



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ ΣΕΡΑΦΕΙΜ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ  
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

**«Κινητικές μελέτες σύνδεσης βιοδραστικών ενώσεων στο μεταβολικό ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου για την ανάπτυξη αντιγλυκαιμικών παραγόντων»**

**“Kinetic studies of the binding of bioactive compounds in the metabolic enzyme glycogen phosphorylase for the development of antiglycemic agents”**

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο: «Κινητικές μελέτες σύνδεσης βιοδραστικών ενώσεων στο μεταβολικό ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου για την ανάπτυξη αντιγλυκαιμικών παραγόντων» εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ:** ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ:** ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ.

**ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ:** ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ.

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ:** ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	7
Περίληψη – Abstract.....	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	9
1.2 Ομοιόσταση γλυκόζης.....	9
1.2.1 Μεταφορείς γλυκόζης (Glucose Transporters, GLUTS).....	10
1.2.2 Ινσουλίνη - Ρόλος και μεταβολικές επιδράσεις στη σύνθεση του γλυκογόνου.....	10
1.2.3 Σύνθεση του γλυκογόνου.....	12
1.2.4 Γλυκαγόνη – Ρόλος και μεταβολικές επιδράσεις στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου .....	12
1.2.5 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	13
1.2.6 Νόσοι Αποθήκευσης του γλυκογόνου.....	14
1.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP).....	15
1.3.1 Μυϊκή Φωσφορυλάση.....	16
1.3.2 Ηπατική Φωσφορυλάση.....	17
1.3.3 Φωσφορυλάση του εγκεφάλου.....	17
1.3.4. Ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης.....	17
1.3.5 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	18
1.3.5.1 Καταλυτικό κέντρο.....	18
1.3.5.2 Κέντρο αναστολής.....	18
1.3.5.3 Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου.....	19
1.3.5.4 Αλλοστερικό κέντρο.....	19
1.3.5.5 Νέο αλλοστερικό κέντρο.....	19
1.3.5.6 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης.....	19
1.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως φαρμακευτικός στόχος για την ανάπτυξη αντιγλυκαιμικών παραγόντων.....	20
1.4.1 Σακχαρώδης Διαβήτης.....	20
1.4.2 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I (Ινσουλινοεξαρτώμενος).....	21
1.4.3 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II (Μη ινσουλινοεξαρτώμενος).....	21
1.4.4 Θεραπευτικές Προσεγγίσεις.....	22
1.4.5 GP και Καρκίνος.....	23
1.5 Ανθοκυανίνες.....	23
2. Σκοπός.....	24

3. Υλικά και Μέθοδοι.....	25
3.1 Οργανολογία.....	25
3.2 Υλικά.....	25
3.3 Διαλύματα.....	26
3.4 Αναλώσιμα.....	26
3.5 Κυτταρική σειρά HepG2.....	27
3.6 Ουσίες.....	28
3.7 Τεχνικές κυτταροκαλλιεργειών.....	28
3.7.1 Απόψυξη κυττάρων.....	28
3.7.2 Θρυψινοποίηση.....	28
3.7.3 Ψύξη κυττάρων.....	28
3.7.4 Μέτρηση κυττάρων και στρώσιμο.....	28
3.7.5 Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT.....	29
3.8 Τεχνικές εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών – Αναλυτικές μέθοδοι.....	29
3.8.1 Harvest-Συλλογή κυττάρων.....	29
3.8.2 Κυτταρική λύση.....	29
3.8.3 Χρωματομετρική μέθοδος Bradford.....	30
3.8.4 Προετοιμασία των κυττάρων για το πείραμα ελέγχου δραστικότητας του ενζύμου GPa.....	30
3.8.5 Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστικότητας της GPa.....	30
3.8.6 Μελέτες με αναστολείς- Προσθήκη ουσιών.....	31
3.8.7 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών μελετών.....	31
4. Αποτελέσματα.....	32
4.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος ανθοκυανινών από χυμό ροδιού.....	32
4.2 Βελτιστοποίηση του πειραματικού πρωτοκόλλου για τον ενζυμικό προσδιορισμό της δραστικότητας της GPa.....	32
4.3 Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστικότητας της GPa – Μελέτες με τον αναστολέα.....	35
4.4 Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστικότητας της GPa – Μελέτες με τον αναστολέα και τις ουσίες Phloridzin, Phloretin.....	36
5. Συζήτηση.....	38
6. Βιβλιογραφία.....	39

## Περιεχόμενα Εικόνων, Πινάκων και Διαγραμμάτων

Εικόνα 1.....	9
Εικόνα 2.....	9
Εικόνα 3.....	10
Εικόνα 4.....	12
Εικόνα 5.....	12
Εικόνα 6.....	13
Εικόνα 7.....	14
Εικόνα 8.....	15
Εικόνα 9.....	16
Εικόνα 10.....	18
Εικόνα 11.....	20
Εικόνα 12.....	20
Εικόνα 13.....	27
Εικόνα 14.....	36
Εικόνα 15.....	36
Πίνακας 1.....	15
Πίνακας 2.....	22
Πίνακας 3.....	24
Πίνακας 4.....	25
Πίνακας 5.....	25
Πίνακας 6.....	26
Πίνακας 7.....	26
Πίνακας 8.....	27
Πίνακας 9.....	33
Πίνακας 10.....	34
Πίνακας 11.....	34
Πίνακας 12.....	35
Διάγραμμα 1.....	32
Διάγραμμα 2.....	35
Διάγραμμα 3.....	37

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Σεπτέμβριο του 2019 έως τον Ιούνιο του 2020, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Βιοχημείας – Μεταβολισμού, Δρ. Σκαμνάκη Βασιλικής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη καθηγήτρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την τιμή που μου έκανε να αποτελώ μέλος της ερευνητικής της ομάδας, αλλά και για την αμέριστη βοήθεια που μου έδωσε όλο αυτό το διάστημα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας του ΤΒΒ, καθώς και τον Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο, Καθηγητή Βιοχημείας του ΤΒΒ, για την άποψη συνεργασία, τις γνώσεις και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Δράκου Χριστίνα για την αδιάκοπη βοήθεια και το χρόνο της, καθώς ήταν πάντοτε πρόθυμη να με καθοδηγήσει, τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου μας Τσιάλτα Γιάννη, για την καθημερινή του στήριξη και υπομονή οποιαδήποτε στιγμή κι αν αυτή χρειάστηκε, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα αλλά και φίλο Κούλα Συμεών τόσο για την στήριξη και την υπομονή του σε όλα στα στάδια της ερευνητικής διαδικασίας όσο και της πολύτιμης συμβολής του στα εκτός εργαστηρίου ζητήματα όλα αυτά τα χρόνια. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Στραβοδήμο Γεώργιο, τον Δρ. Κυριάκη Ευθύμιο, την Δρ. Καρρά Κατερίνα και τις υποψήφιες διδάκτορες Τσαγκαράκου Αναστασία, Σολοβού Θεοδώρα, Παπαϊωάννου Όλγα για την υπέροχη συνύπαρξη, την στήριξη και τη βοήθειά τους. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στον φίλο και υποψήφιο διδάκτορα Γεωργαντόπουλο Αχιλλέα για την μεγάλη συνεισφορά του, αλλά και την σημαντική βοήθειά του όλα αυτά τα χρόνια της κοινής μας πορείας τόσο στο εργαστήριο όσο και έξω από αυτό. Ακόμη δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος κατά τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για τη βοήθεια, την υποστήριξη και την πολύτιμη συμβολή τους όλα αυτά τα χρόνια, καθώς χωρίς αυτούς δεν θα είχα τη δυνατότητα να συνεχίσω τις σπουδές μου και δεν θα είχα καταφέρει τους στόχους μου.

## Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί μία από τις σοβαρότερες μεταβολικές διαταραχές και χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία), που οφείλεται στην ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης ή/ και στη μειωμένη δράση της. Ένζυμα του μεταβολισμού του γλυκογόνου που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για τον σχεδιασμό ενώσεων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase, GP) καταλύει το πρώτο βήμα καταβολισμού του γλυκογόνου προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το ένζυμο εντοπίζεται σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: τη φωσφορυλιωμένη GP<sub>a</sub> (R στεροδιαμόρφωση - υψηλή δραστηριότητα- υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα) και την απόφωσφορυλιωμένη GP<sub>b</sub> (T στεροδιαμόρφωση - χαμηλή δραστηριότητα- χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα). Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η ανασταλτική ικανότητα του εκχυλίσματος από χυμό ροδιού της ποικιλίας «Ερμιόνη» που είναι πλούσιο σε ανθοκυανίνες στην ενζυμική δραστηριότητα της GP με την πραγματοποίηση κινητικών μελετών σε *ex vivo* σύστημα ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2. Τέλος, μελετήθηκε ο τρόπος εισόδου της γλυκόζης και η επίδραση δύο αναστολέων των GLUT (Phloridzin, Phloretin) στην ενζυμική δραστηριότητα της GP παρουσία και απουσία του εκχυλίσματος.

Λέξεις – Κλειδιά: Ένζυμα – Ανάλυση - Φωσφορυλάση του γλυκογόνου - Γλυκογόνο – Μεταβολισμός – Σακχαρώδης Διαβήτης

## Abstract

Diabetes mellitus (DM) is one of the most serious hormonal disorders and is characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia) due to insufficient insulin secretion and / or reduced activity. Enzymes in glycogen metabolism involved in regulating glucose levels are used as molecular targets to design compounds and can be used as potential hypoglycemic drugs. GP is a key enzyme involved in glycogen metabolism by catalyzing the first step of glycogen breakdown towards glucose-1-phosphate (Glc-1-P). It exists in two interconvertible forms: a phosphorylated form (GP<sub>a</sub>, R state; high activity; substrate specificity) and a dephosphorylated (GP<sub>b</sub>, T state; low activity; substrate specificity). In the present study, the inhibitory capacity of the pomegranate extract of the "Ermioni" variety, which is rich in anthocyanins in the enzymatic activity of GP, was studied by conducting kinetic studies in *ex vivo* hepatocellular HepG2 system. Finally, the mode of glucose entry and the effect of two GLUT inhibitors (Phloridzin, Phloretin) on the enzymatic activity of GP was studied in the presence and absence of the extract.

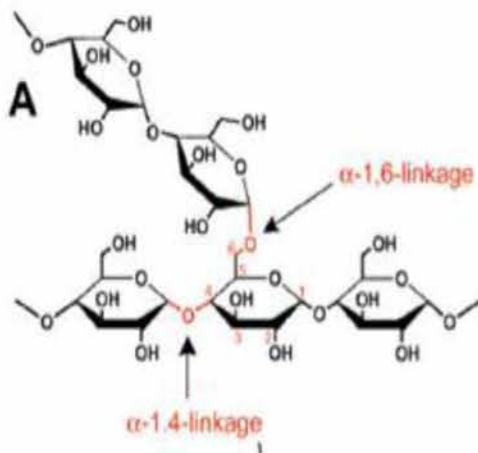
Keywords: Enzymes - Analysis - Glycogen Phosphorylase - Glycogen - Metabolism – Diabetes Mellitus



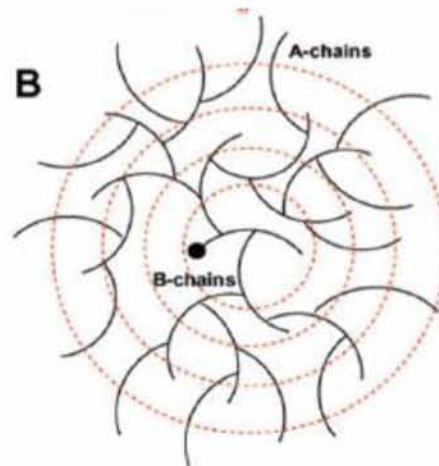
## 1) Εισαγωγή

### 1.1) Μεταβολισμός του Γλυκογόνου

Το 1857 ο Claude Bernard ανακάλυψε το γλυκογόνο του ήπατος. Από τότε ακολούθησαν αρκετές ερευνητικές μελέτες για το ρόλο και την σημασία του γλυκογόνου. Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές μορίων γλυκόζης που χρησιμεύει ως μέσο αποθήκευσης γλυκόζης στα κύτταρα, όταν υπάρχει αρκετή γλυκόζη για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού και χρησιμοποιείται σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης. Το γλυκογόνο αποτελεί ένα σημαντικό απόθεμα καύσιμων μορίων, αφού ο ελεγχόμενος καταβολισμός του και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Με τον τρόπο αυτό το γλυκογόνο συμβάλλει στη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος αυτός του γλυκογόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικό, αφού η γλυκόζη είναι το μόνο καύσιμο για τον εγκέφαλο. Η απελευθερούμενη από το γλυκογόνο γλυκόζη μπορεί να προμηθεύσει ενέργεια απουσία οξυγόνου και έτσι μπορεί να τροφοδοτεί με ενέργεια αναερόβιες δραστηριότητες. Το γλυκογόνο βέβαια εκτός των θηλαστικών ανιχνεύεται σε αρχαία και βακτήρια, ενώ στα φυτά τον ρόλο του παίζουν η αμυλόζη και η αμυλοπεκτίνη. Στο μόριο του γλυκογόνου τα κατάλοιπα γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς κατά μήκος των γραμμικών αλυσίδων και με  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς στις διακλαδώσεις, που συναντώνται περίπου κάθε δέκατο κατάλοιπο. Οι κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ, οι μύες και ο εγκέφαλος, ωστόσο, εντοπίζεται και σε άλλους ιστούς, όπως ο λιπώδης ιστός και η καρδιά, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ο ρόλος του σ' αυτούς. Στο ήπαρ οι διαδικασίες της σύνθεσης και της αποικοδόμησής του ελέγχονται με τέτοιο τρόπο, ώστε η συγκέντρωση της γλυκόζης του αίματος να διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα, σε αντίθεση με τους μύες που οι αντίστοιχες διεργασίες ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών. [12],[13], [16]



Εικόνα 1 : Το μόριο του γλυκογόνου, όπου παρατηρούνται οι  $\alpha$ -1,4 και  $\alpha$ -1,6-γλυκοζιτικοί δεσμοί. [12]

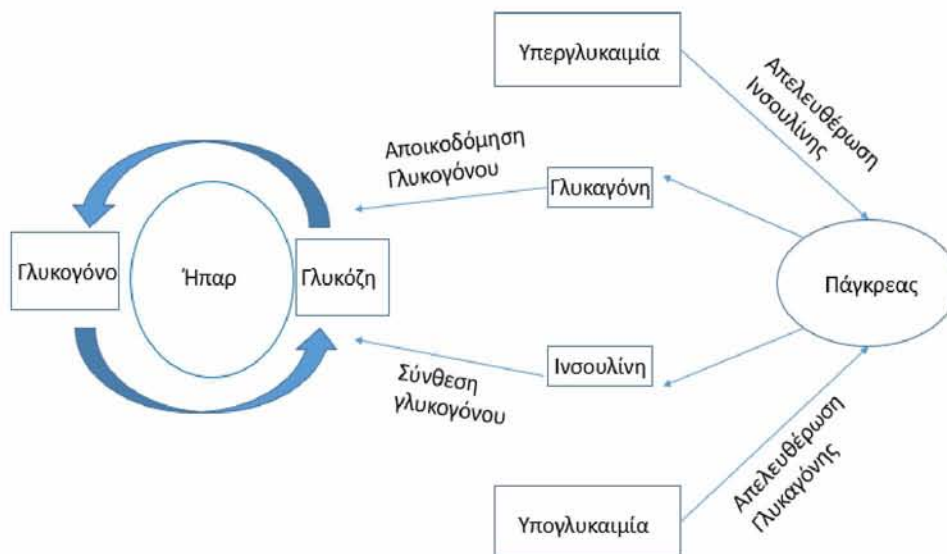


Εικόνα 2 : Οι  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδες του γλυκογόνου και η γλυκογενίνη που εμφανίζεται ως μαύρη κουκίδα στο κέντρο. [12]

### 1.2) Ομοίωση της γλυκόζης

Η διατήρηση της γλυκόζης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα είναι μία απαραίτητη προϋπόθεση για την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Αυτό πραγματοποιείται μέσω ενός πολύπλοκου συστήματος που υπόκειται σε ορμονικό και νευρικό έλεγχο μέσω μορίων (νευροδιαβιβαστών και ορμονών) που απελευθερώνονται από τους μύες, τον λιπώδη ιστό, τον εγκέφαλο, το ήπαρ, το πάγκρεας

και το έντερο. Καθοριστική συμβολή στην διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης έχει το πάγκρεας μέσω των αντίθετων δράσεων της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης που εκκρίνονται από αυτό. [1] (εικόνα 3)



**Εικόνα 3:** Ο μηχανισμός ρύθμισης της ομοιόστασης της γλυκόζης. Τα αυξημένα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος διεγείρουν την απελευθέρωση της ινσουλίνης και τα μειωμένα της γλυκαγόνης από το πάγκρεας. Η ινσουλίνη αφού απελευθερωθεί διεγείρει την γλυκογονική σύνθεση στο ήπαρ. Αντιθέτως, η γλυκαγόνη διεγείρει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου επίσης στο ήπαρ μέσω διάσπασης της γλυκόζης.

### 1.2.1) Μεταφορείς Γλυκόζης (Glucose Transporters, GLUTS)

Τα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών εισάγουν γλυκόζη με διάχυση που διαμεσολαβείται από μέλη της οικογένειας μεταφορών GLUT (SLC2A). Δεκατέσσερις πρωτεΐνες GLUT εκφράζονται στον άνθρωπο και περιλαμβάνουν μεταφορείς για υποστρώματα, όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η μυοϊνσοσιτόλη και το ουρικό οξύ. Οι πιο κοινές ισομορφές του μεταφορέα γλυκόζης, οι GLUTS 1– 4, είναι γνωστό ότι έχουν ξεχωριστές ρυθμιστικές ιδιότητες αντικατοπτρίζουν τους ειδικούς τους ρόλους στην εύρυθμη κυτταρική λειτουργία και στην ομοιόσταση της γλυκόζης. [2],[3]

Οι πρωτεΐνες GLUT διακρίνονται σε τρεις τάξεις. Η **τάξη I** περιλαμβάνει: τον GLUT1 (SLCA1) που εκφράζεται ευρέως σε εμβρυϊκούς ιστούς, τον GLUT2 (SLCA2) που εκφράζεται στους νεφρούς, στο ήπαρ, στα β- κύτταρα του παγκρέατος και στο λεπτό έντερο, τον GLUT3 (SLCA3) που εκφράζεται κυρίως στους νευρώνες και στον πλακούντα, τον GLUT4 (SLCA4) που εκφράζεται στον λιπώδη ιστό και στους μύες (σκελετικούς και καρδιακό), ενώ είναι και ο μεταφορέας γλυκόζης που ρυθμίζεται από την ινσουλίνη, υπεύθυνος για την ρυθμιζόμενη από την ινσουλίνη αποθήκευση γλυκόζης και τέλος τον GLUT14 (SLCA14) που εκφράζεται στους όρχεις. Η **τάξη II** περιλαμβάνει: τον GLUT5 (SLC2A5), έναν μεταφορέα φρουκτόζης στα κύτταρα του εντέρου, τον GLUT7 (SLC2A7), που βρίσκεται στο λεπτό και στο παχύ έντερο μεταφέροντας γλυκόζη από το ενδοπλασματικό δίκτυο, τον GLUT9 (SLC2A9) που εντοπίζεται στο έντερο, στο ήπαρ και στους νεφρούς και τον GLUT11 (SLC2A11) που εκφράζεται σε πολλούς ιστούς. Η **τάξη III** περιλαμβάνει: τον GLUT6 (SLC2A6), τον GLUT8 (SLC2A8), τον GLUT10 (SLC2A10), τον GLUT12 (SLC2A12) και τον μεταφορέα H<sup>+</sup>/μυοϊνσοσιτόλης (HMIT) GLUT13 που εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο. [2],[3]

### 1.2.2) Ινσουλίνη - Ρόλος και μεταβολικές επιδράσεις στην σύνθεση του γλυκογόνου



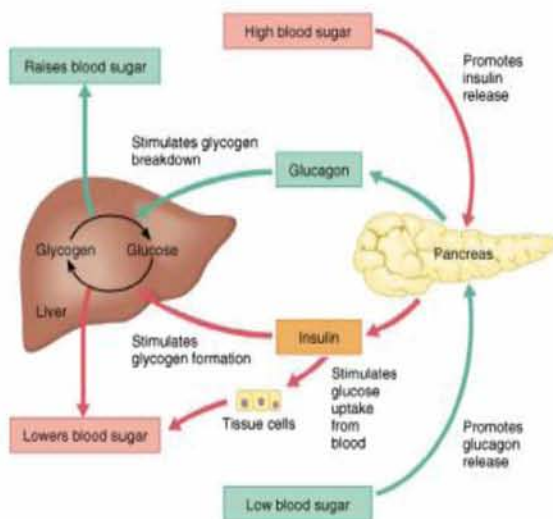
Η ινσουλίνη είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη, που αποτελείται από δύο αλυσίδες αμινοξέων (Α αλυσίδα: 21 αμινοξέα, Β αλυσίδα: 30 αμινοξέα) και έχει μοριακό βάρος 6000 Da. Οι αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με διθειοφυλικό δεσμό. Η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β κύτταρα του παγκρέατος, όταν αυξάνονται τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Καθώς η ινσουλίνη συνδέεται με τους υποδοχείς ινσουλίνης του κυττάρου- στόχου, διεγείρει το κύτταρο, οδηγώντας σε πτώση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Όταν η ινσουλίνη επιτύχει τους στόχους της η περαιτέρω έκκρισή της από τα β-κύτταρα του παγκρέατος αναστέλλεται μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης. Στους σκελετικούς μύες και στον λιπώδη ιστό υπάρχουν τρεις τύποι μεταφορέων γλυκόζης: GLUT1, GLUT3 και GLUT4. Η ινσουλίνη αυξάνει το ποσοστό πρόσληψης γλυκόζης, κυρίως με διέγερση της μετατόπισης των ισομορφών του GLUT4 από το εσωτερικό του κυττάρου στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, αυξάνοντας τον ρυθμό μεταφοράς γλυκόζης στο εσωτερικό. [4]

Η έκκριση της ινσουλίνης διεγείρεται από την υπεργλυκαιμία. Η γλυκόζη μεταφέρεται στα β-κύτταρα μέσω των μεταφορέων γλυκόζης GLUT2. Μετά την είσοδό της, η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη (Glucose 6-phosphate, G6P) από το ένζυμο γλυκοκινάση. Ο περαιτέρω μεταβολισμός της G6P δημιουργεί ATP (Adenosine Triphosphate). Τα  $K^+$  κανάλια που βρίσκονται στα β-κύτταρα είναι ευαίσθητα στο ATP και είναι υπεύθυνα για την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Το κλείσιμο αυτών των καναλιών αυξάνει την εισροή ιόντων  $Ca^{2+}$  μέσω τάσεοεξαρθρωμένων καναλιών ασβεστίου τύπου L (L-type Voltage-gated calcium channel, L-VGCC). Αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$  θεωρείται ότι διεγείρει την εξωκυττάρωση της ινσουλίνης. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν επίσης έναν διαφορετικό μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος από τα κανάλια  $K^+$ -ATP. Συνολικά, προτείνεται ότι η γλυκόζη ελέγχει την έκκριση της ινσουλίνης μέσω δύο μηχανισμών. [5] (Εικόνα 5)

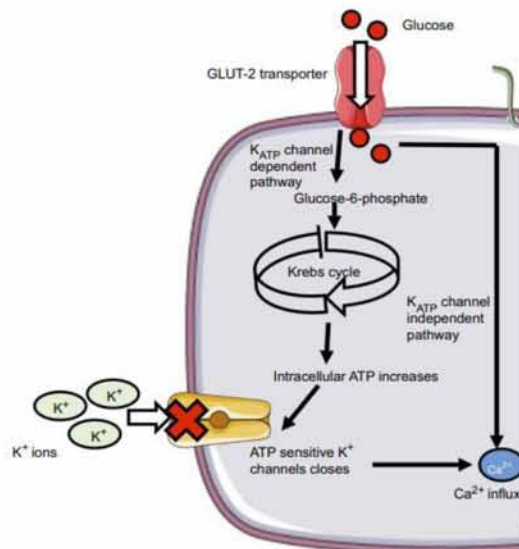
Η ινσουλίνη επιδρά μέσω της δέσμευσής της στον ειδικό διαμεμβρανικό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης. Ο υποδοχέας ινσουλίνης (Insulin Receptor, IR) είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη με δύο εξωκυτταρικές υπομονάδες και δύο ενδοκυτταρικές β-υπομονάδες και εντοπίζεται τόσο στους περιφερειακούς όσο και στους κεντρικούς ιστούς. Στους περιφερεικούς ιστούς, η ινσουλίνη ελέγχει τον μεταβολισμό μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης της φωσφατοδιλο-ινοσιτόλης 3 (Phosphoinositide 3-Kinase, PI3K) και του υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης (Insulin Receptor Substrate, IRS). Ο καταρράκτης IRS-PI3K έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πολλών κινασών. [5]

Η ινσουλίνη αναστέλλει τη χρήση λίπους καταστέλλοντας την απελευθέρωση γλυκαγόνης. Η ινσουλίνη μπορεί να θεωρηθεί ορμόνη αποθήκευσης, καθώς προωθεί την κίνηση της γλυκόζης και συμμετέχει στην μεταφορά θρεπτικών συστατικών σε περιφερεικούς ιστούς. Αυτά τα αποτελέσματα της ινσουλίνης οδηγούν σε διέγερση της σύνθεσης των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και του λίπους (λιπογένεση). Πιο συγκεκριμένα, η ινσουλίνη αναστέλλει τη γλυκονεογένεση και τη γλυκογονόλυση, διεγείρει τη γλυκόλυση και τη γλυκογένεση, ενώ διεγείρει την πρωτεϊνοσύνθεση, αναστέλλοντας την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Έτσι, μακροπρόθεσμα αποτελεί μία αναβολική ορμόνη. [4]

Η ινσουλίνη είναι ο κύριος ορμονικός ρυθμιστής του μεταβολισμού στην ανάπαυση, ενώ σε συνθήκες έλλειψης ινσουλίνης, η πρόσληψη γλυκόζης μειώνεται στους ιστούς και αυξάνεται η κινητοποίηση των λιπιδίων στα κύτταρα του λιπώδους ιστού. Παρουσία ινσουλίνης, η πρόσληψη γλυκόζης αυξάνεται στους ιστούς και μειώνεται η κινητοποίηση των λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Αμέσως μετά από ένα γεύμα με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, η απορροφούμενη γλυκόζη προκαλεί ταχεία έκκριση ινσουλίνης. Η ινσουλίνη προκαλεί ταχεία πρόσληψη, αποθήκευση και χρήση της γλυκόζης από σχεδόν όλους τους ιστούς του σώματος άμεσα (π.χ. εγκέφαλος, έντερο) ή έμμεσα επηρεάζοντας την κινητοποίηση των λιπιδίων από τον λιπώδη ιστό. Επιπλέον, η ινσουλίνη αυξάνει τη χρήση γλυκόζης από τα περισσότερα κύτταρα του σώματος, εκτός από τον εγκέφαλο, και επιδρά στη μεταφορά και τη χρήση γλυκόζης από τα μυϊκά κύτταρα. [4] (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Οι δράσεις της ινσουλίνης που περιγράφηκαν παραπάνω [4]



Εικόνα 5: Ο μηχανισμός της έκκρισης της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος ως απόκριση στην γλυκόζη [5]

### 1.2.3) Σύνθεση του γλυκογόνου

Η σύνθεση γλυκογόνου πραγματοποιείται στο κυττασώλιο από εξωκυτταρική γλυκόζη που μεταφέρεται στα κύτταρα μέσω μεταφορέων γλυκόζης ή από έμμεσο μονοπάτι όπου το γαλακτικό και αμινοξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Το πρώτο βήμα της σύνθεσης γλυκογόνου αποτελείται από την αυτό-γλυκοσυλίωση της βασικής πρωτεΐνης, γλυκογενίνης, η οποία παρέχει μία πρόδρομη αλυσίδα ολιγοσακχαριτών. Ακολούθως, σε αυτή την πρόδρομη αλυσίδα ολιγοσακχαριτών η συνθάση του γλυκογόνου (Glycogen Synthase, GS) επιμηκύνει την αλυσίδα της γλυκόζης μέσω της σύνδεσης της ουριδινοφωσφορικής γλυκόζης (UDP-γλυκόζη) μέσω α-1,4 γλυκοσιδικών δεσμών. Το ένζυμο πυροφωσφορλάση της UDP-γλυκόζης είναι αυτό που καταλύει την αντίδραση της σύνθεσης της UDP-γλυκόζης από 1-φωσφορική γλυκόζη και τριφωσφορική ουριδίνη (UTP). Στη συνέχεια, όταν η επιμηκυνόμενη αλυσίδα φτάνει περίπου σε 12 μόρια γλυκόζης, το ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου μεταφέρει μια αλυσίδα επτά μορίων γλυκόζης σε μια γειτονική αλυσίδα μέσω α-1,6 γλυκοσιδικού δεσμού. Η συνθάση του γλυκογόνου επιμηκύνει την αλυσίδα του γλυκογόνου, ενώ το ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου παράγει νέες διακλαδώσεις. [12],[13] (εικόνα 7)

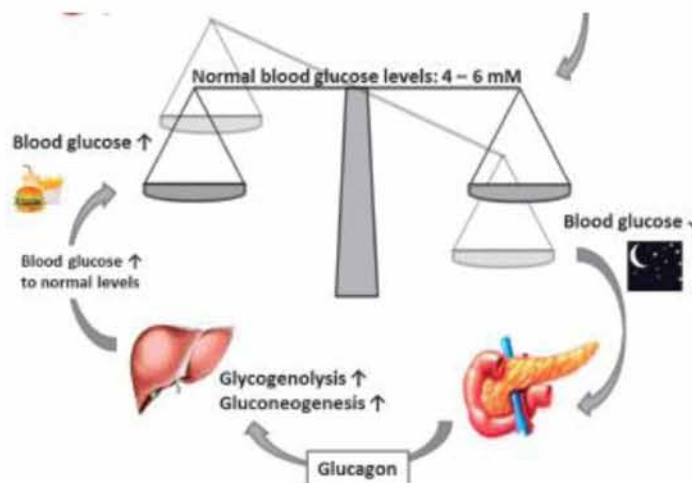
### 1.2.4) Γλυκαγόνη - Ρόλος και μεταβολικές επιδράσεις στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η γλυκαγόνη είναι μια παγκρεατική πολυπεπτιδική ορμόνη που αποτελείται από 29 αμινοξέα με μοριακό βάρος 3.845 Da και εκκρίνεται από τα α-κύτταρα του παγκρέατος. Η γλυκαγόνη δρα στη ρύθμιση του μεταβολισμού και στη διέγερση της παραγωγής γλυκόζης, η οποία επιτυγχάνεται με επιτάχυνση της γλυκογονόλυσης και της γλυκονεογένεσης. [4]

Η δράση της γλυκαγόνης ξεκινά με τη δέσμευση στον υποδοχέα της. Σε αντίθεση με τον IR, ο υποδοχέας γλυκαγόνης (Glucagon Receptor, GR) είναι μία επταμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Η κατανομή αυτών των υποδοχέων διαφέρει επίσης από το IR, καθώς ο GR εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο ήπαρ και στους νεφρούς. Η ενεργοποίηση των GR πραγματοποιείται μέσω μιας G πρωτεΐνης που συνδέεται με GTP (Guanosine Triphosphate) και οδηγεί σε επακόλουθη ενεργοποίηση της οδού cAMP-PKA. Η διέγερση των GR μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση της οδού φωσφολιπάσης C-φωσφορικής ινοσιτόλης με αποτέλεσμα την έκκριση ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$ . [5]



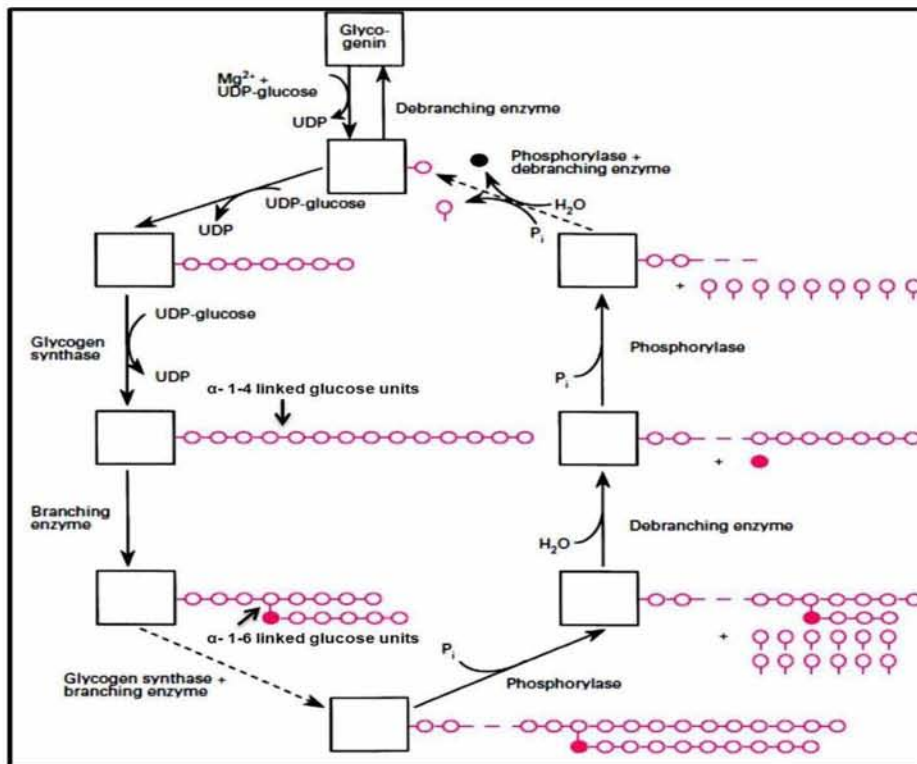
Η γλυκαγόνη διεγείρει την πρόσληψη αμινοξέων και αυξάνει τον ρυθμό καταβολισμού των πρωτεϊνών από το ήπαρ για την πρόληψη της υπογλυκαιμίας της ινσουλίνης. Επίσης, μειώνει τη συγκέντρωση των αμινοξέων στο πλάσμα και μπορεί να επηρεάσει την πρωτεϊνοσύνθεση στους μύες. Έτσι συνολικά η γλυκαγόνη διατηρεί την ομοιόσταση της γλυκόζης. Η γλυκαγόνη διεγείρει επίσης την παραγωγή κετονικών σωμάτων από αμινοξέα και λιπαρά οξέα. Όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα επανέλθουν στο φυσιολογικό, η έκκριση της γλυκαγόνης σταματά μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης. Η γλυκαγόνη αυξάνει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης και τη λιπόλυση. Μακροπρόθεσμα, λοιπόν, είναι μία καταβολική και ισχυρή υπεργλυκαιμική ορμόνη. [4] (εικόνα 6)



**Εικόνα 6:** Διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα από τη γλυκαγόνη. Όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλά, το πάγκρεας εκκρίνει γλυκαγόνη, που αυξάνει τα επίπεδα της ενδογενούς γλυκόζης στο αίμα μέσω της γλυκογονόλυσης. [1]

### 1.2.5) Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και στα λυσοσώματα και απαιτεί τις ταυτόχρονες δραστηριότητες της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και του διλειτουργικού ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, διασπά τους α-1,4 δεσμούς για την απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από την αλυσίδα του γλυκογόνου, προκειμένου να σχηματιστεί η 1-φωσφορική γλυκόζη. Περαιτέρω, όταν υπάρχουν τέσσερα κατάλοιπα γλυκόζης πριν από το σημείο της διακλάδωσης, το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου χρησιμοποιεί τη δραστηριότητα τρανσφεράσης και μεταφέρει τρία κατάλοιπα γλυκόζης από μία εξωτερική διακλάδωση σε ένα γειτονικό κλάδο της αλυσίδας του γλυκογόνου. Ακολουθώντας, μέσω της δραστηριότητας της γλυκοσιδάσης, το ένζυμο αποδιακλάδωσης διασπά υδρολυτικά τον α-1,6 δεσμό, για να απελευθερώσει ένα μόριο ελεύθερης γλυκόζης από το σημείο του κλάδου. Έπειτα, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου συνεχίζει τη διάσπαση των καταλοίπων γλυκόζης από την γραμμική πλέον αλυσίδα του γλυκογόνου, παράγοντας 1-φωσφορική γλυκόζη. Η 1-φωσφορική γλυκόζη που προέρχεται από το γλυκογόνο μέσω μετατροπής της σε 6-φωσφορική γλυκόζη και η ελεύθερη γλυκόζη μπορούν να εισέλθουν στο μονοπάτι της γλυκόλυσης ή στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. [12],[13] (εικόνα 7)



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων που απαιτούνται για τον μεταβολισμό του γλυκογόνου (Σύνθεση και Αποικοδόμηση). Εμφανίζονται και τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις που απαιτούνται για αυτές τις πορείες. [14]

### 1.2.6) Νόσοι Αποθήκευσης του Γλυκογόνου

Μεταλλάξεις σε γονίδια (είτε αυτοσωμικά είτε συνδεδεμένα με το χρωμόσωμα X) που κωδικοποιούν μεμονωμένα ένζυμα στις οδούς μεταβολισμού του γλυκογόνου οδηγούν σε μια κατηγορία κληρονομικών ασθενειών που ονομάζονται διαταραχές αποθήκευσης του γλυκογόνου ή γλυκογονιώσεις (Glycogen Storage Diseases, GSDs). Ανάλογα με την έλλειψη του ενζύμου και την έκφρασή του στο ήπαρ, στα νεφρά, στους σκελετικούς μύες ή στην καρδιά, οι κλινικές εκδηλώσεις των GSDs ποικίλλουν από τη μία διαταραχή στην άλλη. Κατά γενικό κανόνα, τα GSDs του ήπατος συνήθως εμφανίζονται με υπογλυκαιμία και ηπατομεγαλία. Οι συγκεκριμένες ανεπάρκειες οδηγούν είτε μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις του γλυκογόνου στους ιστούς είτε σε λανθασμένα σχηματισμένο γλυκογόνο. [15]

Ασθένεια	Έλλειψη Ενζύμου	Έλλειψη στο Γονίδιο	Όργανο που προσβάλλεται	Χρωμόσωμα
I, Νόσος Von Gierke	Φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης	G6PC, SLC37A4	Ήπαρ, Νεφροί	17q21, 11q23
II, Νόσος Pompe	Λυσοσωμική α-γλυκοσιδάση	GAA	Καρδιά, Μύες	17q25.3
III, Νόσος Forbes-Cori	Ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου	AGL	Ήπαρ, Μύες, Καρδιά	1p21.2
IV, Νόσος	Ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου	GBE1	Ήπαρ	3p12.2

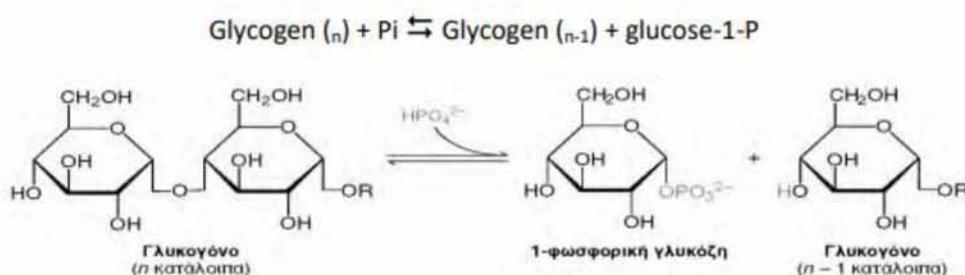


<b>Andersen</b>				
<b>V, Νόσος Mc Ardle</b>	Μυϊκή Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	PYGM	Μύες	11q13.1
<b>VI, Νόσος Hers</b>	Ηπατική Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	PYGL	Ήπαρ	14q22.1
<b>VII, Νόσος Tarui</b>	Φωσφοφρουκτοκινάση, Κινάση του φωσφογλυκερικού, Μουτάση του φωσφογλυκερικού	PFKM	Μύες	12q13.11
<b>IX</b>	Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	PHKA2, PHKB, PHKG2, PHKA1	Ήπαρ	Xp22.13, 16q12.1, 16p11.2, Xq13.1

**Πίνακας 1:** Κάποιες από τις σημαντικότερες γλυκογονιώσεις που έχουν βρεθεί μέχρι. Παράλληλα παρουσιάζονται το γονίδιο στο οποίο εμφανίζεται η έλλειψη, τα όργανα που προσβάλλονται και το χρωμόσωμα στο οποίο εντοπίζονται τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την κάθε μορφή των γλυκογονιώσεων. [15]

### 1.3) Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase, GP, EC 2.4.1.1) είναι ένα κρίσιμο ένζυμο για το μεταβολισμό του γλυκογόνου, αφού καταλύει το πρώτο βήμα της αποικοδομητικής πορείας του γλυκογόνου, διασπώντας το γλυκογόνο με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού (Pi) προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η GP μέσω της φωσφορλυτικής διάσπασης των α-1,4-γλυκοζιτικών δεσμών καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα της γλυκογονικής αλυσίδας. Το ορθοφωσφορικό ιόν διασπά τον γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ του C-1 του τελικού καταλοίπου και του C-4 του γειτονικού, ενώ η διαμόρφωση α στον C-1 διατηρείται. [17],[18] (εικόνα 8)



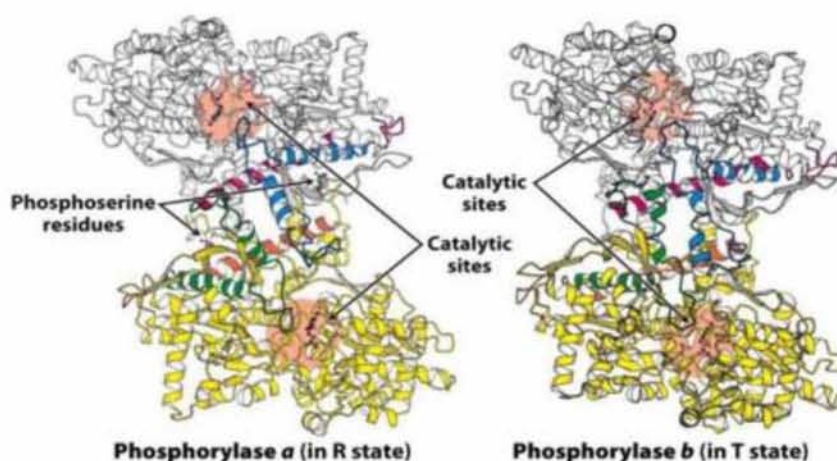
**Εικόνα 8 :** Η αντίδραση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου που καταλύεται από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. [16]

Η πορεία της αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση είναι αντιστρεπτή in vitro με τον λόγο της ισορροπίας της της 1-φωσφορικής γλυκόζης προς το ορθοφωσφορικό να είναι 0,28 σε pH 6,8. Αντίθετα, στο εσωτερικό του κυττάρου η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου είναι σημαντικά περισσότερη από την συγκέντρωση της 1-

φωσφορικής γλυκόζης με άμεσο επακόλουθο η αντίδραση να πραγματοποιείται προς την κατεύθυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης του γλυκογόνου. [17], [18]

Τα γονίδια PYGL, PYGM και PYGB κωδικοποιούν τις τρεις διαφορετικές ισομορφές της φωσφορυλάσης που εκφράζονται στο ήπαρ, στους μύες και στον εγκέφαλο. Σχετικά με την ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας εντοπίζεται 90% ομοιότητα μεταξύ της ανθρώπινης ηπατικής και της ανθρώπινης μυϊκής φωσφορυλάσης, 80-83% μεταξύ των τριών ανθρώπινων ισομορφών συνολικά, 97% ομοιότητα μεταξύ ανθρώπινων ισομορφών και των αντίστοιχων στα τρωκτικά και 97% μεταξύ της μυϊκής φωσφορυλάσης από κονίκλους (rabbit muscle Glycogen Phosphorylase, rmGP) και της ανθρώπινης μυϊκής φωσφορυλάση (human muscle Glycogen Phosphorylase, hmGP). Και οι τρεις ισομορφές της φωσφορυλάσης ρυθμίζονται αλλοστερικά με δέσμευση μεταβολιτών και με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της σερίνης 14. Η φωσφορυλάση ήταν το πρώτο ένζυμο, που φαίνεται ότι ρυθμίζεται με ομοιοπολική φωσφορυλίωση μετά την ανακάλυψη των Krebs και Fisher, ενώ πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο ρυθμίζεται και με ακετυλίωση. [19]

Η GP<sub>a</sub> και η GP<sub>b</sub> αποτελούν τις δύο μορφές στις οποίες συναντάται η φωσφορυλάση, την φωσφορυλιωμένη α και την αποφωσφορυλιωμένη b. Η GP βρίσκεται σε μία ισορροπία μεταξύ δύο διαμορφώσεων, μιας ενεργούς χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργούς τεταμένης κατάστασης T. Η κατάσταση R έχει υψηλή συγγένεια για υποστρώματα και ορισμένους αλλοστερικούς τελεστές όπως το AMP (Adenosine Monophosphate), ενώ η κατάσταση T έχει χαμηλή συγγένεια για το γλυκογόνο και το Pi. Η φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης από την κινάση της φωσφορυλάσης στη σερίνη-14 και η δέσμευση αλλοστερικών ενεργοποιητών ευνοεί την κατάσταση R. Αντίθετα, η αποφωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική φωσφατάση ή η δέσμευση αναστολέων στο αλλοστερικό κέντρο, όπως η G6P, η 1-φωσφορική φρουκτόζη, η ATP, η ADP (Adenosine Diphosphate) και η IMP (Inosine Monophosphate) προάγουν τη μετάβαση από την κατάσταση R σε T. Η τριτοταγής δομή του ενζύμου υφίσταται εκτεταμένες αλλαγές στη διαμόρφωση με αποτέλεσμα την αλλαγή του εύκαμπτου βρόχου 280s (κατάλοιπα 282 έως 285) από μια διαμόρφωση που δεν επιτρέπει την πρόσβαση στην καταλυτική θέση του ενζύμου (κατάσταση T) σε αυτή που επιτρέπει τη δέσμευση του υποστρώματος (κατάσταση R). [19] (εικόνα 9)



**Εικόνα 9 :** Δομή της φωσφορυλάσης a και της φωσφορυλάσης b. Η φωσφορυλάση a φωσφορυλιώνεται στη Ser 14 κάθε υπομονάδας και η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης R.. Η φωσφορυλάση b δεν είναι φωσφορυλιωμένη και υπάρχει κυρίως στη κατάσταση T. [19]

### 1.3.1) Μυϊκή Φωσφορυλάση

Η μυϊκή ισομορφή του ενζύμου είναι ένα διμερές και υπάρχει σε δύο μορφές: την a που είναι συνήθως ενεργή και την b που είναι συνήθως ανενεργή. Οι δύο μορφές διαφέρουν μεταξύ τους κατά μία φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Επίσης, βρίσκεται σε μία ισορροπία μεταξύ μιας ενεργούς



χαλαρής R κατάστασης και μιας πολύ λίγο ενεργούς τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για τη φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R ενώ η ισορροπία για την φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T. Το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου είναι αυτό που καθορίζει ποια κατάσταση της μυϊκής φωσφορυλάσης ευνοείται από τις δύο. Η b μορφή παρουσιάζει δραστικότητα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, ενώ η ATP δρα ως αρνητικός αλλοστερικός τελεστής, που ανταγωνίζεται την AMP, με επακόλουθο να σταθεροποιείται η κατάσταση T. Φυσιολογικά, η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή, χωρίς να επηρεάζεται από τα επίπεδα της AMP, της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Σε συνθήκες ηρεμίας, σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή b σε αντίθεση με τις συνθήκες άθλησης που το αυξημένο επίπεδο της AMP έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης b. [16]

### 1.3.2) Ηπατική Φωσφορυλάση

Παρά την υψηλή τους αμινοξική ομολογία η μυϊκή και η ηπατική φωσφορυλάση εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, η ηπατική φωσφορυλάση a οδηγείται πιο εύκολα σε μετάπτωση από την T στην R κατάσταση σε αντίθεση με την b. Επιπρόσθετα, η AMP δεν προκαλεί μεγάλη ενεργοποίηση της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης b (human liver Glycogen Phosphorylase b, hIGPb). Η γλυκόζη λειτουργεί ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τροποποιητής και απενεργοποιεί την ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση a (human liver Glycogen Phosphorylase a, hIGPa), καθώς η αποικοδόμηση του γλυκογόνου στο ήπαρ έχει ως στόχο παράγωγη γλυκόζης για εξαγωγή σε άλλους ιστούς προκειμένου να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες, όταν το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλό. Ακόμη, η AMP δεν ρυθμίζει την δραστικότητα της ηπατικής φωσφορυλάσης, αφού στο ήπαρ δεν παρατηρούνται εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο, όπως συμβαίνει στα μυϊκά κύτταρα. [16]

### 1.3.3) Φωσφορυλάση του εγκεφάλου

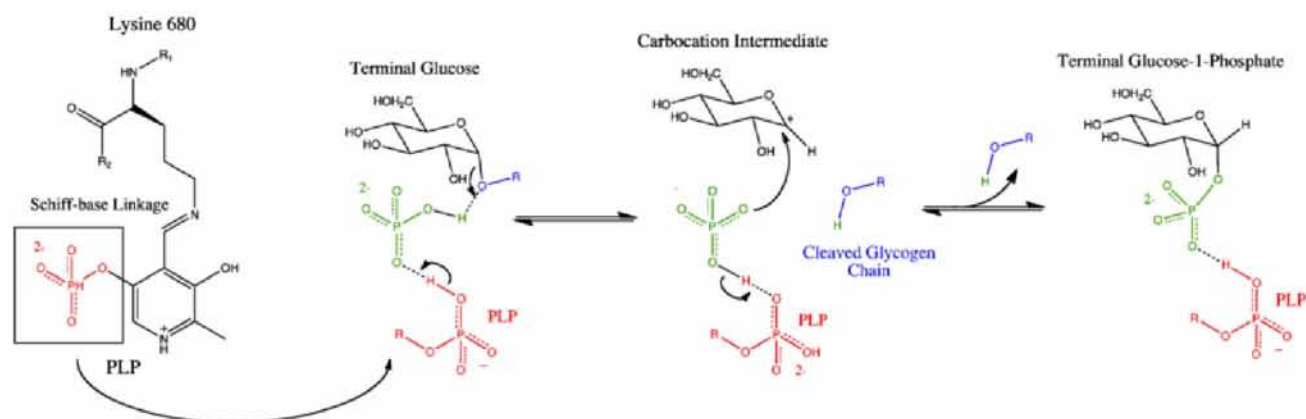
Η συγκεκριμένη ισομορφή της φωσφορυλάσης είναι η λιγότερο μελετημένη και γνωστή από τις τρεις, αφού η δομή της ανακαλύφθηκε πριν από λίγα χρόνια έπειτα από πολλές ερευνητικές προσπάθειες χρόνων. Η φωσφορυλάση του εγκεφάλου ενεργοποιείται από την AMP, όπως η μυϊκή ισομορφή και εκφράζεται στον εγκεφαλικό ιστό και στα μυοκύτταρα της καρδιάς. Η φωσφορυλάση του εγκεφάλου (brain Glycogen Phosphorylase, bGP) είναι κρίσιμη για την υποστήριξη των λειτουργιών του εγκεφάλου επειδή επιτρέπει την κινητοποίηση του αποθέματος γλυκογόνου εγκεφάλου. Η σημασία της bGP περαιτέρω υποστηρίζεται από το γεγονός ότι δεν υπάρχουν μεταλλάξεις για αυτό το ισοένζυμο. Αυτό είναι πιθανό να συμβαίνει, επειδή η bGP είναι το μόνο ισοένζυμο που εκφράζεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου και αντικαθίσταται αργότερα από την μυϊκή (muscle Glycogen Phosphorylase, mGP) και την ηπατική φωσφορυλάση (human liver Glycogen Phosphorylase, hIGP) στα αντίστοιχα όργανα. Επιπλέον, είναι πλέον αποδεκτό ότι η συσσώρευση γλυκογόνου στους νευρώνες οδηγεί σε εκφυλισμό τους και εμπλέκεται στη γήρανση καθώς και στην προώθηση πολλών παθολογικών καταστάσεων του εγκεφάλου. Η δραστικότητα του bGP είναι κρίσιμη για την ελεγχόμενη αποδόμηση του γλυκογόνου σε νευρώνες καθώς εκφράζουν μόνο την συγκεκριμένη ισομορφή της GP. Μια μείωση της δραστικότητας της bGP θα οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη συσσώρευση γλυκογόνου στους νευρώνες με συνέπεια την παθολογική διαμόρφωση εγκεφαλικών ασθενειών. [20]

### 1.3.4) Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης

Η ανακάλυψη της φωσφορικής πυριδοξάλης έγινε το 1957 από τον Baranowski στην μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου κονίκλων (rmGPa). Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP, Pyridoxal 5'-Phosphate, P5P), η δραστική μορφή της βιταμίνης B6, είναι ένα συνένζυμο που συμμετέχει σε μια ποικιλία ενζυμικών αντιδράσεων. Η PLP δρα ως συνένζυμο σε όλες τις αντιδράσεις τρανσαμιδοποίησης και σε ορισμένες αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης, απαμίνωσης και ρακεμοποίησης αμινοξέων. [21]

Στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου η PLP βρίσκεται σε κάθε καταλυτικό κέντρο. Η φωσφορική πυριδοξάλη συνδέεται με την Lys680 και σχηματίζει μία βάση Schiff. Μόλις σχηματιστεί η βάση Schiff, κρατώντας το μόριο της PLP στο καταλυτικό κέντρο, η 5- φωσφορική ομάδα της PLP μεταφέρει ένα

πρωτόνιο σε ένα ορθοφωσφορικό ιόν, επιτρέποντας στη συνέχεια το ορθοφωσφορικό να μεταφέρει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο, που είναι στον άνθρακα 4 της αποχωρούσας αλυσίδας του γλυκογόνου. Το βήμα αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος που προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό με αποτέλεσμα τον σχηματισμό φωσφορικής γλυκόζης δεσμού α-1. Επίσης, ένα άτομο υδρογόνου επιστρέφει στην PLP. Με τον μηχανισμό αυτό η φωσφορική πυριδοξάλη αποκλείει το νερό από το ενεργό κέντρο και συμβάλλει στην φωσφορλυτική διάσπαση του γλυκογόνου η οποία υπερτερεί ενεργειακά έναντι της υδρόλυσης, καθώς έχει ως αποτέλεσμα την εξοικονόμηση του ATP που απαιτείται για την φωσφορλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. [16],[18] (εικόνα 10)



**Εικόνα 10:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της φωσφορλίωσης του γλυκογόνου, όπου παρουσιάζεται και η συνεισφορά της PLP στην κατάλυση. Η PLP αριστερά σχηματίζει μια βάση Schiff με την λυσίνη 680 στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορλίωσης του γλυκογόνου. Μια προσδεσμένη  $\text{HPO}_4^{2-}$  (πράσινο χρώμα) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο χρώμα). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου από την πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης φωσφορικής πυριδοξάλης (κόκκινο χρώμα). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού ιόντος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης [16]

### 1.3.5) Δομή της φωσφορλίωσης του γλυκογόνου

Η φωσφορλίωση είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, που αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες μοριακού βάρους 97.4 kDa (842 κατάλοιπα). Κάθε υπομονάδα αποτελείται από μία αμινοτελική δομική περιοχή που αποτελείται από τα κατάλοιπα 1-484 και μία καρβοξυτελική δομική περιοχή που αποτελείται από τα κατάλοιπα 485-842. Πολλές ρυθμιστικές περιοχές εντοπίζονται στην αμινοτελική περιοχή μεταξύ αυτών, η σερίνη 14, το αλλοστερικό κέντρο και το κέντρο πρόσδεσης γλυκογόνου, ενώ στην καρβοξυτελική περιοχή βρίσκεται η θέση πρόσδεσης του συνενζύμου PLP. [16],[22] Έχουν αναγνωριστεί έξι διαφορετικά κέντρα στην φωσφορλίωση του γλυκογόνου : 1. Το καταλυτικό κέντρο 2. Το αλλοστερικό κέντρο 3. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου 4. Το κέντρο αναστολής 5. Το νέο αλλοστερικό κέντρο 6. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης. [23] (εικόνα 11)

#### 1.3.5.1) Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο της φωσφορλίωσης του γλυκογόνου βρίσκεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας του ενζύμου. Περιλαμβάνει την PLP και είναι προσβάσιμο μέσω ενός καναλιού μήκους 15 Å. Το κλείσιμο του καναλιού αυτού πραγματοποιείται με σταθεροποίηση του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282-287) έπειτα από τη σύνδεση αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εμποδίζεται η πρόσβαση του υποστρώματος και να σταθεροποιείται η T-στερεοδιαμόρφωση του ενζύμου. Ο φυσιολογικός αναστολέας της φωσφορλίωσης του γλυκογόνου είναι η α-D-γλυκόζη. Οι πιο ισχυροί

αναστολείς της GP που δεσμεύονται στο καταλυτικό κέντρο είναι στην πλειοψηφία τους ανάλογα γλυκόζης. [16],[23] (εικόνα 11)

### 1.3.5.2) Κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου της GP σε απόσταση περίπου 12 Å από αυτό και είναι γνωστό και ως κέντρο σύνδεσης της καφεΐνης. Πρόκειται για μια υδρόφοβη περιοχή που χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων Phe285 και Tyr613. Οι αναστολείς του συγκεκριμένου κέντρου είναι πιο ισχυροί παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης και σταθεροποιούν τη T- στερεοδιαμόρφωση. Η καφεΐνη συγκεκριμένα κατά τη σύνδεση με την gmGPb παρεμβάλλεται μεταξύ των 2 αρωματικών καταλοίπων που αναφέρθηκαν πιο πάνω και σχηματίζει πολλούς δεσμούς Van der Waals, ενώ και τα φλαβονοειδή λειτουργούν ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μέσω πρόσδεσης στο κέντρο αυτό. [16],[23] (εικόνα 11)

### 1.3.5.3) Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και είναι η περιοχή του ενζύμου που συνδέεται το γλυκογόνο. Αποτελείται από 2 έλικες και ένα βρόχο που συνδέει 2 αντιπαράλληλους κλώνους. Για την πρόσδεση α-, β- και γ- κυκλοδεξτρινών στην gmGPb έγιναν κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες και απέδειξαν την ανασταλτική τους επίδραση [17]. Άλλοι αναστολείς που προσδένονται στο συγκεκριμένο κέντρο είναι η ακαρβόζη, η μαλτοπεντόζη (G5) και η μαλτοεπτάοζη (G7). Οι αναστολείς αυτοί προσδένονται στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου μέσω δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα Ser429, Lys473 και Asn407, καθώς και μέσω αλληλεπιδράσεων μορίων νερού με τα κατάλοιπα Gln401, Arg426, Val431 και Gln433. [16],[23] (εικόνα 11)

### 1.3.5.4) Αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου συντίθεται από δύο α-έλικες και τέσσερις β-κλώνους.[33] Στο αλλοστερικό κέντρο έχουν βρεθεί να προσδένονται τα μόρια AMP, IMP, ATP, G6P, NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide), UDP-γλυκόζη και ορθοφωσφορικά ιόντα, δηλαδή πληθώρα φωσφορυλιωμένων ενώσεων. Η AMP και η IMP ενεργοποιούν την GPb με την AMP να είναι ένας αρκετά ισχυρότερος ενεργοποιητής. Αντίθετα η ATP, η G6P και η UDP-γλυκόζη αναστέλλουν το ένζυμο σταθεροποιώντας την T-στερεοδιαμόρφωση. Η 6-φωσφορική γλυκόζη είναι ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας της GPb που προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο. Η σύνδεση αυτών των προσδετών αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, είτε μέσω ανταγωνισμού με την AMP που είναι φυσιολογικός ενεργοποιητής είτε μέσω σταθεροποίησης της ανενεργού διαμόρφωσης T του ενζύμου. [16],[23] (εικόνα 11)

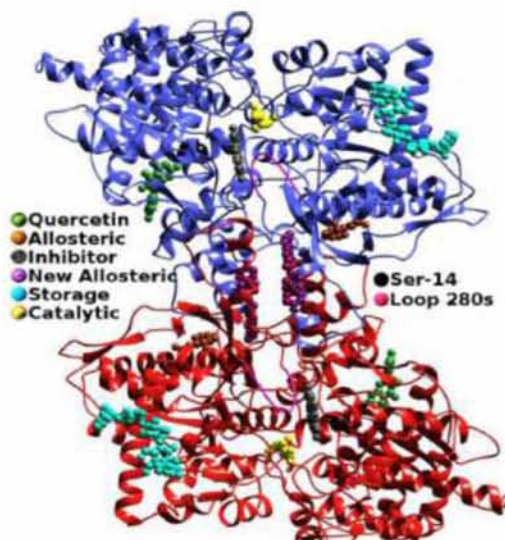
### 1.3.5.5) Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο ή θέση πρόσδεσης ινδόλης ανακαλύφθηκε το 2000 και βρίσκεται στο κέντρο της κοιλότητας του διμερούς ενζύμου. Η κοιλότητα του νέου αλλοστερικού κέντρου σχηματίζεται στο ένα άκρο από κατάλοιπα της car' περιοχής και α2 έλικες και στο άλλο άκρο από τον πύργο α7 ελίκων. Τα 18 αμινοξέα (9 από κάθε υπομονάδα) που συνθέτουν αυτό το κέντρο είναι πολύ συντηρημένα στην ανθρώπινη ηπατική και μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου, και στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών, του ήπατος και του εγκεφάλου κονίκλων. Το νέο αλλοστερικό κέντρο απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολέα. Ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας του νέου αλλοστερικού κέντρου είναι το ινδόλιο. Οι αναστολείς που προσδένονται στο νέο αλλοστερικό κέντρο λειτουργούν σαν κλασσικοί αλλοστερικοί αναστολείς σταθεροποιώντας την κατάσταση T, ενώ εμφανίζουν και συνέργεια με άλλους αναστολείς, όπως η γλυκόζη. [16],[23] (εικόνα 11)

### 1.3.5.6) Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης



Το κέντρο πρόσδεσης της κερσεΐνης ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσεΐνης σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Lys544, Arg551, Lys665 και Tyr548 της C-περιοχής και από τα κατάλοιπα Glu120 και Glu123 της N-περιοχής. Αυτό το κέντρο απέχει 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Συγκριτική δομική ανάλυση των T και R διαμορφώσεων, μεταξύ του συμπλόκου gmGPb – κερσεΐνης και της ελεύθερης gmGPb, έδειξαν ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην R-κατάσταση, σε αντίθεση με την T-κατάσταση που οι διαφορές ήταν μικρές. Επιπλέον, η λιγότερο ενεργή κατάσταση T είναι αυτή που ευνοείται από την πρόσδεση της κερσεΐνης στο συγκεκριμένο κέντρο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σταθεροποίησης του βρόχου (κατάλοιπα 548-556) στην κατάσταση T. [23] (εικόνα 11)



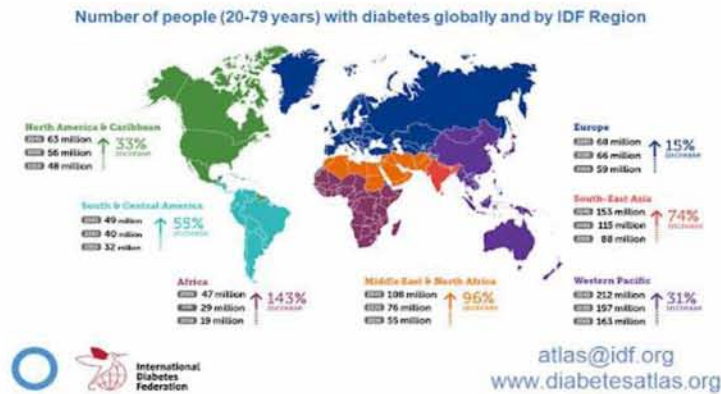
Εικόνα 11 : Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στην T- κατάσταση, όπου διακρίνονται τα έξι διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης, η θέση φωσφορυλίωσης στη Ser14 από την PhK και ο βρόχος 280s. [24]

#### 1.4) Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως φαρμακευτικός στόχος για την ανάπτυξη αντιγλυκαιμικών παραγόντων

##### 1.4.1) Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (Diabetes mellitus) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεταβολικές διαταραχές και συνιστά μία σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία, καθώς έχει ήδη προσβάλει και θα συνεχίσει να προσβάλει εκατομμύρια ανθρώπους ανά τον κόσμο. [6] Αφορά μια ομάδα μεταβολικών ασθενειών οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία, που οφείλεται στην ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης ή/ και στη μειωμένη δράση της. Επιπλέον, σχετίζεται με επιπλοκές της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού, όπως η νεφροπάθεια, η αμφιβληστροειδοπάθεια, η νευροπάθεια και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. [7],[8] Σχετικά με την αιτιολογία της ασθένειας, υπάρχει μεγάλη διακύμανση ως προς τις αιτίες εκδήλωσης της, καθώς πρόκειται για ένα πολυπαραγοντικό νόσημα. Οι παράγοντες αυτοί, όπως είναι η ηλικία, η παχυσαρκία, η διατροφή, η άσκηση και η γενετική προδιάθεση μπορούν να δημιουργήσουν ορμονική δυσλειτουργία. Τα συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν την πολυουρία, την πολυδιψία, απώλεια βάρους, την πολυφαγία και τη θολή όραση, ενώ οι απειλητικές για την ζωή επιπλώσεις του διαβήτη συνοδεύονται από εμφάνιση μη κετοξικού υπεροσμωτικού συνδρόμου ή υπεργλυκαιμίας με κετοξέωση. Ο ΣΔ διακρίνεται σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος), σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και στο διαβήτη της κύησης. Εκτός από αυτές τις κατηγορίες υπάρχουν και κάποιες ειδικές κατηγορίες διαβήτη, όπως είναι η γενετήσια έλλειψη των β-παγκρεατικών κυττάρων, ενδοκρινοπάθειες, ασθένειες του εξωκρινούς παγκρέατος και ο επαγόμενος από φάρμακα ή χημικά διαβήτης. [9]





Εικόνα 12: Γεωγραφική κατανομή των πασχόντων από σακχαρώδη διαβήτη. Επίσης, παρουσιάζεται η πρόβλεψη για τον αριθμό των ατόμων που θα πάσχουν το 2045. (IDF DIABETES ATLAS - 9TH EDITION).

#### 1.4.2) Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου I (Ινσουλινοεξαρτώμενος)

Ο ΣΔ1 χαρακτηρίζεται από αυτόνομη καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων που εκκρίνουν ινσουλίνη. Λόγω της έλλειψης ή της ανεπάρκειας ινσουλίνης παρεμποδίζεται η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα, το ήπαρ παραμένει σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης, ενώ αναστέλλεται η γλυκόλυση. Αυτός είναι και ο λόγος που οι ασθενείς με διαβήτη τύπου I χρειάζονται θεραπεία με εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης για την επιβίωσή τους. Τα συμπτώματα της συγκεκριμένης νόσου διαφέρουν μεταξύ των ασθενών. [9],[10]

#### 1.4.3) Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου II (Μη ινσουλινοεξαρτώμενος)

Ο διαβήτης τύπου II είναι η πιο κοινή μορφή διαβήτη (90-95%) και είναι γνωστός ως διαβήτης των ενηλικών. Η αιτιολογία της ασθένειας παραμένει άγνωστη μέχρι σήμερα, ενώ σχετίζεται με σημαντική γενετική προδιάθεση. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της ασθένειας φαίνεται να διαδραματίζει ο τρόπος ζωής και το περιβάλλον. Στην περίπτωση του διαβήτη τύπου II, το πάγκρεας παράγει συνήθως ινσουλίνη, αλλά η νόσος οφείλεται σε ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης. Η μειωμένη αυτή ευαισθησία προς την ινσουλίνη συχνά αναφέρεται ως αντίσταση στην ινσουλίνη. Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει κυρίως στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, του ήπατος και των μυών. Στη συγκεκριμένη νόσο παράγεται ινσουλίνη η οποία δεν εκμεταλλεύεται από τον οργανισμό, ενώ δεν παρατηρείται αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, όπως στον διαβήτη τύπου I. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η εξωγενής χορήγηση ινσουλίνης να μην συμβάλλει στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου. Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου II μπορεί να αναπτυχθούν σταδιακά και μπορεί να είναι ανεπαίσθητα, ενώ σε μερικούς ασθενείς ο διαβήτης τύπου II παραμένει αδιάγνωστος για χρόνια. Ο διαβήτης τύπου II αναπτύσσεται πιο συχνά στη μέση ηλικία και σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, που έχουν αυξημένο σωματικό βάρος ή είναι παχύσαρκα. Αυτά τα χαρακτηριστικά, κάποτε σπάνια στα νεαρά άτομα, παρατηρούνται όλο και πιο συχνά τα τελευταία χρόνια, καθώς αρκετά παιδιά και έφηβοι τα εμφανίζουν, εξαιτίας του τρόπου ζωής και των συνθηκών τους. [9]

#### 1.4.4) Θεραπευτικές Προσεγγίσεις

Η αυξημένη δυσκολία στην πρόγνωση της νόσου σε συνδυασμό με την απουσία κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, έχει ως αποτέλεσμα την προσπάθεια ανάπτυξης σημαντικού αριθμού υπογλυκαιμικών φαρμάκων, που στοχεύουν στον δραστικό έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος, καθώς με τον τρόπο αυτό θα αποφευχθούν οι δευτερογενείς επιπτώσεις του διαβήτη. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται καλύπτουν ένα μεγάλο φάσμα, αφού για τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, διατίθενται 6 κατηγορίες φαρμακευτικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται οι σουλφονουλιδίες 1<sup>ης</sup> γενιάς και 2<sup>ης</sup> γενιάς, οι διγουανιδίνες, όπως η μετφορμίνη και οι θειαζολιδινεδιόνες.

Ακόμη, χρησιμοποιούνται αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης για την αντιμετώπιση της νόσου, όπως η ακαρβόζη και η μιγλιτόλη. Τέλος, η ενδορινική χορήγηση ινσουλίνης έχει προταθεί για να ξεπεραστούν οι δυσκολίες που προκύπτουν από τις υποδόριες ενέσεις ινσουλίνης στον διαβήτη τύπου I και II. Τα συγκεκριμένα φαρμακευτικά προϊόντα εμφανίζουν αρκετές παρενέργειες, με μεγαλύτερο κίνδυνο την πρόκληση υπογλυκαιμίας. Έτσι, αρκετές ελπίδες για την ίαση των ασθενών από το μεταβολικό αυτό σύνδρομο εναπόκεινται στις νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις των τελευταίων ετών, που στηρίζονται στην καλύτερη κατανόηση των πολύπλοκων βιοχημικών διαδικασιών, που ρυθμίζουν τη συγκεκριμένη νόσο. [7],[11]

Στον ΣΔ2 παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα γλυκογονόλυσης με αποτέλεσμα τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα να αυξάνονται ακόμα περισσότερο. Ο έλεγχος του μεταβολισμού του γλυκογόνου στον ΣΔ2 αποτελεί μια υποσχόμενη προσέγγιση για τον ΣΔ2, με σκοπό τη μείωση της υπεργλυκαιμίας. Η σύνδεση της γλυκαγόνης στον υποδοχέα της στην κυτταρική μεμβράνη οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που ξεκινάει με την παραγωγή της cAMP και οδηγεί σε διαδοχική ενεργοποίηση των ενζύμων, PKA, PhK και GP, με την GP να αποτελεί το ένζυμο που ξεκινάει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου [35]. Εξαιτίας του καθοριστικού ρόλου της φωσφορυλάσης στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και συγκεκριμένα στη γλυκονογένεση, το ένζυμο αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς στόχους για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη πιθανών αντιγλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Οι μελέτες έχουν ως στόχο την μερική αναστολή της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και όχι των υπόλοιπων ισομορφών του ενζύμου. Το πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι συγκεκριμένες μελέτες είναι ότι τα ισόενζυμα εμφανίζουν μεγάλη ομολογία με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η εξειδίκευση των πιθανών φαρμάκων για την ηπατική ισομορφή. [25],[26] Πληθώρα μελετών έχει πραγματοποιηθεί στο συγκεκριμένο τομέα με την πλειοψηφία να στοχεύει το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Αυτό συμβαίνει, διότι το καταλυτικό κέντρο αποτελεί και την περιοχή πρόσδεσης του φυσιολογικού αναστολέα του ενζύμου, της α-D-γλυκόζης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω [27],[28]. Έτσι, ένας μεγάλος αριθμός δομών συμπλόκου του ενζύμου με αναστολείς χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη σύνθεση των πιθανών φαρμάκων. Ο προσδιορισμός των δομών αυτών πραγματοποιήθηκε με τη συνεισφορά της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και της φασματοσκοπίας NMR. [29] Τα τελευταία χρόνια εκτός από τη μελέτη ενώσεων που προέρχονται από οργανική σύνθεση, γίνεται προσπάθεια σάρωσης φυσικών προϊόντων, προκειμένου να βρεθούν συστατικά τροφίμων (nutraceutical), όπως τα φλαβονοειδή, που θα συμβάλουν στη ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις-οδηγοί και μέσω τροποποιήσεων να συμβάλουν στην αντιμετώπιση του διαβήτη. Επί του παρόντος, το 57% των διαβητικών ακολουθούν συμπληρωματικές και εναλλακτικές θεραπείες που βοηθούν στην πρόληψη και τη διαχείριση του διαβήτη τύπου II. Παρά το γεγονός ότι τα φυτά είναι η πιο παραγωγική πηγή βιοδραστικών υλικών για διάφορες διατροφικές φαρμακευτικές εφαρμογές, έχει εκτιμηθεί ότι μόνο 5 έως 15% των 250.000 έως 750.000 υπαρχόντων ειδών ανώτερων φυτών έχουν ερευνηθεί για βιοδραστικές ενώσεις. Έτσι, η πλειονότητα των φυσικών ενώσεων δεν έχει δοκιμαστεί για βιολογική δραστηριότητα και πολλές νέες, δυνητικά χρήσιμες βιοδραστικές ενώσεις, δεν έχουν ακόμη ανακαλυφθεί. [30], [32]

Απώτερος και κοινός στόχος όλων των ερευνητικών μελετών αποτελεί η ανακάλυψη ή η εύρεση ενός αναστολέα που θα μιμείται την γλυκόζη τόσο στις αλληλεπιδράσεις που έχει με το ένζυμο όσο και στην επίδραση της σ' αυτό. Ωστόσο αυτός ο αναστολέας θα πρέπει να δρα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ώστε να μην αναστέλλεται ολοκληρωτικά η φωσφορυλάση και προκαλούνται μεταβολικά προβλήματα.

Κέντρα Δέσμευσης	Αναστολείς
<i>Καταλυτικό Κέντρο</i>	Γλυκόζη-Ανάλογα Γλυκόζης
<i>Κέντρο Αποθήκευσης Γλυκογόνου</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Κυκλοδεξτρίνες</li> <li>▪ Ακαρβόζη</li> <li>▪ Μαλτοπεντόζες, Μαλτοεπτόζες</li> </ul>
<i>Αλλοστερικό Κέντρο</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 6-GP και Πολλές φωσφορυλιωμένες ενώσεις</li> <li>▪ Παράγωγα διυδροπυριδινικού οξέος</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Παράγωγα φθαλικού Οξέος</li> <li>▪ Ακυλοουρίες</li> </ul>
<i>Νέο Αλλοστερικό Κέντρο</i>	Ινδόλιο
<i>Κέντρο Κερσετίνης</i>	Κερσετίνη
<i>Κέντρο Αναστολής</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Καφεΐνη</li> <li>▪ Φλαβοπυριδόλη και παράγωγά της</li> <li>▪ 5-σουλφονική ινδιρουβίνη</li> <li>▪ Χρυσίνη</li> </ul>

**Πίνακας 2:** Παρουσιάζονται τα διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου σε συνδυασμό με τους κυριότερους αναστολείς που προσδένονται σ αυτά. [29]

#### 1.4.5) GP και καρκίνος

Στο πεδίο του καρκίνου, μελέτες προτείνουν τη χρήση αναστολέων έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη όγκων. Η στρατηγική αυτή έχει μεγάλο θεραπευτικό ενδιαφέρον. Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός των καρκινικών κυττάρων παρέχει ενέργεια και πολλαπλά μεταβολικά ενδιάμεσα κρίσιμα για την κυτταρική ανάπτυξη. Η υποξία στους όγκους αντιπροσωπεύει ένα εχθρικό περιβάλλον που μπορεί να ενθαρρύνει αυτούς τους μετασχηματισμούς. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου επάγεται σε όγκους *in vivo* και σε καρκινικά κύτταρα *in vitro* ως απάντηση στην υποξία. *In vitro*, η υποξία προκαλεί συσσώρευση γλυκογόνου, ακολουθούμενη από σταδιακή αποικοδόμηση του. Ταυτόχρονα, παρατηρείται επαγωγή της συνθάσης του γλυκογόνου (GYS1) ακολουθούμενη στη συνέχεια από επαγωγή της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου φωσφορυλάσης (PYGL). Συνεπώς, η αναστολή ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου και συγκεκριμένα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μπορεί να παρέχει σημαντικά αποτελέσματα στην προσπάθεια αντιμετώπισης του καρκίνου. [13],[34]

#### 1.5) Ανθοκυανίνες

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία με την πρόληψη ασθενειών λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε βιοδραστικά συστατικά. Πλούσια σε φαιολικές ενώσεις είναι τα κόκκινα φρούτα (φράουλες, κεράσια, ρόδια), καθώς περιέχουν φαιολικά οξέα, φλαβονοειδή και τανίνες. Ο όρος φλαβονοειδή χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα ευρύ σύνολο φυσικών προϊόντων που αποτελούνται από έναν ανθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων (C6-C3-C6). Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε επιμέρους ομάδες όπως τις ανθοκυανίνες, τις φλαβόνες, τις φλαβονόνες, τις διϋδροφλαβονόλες, τις χαλκόνες, τις φλαβονόλες, τις φλαβάνες, τις προανθοκυανιδίνες και τα ισοφλαβονοειδή. Πιο συγκεκριμένα, το ρόδι τόσο σαν φρούτο, όσο και σαν χυμός μαζί με τα εκχυλίσματα του παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικά συστατικά. Τα συστατικά αυτά συνεισφέρουν στην προστασία της υγείας, αφού διαθέτουν αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ συμβάλλουν και στην καλύτερη ποιότητα ζωής καθώς δρουν ως αντιοξειδωτικά, αντικαρκινικοί παράγοντες, αντιηπατοτοξικοί παράγοντες. [31]

Πλήθος μελετών υποδεικνύει ότι η υψηλή πρόσληψη φλαβονοειδών συμβάλει στη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης, καθώς μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών (μεταξύ των οποίων και οι ανθοκυανιδίνες) ανέστειλαν στις συγκεκριμένες μελέτες τόσο τη φωσφορυλιωμένη ενεργή GPα όσο και την αποφωσφορυλιωμένη GPb. [33] Οι ανθοκυανίνες (Anthocyanines, ACN) είναι η μεγαλύτερη και πιο σημαντική ομάδα φλαβονοειδών που υπάρχουν στο χυμό του ροδιού (Pomegranate Juice, PJ) και μαζί με τις υδρολύσιμες τανίνες (Hydrolysable Tannins, HT) αποτελούν τις πιο πολύτιμες βιοδραστικές ενώσεις. Παρότι υπάρχουν πολλές ανθοκυανίνες, αγλυκόνες υπάρχουν λίγες και ονομάζονται



ανθοκυανιδίνες και προκύπτουν από την υδρόλυση του γλυκοσιδικού δεσμού των ACN που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενός μορίου σακχάρου και της αγλυκόνης. [31]

Μεταξύ των 25 διαφορετικών αγλυκονών έχουν ταυτοποιηθεί μόνο 6 ανθοκυανιδίνες, δηλαδή η κυανιδίνη (Cyanidin, Cy), η δελφινιδίνη (Delphinidin, Dp), η μαλβιδίνη (Malvidin, Mv), η πελαργονιδίνη (Pelargonidin, Pg), η πεονιδίνη (Peonidin, Pn) και η πετουνιδίνη (Petunidin, Pt) που είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 90% των αναγνωρισμένων ACN. Μεταξύ αυτών εντοπίζονται διαφορές τόσο στον αριθμό των υδροξυλιωμένων ομάδων όσο και στον αριθμό των σακχάρων που είναι συνδεδεμένο στη δομή τους. Επιπλέον, αυτά τα μόρια διαφέρουν στις αρωματικές καρβοξυλομάδες που είναι συνδεδεμένες με το σάκχαρο. Ο χυμός τους ροδιού χαρακτηρίζεται από το παρουσία των 3-γλυκοζιτών και 3,5-δι-γλυκοζιτών των Dp, Cy και Pg (Πίνακας 3). Υπολογίζεται ότι το 10% της αντιοξειδωτικής δράσης του PJ οφείλεται στην παρουσία των ACN. [31]

Οι ACN απορροφώνται και κυκλοφορούν στο πλάσμα και σε άλλα υγρά του σώματος χωρίς να υφίστανται μεταβολικές τροποποιήσεις. Επιπλέον, διαφέρουν από άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών, λόγω των αναδιατάξεων που παρουσιάζουν ως απόκριση στις μεταβολές του pH. Σε όξινες συνθήκες εμφανίζονται υπό τη μορφή κατιόντος φλαβουλίου που έχει κόκκινο χρώμα, ενώ σε βασικές συνθήκες έχουν τη μορφή άχρωμης καρβινόλης. Μετά την απορρόφηση τους διανέμονται σε διαφορετικά όργανα, όπως το ήπαρ, οι νεφροί, οι πνεύμονες, η καρδιά και ο εγκέφαλος. Ο μηχανισμός μεταφοράς τους στο εσωτερικό του κυττάρου είναι αντικείμενο έρευνας αρκετών μελετών και φαίνεται να εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων στη δομή τους. [31]

Ανθοκυανίνες στο εκχύλισμα από το χυμό του ροδιού	Ποσοστό στο εκχύλισμα
3,5- διγλυκοζίτης δελφινιδίνης	14,2%
3,5- διγλυκοζίτης κυανιδίνης	27,4%
3,5- διγλυκοζίτης πελαργονιδίνης	2,4%
3- γλυκοζίτης δελφινιδίνης	9,2%
3- γλυκοζίτης κυανιδίνης	40,8%
3- γλυκοζίτης πελαργονιδίνης	6%

**Πίνακας 3 :** Παρουσιάζονται οι κυριότεροι γλυκοζίτες που περιέχονται στον χυμό του ροδιού (αριστερή στήλη) και το ποσοστό περιεκτικότητας κάθε μεμονωμένης ανθοκυανίνης σε σχέση με τη συνολική περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε ανθοκυανίνες (ACNs). [31]

## 2) Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί τμήμα ευρύτερης ερευνητικής δραστηριότητας που πραγματοποιείται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κύριο αντικείμενο της έρευνας αυτής αποτελεί η μελέτη ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του γλυκογόνου, όπως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου και η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Απώτερος στόχος της συγκεκριμένης ερευνητικής ομάδας είναι η ανακάλυψη ενώσεων που προσδένονται στα ένζυμα αυτά και ρυθμίζουν την δραστηριότητά τους. Οι ενώσεις αυτές, λόγω των ανασταλτικών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, με σκοπό την διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα.



Κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της βιοδραστικότητας φυσικών ενώσεων και συγκεκριμένα μελέτη της αντιγλυκαιμικής δράσης του εκχυλίσματος των ανθοκυανινών από το χυμό του ροδιού μέσω της στόχευσης ενζύμων, που ελέγχουν το μεταβολισμό του γλυκογόνου. Ειδικότερα, μελετήθηκε *ex vivo* σε σύστημα κυτταρικής σειράς ηπατοκαρκινώματος HepG2 η επίδραση των ανθοκυανινών του εκχυλίσματος ροδιού της ποικιλίας “Ερμιόνη” στη δραστικότητα του ενζύμου της γλυκογονόλυσης, φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP). Επιπλέον, διερευνήθηκε ο τρόπος εισόδου της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου και η επίδραση δύο αναστολέων των GLUT (Phloridzin και Phloretin) στην δραστικότητα της φωσφορυλάσης παρουσία και απουσία του εκχυλίσματος των ανθοκυανινών του ροδιού. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας παρέχουν σημαντικές γνώσεις, που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη αντιγλυκαιμικών παραγόντων με στόχο την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II.

### 3) Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1) Οργανολογία

Laminar Flow Hood Tel Star AV-30/70.	Φυγόκεντρος Entrofriger- BLII/ PS Selecta.	Ειδικό πλαστικό ξύστρο (scraper)	Επωαστικός κλίβανος CO2 (Galaxy 170S, New Brunswick)	Υδατόλουτρο (Selecta)
Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης) Kruss Optronic Germany	Αιμοκυτταρόμετρο (Πλάκα Neubauer)	Αυτόματος πιπεταδόρος (HTL Lab Solution)	φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός/UV UV- 1600PC Spectrophotometer VWR	Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N
Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S	Φυγόκεντρος HermLe Z36HK	Ηλεκτρονικό πεχάμετρο Metrohm	Υδατόλουτρο WiseBath, Wisd	Πιπέτες: Air displacement pipettes όγκων 0,1-2 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, 100-1.000 μl

**Πίνακας 4:** Συγκεντρωτικός πίνακας των οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν εντός και εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών.

#### 3.2) Υλικά

Ουσία	Εταιρεία	Ουσία	Εταιρεία
Ammonium Molybdate tetrahydrate	Sigma Aldrich	Imidazole	Sigma Aldrich

Bovine serum Albumine, (BSA)	New England Biolabs	L-Ascorbic acid	Sigma
Bradford Protein Assay	Bio-Rad	L-glutamine	Gibco
DMSO	Panreac	NaF	Sigma
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Life Technologies – Invitrogen	NaOH	Merck
Dexamethasone (DEX)	Riedel-de Haen	Penicillin	Gibco
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem	Phenylmethylsulfonylfluoride	AppliChem
Ethanol 70 %	Sigma Aldrich	Potassium Chloride	Alpha Aesar
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac	Streptomycin	Gibco
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	Sodium dodecyl sulfate	Serva
Glucose Liquid Fast	Zafeiropoulos Diagnostica	Trypsin	Gibco
Glycogen	Sigma Aldrich	Tris	Merck
Hepes	Serva	Triton X-100	AppliChem
Hydrochloric Acid (HCl)	AppliChem	Zinc Acetate	Sigma Aldrich
$\beta$ -GP	Sigma Aldrich	$\beta$ -Μερκαπτοαιθανόλη	Sigma Aldrich
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma	a-D-glucose 1 phosphate	Sigma Aldrich
Phloridzin	Sigma Aldrich	Phloretin	Sigma Aldrich

**Πίνακας 5:** Στην πρώτη και τρίτη στήλη παρουσιάζονται τα χημικά υλικά, ενώ στη δεύτερη και στην τέταρτη οι εταιρείες απ' όπου προμηθεύτηκαν.

### 3.3) Διαλύματα

<b>PMSF 0.1 M:</b> Για την παρασκευή 1 mL PMSF 0.1 M διαλύονται 0.017 gr PMSF σε 1 mL ισοπροπανόλης.	<b>Lysis Buffer:</b> 20 mM Hepes pH 7, 0.05 % Triton X-100, 1 mM NaF. Αποθήκευση στους 4 °C. Πριν τη χρήση του γίνεται προσθήκη 1 mM PMSF.
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα 1:</b> Ιμιδαζόλιο 200mM, KCl 400mM, DTT 4mM, EDTA 4mM, pH 6.8	<b>Ρυθμιστικό διάλυμα 2:</b> Ιμιδαζόλιο 135mM, KCl 270mM, DTT 2.7mM, EDTA 2.7mM, pH 6.8
<b>Μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου.</b> Το pH του μίγματος ρυθμίζεται στο 5.0 με πυκνό HCl και φυλάσσεται σε αδιαφανές μπουκάλι και	<b>Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0.</b> Η ρύθμιση του pH γίνεται με πυκνό NaOH και φυλάσσεται σε αδιαφανές μπουκάλι.

μακριά από ηλιακή ακτινοβολία	
<b>Ρυθμιστικό Διάλυμα 50:50:1</b> : 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 50 mM β-GP, 1 mM EDTA, το pH του ρυθμίζεται στο 6.8	

**Πίνακας 6:** Συγκεντρωτικός πίνακας των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

### 3.4) Αναλώσιμα

Αναλώσιμα	Εταιρεία
Πιπέττες ορολογικές -Serological (2, 5, και 10 mL)	Sarstedt
Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL, 50 mL)	Sarstedt
Πλαστικά σωληνάρια τύπου erendorfs (1.5 mL)	Sarstedt
Ρύγχοι (0.2-10 µL, 20-200 µL και 100-1000 µL)	Sarstedt
Γυάλινα σιφώνια	Kimble
cryovials για φύλαξη κυττάρων στους -80 °C	Sarsted
Φλάσκες για καλλιέργεια κυττάρων, επιφάνειας και 75 cm <sup>2</sup>	Sarsted

**Πίνακας 7:** Παρουσίαση όλων των αναλώσιμων που χρησιμοποιήθηκαν.

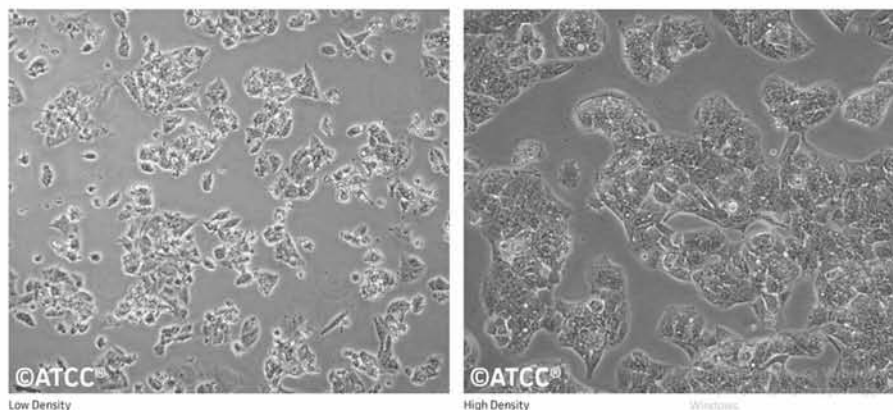
### 3.5) Κυτταρική Σειρά HepG2

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα από την κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line).

<b>Οργανισμός</b>	<b>Homo sapiens, άνθρωπος</b>
Τύπος Κυττάρου	Επιθηλιακό
Ιστός	Ήπαρ
Ασθένεια	Ηπατοκαρκίνωμα
Καρυότυπος	Χρωμοσωμικός αριθμός ίσος με 55
Προέλευση	Ηπατοκαρκίνωμα 15χρονου καυκάσιου
Γονίδια και κυτταρικά προϊόντα	Πλήθος γονιδίων που εκφράζονται και πρωτεϊνών που παράγονται



## Πίνακας 8: Γενικά στοιχεία και πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική σειρά HepG2



Εικόνα 13: Κύτταρα HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) ([www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org))

### 3.6) Ουσίες

Το εκχύλισμα ανθοκυανινών από χυμό ροδιού της ποικιλίας “Ερμιόνη” είχε συγκέντρωση 0,383 µg/ml και στάλθηκε στο εργαστήριό μας από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών διαλυμένο σε οξινομένο νερό (0,01% v/v HCl, pH=3) και αποθηκεύτηκε στους -20 °C πριν τη χρήση του. Για την εισαγωγή του στα κύτταρα αναμιγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα 0,5 M HEPES pH 7.

Οι ουσίες Phloridzin και Phloretin προέρχονται από την εταιρεία Sigma-Aldrich σε μορφή σκόνης με αρχική συγκέντρωση 0,1 M, ενώ για την πειραματική διαδικασία διαλύθηκαν σε 100% DMSO και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

### 3.7) Τεχνικές Κυτταροκαλλιιεργειών

#### 3.7.1) Απόψυξη κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές φυλάσσονται σε cryovial σε βαθιά κατάψυξη: είτε σε θερμοκρασία -80°C είτε σε υγρό άζωτο, -120° C. Η διαδικασία της απόψυξης έχει ως εξής: αρχικά πραγματοποιείται εξαγωγή του cryovial από την κατάψυξη και τοποθετείται στο εσωτερικό του υδατόλουτρου (37°C) όπου παραμένει έως ότου ξεπαγώσει σχεδόν πλήρως. Στο σημείο αυτό μεταφέρεται στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood). Έπειτα, πραγματοποιείται μεταφορά του περιεχομένου του cryovial (1ml) στον δοκιμαστικό σωλήνα (falcon) στον οποίο έχουν προστεθεί 4-5ml θρεπτικού μέσου (DMEM). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1000 rpm και σε θερμοκρασία 20-25°C. Με το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο απομακρύνεται και πραγματοποιείται καλή επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 5 ml θρεπτικού. Τέλος, το περιεχόμενο μεταφέρεται σε φλάσκα και τοποθετείται εντός του επωαστικού κλιβάνου, σε συνθήκες 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Βέβαια, πριν την είσοδο στον κλίβανο τα ξεπαγωμένα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

#### 3.7.2) Θρυψινοποίηση

Η θρυψίνη είναι μία πρωτεάση που προκαλεί πρωτεόλυση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και στην επιφάνεια της φλάσκας. Η θρυψινοποίηση είναι μία διαδικασία απαραίτητη πριν από τη χρήση ή τη μεταφορά των κυττάρων, όπως και σε περιπτώσεις κορεσμού και δημιουργίας συσσωματωμάτων. Αρχικά, πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού από τη φλάσκα και προστίθενται 1-2ml θρυψίνης. Στην συνέχεια, καλύπτονται όλα τα κύτταρα στη φλάσκα από τη θρυψίνη και η φλάσκα ελέγχεται μικροσκοπικά προτού επανατοποθετηθεί στον κλίβανο για 1- 2 λεπτά. Με το πέρας του χρόνου η φλάσκα επανεξετάζεται. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο χρόνος που τα κύτταρα εκτίθενται στην θρυψίνη, καθώς η υπερβολική έκθεση μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη πρωτεόλυση των πρωτεϊνών τους και τελικά σε κυτταροτοξικότητα. Για να σταματήσει η δράση της

θρυψίνης προστίθεται τετραπλάσια ποσότητα θρεπτικού μέσου σε σχέση με τον όγκο της θρυψίνης. Τέλος, το περιεχόμενο μεταφέρεται σε falcon και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά, στα 1000rpm στους 20-25°C. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα μεταφέρονται στην φλάσκα ανάπτυξης και τοποθετούνται στον κλίβανο.

### 3.7.3) Ψύξη κυττάρων

Είναι μια διαδικασία η οποία χρησιμοποιείται για την αποθήκευση κυττάρων για μελλοντικές μελέτες και νέα πειράματα. Η ποσότητα των κυττάρων που ψύχεται εξαρτάται από την εκάστοτε κυτταρική σειρά καθώς και από τη διαθεσιμότητα των κυττάρων. Η διαδικασία είναι παρόμοια με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης με τη διαφορά ότι μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται και τοποθετείται σε cryovial με αναλογία FBS/DMSO 90%/10%. Η φλάσκα στη συνέχεια αποθηκεύεται στους -80°C με πολύ γρήγορες κινήσεις καθώς το DMSO εμφανίζει μεγάλη τοξικότητα.

### 3.7.4) Μέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου-πλάκας Neubauer. Πρόκειται για μία αντικειμενοφόρο πλάκα με διαβαθμίσεις και δύο επιφάνειες. Κάθε επιφάνεια αποτελείται από 16 τετράγωνα, κάθε ένα από τα οποία χωρίζεται σε μικρότερα τετράγωνα με διαβαθμίσεις. Μετά την θρυψινοποίηση 10 μl από τα κύτταρα μεταφέρονται σε καλυπτρίδα στο αιμοκυτταρόμετρο. Ακολούθως, η πλάκα Neubauer τοποθετείται στο οπτικό μικροσκόπιο και υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων με τη βοήθεια του τύπου  $(a+b+c+d/4)$ , όπου a, b, c και d ο συνολικός αριθμός των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο. Έπειτα, υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που διαθέτουμε ανά ml, ο αριθμός των επιθυμητών κυττάρων και ο όγκος του διαλύματος που περιέχει τα επιθυμητά κύτταρα. Στο σημείο αυτό ο επιθυμητός όγκος μεταφέρεται σε falcon και φυγοκεντρείται. Το κυτταρικό ίζημα που προκύπτει διαλυτοποιείται και μεταφέρεται σε ίσες ποσότητες στα επιθυμητά wells. Ακολουθεί μικροσκοπική εξέταση του plate και τοποθέτησή του στον επωαστικό κλίβανο.

### 3.7.5) Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας MTT

Η δοκιμασία MTT είναι μια χρωματομετρική δοκιμασία για την αξιολόγηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Η μέθοδος για την αξιολόγηση της πιθανής κυτταροτοξικότητας βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου της μιτοχονδριακής ηλεκτρικής αφυδρογονάσης να ανάγει το κίτρινο άλας τετραζολίου MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) σε μωβ παράγωγο φορμαζάνης. Η αδιάλυτη φορμαζάνη είναι δυνατόν να διαλυθεί με τη χρήση ισοπροπανόλης ή άλλου οργανικού διαλύτη. Η οπτική πυκνότητα της διαλυμένης φορμαζάνης μετρείται φασματοφωτομετρικά αποδίδοντας απορρόφηση ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της μετατρεπόμενης χρωστικής που σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των μεταβολικώς ενεργών κυττάρων στην καλλιέργεια. Την πρώτη μέρα πραγματοποιείται στρώσιμο κυττάρων (12.000 κύτταρα ανά well στην δικιά μας περίπτωση) σε 96άρι well-plate σε DMEM high glucose (25mM) στο οποίο έχει προστεθεί 10% FBS και 1% L-glutamine. Στη συνέχεια ακολουθεί η αφαίρεση του θρεπτικού και η προσθήκη των ουσιών (το εκχύλισμα του ροδιού στη συγκεκριμένη μελέτη) σε DMEM w/o glucose προς εξέταση της κυτταροτοξικότητας που πιθανόν να προκαλούν και επώαση για 3 ώρες. Με το πέρας των 3 ωρών ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού, προσθήκη του αντιδραστηρίου MTT  $C_{T_{ελ}}=0,5\text{mg/ml}$  (διαλυμένο στο θρεπτικό) και μία ακόμη επώαση για 3 ώρες στις παρακάτω συνθήκες 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια το MTT αφαιρείται, προστίθεται ισοπροπανόλη και στο κατάλληλο χρονικό διάστημα που διαφέρει ανάλογα με το πείραμα και πραγματοποιείται η φωτομέτρηση στα 570 και στα 690 nm.

## 3.8) Τεχνικές εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών – Αναλυτικές Μέθοδοι

### 3.8.1) Harvest – Συλλογή κυττάρων

Με την επώαση των κυττάρων με τις επιθυμητές ουσίες για το κατάλληλο χρονικό διάστημα τα κύτταρα συλλέγονται για την συνέχεια της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας. Η συλλογή γίνεται με πλύση των κυττάρων με PBS 1X, αφού έχει αφαιρεθεί το θρεπτικό μέσο. Μετά την πλύση με τη βοήθεια του ειδικού μηχανήματος που ονομάζεται scraper τα κύτταρα συλλέγονται. Το scraper χρησιμοποιείται με πολύ προσεκτικές κινήσεις σε όλη την επιφάνεια του well και μεταφέρει τα κύτταρα σε νέα κλειστά erpendorfs και τοποθετούνται στο πάγο. Ακολούθως, η διαδικασία με την πλύση επαναλαμβάνεται για να συλλεχθούν όλα τα κύτταρα που βρίσκονται στο well. Με την λήψη όλου του κυτταρικού περιεχομένου τα erpendorfs φυγοκεντρούνται για 5 min στα 1500 rpm στους 4 °C. Το προκύπτον υπερκείμενο απομακρύνεται και το κυτταρικό ίζημα αποθηκεύεται στους -80 °C ή χρησιμοποιείται απευθείας για τη συνέχεια του πειράματος.

### 3.8.2) Κυτταρική Λύση

#### I) Λύση με χρήση lysis buffer

Το lysis buffer, ο όγκος του που προστίθεται και ο χρόνος επώασής του με τα κύτταρα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την κυτταρική σειρά και την πειραματική διαδικασία. Στην συγκεκριμένη μελέτη όμως περιείχε 20 mM Hepes pH 7, 0.05 % w/v Triton X-100, 1 mM NaF, 0,1 M PMSF. Ο όγκος του που προστίθεται σε κάθε erpendorf που διαθέτει το κυτταρικό ίζημα είναι 500 μL και επωάζεται μαζί με τα κύτταρα για 15-20 min, αφού γίνει καλή ανάδευση στο erpendorf προκειμένου να διασφαλιστεί η κυτταρική λύση.

#### II) Λύση με υπερήχους (Sonication)

Μετά την επώαση με το lysis buffer ακολουθεί η περαιτέρω λύση των κυττάρων και ο κατακερματισμός του DNA με τη χρήση των υπερήχων. Πρόκειται για μία βίαιη διαδικασία λύσης στην οποία οι επαναλήψεις και ο χρόνος διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε έκθεση των κυττάρων για 1 sec για 4-5 επαναλήψεις σε 35% Amplitude, 1 cycle, ενώ το διάστημα ανάμεσα στις επαναλήψεις ήταν 30 sec.

### 3.8.3) Χρωματομετρική μέθοδος Bradford

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που περιέχονται στο κυτταρικό διάλυμα και στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 παράγει έγχρωμο μπλε προϊόν ύστερα από πρόσδεση στις πρωτεΐνες και κυρίως σε κατάλοιπα λυσίνης. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής Coomassie, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Σ' αυτό το μήκος κύματος υπολογίζεται η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών του κυτταρικού διαλύματος. Για το λόγο αυτό αρχικά κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης βόειου ορού (BSA). Η πρότυπη καμπύλη δημιουργείται μετρώντας τα πρωτεϊνικά διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης στα 595 nm και έχει τη μορφή  $y = ax + b$ , όπου  $y$  η τιμή της φωτομέτρησης του κυτταρικού εκχυλίσματος και  $x$  η ποσότητα των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στο διάλυμα. Στη συγκεκριμένη μελέτη η εξίσωση είναι η :  $y = 0,0864x + 0.0681$ .

### 3.8.4) Προετοιμασία κυττάρων για το πείραμα ελέγχου δραστηριότητας του ενζύμου GPa

Κύτταρα HepG2 ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος καλλιεργούνται σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα που περιέχει 5% CO<sub>2</sub> στους 37°C και διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM υψηλής γλυκόζης (25mM) που περιέχει 10% w/v FBS, 1% w/v L-γλουταμίνη και πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε πιάτα καλλιέργειας 60 X 15 mm σε πυκνότητα  $1,75 \times 10^6$  κύτταρα ανά τρυβλίο. Μετά την προσκόλληση των κυττάρων (16-18 ώρες) το θρεπτικό μέσο DMEM αντικαθίστανται από θρεπτικό μέσο DMEM υψηλής γλυκόζης χωρίς L-γλουταμίνη, χωρίς FBS παρουσία πενικιλίνης / στρεπτομυκίνης, 10 ηM δεξαμεθαζόνης και 100 ηM ινσουλίνης για να προκληθεί σύνθεση γλυκογόνου. Μετά από επώαση 16-18 ωρών, τα κύτταρα επωάζονται για 3 ώρες απουσία ή παρουσία των συγκεντρώσεων των αναστολέων σε θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς ερυθρό της φαινόλης, χωρίς L-γλουταμίνη, χωρίς FBS και χωρίς γλυκόζη παρουσία 100 ηM γλυκαγόνου προκειμένου να ενεργοποιηθεί η γλυκογονόλυση. Στη

συνέχεια, πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων με το ίδιο DMEM όπου βρίσκονται και συλλέγονται με φυγοκέντρηση στα 380 rcf για 5 λεπτά. Τα κυτταρικά ιζήματα είτε αποθηκεύονται στους -80°C έως τη μέρα του πειράματος είτε χρησιμοποιούνται απευθείας. Τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 20 mM HEPES pH 7, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 0,05% w/v Triton και ακολουθεί λύση με υπερήχους σε πάγο για 4X1sec. Τα προϊόντα της λύσης φυγοκεντρώνονται σε μικροφυγόκεντρο στα 15.600 rcf στους 4°C για 15 λεπτά. Στα προκύπτοντα υπερκείμενα, η συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford.

### 3.8.5) Ενζυμικός Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GPa

Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση είναι αμφίδρομη. Στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μελετήθηκε η αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, προς τη σύνθεση του γλυκογόνου, δηλαδή η ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο, ώστε να προκύψει γλυκογόνο με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών από την Glc-1-P. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά με τη μέθοδο του ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου, ώστε να ποσοτικοποιηθούν.

Αρχικά, τα προϊόντα της κυτταρικής λύσης αναμιγνύονται με 1% w/v γλυκογόνο και επωάζονται για 15 λεπτά στους 30 ° C στο υδατόλουτρο. Από το διάλυμα αυτό μεταφέρονται 100 και 170 μl στο διάλυμα υποστρωμάτων που αποτελείται από 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P) 30mM και dH<sub>2</sub>O. Η Glc-1-P των 30 mM προκύπτει με αραιώση από την Glc-1-P των 400 mM μέσω προσθήκης 325 μl από την Glc-1-P των 400 mM που είναι το stock του εργαστηρίου και 675 μl από το Ρυθμιστικό Διάλυμα 1 σε τελικό όγκο 1 ml.

Στη συνέχεια από το μίγμα που προκύπτει μεταφέρονται 40μl σε erpendorf που περιέχει 10 μl SDS 1% w/v, ώστε να σταματήσει η αντίδραση λόγω μετουσίωσης της πρωτεΐνης. Οι χρόνοι στους οποίους γινόταν λήψη δείγματος για να σταματήσει η αντίδραση ήταν: 0, 10min, 20min, 30min και 40min μετά την έναρξή της.

Ακολούθως, στα δείγματα προστίθενται 500 μl διαλύματος φωτομέτρησης (διάλυμα ασκορβικού οξέος-διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1/4) για τον προσδιορισμό του φωσφόρου. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του φωσφόρου με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου. Σε pH 5 παρουσία Zn<sup>2+</sup> το ανόργανο φωσφορικό σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο, το οποίο απορροφά ισχυρά την υπεριώδη ακτινοβολία. Μετά από αναγωγή με το ασκορβικό οξύ, παράγεται ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 850 nm. Απουσία ορθοφωσφορικών ιόντων το χρωμοφόρο σύμπλοκο δεν παράγεται. Το μίγμα αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Στη συνέχεια προστίθεται στα δείγματα και αυτά επωάζονται σε θερμοκρασία 30°C για άλλα 15 min στο υδατόλουτρο.

Η μέθοδος προσδιορισμού της δραστηριότητας του ένζυμου βασίζεται στο προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση φωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου αλλά είναι παρόντα στο μίγμα αντίδρασης ως ενδογενή φωσφορικά των κυτταρικών εκχυλισμάτων. Έτσι παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα-μάρτυρες εις διπλούν και υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών :

- Διάλυμα H<sub>2</sub>O : 10 μl SDS 1 % (w/v) + 40 μL dH<sub>2</sub>O
- Διάλυμα Glc-1-P : 10 μl SDS 1 % (w/v)+ 31,1 μl dH<sub>2</sub>O + 8,9 μl μεγαλύτερη συγκέντρωση Glc-1-P (30mM)
- Διάλυμα φωσφορικών : 10 μl SDS 1 % (w/v)+ 30 μl dH<sub>2</sub>O + 10 μl Pi 1 mM



### 3.8.6) Μελέτες με αναστολείς – Προσθήκη Ουσιών

Για να διερευνηθεί η αναστολή που προκαλούν οι ενώσεις χρησιμοποιώντας ex vivo σύστημα ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2 πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες αρχικά ως προς διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος του ροδιού με σκοπό να διαπιστωθεί αν επηρεάζει τη δραστικότητα της φωσφορυλάσης. Για το εκχύλισμα του ροδιού χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τιμές, ενώ οι βέλτιστες έπειτα από σειρά πειραμάτων ήταν οι 3 µg/ml, 10 µg/ml και 15 µg/ml. Επίσης, έγινε προσπάθεια υπολογισμού της IC 50 παρουσία των παραπάνω συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος του ροδιού για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P (30mM).

Επιπλέον, στο κυτταρικό σύστημα των HepG2 εισήχθησαν και οι ουσίες Phloridzin, Phloretin παρουσία 10 µg/ml εκχυλίσματος ροδιού. Οι ουσίες αυτές αποτελούν αναστολείς των μεταφορέων γλυκόζης (GLUT) παρεμποδίζοντας την είσοδο της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι δύο αυτές ουσίες εισήχθησαν στα κύτταρα σε συγκέντρωση 80µM, ενώ η αρχική τους συγκέντρωση ήταν 0,1M και βρίσκονταν διαλυμένες σε 100% DMSO. Η συγκέντρωση του DMSO στο θρεπτικό των κυττάρων ήταν 1:1000.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στα πειράματα με αυτές τις ουσίες είναι η ίδια που περιγράφηκε παραπάνω.

### 3.8.7) Επεξεργασία δεδομένων κινητικών μελετών

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των κινητικών ενζυμικών μελετών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraFit 6.0. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression). Για τον προσδιορισμό της σταθεράς IC50, βάσει των ταχυτήτων της αντίδρασης παρουσία και απουσία αναστολέα υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (\text{sp. activity control} - \text{sp. activity αναστολέα} / \text{sp. activity control}) \times 100$$

Ακολουθως, η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα μετατρέπεται σε επί τις εκατό δραστικότητα και τα δεδομένα εισάγονται στο πρόγραμμα GraFit για τον υπολογισμό της σταθεράς IC50. Επιπλέον, οι μελέτες για τον προσδιορισμό της IC50 στηρίζονται στο διάγραμμα: %αναστολή=f([Inhibitor]). Ο υπολογισμός όλων των απαραίτητων παραμέτρων γίνεται ως εξής: ο συντελεστής f που υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο

$$f = \frac{\text{limit}}{\text{assay volume} \times C}$$

όπου C, η συγκέντρωση του ενζύμου στον όγκο της αντίδρασης.

Το limit υπολογίζεται από τον τύπο: limit = 0.78 X [Glc-1-P] X assay volume. Το 0.78 είναι το % (78%) ποσοστό της G1P που έχει καταναλωθεί για παραγωγή ορθοφωσφορικών ιόντων, όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία, [Glc-1-P] η συγκέντρωση της Glc-1-P στην αντίδραση και assay volume ο όγκος που λάβαμε για να σταματήσουμε την αντίδραση.

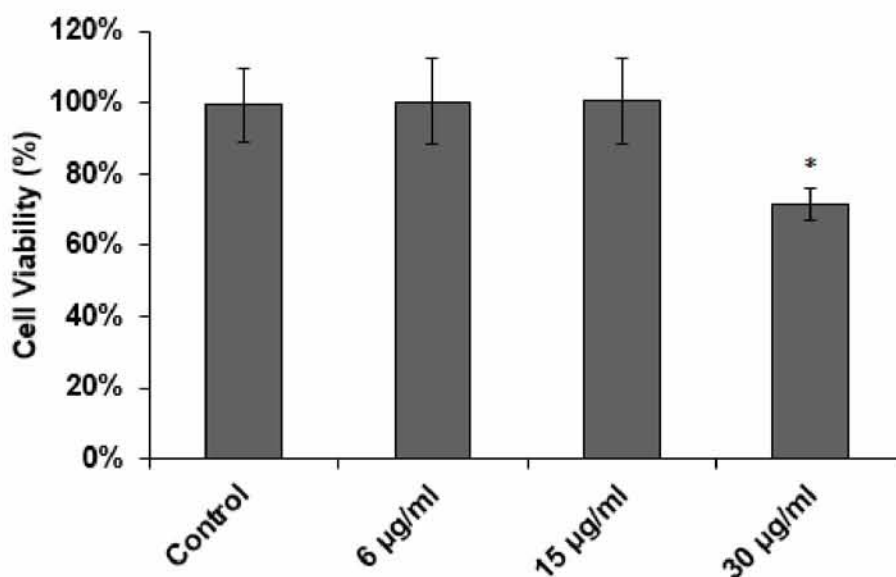
## 4) Αποτελέσματα

### 4.1) Έλεγχος κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος ανθοκυανινών από χυμό ροδιού

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος των ανθοκυανινών από το χυμό του ροδιού σε κύτταρα HepG2, με σκοπό τον εντοπισμό του εύρους των ασφαλών μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε η δοκιμή του MTT. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται



το ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων (6 µg/ml-15 µg/ml- 30µg/ml) του εκχυλίσματος και η κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τεσσάρων επαναλήψεων.



**Διάγραμμα 1:** Έλεγχος κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος ανθοκυανινών από χυμό ροδιού σε κύτταρα HepG2 με τη δοκιμή του MTT.

Κύτταρα HepG2 αναπτύχθηκαν σε 96-well plate (12.000 cells/well), κι έπειτα επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος των ανθοκυανινών από το χυμό του ροδιού για 3 ώρες, ενώ τα κύτταρα μάρτυρες (control) επωάστηκαν με την αντίστοιχη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 0.5 M HEPES pH 7 και dH<sub>2</sub>O. Ακολούθησε μέτρηση της κυτταροτοξικότητας και έκφραση των αποτελεσμάτων ως επί τοις εκατό βιωσιμότητα, όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα.

Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα προκάλεσε μια μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων HepG2, σε ποσοστό περίπου 30% στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 30 µg/ml (\* στο διάγραμμα). Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε καμία κυτταροτοξικότητα στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

#### 4.2) Βελτιστοποίηση του πειραματικού πρωτοκόλλου για τον ενζυμικό προσδιορισμό της δραστηριότητας της GPa

Προκειμένου να μελετηθεί με κινητικές μελέτες η επίδραση του εκχυλίσματος ανθοκυανινών από χυμό ροδιού, πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών του πειραματικού πρωτοκόλλου. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες με κυτταρικά εκχυλίσματα χωρίς αναστολέα (control). Οι δύο ποσότητες κυτταρικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είναι τα 100 µl και τα 170 µl. Οι χρόνοι στους οποίους λαμβάναμε δείγμα, για να σταματήσουμε την αντίδραση μετά την έναρξή της ήταν: 0 min, 5min, 10min, 15min και 20min.

Δείγμα	Τιμές Ενζυμικής Δραστηριότητας (nmol/min/mg)
C1 100 µL	2,6 ± 0,1
C1 170 µL	2.9 ± 0,1
C2 100 µL	2,7 ± 0,1

C2 170 $\mu$ L	2,4 $\pm$ 0,1
----------------	---------------

**Πίνακας 9:** Παρουσιάζονται τα δείγματα – μάρτυρες και οι τιμές ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας για το πείραμα που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθούν οι δύο ποσότητες (100  $\mu$ L και 170  $\mu$ L) κυτταρικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήσαμε.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου της επίδρασης της δεξαμεθαζόνης (DEX) στο πειραματικό πρωτόκολλο. Έτσι ελέχθηκαν εις διπλούν 3 δείγματα στα οποία προστέθηκαν 10 nM DEX κατά την πειραματική διαδικασία και 3 δείγματα χωρίς DEX στα οποία προστέθηκαν 100 nM γλυκαγόνης. Η DEX είναι ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές που αποτελεί αγωνιστή του υποδοχέα της γλυκαγόνης (GR) και οδηγεί στην ενεργοποίηση της γλυκονεογένεσης. Οι χρόνοι στους οποίους σταματούσαμε την αντίδραση είναι: 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min.

Δείγμα	Τιμές Ενζυμικής Δραστηριότητας (nmol/min/mg)
DEX 1	2,3 $\pm$ 0,1
DEX 2	2,8 $\pm$ 0,1
DEX 3	2,4 $\pm$ 0,2
Glucagon 1	3,2 $\pm$ 0,1
Glucagon 2	2,4 $\pm$ 0,2
Glucagon 3	2,7 $\pm$ 0,1

<b>M.O. Δειγμάτων DEX</b>
<b>2,5</b>
<b>M.O. Δειγμάτων Glucagon</b>
<b>2,75</b>

**Πίνακας 10:** Παρουσιάζονται τα δείγματα - μάρτυρες, οι τιμές της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας καθώς και ο μέσος όρος των ειδικών ενζυμικών δραστηριοτήτων ανά τριάδες δειγμάτων για το πείραμα που πραγματοποιήθηκε, ώστε να ελεγχθεί η επίδραση της δεξαμεθαζόνης (DEX) στο πειραματικό πρωτόκολλο.

Δείγμα	Τιμές Ενζυμικής Δραστηριότητας (nmol/min/mg)
DEX 1	1,1 $\pm$ 0,1
DEX 2	1,5 $\pm$ 0,2
DEX 3	1,7 $\pm$ 0,1
Glucagon 1	1,1 $\pm$ 0,1
Glucagon 2	1,2 $\pm$ 0,1

Glucagon 3	1,6 ± 0,2
------------	-----------

M.O. Δειγμάτων DEX
1,4
M.O. Δειγμάτων Glucagon
1,3

**Πίνακας 11:** Παρουσιάζονται τα δείγματα - μάρτυρες, οι τιμές της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας καθώς και ο μέσος όρος των ειδικών ενζυμικών δραστηριοτήτων ανά τριάδες δειγμάτων για το πείραμα που πραγματοποιήθηκε, ώστε να ελεγχθεί η επίδραση της δεξαμεθαζόνης (DEX) στο πειραματικό πρωτόκολλο.

Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών οδήγησαν στο συμπέρασμα, ότι η γλυκαγόνη και η δεξαμεθαζονη έχουν την ίδια επίδραση στις τιμές της ενζυμικής δραστηριότητας, όπως φαίνεται και στους παραπάνω πίνακες.

Λόγω των χαμηλών τιμών ενζυμικής δραστηριότητας που παρατηρήθηκαν στα παραπάνω πειράματα, αυξήσαμε τους χρόνους στους οποίους σταματούσαμε την αντίδραση, ενώ στο lysis buffer προσθέσαμε 1mM NaF, που λειτουργεί ως αναστολέας φωσφατασών, ώστε να μην είναι εκτεθειμένη η GPα σε αποφωσφορυλίωση από τη δράση φωσφατασών, που βρίσκονται στο κυτταρικό εκχύλισμα. Έτσι, το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε σε δείγματα control με το νέο lysis buffer, προτού εισαχθεί το εκχύλισμα ανθοκυανινών από χυμό ροδιού στο σύστημα ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2. Οι νέοι χρόνοι στους οποίους λαμβάναμε δείγμα, για να σταματήσουμε την αντίδραση μετά την έναρξή της ήταν: 0 min, 10min, 20min, 30min και 40min.

Δείγμα	Τιμές Ενζυμικής Δραστηριότητας (nmol/min/mg)
C1 100 μL	3,9 ± 0,1
C1 170 μL	5,5 ± 0,3
C2 100 μL	3,3 ± 0,2
C2 170 μL	4,9 ± 0,3

**Πίνακας 12:** Παρουσιάζονται τα δείγματα – μάρτυρες και οι τιμές της ειδικής ενζυμικής δραστηριότητας για το πείραμα που πραγματοποιήθηκε ύστερα από αύξηση των χρόνων της αντίδρασης αλλά και την προσθήκη του 1mM NaF στο διάλυμα λύσης.

Η προσθήκη του 1mM NaF στο νέο lysis buffer και η αύξηση των χρόνων στους οποίους σταματούσαμε την αντίδραση, οδήγησε στη λήψη πολύ μεγαλύτερων τιμών δραστηριότητας. Έτσι, ήταν δυνατόν να εντοπιστούν διαφορές στα πειράματα με τον αναστολέα, χωρίς αυτά να οφείλονται σε πειραματικό σφάλμα.

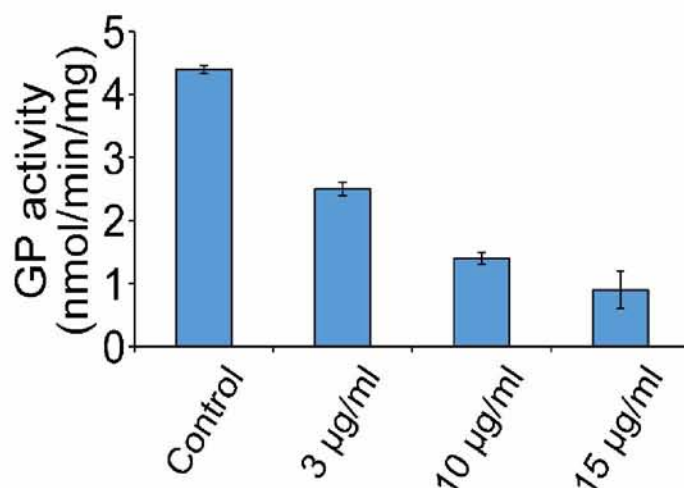
#### 4.3) Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της GPα – Μελέτες με τον αναστολέα

Το εκχύλισμα ανθοκυανινών από χυμό ροδιού χρησιμοποιήθηκε σε ex vivo σύστημα ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2, ώστε να πραγματοποιηθούν κινητικές μελέτες ως προς διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, με σκοπό να διαπιστωθεί, αν προκαλείται αναστολή.

Για το εκχύλισμα ανθοκυανινών από χυμό ροδιού χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση περίπου 10 φορές μεγαλύτερη (μg/ml) συγκριτικά με την IC50 του έναντι της hGPα στα in vitro πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από άλλα μέλη της ερευνητικής μας ομάδας σε προηγούμενες μελέτες. Η τιμή της σταθεράς αναστολής IC50 που υπολογίστηκε έναντι της hGPα ήταν  $0,32 \pm 0,014 \mu\text{M}$ . Το πειραματικό



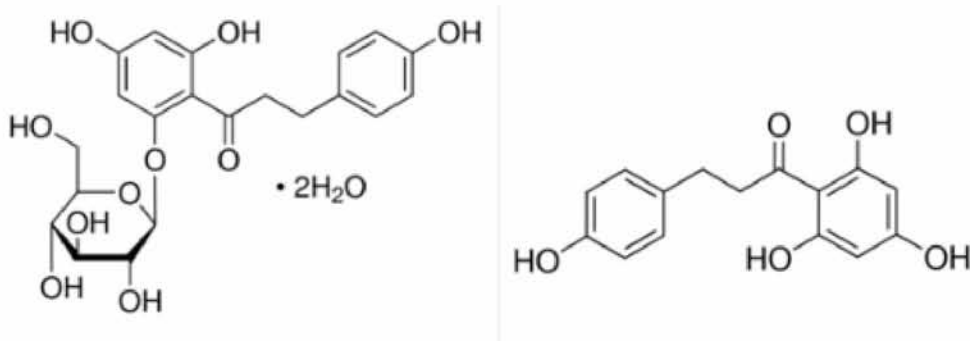
πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτό που περιγράφηκε στο 3.8, ενώ οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 3  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 15  $\mu\text{g/ml}$  (το εκχύλισμα ήταν διαλυμένο σε κατάλληλο όγκο 0.5 M HEPES pH 7). Οι χρόνοι στους οποίους λαμβάναμε δείγμα, για να σταματήσουμε την αντίδραση μετά την έναρξή της ήταν: 0 min, 10min, 20min, 30min και 40min.

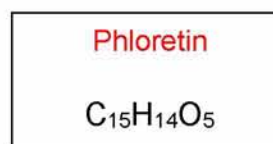
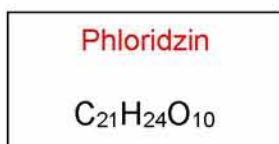


**Διάγραμμα 2:** Διάγραμμα της δραστηριότητας της GP σε αντιδράσεις ελέγχου (χωρίς αναστολέα) και σε αντιδράσεις με αναστολέα (εκχύλισμα ανθοκυανινών από χυμό ροδιού). Η δραστηριότητα της GP εκφράζεται ως  $\text{nmol} / \text{min} / \text{mg}$  πρωτεΐνης και υπολογίζεται χρησιμοποιώντας 5 χρονικά σημεία και σφάλματα (εμφανίζονται στις ράβδους).

Οι πειραματικές διαδικασίες έδειξαν ότι το εκχύλισμα αναστέλλει τη δραστηριότητα της GP σε κύτταρα HepG2. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα εμφάνισε περίπου 45% αναστολή στα 3  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , 70% αναστολή στα 10  $\mu\text{g/ml}$  και 80% αναστολή στα 15  $\mu\text{g} / \text{ml}$  σε σύγκριση με τα δείγματα control που επωάστηκαν απουσία του αναστολέα.

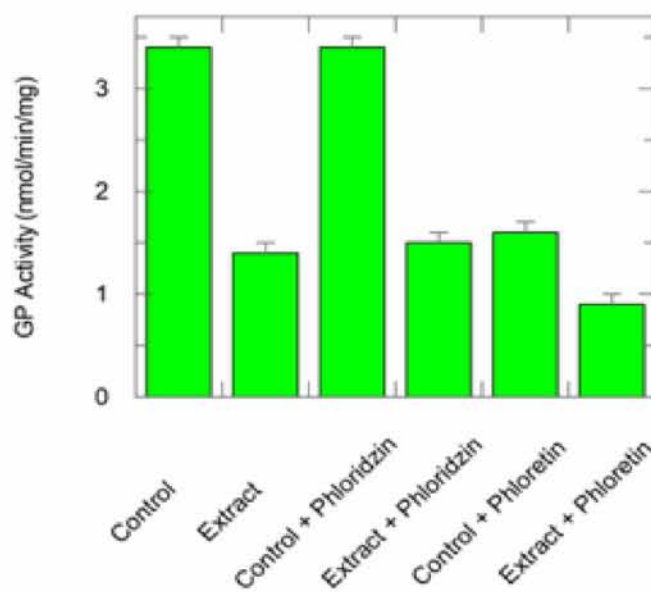
#### 4.4) Ενζυμικός προσδιορισμός της δραστηριότητας της GPα – Μελέτες με τον αναστολέα και τις ουσίες Phloridzin, Phloretin





**Εικόνες 14, 15:** Η δομή και ο συντακτικός τύπος των δύο ουσιών – αναστολέων των GLUT Phloridzin, Phloretin που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. (sigmaaldrich.com)

Οι δύο ουσίες – αναστολείς των GLUT εισήχθησαν στο σύστημα ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2 μαζί με τον αναστολέα-εκχύλισμα ανθοκυανινών από χυμό ροδιού, προκειμένου να διερευνηθεί ο τρόπος εισόδου της γλυκόζης στα κύτταρα αυτά. Ειδικότερα, οι δύο ουσίες εισήχθησαν σε συγκέντρωση 80μM διαλυμένες σε DMSO. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση επιλέχθηκε ύστερα από μελέτη της βιβλιογραφίας για τον εντοπισμό του εύρους των ασφαλών συγκεντρώσεων. Οι δύο ουσίες σε συγκεντρώσεις έως 120 μM δεν εμφάνισαν καμία κυτταροτοξικότητα με βάση τη βιβλιογραφία [36], [37]. Οι υπολογισμοί των συγκεντρώσεων έγιναν με τέτοιο τρόπο, ώστε η συγκέντρωση του DMSO στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων να είναι 1:1000. Επιπλέον, στο ex vivo σύστημα κυττάρων εισήχθη και το εκχύλισμα ανθοκυανινών από χυμό ροδιού σε συγκέντρωση 10 μg/ml διαλυμένο σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 0,5 M HEPES pH 7. Οι χρόνοι στους οποίους λαμβάναμε δείγμα, για να σταματήσουμε την αντίδραση μετά την έναρξή της ήταν: 0 min, 10min, 20min, 30min και 40min.



**Διάγραμμα 3:** Διάγραμμα της δραστηριότητας της GP σε αντιδράσεις ελέγχου (control), σε αντιδράσεις ελέγχου παρουσία των ουσιών Phloridzin, Phloretin, σε αντιδράσεις με αναστολέα (εκχύλισμα ανθοκυανινών από χυμό ροδιού) και σε αντιδράσεις με αναστολέα παρουσία των ουσιών Phloridzin, Phloretin. Η δραστηριότητα της GP εκφράζεται ως nmol / min / mg πρωτεΐνης. Η δραστηριότητα της GP που εμφανίζεται υπολογίζεται, χρησιμοποιώντας 5 χρονικά σημεία και σφάλματα (εμφανίζονται στις ράβδους).

Από το συγκεκριμένο πείραμα παρατηρείται ότι ο αναστολέας των GLUT Phloridzin δεν προκαλεί αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας της φωσφορυλάσης απουσία του αναστολέα (εκχύλισμα ανθοκυανινών από χυμό ροδιού), ενώ παρουσία του προκαλεί αναστολή παρόμοια με το δείγμα του

εκχυλίσματος ανθοκυανινών. Αντιθέτως, η ουσία Phloretin οδηγεί σε σημαντική αναστολή της φωσφορυλάσης τόσο παρουσία όσο και απουσία του εκχυλίσματος ανθοκυανινών. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η ουσία αυτή δεν δρα απευθείας στην φωσφορυλάση, αλλά δρα ανοδικά στο σηματοδοτικό μονοπάτι της γλυκογονόλυσης, γεγονός που υποστηρίζεται από την αναστολή που παρατηρείται παρουσία της ουσίας στα δείγματα Control + Phloretin όσο και στα δείγματα του εκχυλίσματος ανθοκυανινών + Phloretin σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα Control και του εκχυλίσματος ανθοκυανινών.

## 5) Συζήτηση

Ο διαβήτης τύπου II συνιστά μία μεταβολική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία και οφείλεται σε ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα καθοριστικό ένζυμο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου καταλύοντας το πρώτο στάδιο της αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης (Glc-1-P). Λόγω αυτού του σημαντικού ρόλου, το ένζυμο αυτό θεωρείται στόχος για το σχεδιασμό των υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα διμερές ένζυμο που έχει ως συμπαραγόντα τη φωσφορική πυριδοξάλη (PLP).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή υπογλυκαιμική δράση αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2. Η μελέτη έγινε με εκχυλίσματα ανθοκυανινών από χυμό ροδιού (συγκέντρωση 0,383 μg/ml). Το εκχύλισμα αυτό εξετάστηκε σε προηγούμενες μελέτες σε *in vitro* πειράματα και έδειξε σημαντική αναστολή της ηπατικής GP (Η τιμή της σταθεράς αναστολής IC50 που υπολογίστηκε έναντι της hIGPa ήταν  $0,32 \pm 0,014$  μM). Τα αποτελέσματα των μελετών αποδεικνύουν ότι τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα έχουν χαμηλή κυτταροτοξικότητα έως τα 30 μg/ml και σημαντική ανασταλτική ικανότητα σε κυτταρικό επίπεδο (45% αναστολή στα 3 μg / ml, 70% αναστολή στα 10 μg/ml και αναστολή 80% στα 15 μg / ml). Επιπλέον, διερευνήθηκε ο τρόπος εισόδου της γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων και η επίδραση 2 ουσιών-αναστολέων των GLUT (Phloridzin, Phloretin) στη δραστηριότητα της GP στο ίδιο *ex vivo* σύστημα παρουσία και απουσία του εκχυλίσματος ανθοκυανινών από χυμό ροδιού. Από τα συγκεκριμένα πειράματα με τις ουσίες Phloridzin και Phloretin δεν είμαστε σε θέση να υποστηρίξουμε με ασφάλεια τον τρόπο εισόδου της γλυκόζης στα κύτταρα HepG2. Η ανασταλτική ικανότητα των ACN του χυμού του ροδιού αξιολογήθηκε από την ερευνητική μας ομάδα μέσω ενός συνδυασμού *in vitro* και *ex vivo* πειραμάτων στα κύτταρα HepG2 αλλά και μελετών κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Οι μελέτες κρυσταλλογραφίας συγγένειας αποκαλύπτουν, ότι το εκχύλισμα προκαλεί την αναστολή μέσω δέσμευσης του γλυκοζίτη πελαργονιδίνη στον κέντρο αναστολής της GP. Αυτή η ανασταλτική επίδραση των ACN του εκχυλίσματος μέσω δέσμευσής στο κέντρο αναστολής της GP μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία για μελλοντικές προσπάθειες σχεδιασμού αντιγλυκαιμικών παραγόντων με βάση τη δομή. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης από την ερευνητική μας ομάδα θα παρουσιασθούν σε σχετική δημοσίευση (υποβλήθηκε στο περιοδικό "Journal of Agricultural and Food Chemistry").

## 6) Βιβλιογραφία

- [1] Roder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*. 2016; 48:e219.
- [2] Thorens B, Mueckler M (2010). "Glucose transporters in the 21st Century". *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 298 (2): E141-5.
- [3] Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S (March 1990). "Molecular biology of mammalian glucose transporters". *Diabetes Care*. 13 (3): 198–208.
- [4] Qaid & Abdelrahman (2016), Role of insulin and other related hormones in energy metabolism—A review *Cogent Food & Agriculture* (2016), 2: 1267691
- [5] Ashutosh Ojha, Utkarsh Ojha, Raihan Mohammed, Abhinaya Chandrashekar, Harsh Ojha (2019), Current perspective on the role of insulin and glucagon in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus, *Clinical Pharmacology: Advances and Applications* 2019:11 57–65
- [6] Carlos Lorenzo, Lynne E. Wagenknecht, Ralph B. D'Agostino, Jr., Marian J. Rewers, Andrew J. Karter, Seeven M. Haffnerd (2010). "Insulin Resistance,  $\beta$ -Cell Dysfunction, and conversion to Type 2 Diabetes in a Multiethnic Population. *Diabetes care*, volume 33
- [7] Subhasis Chattopadhyay, Subhasis Samanta, Subarna Ganguly, Janmajoy Banerjee, Ranabir Chanda (2020), Types, Causes, Effect and Common Treatment of Diabetic Mellitus (DM), A Long Term Endocrine Metabolic Disorder: A Review, *Sustainable Humanosphere* ISSN: 1880 - 6503 Volume: 16 Issue: 1
- [8] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Feb;103(2):137-49.
- [9] American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33 Suppl1:S62-9
- [10] Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* 414(6865): 799-806
- [11] Somsak, L., K. Czifrak, M. Toth, E. Bokor, E. D. Chrysina, K. M. Alexacou, J. M. Hayes, C. Tiraidis, E. Lazoura, D. D. Leonidas, S. E. Zographos and N. G. Oikonomakos (2008). "New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents." *Curr Med Chem* 15(28): 2933-2983.
- [12] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J*. 2012;441(3):763-87.
- [13] Zois CE, Harris AL. Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*. 2016;94(2):137-54.
- [14] Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 1998
- [15] Shibani Kanungo, Kimberly Wells, Taylor Tribett, Areeg El-Gharbawy (2018), Glycogen metabolism and glycogen storage disorders, *Annals of Translational Medicine*; 6(24):474
- [16] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
- [17] Pinotsis N, Leonidas DD, Chrysina ED, Oikonomakos NG, Mavridis IM. The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Protein Sci* 2003
- [18] Livanova NB, Chebotareva NA, Eronina TB, Kurganov BI. Pyridoxal 5'-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase B. *Biochemistry (Mosc)* 2002



- [19] Kantsadi AL, Bokor E, Kun S, Stravodimos GA, Chatzileontiadou DS, Leonidas DD, et al. Synthetic, enzyme kinetic, and protein crystallographic studies of C-beta-dglucopyranosyl pyrroles and imidazoles reveal and explain low nanomolar inhibition of human liver glycogen phosphorylase. *Eur J Med Chem* 2016
- [20] Mathieu C, de la Sierra-Gallay IL, Duval R, Xu X, Coccagn A, Leger T, et al. Insights into Brain Glycogen Metabolism: THE STRUCTURE OF HUMAN BRAIN GLYCOGEN PHOSPHORYLASE. *J Biol Chem* 2016; 291:18072-83.
- [21] Dolphin D, Poulson R, Avramovic O (1986), *Coenzymes and Cofactors*. 1, Part B. New York: Wiley Interscience
- [22] Lorraine Agiu. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. Institutes of Cellular Medicine and Ageing and Health, Medical School, Newcastle University 2015
- [23] Kantsadi, A. L., A. Apostolou, S. Theofanous, G. A. Stravodimos, E. Kyriakis, V. A. Gorgogietas, D. S. Chatzileontiadou, K. Pegiou, V. T. Skamnaki, D. Stagos, D. Kouretas, A. M. Psarra, S. A. Haroutounian and D. D. Leonidas (2014). "Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase." *Food Chem Toxicol* 67: 35-43
- [24] Efthimios Kyriakis, Theodora G.A. Solovou, Sándor Kun, Katalin Czifrák, Béla Szocs, László Juhász, Éva Bokor, George A. Stravodimos, Anastassia L. Kantsadi, Demetra S.M. Chatzileontiadou, Vassiliki T. Skamnaki, László Somsák, Demetres D. Leonidas (2018). Probing the  $\beta$ -pocket of the active site of human liver glycogen phosphorylase with 3-(C -  $\beta$  - d -glucopyranosyl)-5-(4-substituted-phenyl)-1, 2, 4-triazole inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 77, 485–493
- [25] Oikonomakos, N.G. (2002), Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3
- [26] Oikonomakos, N. G. (2008), New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983
- [27] Hayes, J. M. and D. D. Leonidas (2010). "Computation as a tool for glycogen phosphorylase inhibitor design." *Mini Rev. Med. Chem.* 10(12): 1156-1174
- [28] Kantsadi, A. L., J. M. Hayes, S. Manta, V. T. Skamnaki, C. Kiritsis, A. M. Psarra, Z. Koutsogiannis, A. Dimopoulou, S. Theofanous, N. Nikoleousakos, P. Zoumpoulakis, M. Kontou, G. Papadopoulos, S. E. Zographos, D. Komiotis and D. D. Leonidas (2012). "The sigma-hole phenomenon of halogen atoms forms the structural basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b." *ChemMedChem* 7(4): 722-732
- [29] Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochemistry Reviews* 2014;13:471-98
- [30] Kyriakis, E., G. A. Stravodimos, A. L. Kantsadi, D. S. Chatzileontiadou, V. T. Skamnaki and D. D. Leonidas (2015). "Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b." *FEBS Lett* 589(15): 1787-1794.
- [31] Chrysavgi Gardeli, Kalliopi Varela, Eleni Krokida and Athanasios Mallouchos (2019), Investigation of Anthocyanins Stability from Pomegranate Juice (*Punica Granatum* L. Cv Ermioni) under a Simulated Digestion Process, *Medicines* 2019, 6, 90
- [32] Amarchand Chordia Murugan, Md. Rezaul Karim, Mashitah Binti Mohd Yusoff, Suat Hian Tan, Mohd Fazli Bin Farida Asras, and Shah Samiur Rashid (2015), New insights into seaweed polyphenols on glucose homeostasis, Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/13880209.2014.959615



- [33] Sandra Jakobs, Diana Fridrich, Sabine Hofem, Gudrun Pahlke and Gerhard Eisenbrand (2006), Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase, *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 52 – 57
- [34] Favaro, E., Bensaad, K., Chong, M. G., Tennant, D. A., Ferguson, D. J. P., Snell, C., Harris, A. L. (2012), Glucose Utilization via Glycogen Phosphorylase Sustains Proliferation and Prevents Premature Senescence in Cancer Cells, *Cell Metabolism* 16, 751–764
- [35] Haihua Yang and Linghai Yang (2016), Targeting cAMP/PKA pathway for glycemic control and type 2 diabetes therapy, *Journal of Molecular Endocrinology* 57, R93–R108
- [36] Kumar, S., Sinha, K., Sharma, R., Purohit, R., & Padwad, Y. (2019). Phloretin and phloridzin improve insulin sensitivity and enhance glucose uptake by subverting PPAR $\gamma$ /Cdk5 interaction in differentiated adipocytes, *Elsevier, Experimental Cell Research* 383, 111480
- [37] Sandhya V. G. Nair, Ziaullah, H. P. Vasantha Rupasinghe (2014), Fatty Acid Esters of Phloridzin Induce Apoptosis of Human Liver Cancer Cells through Altered Gene Expression, *PLoS ONE* 9(9): e107149.