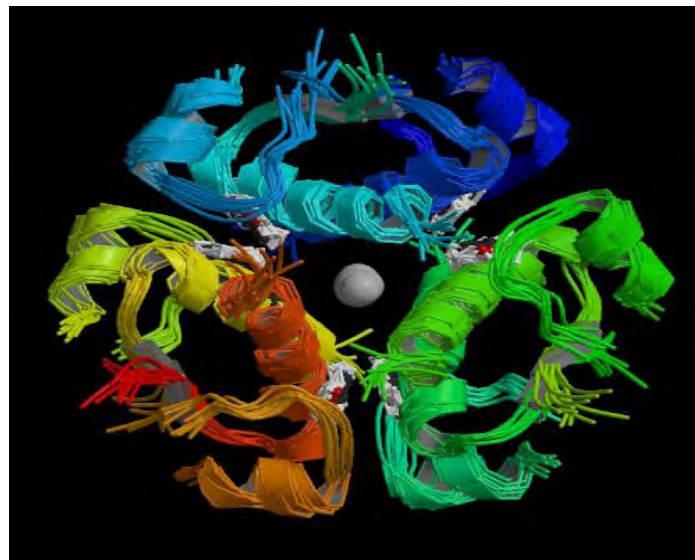


Εικόνα 6. Τύποι κυττάρων που περιέχονται στα νησίδια του Langerhans (Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009).



Εικόνα 7. Έκκριση ορμονών από το πάγκρεας, από κάθε είδος κυττάρων (Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009).

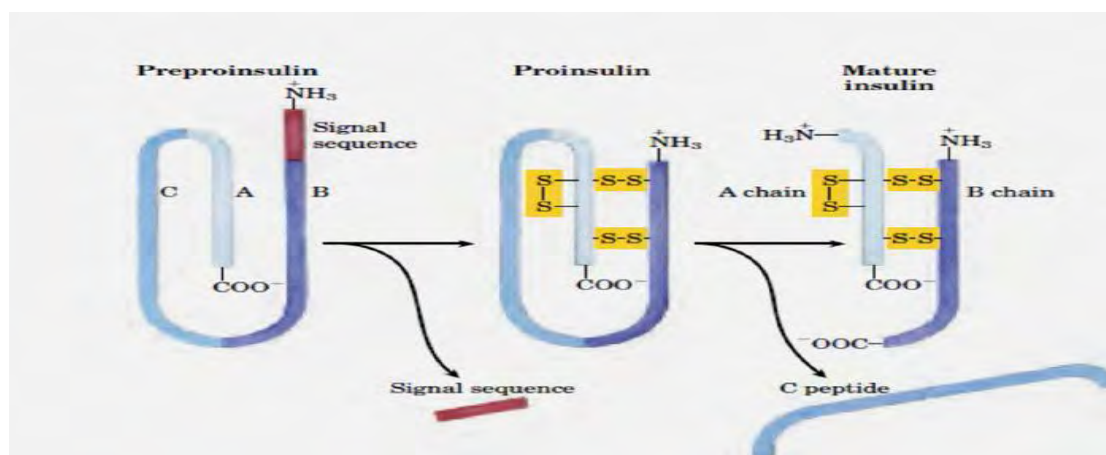
1.5 ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ



Εικόνα 8: 3D-Απεικόνιση του εξαμερούς μορίου της ινσουλίνης

1.5.1 Γενικά

Η ινσουλίνη είναι μία μικρή πρωτεΐνη ($M_r = 5800$) με δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες A και B, οι οποίες συνδέονται με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Συντίθεται στα νησίδια Langerhans του παγκρέατος και συγκεκριμένα από τα β -κύτταρα, σαν ένα ανενεργό πρόδρομο πολυπεπτίδιο, μιας αλυσίδας, το οποίο ονομάζεται προ-προϊνσουλίνη (Εικόνα 9). 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 9 : 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).

1.5.2. Ο Ρόλος της Ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη με πολλαπλές δραστηριότητες. Επιδρά κυρίως στο ήπαρ, τους μύες και το λιπώδη ιστό.

Στο ήπαρ, η ινσουλίνη διαδραματίζει τέσσερις βασικούς ρόλους:

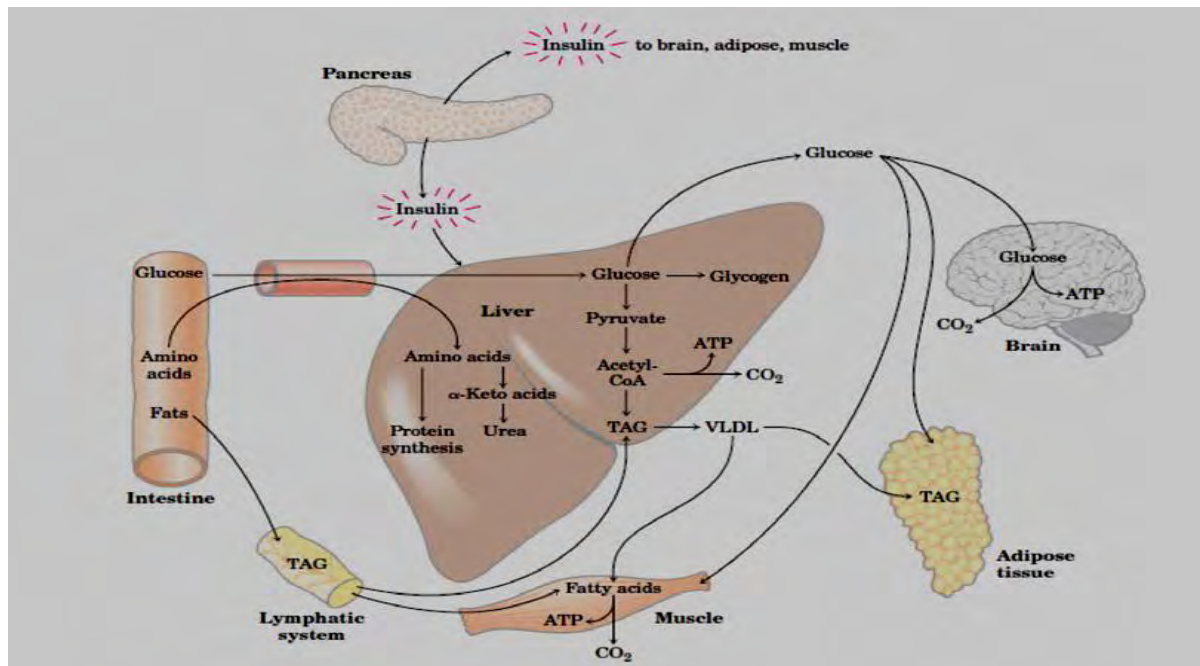
- Ενεργοποιεί την απορρόφηση της γλυκόζης μέσω της αποθήκευσής της συνθέτοντας γλυκογόνο και εμποδίζει τη γλυκογονόλυση, δηλαδή τη διάσπαση του γλυκογόνου και την απελευθέρωση της γλυκόζης. Το γλυκογόνο είναι βασική μορφή εναποθήκευσης της γλυκόζης στο ήπαρ αλλά και στους μύες. Η απελευθέρωση της γλυκόζης στα διαστήματα νηστείας προέρχεται από τη διάσπαση του γλυκογόνου
- Ενεργοποιεί την απορρόφηση της γλυκόζης μέσω της διάσπασής της σε πυροσταφυλικό οξύ, δηλαδή την οξειδωσή της για παραγωγή ενέργειας (γλυκόλυση) και εμποδίζει τη γλυκονεογένεση δηλαδή τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γλυκόζη.
- Ενισχύει τη λιπογένεση, την εναποθήκευση δηλαδή λίπους και την παραγωγή τριγλυκεριδίων και εμποδίζει τη λιπόλυση, τη διάσπαση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα.
- Ενισχύει το μεταβολισμό των πρωτεϊνών και μειώνει τη διάσπαση των πρωτεϊνών.

Στους μύες η ινσουλίνη προωθεί την πρόσληψη της γλυκόζης ενεργοποιώντας ινσουλινοευαίσθητους μεταφορείς στην επιφάνειά τους, καθώς και την εναποθήκευσή της μέσω της μετατροπής της σε γλυκαγόνη και της οξειδωσής της. Επιπλέον, ενεργοποιεί, όπως και στο ήπαρ, τη σύνθεση πρωτεϊνών και την εναποθήκευση λίπους. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και στα λιποκύτταρα. Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται ο ρόλος της ινσουλίνης και του γλυκογόνου και η επίδραση στους μύες και στους ιστούς του σώματος.

Τέλος, η ινσουλίνη εμποδίζει τη διαδικασία της κετογένεσης, της οξειδωσης δηλαδή των λιπαρών οξέων και της παραγωγής κετονικών σωμάτων. Με λίγα λόγια, η ινσουλίνη ευνοεί αναβολικές διεργασίες οι οποίες λειτουργούν στην κατεύθυνση της πρόσληψης της γλυκόζης και της αποθήκευσης ενέργειας, πρωτεϊνών και λίπους (S. C. Woods et al., 2006); (Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009).

1.5.3. 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 10) (Lehninger, 2008). Ακόμη 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 10: Σύντομη περιγραφή της δράσης της ινσουλίνης στο μεταβολισμό, ύστερα από την κατανάλωση ενός πλούσιου γεύματος (Lehninger, 2008).

1.6 ΓΛΥΚΑΓΟΝΗ

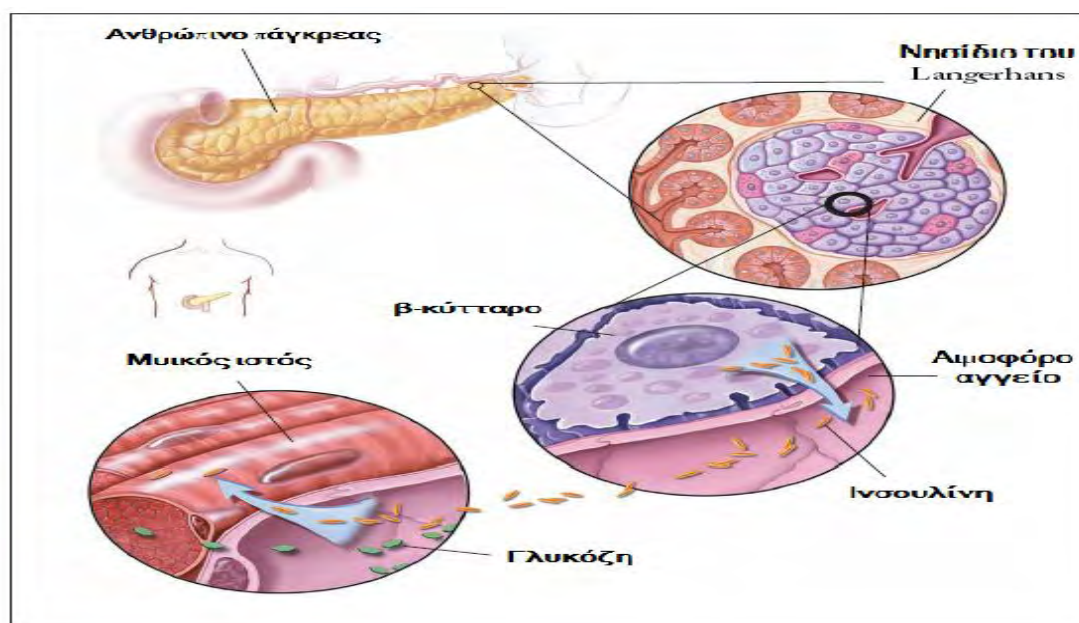


Εικόνα 11: 3D-Απεικόνιση του μορίου της γλυκαγόνης.

1.6.1 Γενικά

Η γλυκαγόνη παρουσιάζει αντίθετη συμπεριφορά. Κύριος ρόλος της είναι η παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ ενεργοποιώντας τη γλυκογονόλυση και εμποδίζοντας τη σύνθεση του γλυκογόνου. Επιπλέον, η γλυκαγόνη στο ήπαρ ενεργοποιεί την οξείδωση του λίπους για την παραγωγή ενέργειας (Εικόνα 10 και 12). Αν αυτό δεν είναι αρκετό, τα λιπαρά οξέα οξειδώνονται μερικώς για την παραγωγή κετονικών σωμάτων. Αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν από άλλους ιστούς ως «καύσιμο». Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι εκτός από τη γλυκόζη, τα

κετοξέα είναι η μόνη πηγή ενέργειας που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό ιδίως κατά τα διαστήματα μεταξύ των γευμάτων (S. C. Woods et al., 2006); (Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009).

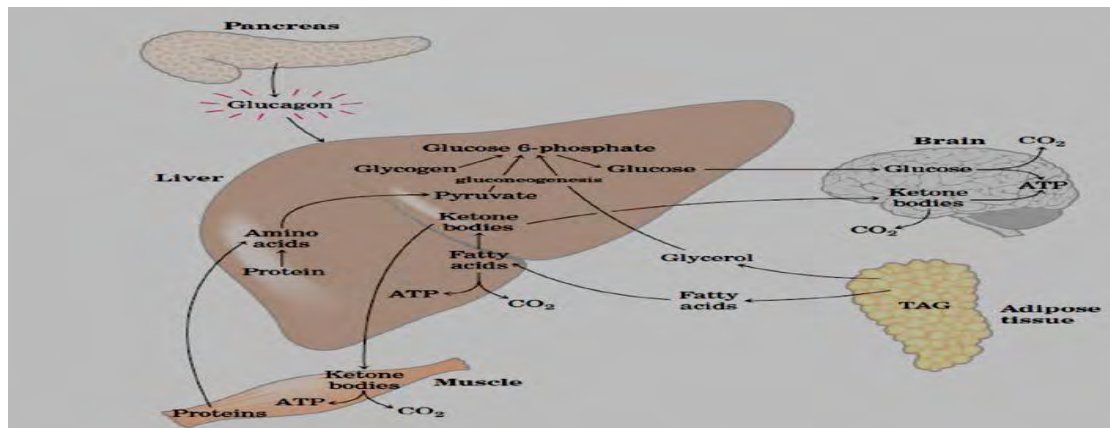


Εικόνα 12. Η επίδραση της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης στους μύες και στους ιστούς του σώματος (Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009).

1.6.2 Δράση της γλυκαγόνης στον μεταβολισμό

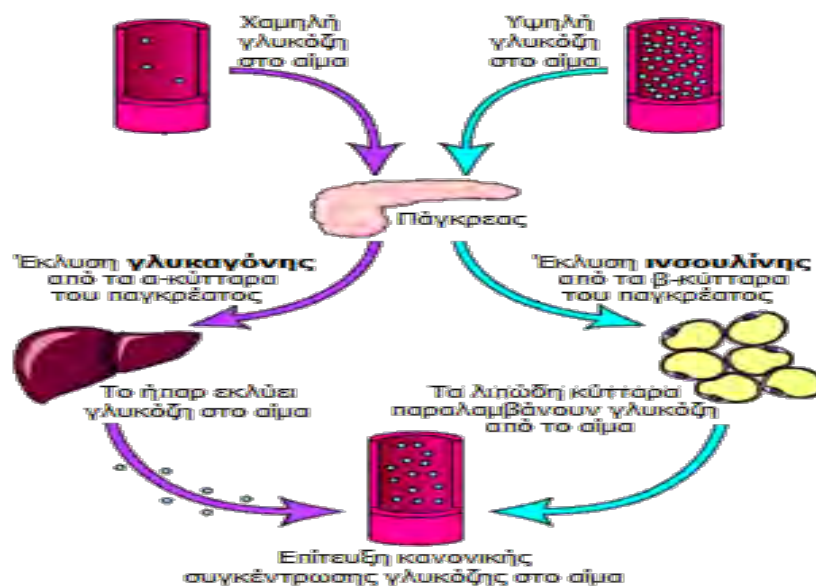
Όπως, έχει ήδη αναφερθεί τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα προκαλούν την έκκριση της γλυκαγόνης και τη μείωση της ινσουλίνης. Μετά από μερικές ώρες χωρίς γεύμα, το ήπαρ γίνεται η βασική πηγή γλυκόζης για τον εγκέφαλο. Η γλυκαγόνη διεγείρει τη διάσπαση του γλυκογόνου του ήπατος ενεργοποιώντας τη φωσφορυλάση 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 μύς 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 14) (Lehninger, 2008).



Εικόνα 13 : Σύνομη περιγραφή της δράσης της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό, σε κατάσταση νηστείας (Lehninger, 2008).

1.8 Γενικός μηχανισμός δράσης των εν λόγω ορμονών στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος.

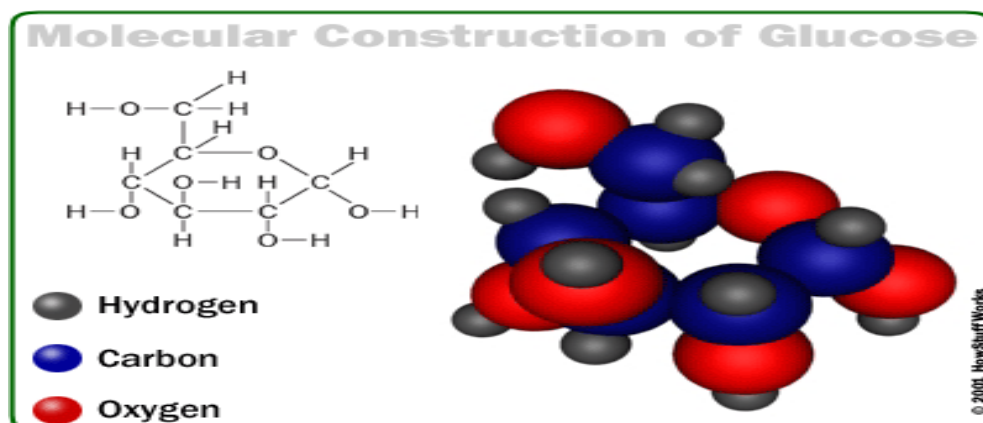


Εικόνα 14 : Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί στην απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Αυτή, στο ήπαρ, προκαλεί τη σύνθεση γλυκογόνου με επακόλουθο, τη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόννης από το πάγκρεας και προσλαμβάνεται από το ήπαρ. Εκεί η γλυκαγόννη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης. Και οι δύο ορμόνες, στόχο έχουν να επαναφέρουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο φυσιολογικό.

2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

2.1. Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο (Εικόνα 15). Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη (Stryer, 1997).



Εικόνα 15. Απεικόνιση ενός μορίου γλυκόζης.

Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων (McArdle et al., 2000). Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έτσι ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν μόνο τη γλυκόζη ως καύσιμο. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης (McArdle et al., 2000). Η συγκέντρωση της στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg

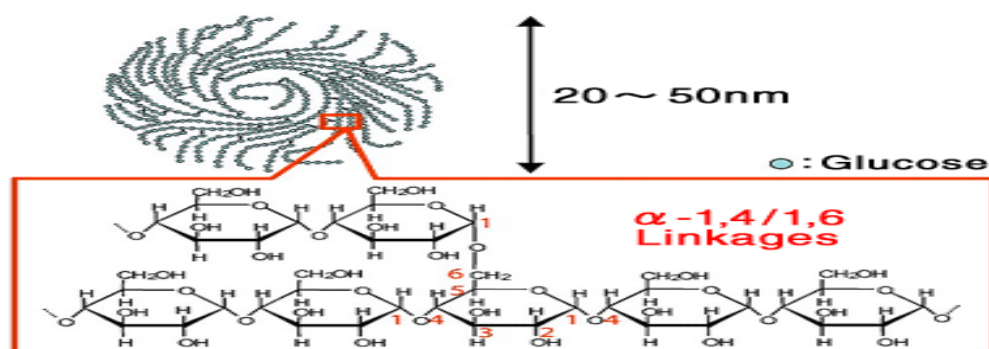
ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη (Stryer, 1997).

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

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη (Martin et al., 1998). Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και την διαιτητική κατάσταση του οργανισμού (McArdle et al., 2000).

2.2. Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια α -D-γλυκόζης και αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης (Stryer, 1997).



Εικόνα 16. Η δομή του γλυκογόνου.

Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό τι στους μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο (Stryer, 1997).

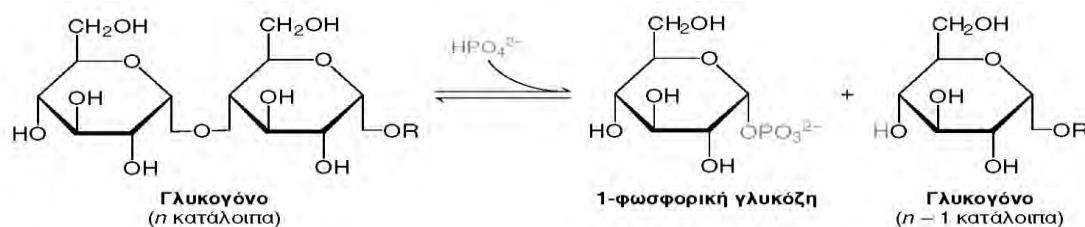
2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936. Το ζεύγος Cori απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης (Cori & Cori, 1936). Η

φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση (Εικόνα 17).

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και διατηρείται η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα (Stryer, 1997).

Γλυκογόνο (n κατάλοιπα) + Pi → 1-φωσφορική-γλυκόζη + γλυκογόνο (n-1 κατάλοιπα)



Εικόνα 17. Αποικοδόμηση γλυκογόνου (Stryer 1997).

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

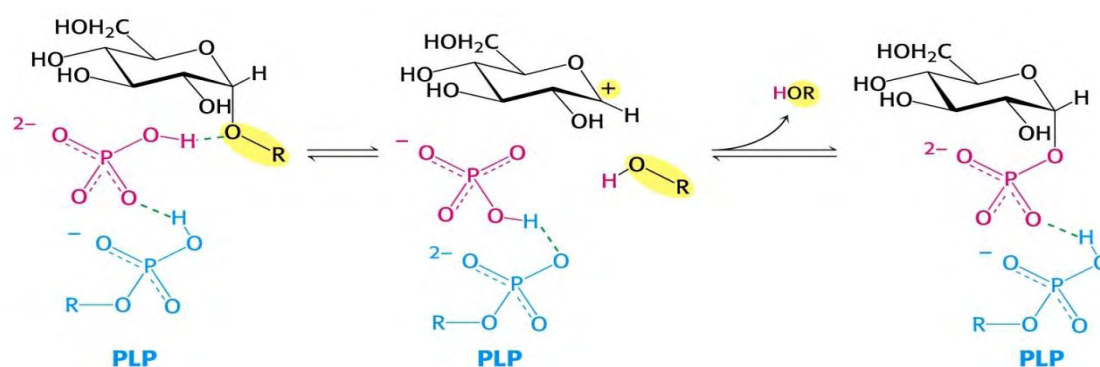
Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται

κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη (Stryer, 1997).

2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

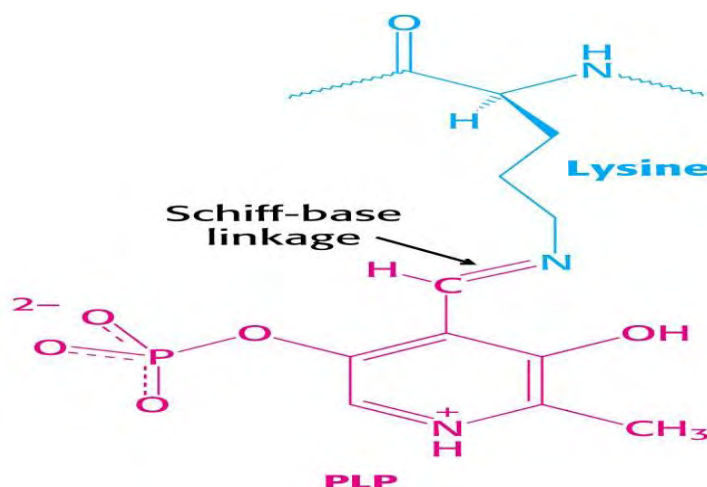
Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο (Stryer, 1997). Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β , δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη (Εικόνα 10) (Stryer, 1997).

Ενδιάμεσο καρβοκατιόντος



Εικόνα 18. Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα HPO_4^{2-} (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται με τη μεταφορά ενός πρωτονίου από την πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης φωσφορικής πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης (Stryer, 1997).

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου (Εικόνα 19). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης (Stryer, 1997).



Εικόνα 19. Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP (κόκκινο) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης (Stryer, 1997).

2.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

2.3.1 Γενικά

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

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

Δομικά η GP είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ότι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B₆. Με βάση διάφορα πειράματα που έγιναν στο παρελθόν αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστηριότητα του ενζύμου (Oikonomakos et al., 1992). Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, τις αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό

ανιόν έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση (McLaughlin, 1984).

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση (Stryer, 1997).

Φυσιολογικά η δραστηριότητα της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G,(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP) (Rath et al., 2000).

2.3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες γίνεται με την βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η λειτουργική δομή των οποίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την καταλυτική τους δράση ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Σύμφωνα με τους Monod, Changeux και Wyman, ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο ευθύνεται για την βιολογική δράση

της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής προκαλεί μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται **αλλοστερική μετάπτωση**. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή (Monod et al., 1963).

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

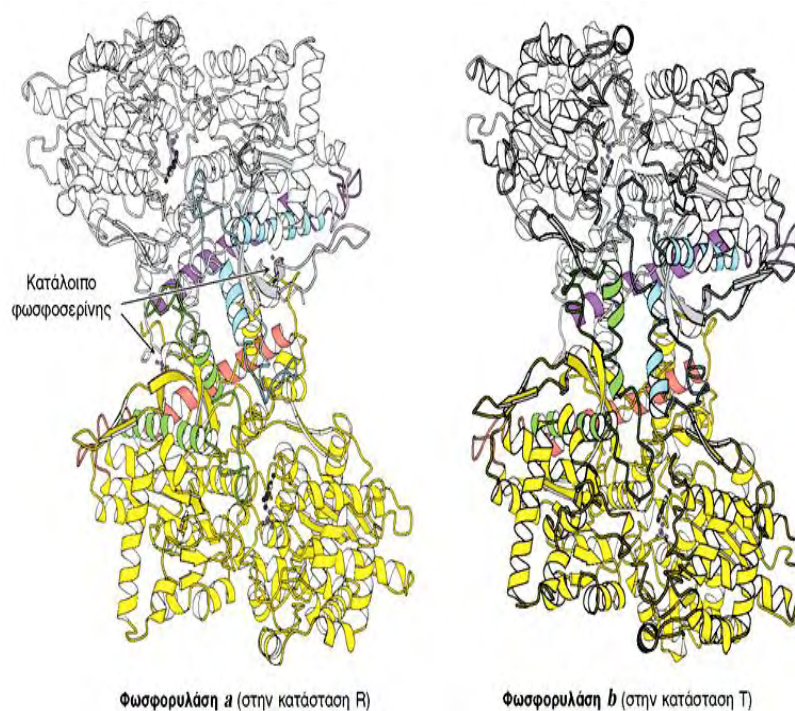
Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται σε ομοτροπικές, μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε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

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση

της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα (Monod et al., 1965).

Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται ανάλογα με το αν η αλλοστερική μετάπτωση προκαλείται από αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου. Σημειώνεται ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών (Monod et al., 1965); (Oikonomakos et al., 1977).

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T (Εικόνα 20). Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α -έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη (Stryer, 1997).

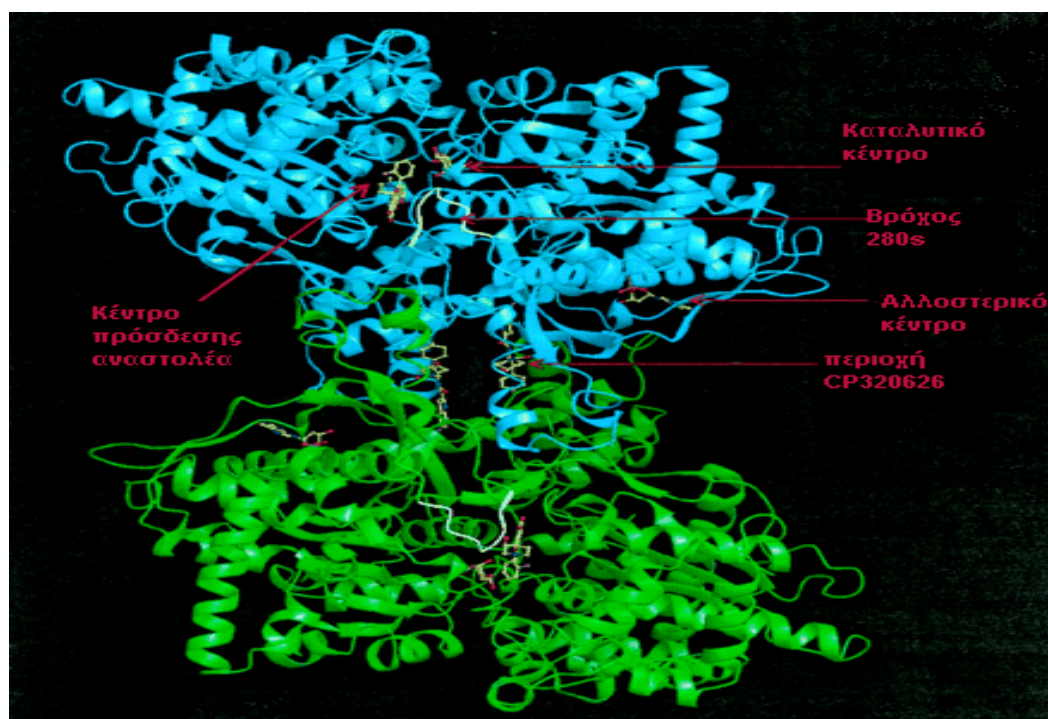


Εικόνα 20. Δομή της φωσφορυλάσης *a* και της φωσφορυλάσης *b*. Η φωσφορυλάση *a* φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 14 κάθε υπομονάδας. Η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης R. Η μία υπομονάδα δείχνεται με λευκό, ενώ οι έλικες και οι θηλιές, που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση, με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα δείχνεται με κίτρινο και οι ρυθμιστικές δομές με πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν φωσφορυλιώνεται και υπάρχει κυρίως στην κατάσταση T (Stryer, 1997).

Η μυϊκή φωσφορυλάση *b* είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης *b* στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης *b* από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου (Stryer, 1997). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση *b* είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση *a* είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μύς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια.

Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα

σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο (Εικόνα 21). Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση. Τέλος, στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T κατάσταση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την R κατάσταση και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP (Οικονομακος, 2001).

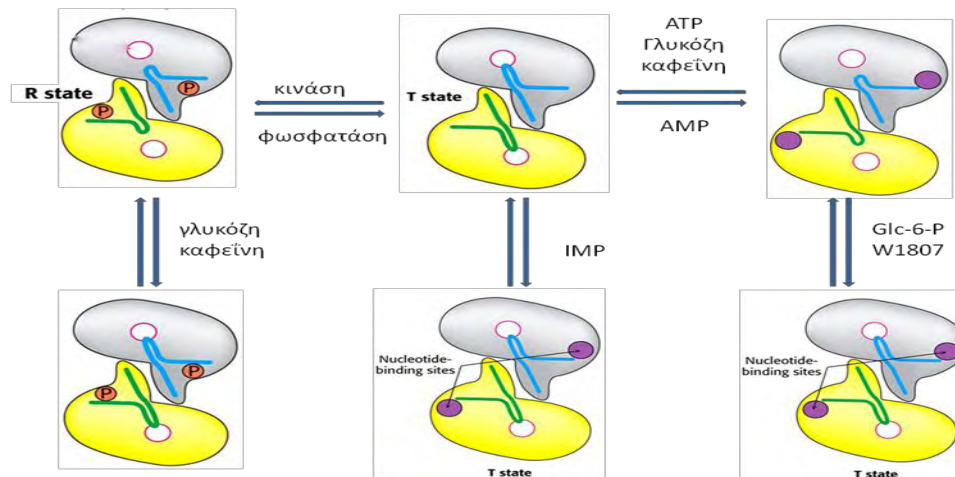


Εικόνα 21. Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Οι αναστολείς είναι προσδεμένοι στα κέντρα του ενζύμου, ενώ υποδεικνύεται και η θέση του βρόχου 280s.

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης b μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν in vitro να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και

άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} (Οικονομακος et al., 1992).

Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P (Εικόνα 22) (Johnson et al., 1989).



Εικόνα 22. Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης (Stryer, 1997).

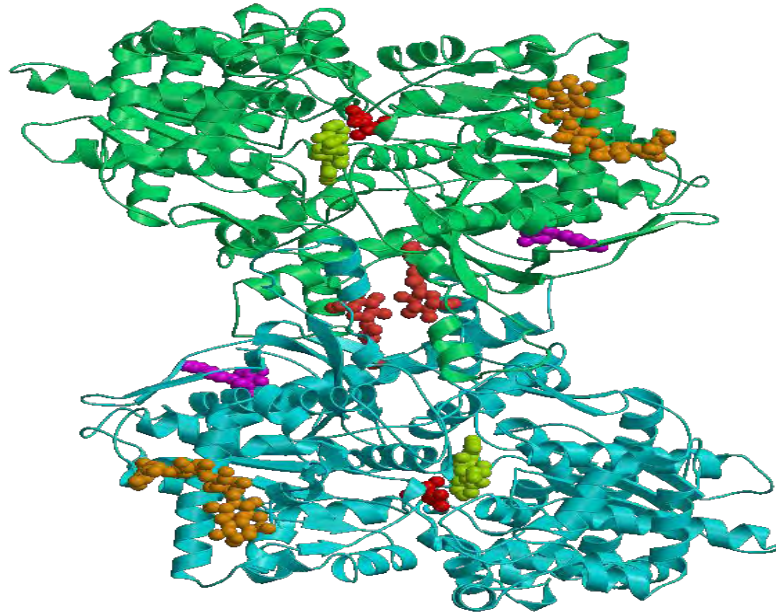
Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοίωση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α, αλλά όχι η β παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο (Stryer, 1997).

2.3.3 Κρυσταλλική δομή της GP

Οι κρυσταλλικές δομές της GP_a και της GP_b (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 (Barford & Johnson, 1989). Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά ύδατος (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Κι αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους (Barford & Johnson, 1989). Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν επίσης την ύπαρξη έξι κέντρων σύνδεσης:

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)
- Καταλυτικό κέντρο (C)
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων)

Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å (Εικόνα 24). Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 3_{10} μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια π έλικα μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόχος 280 (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18) (Oikonomakos et al., 1992).



Εικόνα 23. Σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της GP. Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αντιστοιχούν στην α1 έλικα, στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της α2 έλικας και στην έλικα της περιοχής πύργος, ο βρόχος 280s και η αρχή της α8 έλικας μαζί με τον βρόχο που συνδέει τις διαμορφώσεις β7 και β8 είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Το απαραίτητο συνένζυμο PLP είναι εγκλωβισμένο στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένο με τη Lys680 της α21 έλικας. Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την G1P, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης έχει πρόσβαση σ' αυτό μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, μεταξύ της α2 και της α8 έλικας. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την α12 έλικα και είναι στην επιφάνεια του ενζύμου μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο του νουκλεοζιτικού αναστολέα βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτίδια που συνδέονται σε αυτό το κέντρο δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου.

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

κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων (Fletterick & Madsen, 1980).

2.3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 (Oikonomakos, 2001). Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας (Oikonomakos, 2002).

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

Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε

αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιοριστεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες Χ για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων (Blundell et al., 2002).

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu\text{M}$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης (Witters & Avruch, 1978), στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με $K_i \approx 0.1$.

3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

3.1. Αρχές 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

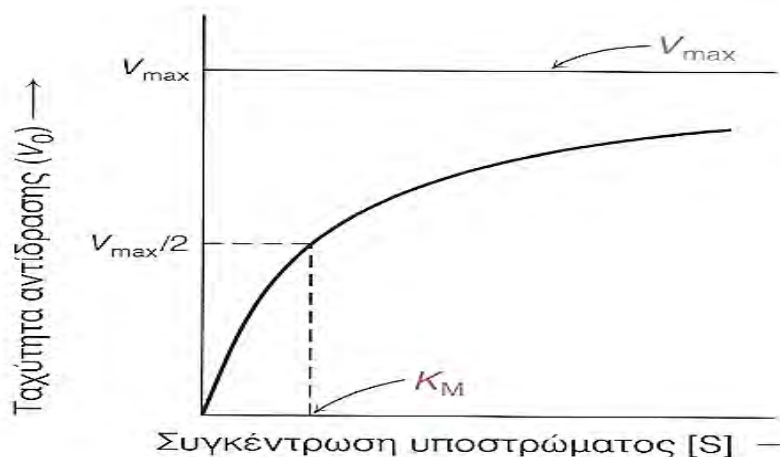
pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Η ενεργότητα ενός ενζύμου, E, εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, η ταχύτητα, V, ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος, S, που καταναλώνεται ή το ποσό 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 **V₀** 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, V₀, με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, [S], είναι μια ορθογώνια υπερβολή (Εικόνα 25). Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, V₀=k[S]), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητικής μηδενικής τάξεως, V₀=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 24 : 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 ασυμπτωτικά. 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, και εκφράζεται ως συγκέντρωση. 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).

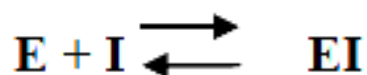
Μια πολύ χρήσιμη σταθερά είναι ο αριθμός ανακύκλωσης δηλαδή η **k_{cat}** , που ορίζεται ως **$k_{cat}=V_{max}/[ET]$** . Η **k_{cat}** αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό moles υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου σε συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε sec^{-1} . Τέλος η σταθερά εξειδίκευσης, k_{cat}/K_M ο λόγος δύο σταθερών, εκφράζεται σε $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 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 (λ.χ. με διαπίδυση) και όταν

αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά την δραστικότητά 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) :



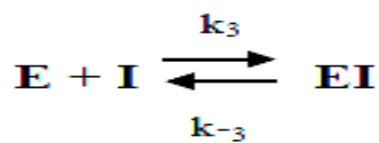
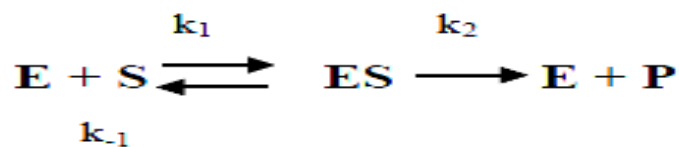
Η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου *EI* ή με άλλα λόγια, η σταθερά της αμφίδρομης πιο πάνω αντίδρασης, δίνει την σχέση:

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

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: Από τη 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 αγχιστεία 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

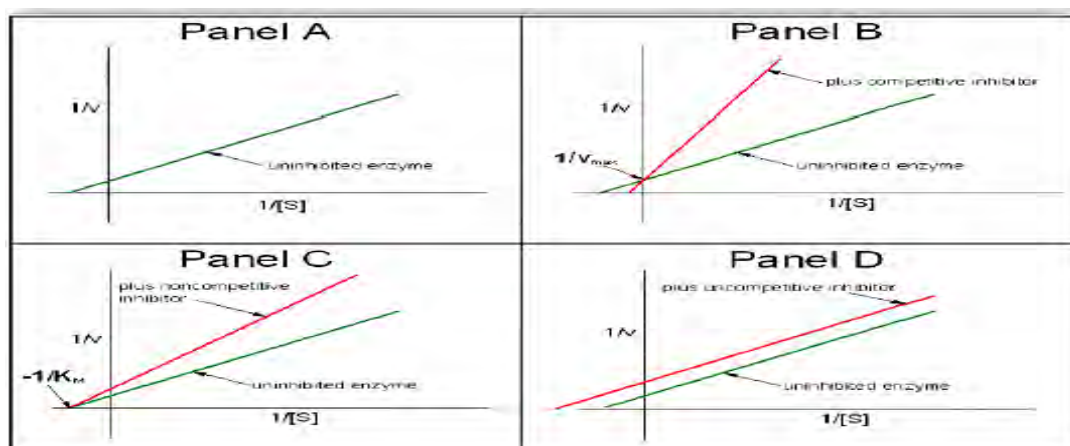
δίνει η μέγιστη ταχύτητα, ώστε ο όρος K_i να γίνεται πάλι μηδαμινός, με αποτέλεσμα η φυσιολογική V_{max} να μη μεταβάλλεται. Λόγω λοιπόν της μορφής του παρονομαστή στην εξίσωση, η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα, δηλαδή η τιμή της $[I]$, είναι ψηλή ή όταν η τιμή της $[S]$ 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 ES. 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 25 : 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 V_{max} παραμένει σταθερή ενώ η K_m αυξάνεται.

4. *Pyrus spinosa*



Εικόνα 26 : Το *Pyrus spinosa* σε ανθοφορία (αριστερά) και σε καρποφορία (δεξιά).

Το ***Pyrus spinosa*** είναι ένας θάμνος του γένους *Pyrus* το οποίο περιέχει περίπου 36 με 124 είδη. Απαντάται σε ξέφωτα δασών, περιθώρια χωραφιών και δίπλα σε δρόμους. Η ανάπτυξη του φυτού φτάνει στα 1- 6 μέτρα. Ανήκει στα φυλλοβόλα και είναι ιθαγενή στην Ιβηρική Χερσόνησο, τη Γαλλία, τη χερσόνησο των Απεννίνων, τη Βαλκανική χερσόνησο και την Τουρκία. Οι θάμνοι προτιμούν μια ηλιόλουστη κατάσταση σε μέτρια υγρά εδάφη και ανέχονται θερμοκρασίες έως -23 °C.

Φαρμακευτικές ιδιότητες

Αιμοστατικό, κατά της δυσπεψίας, κατά της διάρροιας, ψυκτικό, αντισπασμωδικό, ευεργετικό στις παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος και στην οδυνηρή δυσμηόρροια. Συστατικά-ουσίες: Οξέα φρούτων: μαλικό οξύ, κιτρικό οξύ, κουϊνικό οξύ, κυανογενικά γλυκοσίδια (αμυγδαλίνη), αρωματικές ουσίες, παράγωγα του καφεϊκού οξέος και κυρίως 5-κοφφεοϋλ-κουϊνικό οξύ, πηκτίνη.

2^ο ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962), με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) (Melridou and Oikonomakos, 1983).

Υλικά:

- Κουνέλια ποικιλίας *oryctolacus cunicullus* (3 αρσενικά μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (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 CH₃COOH 1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%, 3.6M
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρικς-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/HCl 0.001M] (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M (αρύθμιστου pH)
- 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, pH7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO₃ και 10mM EDTA στους 100°C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 20% αιθανόλη στους 4°C)

Όργανα:

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

Πορεία:

Βήμα 1^ο: Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μύς από 3 κουνέλια. Οι μύς αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες 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**. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2^ο: Όξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH₃COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολρότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κορεσμένο KHCO₃ και ογκομέτρηση του διαλύματος.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για περίπου 16 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30min στους 0-4°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH 7.0 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH 7.0 ίσο με το 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH₃COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο (ενζυμικό διάλυμα) ογκομετρείται.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1ml AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH₃COO)₂Mg 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, (το AMP και το (CH₃COO)₂Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραιώσης (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). 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 6h. 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 ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

5.2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

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

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



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

Πορεία:

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται και λαμβάνεται το ελαιώρημα ένζυμου περιεκτικότητας ~500μg/mL. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 0.2% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου 5% (v/v). Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται επίσης το υπόστρωμα για α-D-Glc-1-P 2.0mM με προσθήκη 200μL υποστρώματος α-D- Glc -1-P 9.0mM, 18μL AMP 50mM και 502μL H₂O (κατάλληλο για τέσσερα δείγματα).

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση στους 30°C επί 15 λεπτά και το υπόστρωμα επί περίπου 3 λεπτά. Μετά την επώαση, 180μL από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 5.0μg ένζυμου ανά mL, 1.0mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P 2.0mM, 50mM υδροχλωρικής τριαιθανολαμίνης, 100mM KCl και 1mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού) λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μL SDS 1.0% (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται). Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D-Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της παρουσίας φωσφορικών).

5.2.1. Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

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 ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α-D- Glc-1-P).

Πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 5% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D- Glc-1-P 2.0, 4.0, 6.0, 10 και 20mM, με προσθήκη 200μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα α-D- Glc-1-P, 18μL AMP 50mM και 502μL H₂O.

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

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

5.3 Προσδιορισμός IC₅₀ αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής (Segel, 1975).

Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή (fully competitive inhibition), αφού η σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και κατ' επέκταση τη δράση του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο της πλήρους συναγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας συνδέεται στο

καταλυτικό κέντρο του ενζύμου «μιμούμενος» το υπόστρωμα και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Η σταθερά IC_{50} 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 του IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση G1P (1-φωσφορικής γλυκόζης).

Υλικά :

Απιονισμένο ύδωρ

Διάλυμα ενζύμου

Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (α -D- Glc-1-P) 18mM

Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM

Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50mM β -φωσφογλυκερόλης (β - GP), 50mM β -μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA)

Γλυκογόνο 1 % (w/v)

Διάλυμα SDS 1%

Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8

Διάλυμα του αναστολέα

Όργανα:

Υδατόλουτρο (ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία πάντα στους 30° C)

Φασματοφωτόμετρο (ρυθμισμένο στα 850nm)

Δοκιμαστικούς σωλήνες

Ζυγός

Πιπέτες

Συσκευή vortex

Συσκευή μέτρησης pH (pH μετρο)

Χρονόμετρο

Πορεία :

5.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη παίρνουμε 10μl και το αραιώνουμε σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκεντρώσεως της GPb, με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής $b=1\text{cm}$ (ξέρουμε προς ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ενζύμου είναι 1.32).

Εν συνεχεία παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα το οποίο περιέχει 25μg/mL GPb, γλυκογόνο 10% w/v, και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 5% v/v, έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: ένζυμο 5.0 μg/ mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2 % w/v και υπόστρωμα α-D- Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης και αναστολέα μεταβαλλόμενης. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση 15 min σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 30° C.

5.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματων

Αξιολόγηση εκχυλισμάτων σε διάλυμα DMSO:

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC_{50} . Η σταθερή συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P είναι 9mM, του AMP 50mM και του DMSO 100%. Μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P είναι 2 mM, της AMP 1mM και του DMSO 2%. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL (Πίνακας 3). Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

Πίνακας 3:

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D- Glc-1-P (9mM)	200 μL	200 μL
AMP (50mM)	18 μL	18 μL
*Αναστολέας	-	18 μL
DMSO 100%	18 μL	-
H₂O	484 μL	484 μL
Τελικός όγκος (V_T)	720μL	720μL

*DMSO: Είναι ένα άχρωμο, ελαιώδες, ελαφρά ιξώδες υγρό. Διαλύει εύκολα μη πολικές ενώσεις και πολλά ανόργανα άλατα.

5.3.3 Εκτέλεση του πειράματος

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180μl από το ενζυμικό μίγμα στον χρόνο 0 σε κάθε διάλυμα υποστρώματος όγκου 720 μL, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολούθως, ανά 1 λεπτό (σε χρόνους 1', 2', 3', 4'), λαμβάνονται από 200 μL και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μL SDS 1%. Έτσι σταματά η ενζυμική αντίδραση, αφού παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μια διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5 ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου (βλ. Πειραματικό μέρος §5.4.1.) σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρηση τους σε μήκος κύματος 850nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των P_i που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Graffit, προκειμένου να προσδιοριστεί η IC₅₀. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά α-

D- Glc-1-P, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της, αλλά και του ενζυμικού διαλύματος, λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.

5.4 Προσδιορισμός φωσφόρου

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

5.4.1 Μέθοδος ασκορβικού οξέος (Saheki et al, 1985)

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

Υλικά (Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάζονται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα):

Διάλυμα μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με ατμίζων HCl 10N.

Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N. Ανάμιξη 4:1 όγκου αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος. Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από **15 min** από την παρασκευή του(δλδ. ανάμιξη) και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

Πορεία:

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

5.5. Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC_{50} 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 τον μηδενισμό του φωτομέτρου.
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της.
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.

Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού, και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους. Επίσης, παρασκευάζεται γνωστό πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$.

3^ο ΜΕΡΟΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 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.

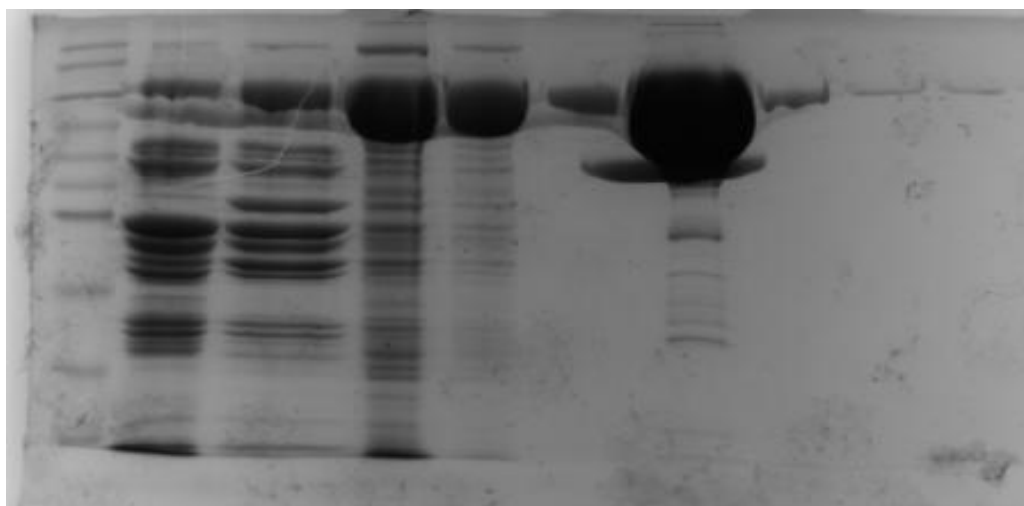
Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων για τον προσδιορισμό της IC_{50} έναντι της μυϊκής *φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου*.

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.

6.2. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

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

Marker 1 2 3 4 5



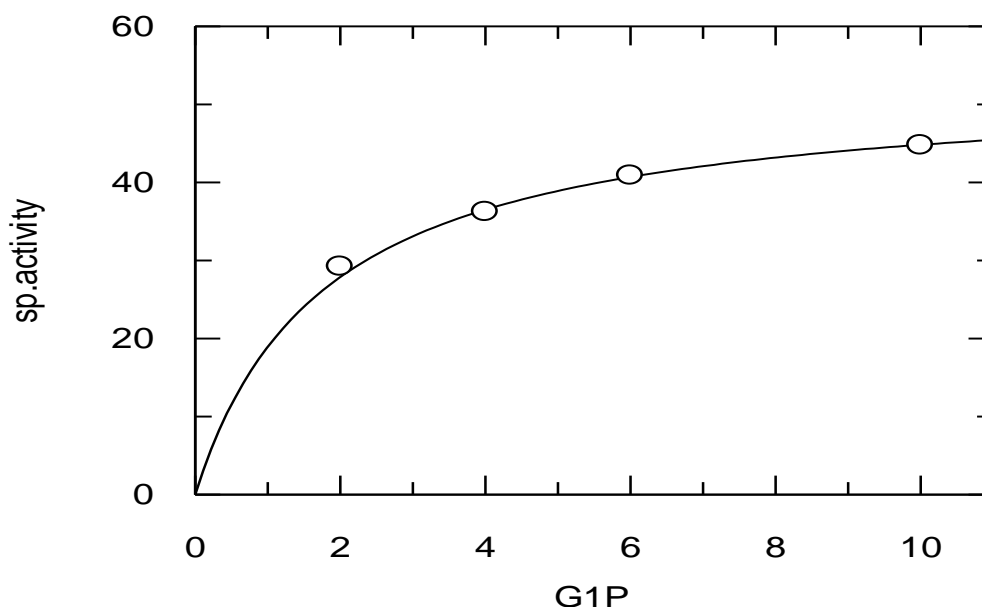
Εικόνα 27. Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη

6.3. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

6.3.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m . (βλ. Πειραματικό μέρος, §5.2.1.)

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=1.79 \pm 0.13 \text{ mM}$ και $V_{max}=52,85 \pm 0,88 \text{ } \mu\text{mol Pi/mg/min}$. Στην εικόνα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών / min/mg ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P).



Εικόνα 28. Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος, της G-1-P [2.0, 4.0, 6.0, 10.0 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.

6.3.2. Κινητική μελέτη πολυφαινολικών εκχυλισμάτων φυτικών προϊόντων

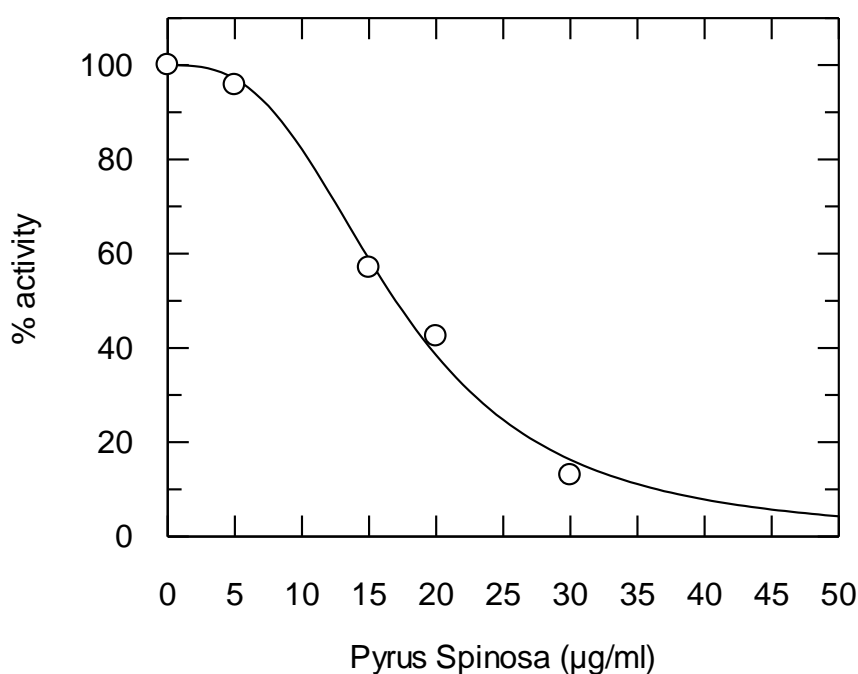
Για το σκοπό της εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου μελετήθηκαν πολυφαινολικά εκχυλίσματα φυτικών προϊόντων ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Graffit (Πίνακας 7) (Leatherbarrow, 1998). Στον πίνακα 7 αναγράφεται το εκχύλισμα που μελετήθηκε, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της IC_{50} καθώς και η τιμή της IC_{50} .

Οι πειραματικές συνθήκες και ο προσδιορισμός των IC_{50} αναφέρονται στην ενότητα 5.3. Η ενζυμική αντίδραση έλαβε χώρα σε σταθερές συγκεντρώσεις AMP (1mM), γλυκογόνου (0.2%), 1-φωσφορικής γλυκόζης (2mM) και διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα.

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας της IC_{50} το διάγραμμα που προέκυψε κατά τον προσδιορισμό της IC_{50} .

Εκχύλισμα	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)
Pyrus Spinosa	5,15,20,30	$16,99 \pm 0.56$

Πίνακας 7: Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή μελετών για τον προσδιορισμό των IC_{50} των υπό μελέτη εκχυλισμάτων



Εικόνα 29. Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.

4ο ΜΕΡΟΣ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συμπεράσματα

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

Η ικανότητα αναστολής έναντι της *φωσφορυλάσης του γλυκογόνου* του φυτικού εκχυλίσματος αξιολογήθηκε με κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το εκχύλισμα *Pyrus Spinoso* που μελετήθηκε εμφανίζει αναστολή με τιμή της IC_{50} να είναι: **16,99 ± 0.56μg/ml** μια τιμή με χαμηλότερη ανασταλτική δράση σε σχέση με τις ποικιλίες εκχυλισμάτων αμπέλου που μελετήθηκαν (Kantsadi A. L., et al., 2014).

Περαιτέρω κρυσταλλογραφικές μελέτες, των παραπάνω εκχυλισμάτων, θα μας βοηθήσουν να ανακαλύψουμε τη δραστική ουσία καθώς και το κέντρο σύνδεσης της στο ένζυμο. Αποτελέσματα 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

Δασκαλάκη Α. Ελένη. (2009). Σχεδίαση, Ανάπτυξη και In silico Συγκριτική Αξιολόγηση Ελεγκτών Κλειστού Βρόχου για Άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1, ΕΜΠ.

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.

Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.

Blundell T. L. & Johnson L. N. (1976). *Protein Crystallography*, Academic Press, London.

Blundell T. L., Jhoti H. & Abell C., (2002). High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, *Nature Reviews, Drug Discovery*, Volume 1.

Buchanan T.A., Xiang A., Kjas S.L. et al., (2007). What is gestational diabetes. *Diabetes Care*; 30: (suppl.2): 5105-5111.

DeFronzo R.A., (1992). Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: a complex metabolic web. *J Cardiovasc Pharmacol* **20 Suppl 11**, S1- 16.

Devlin, T.M., (2005.) *Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations*, Wiley-Liss. *Diabetes Care*, 27: 1047-1053.

Fajans SS et al., (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*.

Fiske C. H. & Subbarow Y., (1925), The colometric determination of phosphorous, *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.

Fletcher R. J. & Madsen N. B., (1980). The structures and related functions of phosphorylase α , *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 31-61.

Kantsadi A. L., Apostolou A., Theofanous S, Stravodimos G. A., Kyriakis E., Gorgogietas V. A., Chatzileontiadou D. S.M., Pegiou K., Skamnaki V. T., Stagos D., Kouretas D., Psarra A-M. G., Haroutounian S. A., Leonidas D.D., (2014). *Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of Vitis vinifera extracts against glycogen phosphorylase*, *Food and Chemical Toxicology*, Elsevier

Leatherbarrow R. J., (1998) GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd., Staines, UK

Martin J. L., Johnson L. N. & Withers S. G., (1990). Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, *Biochemistry*, 29, 10745-10757.

Mc Larty D.G., Athaide I., Bottazzo G.F., Swai A.B.M., Alberti K.G.M.M., (1990). Islet cell antibodies are not specifically associated with insulin-dependent diabetes in rural Tanzanian Africans. *Diabetes Research Clinical Practice*; 9:219-224.

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

McLaughlin P.J., Stuart D.I., Klein H.W., Oikonomakos N.G., Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873.

Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., (1963). Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329.

Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118.

Oikonomakos N.G., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Gavalas N.G., Johnson L.N., (2000b). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for 8, 575-584.

Oikonomakos N. G., Somsak L. Curr. Opin., (2008) *Invest. Drugs*, 9, 379.

Oikonomakos N. G., Acharya K. R. & Johnson L. N., (1992). Post-Translational Modifications of Proteins, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-127.

Oikonomakos N.G., Zographos S.E., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Johnson L.N., (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* 275, 34566-34573.

Oikonomakos N.G., Kosmopoulou M., Zographos S.E., Leonidas D.D., Chrysina E.D., Somsák L., Nagy V., Praly J.-P., Docsa T., Tóth B. and Gergely P., (2002). The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'-b-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696.

Oikonomakos N.G., (2002). Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561-586. p 1-41.

Saheki S., Takeda A. & Shimazu T., (1985). Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity, *Anal. Biochem.*, 148, 277-281.

Saltiel, A.R. & Kahn, C.R., (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806 .

Savona-Ventura C. (2002) *The history of diabetes mellitus. A Maltese perspective*

Segel L.H., (1975). *Enzyme kinetics*, Wiley interscience, New York.

Somsak L., Czifrak K., Toth M., Bokor E., Chrysina E. D., Alexacou K. M., Hayes J. M., Tiraidis C., Lazoura E., Leonidas D. D., Zographos S. E., Oikonomakos N. G. (2008). New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983.

Stryer L. (1997). Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 2η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

Stryer, L. (2005). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Wild S. Roglic G. Green A. Sicree R. King H., (2004). Global prevalence of diabetes.

Zimmet, P. Alberti, K.G. & Shaw J., (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-7.

