

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΑ ΜΑΡΙΑ ΝΕΚΤΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2023

**ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ
ΑΣΠΑΡΑΓΟΕΙΔΩΝ**

**STUDY OF BIOACTIVITY IN PLANT EXTRACTS OF
ASPARAGACEAE**

**ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ
ΑΣΠΑΡΑΓΟΕΙΔΩΝ**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΑ ΜΑΡΙΑ ΝΕΚΤΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Σκαμνάκη Βασιλική: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μεταβολισμού,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.**

**Ψαρρά Άννα-Μαρία: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα,
Ελλάδα.**

**Γαρδέλη Χρυσανγή: Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και
Διατροφής του Ανθρώπου, Σχολή Επιστημών Τροφίμων και Διατροφής,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα.**

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 Γλυκόζη- Μεταβολισμός γλυκόζης.....	9
1.1.1 Ομοιόσταση γλυκόζης	9
1.2 Γλυκογόνο	10
1.2.1 Σύνθεση γλυκογόνου.....	11
1.2.2 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	12
1.3 Φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP)	13
1.3.1 Μυϊκή φωσφορυλάση	15
1.3.2 Ηπατική φωσφορυλάση	15
1.3.3 Φωσφορυλάση του εγκεφάλου	16
1.3.4 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	17
1.3.4.1 Καταλυτικό κέντρο	18
1.3.4.2 Κέντρο αναστολής	18
1.3.4.3 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου	19
1.3.4.4 Αλλοστερικό κέντρο.....	19
1.3.4.5 Νέο αλλοστερικό κέντρο.....	19
1.3.4.6 Κέντρο πρόσδεσης της κερσεΐνης.....	20
1.3.4.7 Κέντρο πρόσδεσης του βενζιμιδαζολίου	20
1.4 Σακχαρώδης διαβήτης.....	20
1.4.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I	21
1.4.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II	22
1.5 Ασπαραγοειδή	23
1.5.1 Ανθοκυάνες.....	24
1.5.2 Muscari Comosum.....	26
1.5.3 Bellevalia dubia	26
2. Σκοπός	27
3. Υλικά και μέθοδοι	28
3.1 Οργανολογία.....	28
3.2 Αντιδραστήρια.....	28
3.3 Διαλύματα.....	30
.....	30

3.4	Κινητικές μελέτες	30
3.4.1	Προσδιορισμός της IC50 των αναστολέων	30
3.4.2	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου	33
3.4.3	Ανάλυση κινητικών αποτελεσμάτων.....	33
3.5	Κρυσταλλογραφικές μελέτες	34
3.5.1	Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων	34
3.6	Φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους φωτός (UV-IR).....	35
4.	Αποτελέσματα.....	36
4.1	Αποτελέσματα φασματοφωτομέτρησης.....	36
4.2	Κινητικά αποτελέσματα.....	37
4.2.1	Προσδιορισμός της IC50 των ανθοκυανίνων έναντι της rmGPb	37
4.3	Δομικά αποτελέσματα.....	38
5.	Συζήτηση.....	40
6.	Βιβλιογραφία	41

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια μεταβολική νόσος, κύριο χαρακτηριστικό της οποίας είναι τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι είτε γιατί το σώμα παράγει μειωμένη ινσουλίνη, ή γιατί τα κύτταρα ανταποκρίνονται ελάχιστα στην ινσουλίνη. Το γλυκογόνο αποτελεί την κύρια μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης και η διάσπαση του σε 1-φωσφορική γλυκόζη πραγματοποιείται από το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Για αυτόν τον λόγο η φωσφορυλάση του γλυκογόνου μελετάται ως στόχος ώστε να κατασκευασθούν αντιπεργλυκαιμικά φάρμακα. Υπάρχουν δύο μορφές φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η μία μορφή είναι η φωσφορυλιωμένη ενεργή GP_a και η δεύτερη είναι η μη φωσφορυλιωμένη και επομένως ανενεργή, GP_b. Οι δύο μορφές βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ της ενεργούς και χαλαρής διαμόρφωσης R και της λιγότερο ενεργής κατάστασης T. Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για να χρησιμοποιηθούν φυσικά προϊόντα στην κατασκευή αντιγλυκαιμικών φαρμάκων. Στην παρούσα διπλωματική έγινε μελέτη της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων ασπαραγοειδών. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες ώστε να βρεθεί η IC₅₀ της ένωσης έναντι στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου και μέσω κρυσταλλογραφίας συγγένειας βρέθηκε ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης σε κρυστάλλους της φωσφορυλάσης από μυς κόνικλων. Επίσης έγινε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του εκχυλίσματος των ανθοκυανινών, με σκοπό να προσδιοριστεί η σύσταση του.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease, the main characteristics of which is elevated blood glucose levels. This happens either because the body produces less insulin, or because the cells respond poorly to insulin. Glycogen is the main storage form of glucose and its breakdown into glucose 1-phosphate is carried out by the enzyme glycogen phosphorylase. For this reason, glycogen phosphorylase is being studied as a target to develop antihyperglycemic drugs. Glycogen phosphorylase occurs in two forms. One form is the phosphorylated active, GP_a, and the second is the unphosphorylated and therefore inactive, GP_b. These two forms are in equilibrium between an active and relaxed R conformation and a less active T state. In recent years attempts have been made to produce antiglycemic drugs using natural substances. In this thesis, the bioactivity of asparagus extracts was studied. Kinetic studies were performed to determine the IC₅₀ of the compound against glycogen phosphorylase and the binding mode of the compound to crystals of rabbit muscle phosphorylase was found by affinity crystallography. In addition spectrophotometric assays were performed on the anthocyanins extract to dispose its composition.

1. Εισαγωγή

1.1 Γλυκόζη- Μεταβολισμός γλυκόζης

Η γλυκόζη είναι ένα σάκχαρο με χημικό τύπο $C_6H_{12}O_6$, που αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας. Εισέρχεται στον οργανισμό μέσω δύο οδών. Η πρώτη είναι με την τροφή (άμεσα) και η δεύτερη με την γλυκονεογένεση και την γλυκογονόλυση (έμμεσα). Το σώμα αποθηκεύει την περίσσεια γλυκόζης ως γλυκογόνο, το οποίο απελευθερώνεται σε περιόδους νηστείας.^[5]

Η γλυκολυτική πορεία παρέχει διπλό όφελος στον οργανισμό. Αρχικά παρέχει ενέργεια καθώς από τον μεταβολισμό ενός μορίου γλυκόζης παράγονται δύο μόρια ATP. Ακόμα παράγονται ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση κυτταρικών συστατικών.^[1]

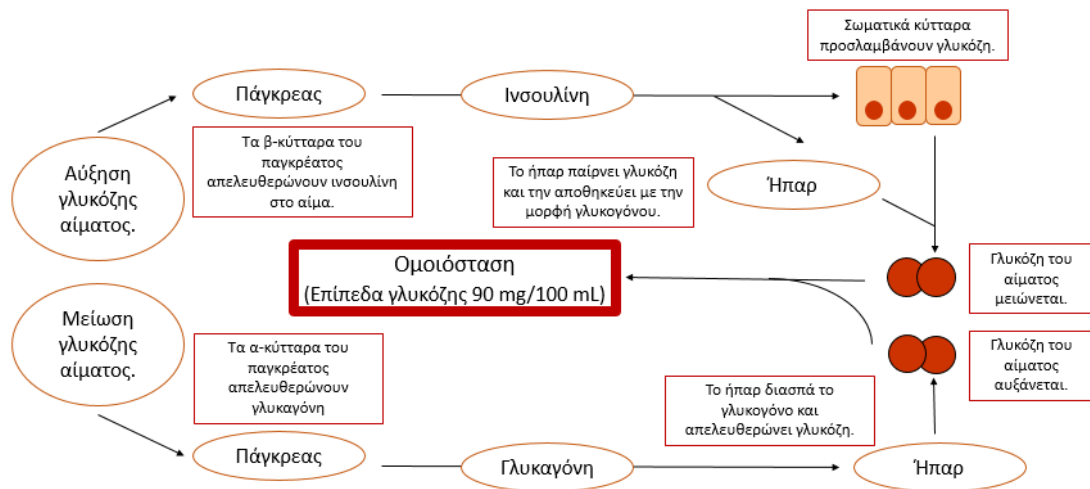
1.1.1 Ομοιόσταση γλυκόζης

Προκειμένου να διατηρηθεί η φυσιολογική λειτουργία του σώματος, τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα πρέπει να παραμένουν σταθερά. Αυτό επιτυγχάνεται με την δράση ορμονών και νευροπεπτιδίων που απελευθερώνονται από το πάγκρεας, το ήπαρ, τον εγκέφαλο, το έντερο, τον λιπώδη και μυϊκό ιστό, με το πάγκρεας να έχει κύριο ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης εκκρίνοντας τις ορμόνες ινσουλίνη και γλυκαγόνη **(Εικόνα 1)**.^[6]

Η ινσουλίνη είναι μία μικρή πολυπεπτιδική ορμόνη που απελευθερώνεται στο αίμα από β-κύτταρα του παγκρέατος. Η δράση της ενεργοποιείται όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα είναι αυξημένη. Πιο συγκεκριμένα η ινσουλίνη απομακρύνει την γλυκόζη από το αίμα και αυτή προσλαμβάνεται από σωματικά κύτταρα ή από το ήπαρ και τους μύς όπου αποθηκεύεται με την μορφή γλυκογόνου για σύνθεση πρωτεϊνών.^[1]

Η γλυκαγόνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται στο αίμα από α-κύτταρα του παγκρέατος αλλά και από κύτταρα του εντέρου. Η έκκριση της ενεργοποιείται, σε αντίθεση με την ινσουλίνη, όταν μειώνονται τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα και έχει αντίθετες δράσεις από την ινσουλίνη. Η γλυκαγόνη προάγει την

διάσπαση γλυκογόνου από το ήπαρ και την παραγωγή γλυκόζης. Έτσι μειώνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης.^[6]

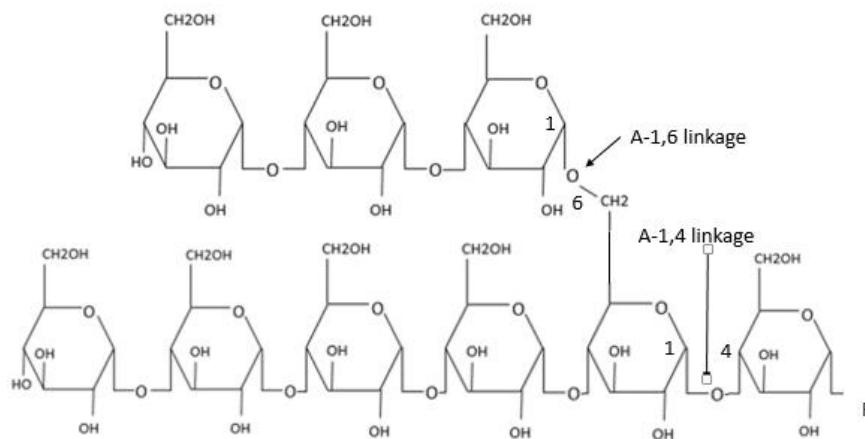


Εικόνα 1: Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη συμμετέχουν με αντίθετες δράσεις στην ομοιόσταση της γλυκόζης (Αναπαραγωγή από Riaz S., 2015).

1.2 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα σύνθετο πολύπλοκο μόριο της γλυκόζης που παρουσιάζει διακλαδώσεις (Εικόνα 2). Χρησιμεύει ως μέσο αποθήκευσης γλυκόζης και βρίσκεται κυρίως στους σκελετικούς μύες και το ήπαρ.^[1] Εντούτοις, παρατηρείται επίσης σε ιστούς, όπως ο νεφρός, η καρδιά, ο λιπώδης ιστός και ο εγκέφαλος, αλλά ο ρόλος του σε αυτούς τους ιστούς είναι ασαφής. Βρίσκεται στον άνθρωπο, καθώς και σε αρχαία και βακτήρια.^[2]

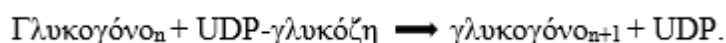
Ο μοριακός τύπος του γλυκογόνου είναι $C_{24}H_{42}O_{21}$ και αποτελείται από συνδεδεμένες μονάδες γλυκόζης. Το γραμμικό τμήμα του μορίου σχηματίζεται από δεσμούς α -1,4 γλυκοζιτικής σύνδεσης μεταξύ των μονάδων γλυκόζης, ενώ στις διακλαδώσεις υπάρχουν δεσμοί α -1,6 γλυκοζιτικής σύνδεσης.^[1] Η αρχική ανακάλυψη του γλυκογόνου του ήπατος έγινε το 1857 από τον Claude Bernard, και ακολούθησαν πολλές έρευνες κατά την διάρκεια πολλών ετών για την κατανόησή του.^[3]



Εικόνα 2: Η δομή του γλυκογόνου (Αναπαραγωγή από Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012)

1.2.1 Σύνθεση γλυκογόνου

Το γλυκογόνο συντίθεται σύμφωνα με την αντίδραση:



Η UDP-γλυκόζη είναι μια ενεργοποιημένη μορφή γλυκόζης που λειτουργεί ως πηγή γλυκόζης κατά την σύνθεση του γλυκογόνου. Παράγεται μέσω μιας αντίδρασης όπου η 1-φωσφορική γλυκόζη συνδέεται με το UTP (νουκλεοτίδιο τριφωσφορική ουριδίνη) στο οποίο συμμετέχει το ένζυμο πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης.^[1]

Ένα σημαντικό ένζυμο που συμμετέχει στην σύνθεση του γλυκογόνου είναι η συνθάση του γλυκογόνου. Αυτό το ένζυμο διευκολύνει την μεταφορά γλυκόζης από την UDP-γλυκόζη στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα του γλυκογόνου. Συγκεκριμένα, η γλυκόζη μεταφέρεται και σχηματίζει δεσμό με την C-4 υδροξυλομάδα του τελικού κατάλοιπου στην αλυσίδα του γλυκογόνου, σχηματίζοντας έναν α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό.^[1]

Επειδή το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές, χρειάζονται περισσότερα ένζυμα για να δημιουργηθούν οι διακλαδώσεις. Αυτό το ένζυμο, ονομάζεται ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου και σχηματίζει τους α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το ένζυμο αυτό διασπά έναν α-1,4 δεσμό και μετακινεί έναν ολιγοσακχαρίτη με 7 ή περισσότερα κατάλοιπα σε νέα θέση εντός του μορίου γλυκογόνου, σχηματίζοντας έναν νέο α-1,6 δεσμό.^[1]

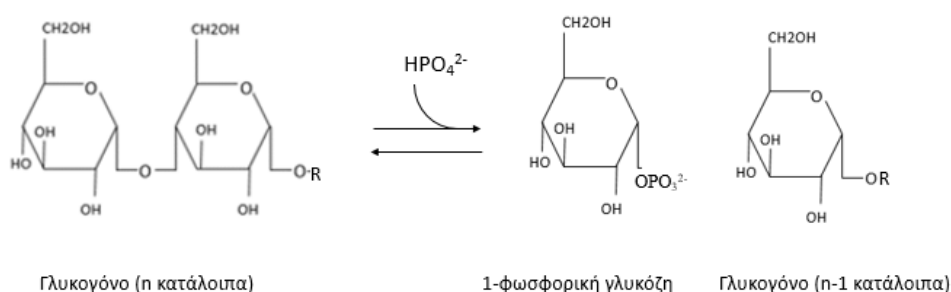
Για να προσθέσει νέα κατάλοιπα γλυκόζης, η συνθάση του γλυκογόνου απαιτεί την παρουσία της γλυκογονίνης. Η γλυκογονίνη λειτουργεί ως εκκινητής και καταλύει τον σχηματισμό των πολυμερών γλυκόζης, τα οποία στην συνέχεια επεκτείνονται από την συνθάση του γλυκογόνου.^[4]

1.2.2 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου γίνεται με σκοπό να παράγει μόρια γλυκόζης όταν υπάρχει ανάγκη για ενέργεια.^[1] Πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και στα λυσοσώματα και απαιτεί την συνεργασία διαφόρων ενζύμων.^[4]

Το κύριο ένζυμο στην διάσπαση του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Αυτό το ένζυμο αποσπά τα μόρια της γλυκόζης από τους α-1,4 δεσμούς στα μη αναγωγικά άκρα του γλυκογόνου. Ωστόσο, η φωσφορυλάση δεν έχει την ικανότητα να διασπάσει τους α-1,6 δεσμούς στις διακλαδώσεις. Όταν η φωσφορυλάση φθάσει σε ένα σημείο 4 καταλοίπων πριν την διακλάδωση, παύει να διασπάει τους α-1,4 δεσμούς. Αντ' αυτού, δύο νέα ένζυμα αναλαμβάνουν την εκτέλεση των επόμενων βημάτων. Το ένα ένζυμο είναι η μεταφοράση, η οποία μεταφέρει τρία κατάλοιπα γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη. Ως αποτέλεσμα, παραμένει μόνο ένα κατάλοιπο γλυκόζης το οποίο έχει α-1,6 δεσμό.^[1]

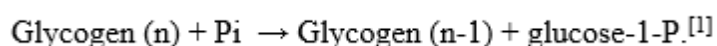
Στην συνέχεια, το ένζυμο αποδιακλάδωσης υδρολύει τον α-1,6 δεσμό, απελευθερώνοντας ένα μόριο γλυκόζης. Με αυτόν τον τρόπο, επιτρέπεται στη φωσφορυλάση να συνεχίσει την διάσπαση του μορίου, το οποίο πλέον είναι γραμμικό **(Εικόνα 3)**.^[4]



Εικόνα 3: Αποικοδόμηση του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη και γλυκογόνο (n-1 κατάλοιπα) (Αναπαραγωγή από Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012)

1.3 Φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι το βασικό ένζυμο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου που αποικοδομεί το γλυκογόνο σύμφωνα με την αντιστρεπτή αντίδραση:

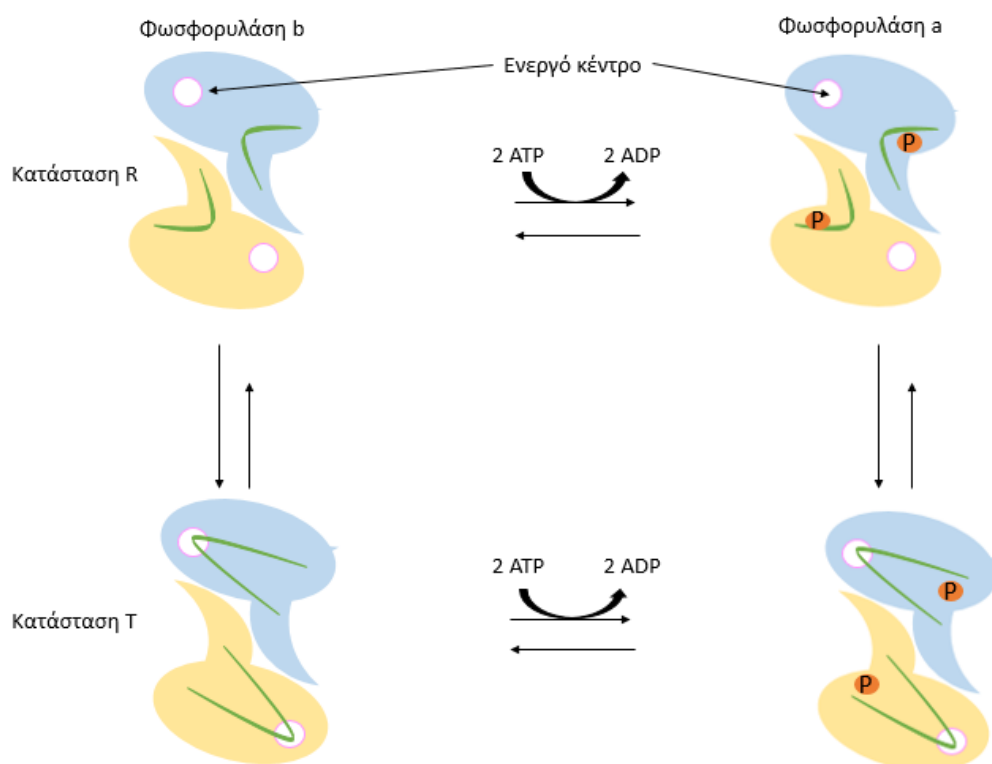


Η GP διασπάει τους α-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς του γλυκογόνου και μέσω της προσθήκης φωσφορικού αποδίδεται 1-φωσφορική γλυκόζη. Η αντίδραση αυτή in vitro είναι ευνοϊκή καθώς σε pH 6.8 ο λόγος της 1-φωσφορικής γλυκόζης προς το ορθοφωσφορικό είναι 0.28. Ωστόσο στο εσωτερικό του κυττάρου η αντίδραση γίνεται προς την κατεύθυνση της διάσπασης του γλυκογόνου καθώς η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης.^[7]

Στον ανθρώπινο οργανισμό, υπάρχουν τρία διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν τρεις διαφορετικές ισομορφές της φωσφορυλάσης. Αυτές οι ισομορφές είναι η ηπατική φωσφορυλάση που προέρχεται από το γονίδιο PYGL, η μυϊκή φωσφορυλάση που προέρχεται από το γονίδιο PYGM, και η φωσφορυλάση του εγκεφάλου που προέρχεται από το γονίδιο PYGB.^[1] Αν και οι τρεις ισομορφές έχουν 80% ομοιότητα περίπου στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, υπάρχει μεγάλη ομοιότητα, περίπου 97%, ανάμεσα στην αμινοξική αλληλουχία της μυϊκής φωσφορυλάσης από κόνικλους και της ηπατικής φωσφορυλάσης στον άνθρωπο.^[8] Η ενεργοποίηση όλων των τριών ισομορφών μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης της Ser14 από την κινάση της φωσφορυλάσης (PhK), είτε μέσω αλλοστερικής ρύθμισης με την δέσμευση ρυθμιστών.^[4]

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου παρουσιάζεται σε δύο μορφές με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Η πρώτη μορφή είναι φωσφορυλιωμένη και ενεργή, γνωστή ως GP_a, και η δεύτερη μορφή δεν είναι φωσφορυλιωμένη και άρα είναι ανενεργή, γνωστή ως GP_b. Αυτές οι δύο μορφές βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ δύο

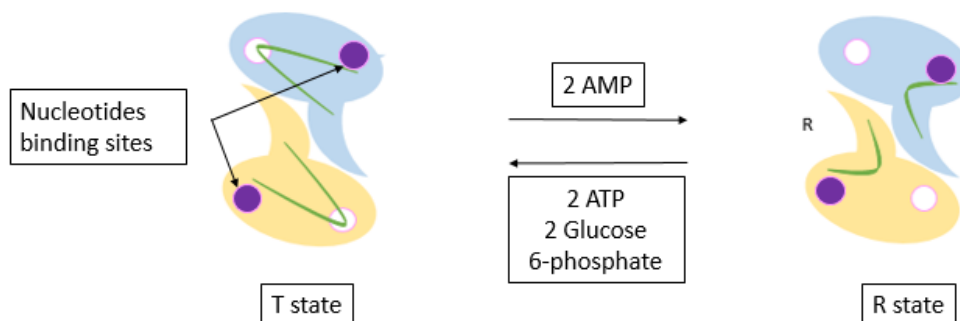
διαμορφώσεων, η μία είναι ενεργή και χαλαρή διαμόρφωση που αναφέρεται ως R, και η άλλη πρόκειται για μία λιγότερο ενεργό κατάσταση που αναφέρεται ως T.^[1] Οι δύο αυτές μορφές διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Αρχικά, η διαμόρφωση R έχει αυξημένη συγγένεια για αλλοστερικούς τελεστές όπως είναι το AMP και υποστρώματα, ενώ η διαμόρφωση T έχει μειωμένη συγγένεια για το P_i και το γλυκογόνο. Επιπλέον, η διαμόρφωση R ευνοείται από την ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μέσω φωσφορυλίωσης ή της σύνδεσης αλλοστερικών ενεργοποιητών. Αντίθετα, η μετάβαση από την διαμόρφωση R στην διαμόρφωση T ευνοείται από την αποφωσφορυλίωση ή την πρόσδεση αλλοστερικών αναστολέων, όπως το ATP.^[4] Κατά την μετάβαση από την διαμόρφωση T στην διαμόρφωση R, το ένζυμο υφίσταται σημαντικές αλλαγές στην τριτοταγή δομή του (**Εικόνα 4**). Στην διαμόρφωση T, ο εύκαμπτος βρόγχος 280s κλείνει την είσοδο στην καταλυτική θέση, εμποδίζοντας το υπόστρωμα να προσδεθεί, ενώ στην διαμόρφωση R, ο βρόγχος μετακινείται και ανοίγει την είσοδο στην καταλυτική θέση.^[1]



Εικόνα 4: Η μετατροπή της φωσφορυλάσης a σε b και αντίστροφα και η μετατροπή από την διαμόρφωση R στην T (Αναπαραγωγή από Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012) .

1.3.1 Μυϊκή φωσφορυλάση

Η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ένζυμο με κύριο ρόλο να παρέχει γλυκόζη στους μύες όταν απαιτείται ενέργεια. Αυτή η φωσφορυλάση εμφανίζεται σε δύο μορφές, την GP_a και την GP_b. Η μορφή a είναι συνήθως ενεργή, ενώ η μορφή b είναι συνήθως ανενεργή. Σε κατάσταση ηρεμίας, η μορφή που επικρατεί είναι η b, ενώ κατά την διάρκεια άθλησης ενεργοποιείται και μετατρέπεται στην μορφή a. Επίσης, βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργούς και χαλαρής κατάστασης που ονομάζεται R, η οποία ευνοείται στην φωσφορυλάση a και μιας τεταμένης κατάστασης που ονομάζεται T και ευνοείται στην φωσφορυλάση b. Η μορφή της φωσφορυλάσης που ευνοείται εξαρτάται από το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου. Η GP_b ενεργοποιείται όταν παρουσιάζεται AMP, το οποίο σταθεροποιεί την μορφή R. Αντίθετα, όταν παρουσιάζεται ATP, η φωσφορυλάση b σταθεροποιείται στην μορφή T, καθώς το ATP είναι αρνητικός αλλοστερικός τελεστής και ανταγωνίζεται το AMP. Η GP_b παραμένει ανενεργή εξαιτίας της ύπαρξης της 6-φωσφορικής γλυκόζης και του ATP (Εικόνα 5). Αντίθετα, η GP_a είναι ενεργή και δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη του ATP, της 6-φωσφορικής γλυκόζης και του ATP.^[1]

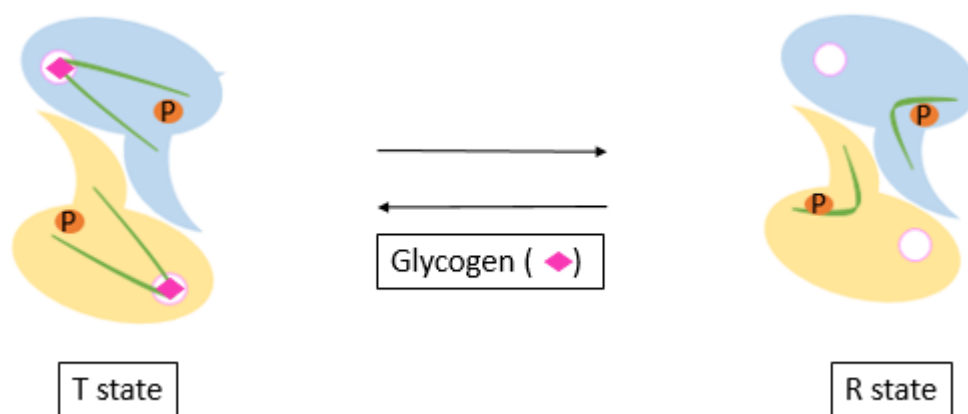


Εικόνα 5: Αλληλομετατροπή της R διαμόρφωσης σε T παρουσία ATP ή 6-φωσφορικής γλυκόζης και AMP αντίστοιχα (Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012).

1.3.2 Ηπατική φωσφορυλάση

Η ηπατική φωσφορυλάση εμφανίζει περίπου 90% ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων με την μυϊκή φωσφορυλάση. Ωστόσο, υπάρχουν και σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Μόνο η φωσφορυλιωμένη μορφή της ηπατικής φωσφορυλάσης (GP_a) είναι καταλυτικά ενεργή, ενώ η μετατροπή μεταξύ της GP_a (φωσφορυλιωμένη)

και της GPb (μη φωσφορυλιωμένη) εξαρτάται από την κινάση της φωσφορυλάσης και την φωσφατάση της φωσφορυλάσης (**Εικόνα 6**). Η GPa είναι σχεδόν παρόμοια με την διαμόρφωση T της GPb, συμπεραίνοντας ότι η φωσφορυλίωση δεν επηρεάζει την ανενεργή κατάσταση της ηπατικής φωσφορυλάσης. Παρόλο που και οι ισομορφές του ήπατος και των μυών συνδέονται με το AMP στην αλλοστερική θέση, η ηπατική ισομορφή έχει λιγότερες αλληλεπιδράσεις με το AMP σε σχέση με την μυϊκή ισομορφή. Μια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ισομορφών είναι ότι το AMP ενεργοποιεί σε μικρό βαθμό την GPb στην ηπατική φωσφορυλάση. Αυτό σημαίνει ότι η ηπατική φωσφορυλάση έχει χαμηλότερη συγγένεια με το AMP σε σχέση με την μυϊκή φωσφορυλάση.^[4]



Εικόνα 6: Μετάπτωση της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από την R στην T διαμόρφωση παρουσία γλυκογόνου (Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012)..

1.3.3 Φωσφορυλάση του εγκεφάλου

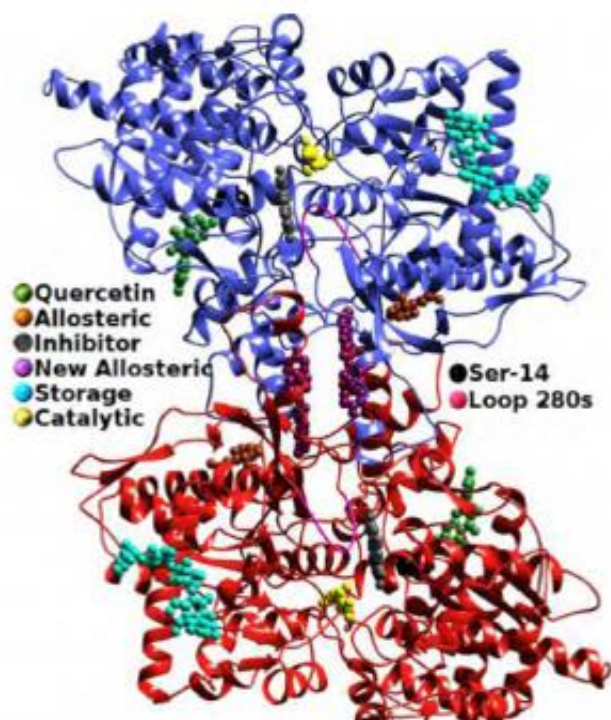
Η φωσφορυλάση του εγκεφάλου είναι η ισόμορφη που είναι λιγότερο μελετημένη. Η κύρια λειτουργία της στον εγκέφαλο είναι η παροχή γλυκόζης στο ίδιο το κύτταρο. Συναντάται σε μεγαλύτερο βαθμό στα αστροκύτταρα, τα οποία έχουν το μεγαλύτερο απόθεμα γλυκογόνου του εγκεφάλου, και πιο σπάνια υπάρχει στους νευρώνες. Στους νευρώνες εκφράζεται μόνο η μορφή του εγκεφάλου, ενώ στα αστροκύτταρα εκφράζονται και οι μυϊκές ισομορφές. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στον εγκέφαλο ρυθμίζεται κυρίως από αλλοστερικούς τελεστές, όπως το AMP. Είναι ενδιαφέρον ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ AMP και Tyr196 είναι μοναδική στην εγκεφαλική ισομορφή του GP καθώς αυτό το αμινοξύ υποκαθίσταται από Phe

στην μυϊκή και ηπατική μορφή. Επίσης η φωσφορυλάση του εγκεφάλου εκφράζεται στην καρδιά, υποδηλώνοντας ότι είναι σημαντικό για την καρδιακή λειτουργία.^[9]

1.3.4 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελείται από δύο υπομονάδες που είναι όμοιες μεταξύ τους. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από 842 κατάλοιπα και χωρίζεται σε δύο περιοχές: την αμινοτελική που έχει 484 κατάλοιπα και την καρβοξυτελική με 358 κατάλοιπα. Οι ρυθμιστικές περιοχές του ενζύμου βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές. Πιο συγκεκριμένα, το αλλοστερικό κέντρο και η θέση της Ser14 εντοπίζονται στην αμινοτελική περιοχή. Αυτές οι περιοχές είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο της ενεργότητας του ενζύμου. Επιπλέον, η θέση πρόσδεσης του συμπαραγόνα φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή. Έχουν βρεθεί επτά κέντρα στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου:

- I. Το καταλυτικό κέντρο
- II. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου
- III. Το κέντρο αναστολής
- IV. Το αλλοστερικό κέντρο
- V. Το νέο αλλοστερικό κέντρο
- VI. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσεΐνης
- VII. Το κέντρο πρόσδεσης του βενζιμιδαζολίου (**Εικόνα 7**).^[10]



Εικόνα 7: Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στην οποία φαίνονται τα κέντρα που έχουν βρεθεί.^[32]

1.3.4.1 Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο εντοπίζεται στο κέντρο της υπομονάδας της φωσφορυλάσης. Μόλις οι αναστολές δεσμευτούν στην καταλυτική θέση σταθεροποιείται η κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s, και εξαιτίας αυτού το υπόστρωμα δεν μπορεί να εισέλθει στην θέση, σταθεροποιώντας την ανενεργή διαμόρφωση T κατάστασης. Στο καταλυτικό κέντρο προσδένονται οι περισσότεροι αναστολές της φωσφορυλάσης, οι οποίοι είναι ανάλογα γλυκόζης.^[10]

1.3.4.2 Κέντρο αναστολής

Το κέντρο πρόσδεσης του αναστολέα, που είναι γνωστό και ως κέντρο δέσμευσης της καφεΐνης εντοπίζεται στην αρχή του καταλυτικού κέντρου. Οι ενώσεις προσδένονται σε αυτή την θέση μέσω της αλληλεπίδρασης με τις αρωματικές πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Phe 285 και Tyr 613. Ο πρώτος αναστολέας που βρέθηκε ότι προσδένεται σε αυτή την θέση είναι η καφεΐνη. Όταν ο αναστολέας

προσδένεται στο κέντρο, η T διαμόρφωση σταθεροποιείται και η είσοδος του καταλυτικού κέντρου φράζεται, και το ένζυμο αναστέλλεται.^[10]

1.3.4.3 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου εντοπίζεται στην επιφάνεια του μορίου του ενζύμου σε απόσταση περίπου 30 Å από την καταλυτική θέση. Αποτελείται από έναν βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλους κλώνους και δύο έλικες. Οι αναστολείς που προσδένονται σε αυτό το κέντρο είναι η μαλτοεπταόζη, η ακαρβόζη και η μαλτοπεντόζη. Αυτοί μέσω δεσμών υδρογόνου συνδέονται με τα αμινοξέα Ser 429, Asn 407, και Lys 473 και μέσω αλληλεπιδράσεων μορίων νερού με τα αμινοξέα Gln 401, Arg 426, Gln433 και Val 431.^[10]

1.3.4.4 Αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο περιέχει δομικά στοιχεία που προέρχονται και από τις δύο υπομονάδες του διμερούς που βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα αποτελείται από 2 α-έλικες και 4 β-κλώνους. Γνωστοί αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου είναι: AMP, IMP, ATP, NADH, G-6-P, UDP-γλυκόζη, με την G-6-P να είναι ο πιο σημαντικός αναστολέας. Η αναστολή γίνεται είτε μέσω ανταγωνισμού με το AMP είτε μέσω σταθεροποίησης της ανενεργής T διαμόρφωσης του ενζύμου.^[10]

1.3.4.5 Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο είναι μέσα στην κεντρική κοιλότητα του διμερούς και σε αποστάσεις 33 Å από το καταλυτικό κέντρο, 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Αποτελείται από 18 αμινοξέα τα οποία διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό στις 3 ισομορφές της φωσφορυλάσης τόσο του ανθρώπου όσο και των κονίκλων. Οι αναστολείς προκαλούν αναστολή σταθεροποιώντας την T διαμόρφωση του ενζύμου και εμφανίζουν συνέργεια με άλλους αναστολείς όπως η γλυκόζη.^[10]

1.3.4.6 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Η κερσετίνη βρέθηκε να δεσμεύεται σε μια νέα θέση, η οποία είναι 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 15 Å από το καταλυτικό κέντρο, και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο αυτό έχει σχήμα ρηχής αύλακας, που σχηματίζεται από τα αμινοξέα Arg 551, Lys 544, Lys 655 και Tyr 548 στην μία πλευρά και Glu123 και Glu120 στην άλλη. Όταν η κερσετίνη δεσμεύεται στη θέση δέσμευσης στην φωσφορυλάση σχηματίζονται αλληλεπιδράσεις van der Waals και δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα Arg 551 και Lys 544. Η δέσμευση της κερσετίνης σε αυτή την θέση ευνοεί την λιγότερο ενεργή T-κατάσταση καθώς σταθεροποιεί την T κατάσταση του βρόγχου.^[10]

1.3.4.7 Κέντρο πρόσδεσης του βενζιμιδαζολίου

Το κέντρο πρόσδεσης του βενζιμιδαζολίου βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου και είναι περίπου 31 Å από το καταλυτικό κέντρο και 32 Å από το αλλοστερικό κέντρο.^[11]

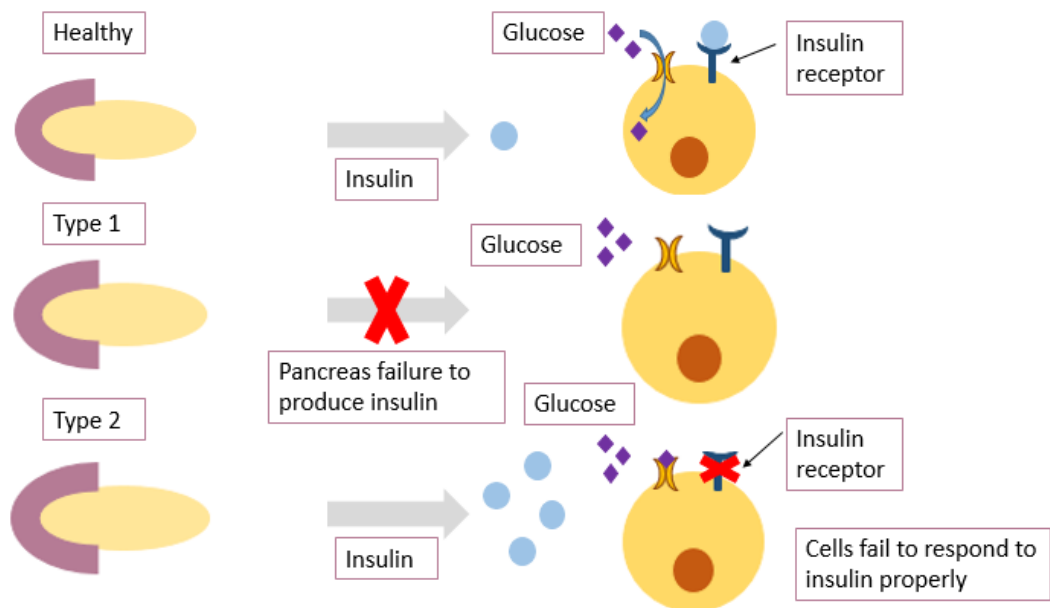
1.4 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο όρος «διαβήτης» χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τον Απόλλωνα από την Μέμφιδα της Αιγύπτου γύρω στο 250 με 300 π.Χ. Οι αρχαίοι ελληνικός, ινδικός και αιγυπτιακός πολιτισμός παρατήρησαν ότι τα ούρα των ασθενών έχουν γλυκιά οσμή και για αυτό ονομάστηκε Σακχαρώδης Διαβήτης. Το 1889 οι Mering και Minkowski, μίλησαν για τον ρόλο του παγκρέατος στην παθογένεση του διαβήτη. Αργότερα οι Banting, Best και Collip ανακάλυψαν την δυνατότητα θεραπείας με ινσουλίνη.^[12]

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια μεταβολική νόσος, στην οποία η γλυκόζη του αίματος παρουσιάζει τιμές μεγαλύτερες του φυσιολογικού. Οι κύριοι υπότυποι του είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔ1) και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2). Η παθογένεση για τον ΣΔ1 και τον ΣΔ2 είναι διαφορετική και επομένως κάθε τύπος έχει διαφορετικές αιτιολογίες και θεραπείες (**Εικόνα 8**).^[12]

Ακόμη είναι ένα από τα πιο συχνά εμφανιζόμενα νοσήματα. Είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα με υγειονομικές, κοινωνικές και οικονομικές συνέπειες. Το 2010

το 6,4% του ενήλικου πληθυσμού έπασχαν από αυτή την ασθένεια και ο αριθμός αυτός θα αυξηθεί εξαιτίας της γήρανσης και της παχυσαρκίας.^[13]

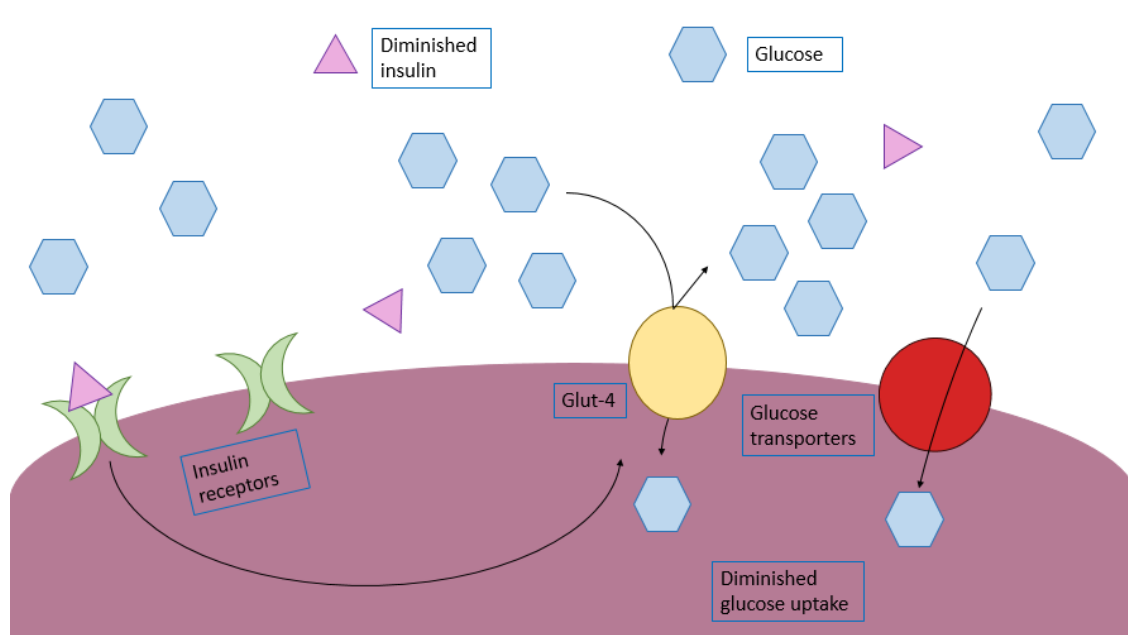


Εικόνα 8: Οι δύο κύριοι υπότυποι του σακχαρώδη διαβήτη (Αναπαραγωγή από Mulyani, D.E. et. al 2023).

1.4.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔ1) είναι μια αυτοάνοση νόσος στην οποία τα βήτα-κύτταρα του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη καταστρέφονται (**Εικόνα 9**). Τα συμπτώματα της νόσου είναι διαφορετικά ανάλογα με την ηλικία και για αυτό απαιτείται εξατομικευμένη προσέγγιση για κάθε ασθενή. Η αποτελεσματική διαχείριση του ΣΔ1 περιλαμβάνει την καθημερινή χορήγηση πολλαπλών ενέσεων ινσουλίνης, την θεραπεία με χρήση αντλίας ινσουλίνης ή την χρήση αυτοματοποιημένου συστήματος χορήγησης ινσουλίνης, καθώς και την συνεχή παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης.^[14]

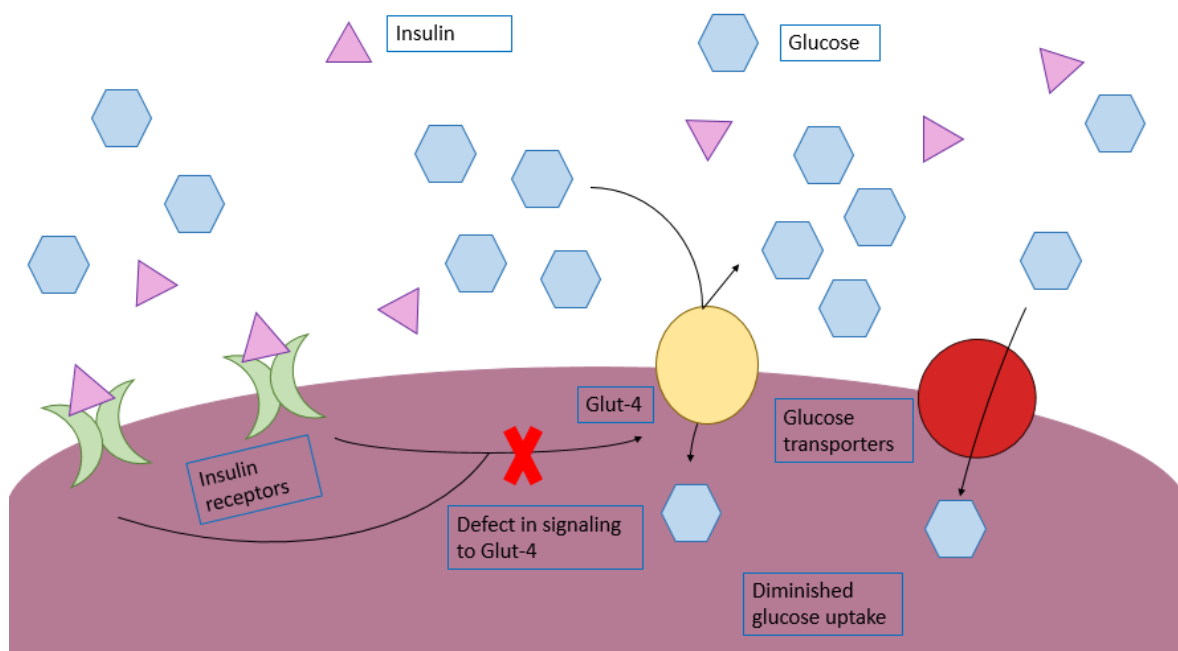
Παρόλο που η αιτία που προκαλεί τον ΣΔ1 είναι ακόμα άγνωστη, πιστεύεται ότι προκαλείται και από γενετικούς παράγοντες. Ωστόσο, περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το στρες και η διατροφή επίσης επηρεάζουν την εμφάνισή του.^[14]



Εικόνα 9: Παθοφυσιολογία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (Αναπαραγωγή από Arneith B et. al. 2019).

1.4.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2) είναι μια από τις συνηθέστερες διαταραχές παγκοσμίως. Χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης από τα βήτα-κύτταρα του παγκρέατος και αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη. Προκαλείται από δύο παράγοντες. Ο πρώτος είναι η ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος και ο δεύτερος η αδυναμία των ιστών να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη (**Εικόνα 10**). Ο ΣΔ2 προκαλείται από έναν συνδυασμό γενετικών, μεταβολικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους. Η πρόοδος της νόσου οδηγεί σε μη ικανοποιητική έκκριση ινσουλίνης και αδυναμία της γλυκόζης να διατηρηθεί σε φυσιολογικά επίπεδα, με αποτέλεσμα την υπεργλυκαιμία.^[16] Όσοι πάσχουν από ΣΔ2 εμφανίζουν παχυσαρκία ή έχουν μεγάλο ποσοστό σωματικού λίπους, συγκεντρωμένο κυρίως στην κοιλιακή περιοχή.^[15]



Εικόνα 10: Παθοφυσιολογία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (Αναπαραγωγή από Arneith B et. al. 2019)

1.5 Ασπαραγοειδή

Τα Ασπαραγοειδή ή Asparagaceae είναι μία ευρέως διαδεδομένη οικογένεια από γυμνόσπερμα φυτά που ανήκουν στην τάξη Ασπαραγώδη (Asparagales). Παλαιότερα κατατάσσονταν στην οικογένεια των Liliaceae, αλλά στα σύγχρονα συστήματα ταξινόμησης, αναγνωρίζεται ως ξεχωριστή οικογένεια. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει περίπου 114 γένη και περισσότερα από 2.900 είδη που συναντιούνται σε διάφορα μέρη του κόσμου, κυρίως σε περιοχές με θερμό κλίμα, όπως η Νότια Αφρική, η Μεσογειακή περιοχή και η Κεντρική Αμερική. Υπάρχουν σε διάφορους οικοτόπους, όπως δάση, λιβάδια, έρημοι και παράκτιες περιοχές.^[17]

Τα ασπαραγοειδή παρουσιάζουν διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Μπορεί να είναι ποώδη ή ξυλώδη και τα φύλλα τους μπορεί να είναι στενά ή πλατιά, απλά ή σύνθετα. Τα άνθη τους είναι συνήθως αμφιφυλόφιλα και έχουν έξι τέπαλα (αδιαφοροποίητα πέταλα και σέπαλα), τα οποία μπορεί να είναι χρωματιστά ή δυσδιάκριτα ανάλογα με το είδος.^[17]

Τα ασπαραγοειδή περιλαμβάνουν μεγάλη ποικιλία φυτών όπως χόρτα, θάμνους ακόμα και δένδρα. Έχουν σημαντική οικονομική σημασία και καλλιεργούνται για διάφορους λόγους, όπως η διακόσμηση των κήπων, η παραγωγή τροφής και η

θεραπευτική χρήση. Ακόμα συμβάλλουν στην οικολογία μέσω της παροχής τροφής για ζώα και της συμβολής στον κύκλο των θρεπτικών ουσιών στο έδαφος. Ορισμένα είδη είναι επίσης σημαντικά για την διατήρηση της βιοποικιλότητας και ως φυτικοί βιότοποι για πολλά άλλα είδη. Ωστόσο υπάρχουν ορισμένα είδη που περιέχουν τοξικές ουσίες. Για παράδειγμα, οι σανσεβιέριες (*Sansevieria*) και οι κάρδαμοι (*Convallaria*) περιέχουν γλυκοσίδες που μπορεί να είναι επιβλαβείς για τα ζώα και τους ανθρώπους αν καταναλωθούν σε μεγάλες ποσότητες.^[17]

Μερικά από τα πιο διάσημα γένη της οικογένειας είναι:

1. *Asparagus*: Οι βλαστοί τους χρησιμοποιούνται ως λαχανικά.
2. *Yucca*: Χρησιμοποιούνται συχνά σε ξηρότερα περιβάλλοντα και είναι δημοφιλή για την εξωτερική διακόσμηση κήπων και αυλών.^[18]
3. *Bellevalia*: Περιλαμβάνει περίπου 65 φυτά. Το κύριο μορφολογικό χαρακτηριστικό που το διαφοροποιεί από άλλα παρόμοια γένη είναι το σχήμα των νηματίων. Ένα από αυτά είναι το *Bellevalia dubia*. Αυτό υπάρχει κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου.^[31]
4. *Muscari*: περιλαμβάνει 60 είδη που εντοπίζονται στην Ευρώπη και την Ασία. Στην Ελλάδα υπάρχουν 14 από αυτά. Το πιο κοινό φυτό αυτής της οικογένειας είναι το *Muscari Comosum*.^[18]

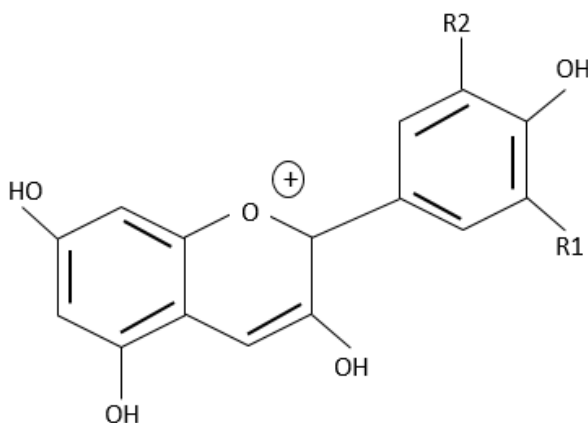
1.5.1 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι φυσικές χρωστικές ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Εντοπίζονται σε πολλά είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων πολλών λουλουδιών. Είναι χαρακτηριστικές των οικογενειών των Αστεροειδών (*Asteraceae*), των Γερανειδών (*Geraniaceae*), των Συριγγιδωνειδών (*Solanaceae*), και πολλών άλλων. Αποτελούνται από έναν βασικό χρωμοφόρο, γνωστό ως ανθοκυανιδίνη, που συνδυάζεται με σάκχαρα για να δημιουργήσει τις χρωστικές ουσίες (**Εικόνα 11**). Οι παραλλαγές στην χημική δομή και σύνθεση των ανθοκυανίνων οδηγούν σε διαφορετικές αποχρώσεις, όπως μπλε, μοβ, ή κόκκινο.^[19]

Προσδίδουν χρώμα και προστασία στα φυτά, ενώ ενδεχομένως παρέχουν οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Προστατεύουν τα φυτά από εξωτερικούς παράγοντες, όπως την υπεριώδη ακτινοβολία και τις επιθέσεις από ζιζάνια. Έχουν επίσης οφέλη για την υγεία του ανθρώπου, καθώς έχουν αναφερθεί για τις

αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε ανθοκυάνες έχει οφέλη για την υγεία, καθώς μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων και υποστηρίζει την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.^[20]

Ορισμένα τρόφιμα που περιέχουν ανθοκυάνες είναι τα μούρα, τα μύρτιλα, οι φράουλες, τα βατόμουρα, οι κόκκινες σταφίδες, το κόκκινο κρασί και το μωβ σταφύλι. Λόγω της εντυπωσιακής τους απόχρωσης, οι ανθοκυάνες χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών για την προσθήκη φυσικού χρώματος. Επίσης οι ανθοκυάνες είναι ευαίσθητες στην οξείδωση από το φως, την θερμότητα και το pH. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια χρώματος και αποδοτικότητας.^[21]



Εικόνα 11: Βασική δομή των ανθοκυανινών (Αναπαραγωγή από Araki, R, et. al. 2021).

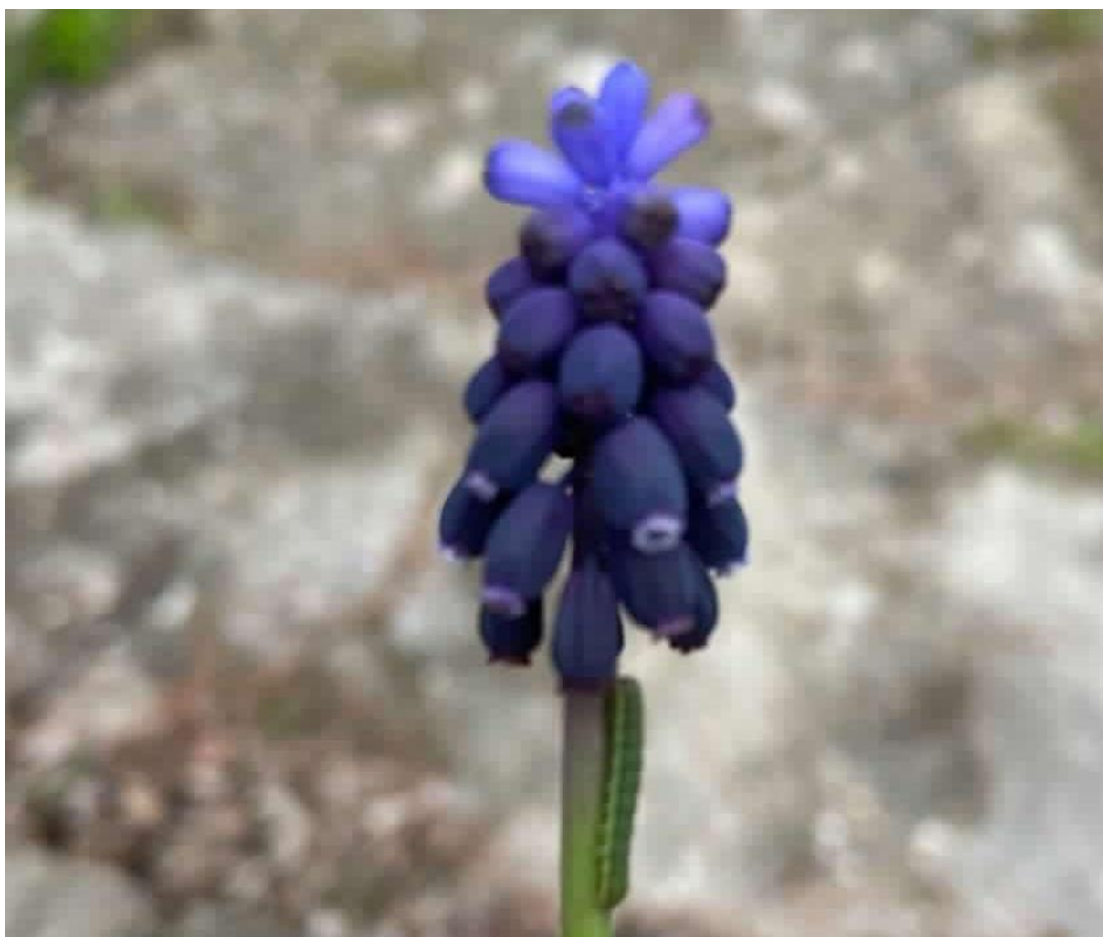
Πίνακας 1: Οι πιο κοινές ανθοκυανιδίνες

Όνόματα ανθοκυανιδίνων	R1	R2
Πελαργονιδίνη	H	H
Κυανιδίνη	OH	H
Δελφινιδίνη	OH	OH
Πεονιδίνη	OCH ₃	H
Πετιουνιδίνη	OCH ₃	OH
Μαλβιδίνη	OCH ₃	OCH ₃

1.5.2 Muscari Comosum

Το *Muscari comosum* είναι ένα φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Ασπαραγοειδών (*Asparagaceae*) (**Εικόνα 12**). Έχει μικρά, κυλινδρικά άνθη που σχηματίζουν μια πυκνή κεφαλή. Τα άνθη είναι συνήθως μπλε, αλλά μπορεί να είναι και λευκά, ροζ ή μωβ. Είναι κατανομημένο σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης και της Μεσογείου και συχνά συναντάται σε θερμές και ξηρές περιοχές, όπως λιβάδια, λόφους και πλαγιές. Ανθίζει κατά την άνοιξη, συνήθως από Απρίλιο έως Μάιο.^[22]

Έχει μεγάλη ποικιλία θρεπτικών συστατικών, όπως άμυλο (8%), νιτρικά άλατα (1000 ppm) και απλά σάκχαρα όπως σακχαρόζη (0,5%), φρουκτόζη (0,3%), γλυκόζη (0,07%) και αραβινόζη (0,04%). Περιέχει επίσης άφθονα μεταλλικά στοιχεία, όπως κάλιο, φώσφορο, ασβέστιο, σίδηρο, χαλκό, μαγγάνιο και μαγνήσιο.^[22]



Εικόνα 22: *Muscari Comosum* από την οικογένεια των Ασπαραγοειδών.

1.5.3 Bellevalia dubia

Το *Bellevalia dubia* είναι ένα είδος ανθοφόρου φυτού της οικογένειας *Asparagaceae*. Εντοπίζεται σε διάφορα μέρη της ανατολικής Μεσογείου, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας, της Τουρκίας και της Μέσης Ανατολής. Συνήθως συναντάται σε βραχώδεις πλαγιές, λιβάδια και ανοιχτά δάση. Η περίοδος ανθοφορίας του είναι η άνοιξη, συνήθως από τον Απρίλιο έως τον Μάιο.^[23]

Είναι ένα βολβώδες φυτό, του οποίου τα φύλλα του είναι στενά και γραμμικά. Τα άνθη είναι σε σχήμα καμπάνας και είναι συνήθως μπλε ή βιολετί, αν και μπορούν να βρεθούν και λευκές ή ροζ ποικιλίες. Οι ρίζες του *Bellevalia dubia* είναι φλοιώδεις και αναπτύσσονται κάτω από το έδαφος. Αυτές οι ρίζες βοηθούν το φυτό να εξάγει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από το έδαφος.^[23]

Απαιτεί ηλιοφάνεια ή ημισκιά και μπορεί να καλλιεργηθεί σε κήπους και περιβάλλοντα φυσικής βλάστησης, προσφέροντας ένα θεαματικό θέαμα με τα μοναδικά της άνθη.^[23]

2. Σκοπός

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία ανήκει στο πλαίσιο ενός ερευνητικού προγράμματος που πραγματοποιείται στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η έρευνα ασχολείται με τα ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του γλυκογόνου, με έμφαση στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Εξετάζονται διάφορες ενώσεις που μπορούν να συνδεθούν με τα ένζυμα αυτά και να επηρεάσουν την λειτουργία τους. Ο στόχος είναι η ανάπτυξη νέων φαρμάκων που μπορούν να ρυθμίζουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στην ανάλυση της επίδρασης εκχυλίσματος ανθοκυανινών, το οποίο προήλθε από το εργαστήριο της κ. Γαρδέλη Χρυσανγής από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο κύριο ένζυμο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου, την φωσφορυλάση του γλυκογόνου καθώς προηγούμενες μελέτες είχαν υποδείξει ότι αυτές οι ενώσεις έχουν ανασταλτική δράση στο ένζυμο. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ανασταλτική δράση του εκχυλίσματος στην μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου που απομονώθηκε από μυς κονίκλων (rmGPb). Εκτελέστηκαν κινητικές μελέτες για τον υπολογισμό της IC50 έναντι στην rmGPb. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλογραφικές μελέτες με την χρήση

κρυσταλλογραφίας ακτίνων X για τον προσδιορισμό του τρόπου και του κέντρου πρόσδεσης του αναστολέα στην mGPb. Τέλος έγινε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του εκχυλίσματος των ανθοκυανίνων.

Τα ευρήματα που παρουσιάζονται στο τέλος της διπλωματικής εργασίας αποτελούν μια σημαντική αφετηρία για περαιτέρω μελέτη της αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθοκυανίνες. Αυτή η έρευνα μπορεί να ανοίξει τον δρόμο για τον σχεδιασμό νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων που προέρχονται από φυσικές πηγές. Έτσι, η παρούσα εργασία ανοίγει νέες προοπτικές για την ανάπτυξη θεραπειών κατά του σακχαρώδη διαβήτη, βασιζόμενες σε φυσικές ενώσεις, που θα μπορούν να προσφέρουν αποτελεσματικότερες και πιο ασφαλείς εναλλακτικές για τους ασθενείς.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Οργανολογία

Πίνακας 2: Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

<u>Όργανο</u>	<u>Εταιρία</u>
Ζυγός ακριβείας	KERN
Πεχάμετρο	Metrohm
Υδατόλουτρο	Wisd
Φωτόμετρο	VWR
Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-VIS)	VWR
Plate φασματοφωτόμετρου	Sigma

3.2 Αντιδραστήρια

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια

<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Εταιρία</u>
Εκχύλισμα ανθοκυανινών	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Potassium Chloride (KCl)	Merck

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Imidazole	Sigma
β-Μερκαπτοαιθανόλη	Sigma
β-GP	Sigma
L-Ascorbic acid	Sigma
Ammonium Molybdate tetrahydrate	Sigma
Zinc acetate	Sigma
α-D-glucose-1-phosphate	Sigma
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Glycogen	Sigma
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Serva
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
BES	Sigma

3.3 Διαλύματα

Πίνακας 4: Διαλύματα

<u>Διαλύματα</u>	<u>Συστατικά</u>
Ρυθμιστικό διάλυμα 1 (AB1)	KCl 400mM, DTT 4mM, EDTA 4mM, imidazole 200mM pH: 6.8
Ρυθμιστικό διάλυμα 2 (AB2)	KCl 270mM, DTT 2,7mM, EDTA 2,7mM, imidazole 135mM pH: 6.8
Ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1	β-μερκαπτοαιθανόλη 50 mM, β-GP 50 mM, EDTA 1 mM pH: 6.8
Διάλυμα ασκορβικού οξέος	Ασκορβικό οξύ 10% (w/v). pH: 5.0
Διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου – οξικού ψευδαργύρου	Μολυβδαινικό αμμώνιο 15mM, οξικός ψευδάργυρος 100mM pH: 5.0
Διάλυμα κρυσταλλοστατευτικό	BES 10 mM, DMSO 30 % (v/v) pH 6.7
Διάλυμα κρυστάλλωσης	BES 10 mM, DMSO 30 % (v/v) Ανθοκυάνες 5 mg/ml pH 6.7

3.4 Κινητικές μελέτες

3.4.1 Προσδιορισμός της IC50 των αναστολέων

IC50 ορίζεται η συγκέντρωση του αναστολέα που απαιτείται για να μειωθεί η δραστηριότητα του ενζύμου κατά 50%.^[24] Μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος από το φυτό *Bellevalia dubia*, που περιείχε ανθοκυανίνες στο ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (gmGPb).

Για τον προσδιορισμό της IC50 μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος έναντι της φωσφορυλάσης με συγκέντρωση 1 μg/ml σε συγκεντρώσεις αναστολέα 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.15 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml και σταθερή συγκέντρωση G1P (2 mM).

Παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα αναστολέα από το διάλυμα αναστολέα με συγκέντρωση 16.2 mg/ml

Πίνακας 5: Διαλύματα αναστολέα

Συγκέντρωση αναστολέα	Αναστολέας 16.2 mg/ml (μL)	DMSO 100% (v/v) (μL)
0.05 mg/ml	3.08	16.91
0.1 mg/ml	6.17	13.83
0.15 mg/ml	9.26	10.74
0.2 mg/ml	12.35	7.65
0.3 mg/ml		

Παρασκευάστηκε διάλυμα G1P 90 mM και διάλυμα G1P 9 mM, τα οποία περιείχαν:

- G1P (90 mM) ➔ 225 μL G1P (400 mM), 675 μL Assay Buffer 1, 100 vL απιονισμένο νερό.
- G1P (9 mM) ➔ 100 μL G1P (90 mM), 900 μL Assay Buffer 2.

Επίσης παρασκευάστηκε ενζυμικό διάλυμα όγκου 400 μL το οποίο περιείχε:

- 7.25 μL rmGPb, ώστε η τελική συγκέντρωση να ισούται με 1 μg/ml
- 40 μL γλυκογόνο, ώστε η τελική συγκέντρωση να ισούται με 1% (w/v)
- 20 μL ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1
- 332.75 μL dH2O

Προετοιμάζονται τα διαλύματα των υποστρωμάτων C, A, B, Γ, Δ, E, Z όγκου 144 μL τα οποία περιέχουν:

Πίνακας 6: Διαλύματα υποστρωμάτων

Δείγμα	Περιεχόμενο
C	40 μl G1P, 7.2 μl AMP, 93.2 μl dH2O, 3,6 μl DMSO 100% (v/v)
A	40 μl G1P, 7.2 μl AMP, 93.2 μl dH2O, 3,6 μl αναστολέας συγκέντρωσης 0.05 mg/ml
B	40 μl G1P, 7.2 μl AMP, 93.2 μl dH2O, 3,6 μl αναστολέας συγκέντρωσης 0.1 mg/ml
Γ	40 μl G1P, 7.2 μl AMP, 93.2 μl dH2O, 3,6 μl αναστολέας συγκέντρωσης 0.15 mg/ml
Δ	40 μl G1P, 7.2 μl AMP, 93.2 μl dH2O, 3,6 μl αναστολέας συγκέντρωσης 0.2 mg/ml
E	40 μl G1P, 7.2 μl AMP, 93.2 μl dH2O, 3,6 μl αναστολέας συγκέντρωσης 0.3 mg/ml

Προετοιμάζονται ταυτόχρονα τα erpendorfs A1-E4. Το κάθε erpendorf περιέχει 10 μl SDS, ώστε η τελική συγκέντρωση να ισούται με 1% (w/v).

Το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 30°C για 15 λεπτά και 3 λεπτά πριν ολοκληρωθεί τοποθετούνται στο υδατόλουτρο τα διαλύματα υποστρώματος. Όταν τελειώσει ο χρόνος επώασης προστίθενται 36 μl ενζυμικού υποστρώματος στο υπόστρωμα C και αυτός ο χρόνος ορίζεται ως ο χρόνος t=0. Μετά από 30 δευτερόλεπτα προστίθενται 36 μl από το ενζυμικό διάλυμα στο διάλυμα υποστρώματος A και ακολουθείται αυτή η διαδικασία για όλα τα διαλύματα υποστρώματος. Έτσι κάθε διάλυμα υποστρώματος έχει πλέον τελικό όγκο 180 μl και περιέχει rmGPb 1 mg/ml, G1P 2 mM, AMP 1 mM και την αντίστοιχη συγκέντρωση του αναστολέα.

Στην συνέχεια λαμβάνονται 40 μl από κάθε διάλυμα υποστρώματος και τοποθετούνται στα σωληνάκια A1-E4 σε χρόνους 3, 6, 9, 12 λεπτά. Στα 3 λεπτά, δηλαδή τοποθετούνται 40 μl από το διάλυμα υποστρώματος C στο erpendorf C1. Μετά από 30 δευτερόλεπτα τοποθετούνται 40 μl από το διάλυμα υποστρώματος A στο A1 και ακολουθείται η ίδια διαδικασία μέχρι το erpendorf E1. Αφού προστεθούν τα 40 μl στα 10 μl SDS ακολουθεί vortex ώστε να σταματήσει η αντίδραση.

Παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα φωτομέτρησης:

- Διάλυμα ασκορβικού οξέος με pH 5.0.
- Διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου και οξικού ψευδαργύρου με pH 5.0.

Τα διαλύματα αυτά αναμιγνύονται με αναλογία 4:1 (μολυβδαινικό αμμώνιο/οξικός ψευδάργυρος: ασκορβικό οξύ) και τοποθετούνται στο σκοτάδι όπου όπου παραμένει για 15 λεπτά. Ακολούθως παρασκευάζονται τα εξής τυφλά διαλύματα (2 από κάθε κατηγορία):

Τυφλό διάλυμα	Περιεχόμενο
H ₂ O	10 μl SDS 1% (w/v), 40 μl H ₂ O
Ενζύμου	10 μl SDS 1% (w/v), 32 μl H ₂ O, 8 μl ενζυμικού διαλύματος
G1P	10 μl SDS 1% (w/v), 31.3 μl H ₂ O, 8,9 μl G1P (9 mM)
Φωσφορικών ιόντων	10 μl SDS 1% (w/v), 30 μl H ₂ O, 10 μl Pi (1 mM)

Πίνακας 7: Τυφλά διαλύματα

Όταν τελειώσει ο χρόνος επώασης τοποθετούνται 700 µl στις σταματημένες αντιδράσεις και στα τυφλά διαλύματα. Αφού επωαστούν στους 30 °C φωτομετρούνται στα 850 nm.

3.4.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

Μέσω αυτής της μεθόδου υπολογίζονται κινητικές παράμετροι, μέσω μίας χρωμοφόρου ένωσης. Κατά την σύνθεση του γλυκογόνου παράγονται φωσφορικά ιόντα (Pi) μέσω της δράσης της φωσφορυλάσης. Τα ιόντα αυτά συμπλοκοποιούνται μέσω διαλύματος ασκορβικού οξέος και παράγεται χρωμοφόρο σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 850 nm

3.4.3 Ανάλυση κινητικών αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις κινητικές μελέτες και η δημιουργία των πειραμάτων γίνεται με το πρόγραμμα GraFit, ένα εργαλείο οπτικοποίησης και ανάλυσης δεδομένων.^[25] Ο υπολογισμός της IC50 έγινε εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση. Η IC50 υπολογίζεται από τον τύπο

$$y = (100\%) / (1 + (x / IC50)^s)$$

όπου s είναι ο συντελεστής κλίσης της ευθείας ^[25]

Από τα δεδομένα υπολογίζονται ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου απουσία και παρουσία αναστολέα, οι οποίες χρησιμοποιούνται για να υπολογιστεί η επί τοις εκατό αναστολή βάσει της εξίσωσης:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{\text{ειδική δραστηριότητα απουσία αναστολέα} - \text{ειδική δραστηριότητα παρουσία αναστολέα}}{\text{ειδική δραστηριότητα απουσία αναστολέα}}$$

Η % ειδική δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ειδική δραστηριότητα} = 100\% - \% \text{αναστολή}$$

Στην συνέχεια η επί τοις εκατό αναστολή μετατρέπεται σε επί τοις εκατό δραστηριότητα και εισάγονται στο GRAFIT. Ο υπολογισμός της IC50 γίνεται από το διάγραμμα %αναστολή=f([αναστολέα]).

Ο συντελεστής f υπολογίζεται από τον τύπο:

$$f = \text{limit} / \text{όγκος διαλύματος} \times c$$

όπου c είναι η συγκέντρωση του ενζύμου και το **limit** είναι το επί τοις εκατό ποσοστό της GIP που καταναλώθηκε ώστε να παραχθούν ορθοφωσφορικά ιόντα όταν γτάσει σε ισορροπία η αντίδραση. Ο τύπος για το limit είναι:

$$\text{limit} = 0,78 \times [\text{GIP}] \times \text{όγκος αντίδρασης}$$

3.5 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

Στις κρυσταλλογραφικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν κρύσταλλοι της μυϊκής φωσφορυλάσης κονίκλων (rmGPb). Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έγιναν με σκοπό να βρεθεί πως προσδένεται η βιοδραστική ένωση του εκχυλίσματος στο ένζυμο. Στους κρυστάλλους προστέθηκε το δείγμα των ανθοκυανίνων, ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο ενζύμου-ανστολέα. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκε τα εξής διαλύματα:

- Διάλυμα κρυστάλλωσης: BES 10 mM, DMSO 30 % (v/v), Ανθοκυάνες 2.7 mg/mL σε pH 6.7
- Κρυοπροστατευτικό διάλυμα: BES 10 mM, DMSO 30 % (v/v) σε pH 6.7

Στην συνέχεια τα διαλύματα τοποθετούνται σε plate κρυστάλλωσης. Στην μεγάλη δεξαμενή τοποθετείται το κρυοπροστατευτικό διάλυμα και στην μικρή δεξαμενή τοποθετείται το διάλυμα κρυστάλλωσης και στην συνέχεια οι κρύσταλλοι rmGPb. Μετά από αυτό το plate σφραγίζεται και τοποθετείται στους 16°C για 18 ώρες.

3.5.1 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η συλλογή των αποτελεσμάτων έγινε σε εγκαταστάσεις στο Αμβούργο. Η επεξεργασία για την κατασκευή των χαρτών έγινε με τα προγράμματα XDS, Aimless,

Refmac5 και Coot.^[26] Τα προβλήματα που είχε ο χάρτης διορθώθηκαν με την βοήθεια του προγράμματος Refmac5 του CCP4.^[26]

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μελέτες με το πρόγραμμα Phenix, ώστε να βρεθεί ποια είναι η δραστική ένωση του εκχυλίσματος που αλληλοεπιδρά με την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Το Phenix είναι ένα σύστημα λογισμικού που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δομής των μακρομορίων. Περιέχει πολλά εργαλεία για κατασκευή μοντέλων δομής. Αυτό που χρησιμοποιήθηκε είναι το Ligand Fitting, το οποίο προσαρμόζει την δομή των προσδεμάτων στην πυκνότητα των ηλεκτρονίων που υπάρχει στον χάρτη. Με αυτόν τον τρόπο χωράει ένα γνωστό πρόσδεμα σε έναν χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Οι ανθοκυανίνες, οι οποίες εξετάστηκαν είναι η πετιουνιδίνη, η δελφινιφίνη, η κυανιδίνη, η μαλβιδίνη και η πεονιδίνη. Αυτές επιλέχθηκαν γιατί είχε προηγηθεί ανάλυση, που έδειξε ότι αυτές είναι πιο πιθανό να υπάρχουν στο εκχύλισμα.^[28]

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία με το ligand fitting, το πρόγραμμα δείχνει για κάθε ανθοκυανίνη πόσα άτομα τοποθετήθηκαν στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του χάρτη και έναν παράγοντα, ο οποίος ονομάζεται Overall CC (correlation coefficient) ή Map Correlation. Το Overall CC πρέπει να είναι 0.75 ή μεγαλύτερο όταν ταιριάζει ο προσδέτης στην πυκνότητα ενώ υπάρχει πρόβλημα με την ταύτιση του προσδέτη με την πυκνότητα όταν είναι μικρότερο από 0.5. Ακόμη όταν δεν τοποθετούνται όλα τα άτομα του προσδέτη στον χάρτη σημαίνει ότι δεν υπάρχει πυκνότητα για αυτά τα άτομα του.^[29]

3.6 Φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους φωτός (UV-IR)

Η φασματοφωτομετρία βασίζεται στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Πιο συγκεκριμένα η ακτινοβολία διέρχεται από ένα διάλυμα και η ουσία του διαλύματος απορροφά μέρος της ακτινοβολίας και αυτή εξέρχεται με χαμηλότερη ένταση.^[27]

Για την κατασκευή του φάσματος μετρήθηκε η απορρόφηση στο δείγμα των ανθοκυανινών. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- **Δείγμα control**, περιείχε DMSO 1% (v/v)
- **Δείγμα ανθοκυανινών**, περιείχε ανθοκυανίνες σε συγκέντρωση 1.62 mg/ml

Τα δείγματα αυτά τοποθετούνται σε plate και εισέρχονται στο φασματοφωτόμετρο, ώστε να πραγματοποιηθεί η μέτρηση. Το αποτέλεσμα που λαμβάνουμε από ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis είναι ένα διάγραμμα το οποίο δείχνει την απορρόφηση της ουσίας σε σχέση με το μήκος κύματος λ και οι απορροφήσεις των 3 δειγμάτων σε μήκη κύματος από 230-800 nm.

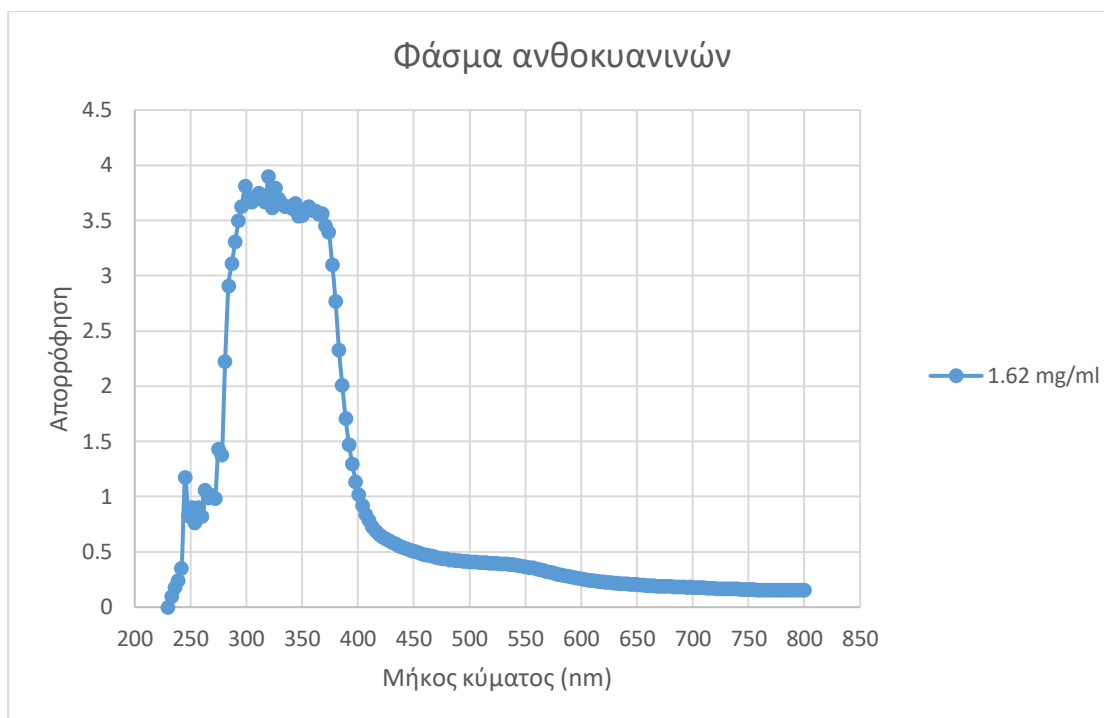
Στην συνέχεια έγινε η επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν. Πιο συγκεκριμένα αφαιρέθηκε από κάθε τιμή απορρόφησης του δείγματος η αντίστοιχη τιμή απορρόφησης του DMSO και κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα της απορρόφησης σε σχέση με το μήκος κύματος.

4. Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα φασματοφωτομέτρησης

Το φάσμα που προέκυψε από την διαδικασία που προαναφέρθηκε φαίνεται παρακάτω (**Εικόνα 13**). Η μεγαλύτερη απορρόφηση για το δείγμα 1 (1.62 mg/ml) είναι 3.896 και εντοπίζεται σε απορρόφηση 320 nm.

Στην καμπύλη υπάρχει κορυφή στα 260-280 nm, η οποία χαρακτηρίζει τις ανθοκυανίνες. Ακόμη όταν το σάκχαρο των ανθοκυανινών είναι ακυλιωμένο παρατηρείται μία κορυφή ακόμα στα 310-340 nm. Στο φάσμα του εκχυλίσματος δεν παρατηρείται κάποια κορυφή σε αυτό το σημείο. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι δεν πρόκειται για ακυλιωμένη ανθοκυανίνη.^[30] Ακόμα αξίζει να σημειωθεί ότι η ουσία που προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά δεν πρόκειται για καθαρή ένωση αλλά για εκχύλισμα. Αυτό ενδεχομένως επηρεάζει την απορρόφηση καθώς μπορεί να υπάρχουν και άλλες ενώσεις εκτός από τις ανθοκυανίνες.

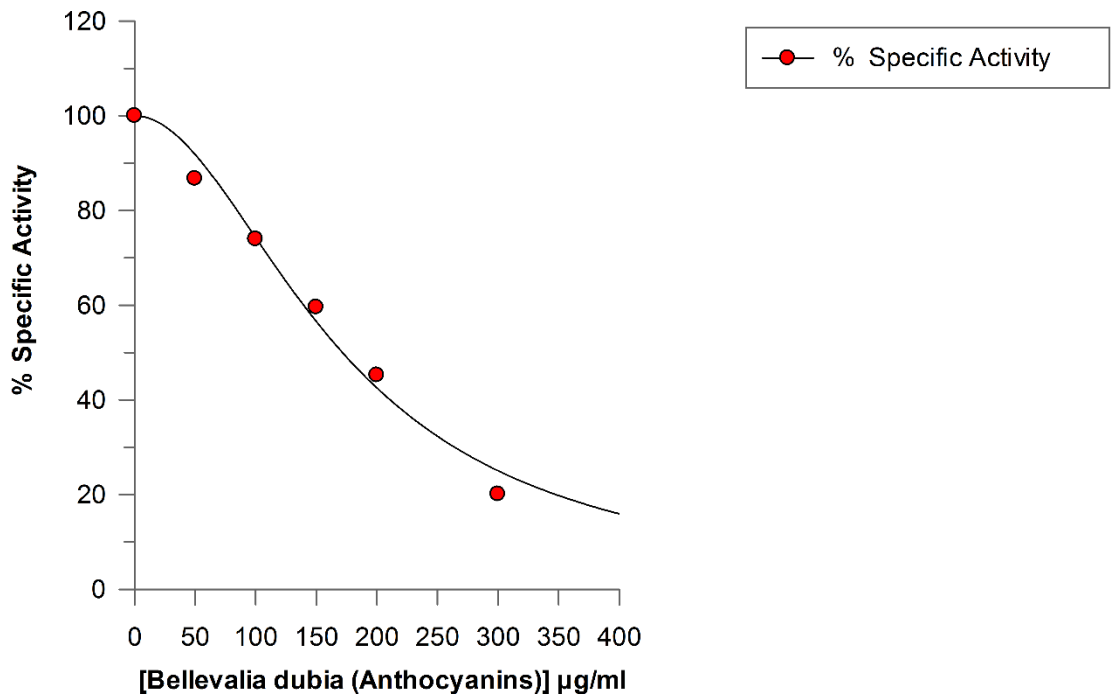


Εικόνα 33: Διάγραμμα απεικόνισης φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού για το εκχύλισμα των ανθοκυανινών. Το δείγμα έχει συγκέντρωση 1.62 mg/ml. Απεικονίζεται στο άξονα χ'χ το μήκος κύματος σε nm και στον άξονα y'y η απορρόφηση του δείγματος.

4.2 Κινητικά αποτελέσματα

4.2.1 Προσδιορισμός της IC50 των ανθοκυανινών έναντι της rmGPb

Η IC50 του δείγματος των ανθοκυανινών υπολογίστηκε με την βοήθεια του προγράμματος GraFit. Η τιμή της υπολογίστηκε ότι είναι 0.1716 ± 0.0082 mg/ml (Εικόνα 14). Από αυτό γίνεται κατανοητό ότι το εκχύλισμα των ανθοκυανινών, είναι ικανό να προκαλέσει αναστολή του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου (rmGPb).

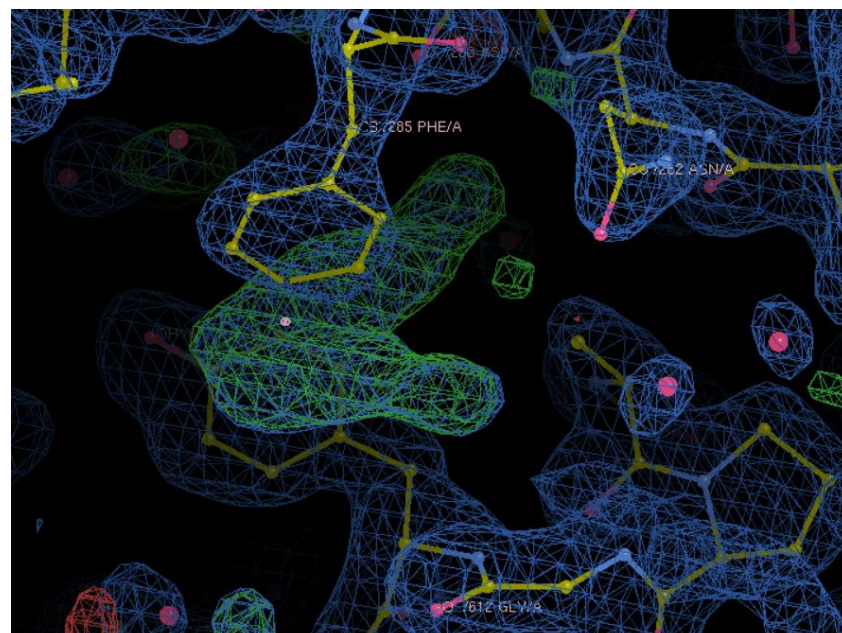


Εικόνα 14: Διάγραμμα για τον προσδιορισμό της IC50 του εκχυλίσματος των ανθοκυανινών. Στον άξονα χ'χ υπάρχει η συγκέντρωση του εκχυλίσματος των ανθοκυανινών που προέρχεται από το φυτό *Bellevalia dubia* σε µg/ml και στον άξονα γ'γ υπάρχει η % ειδική δραστηριότητα του ενζύμου.

4.3 Δομικά αποτελέσματα

Ύστερα από την ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και την κατασκευή των χαρτών με τον τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως, βρέθηκε ότι η ένωση των ανθοκυανινών προσδένεται στο κέντρο αναστολής (κέντρο πρόσδεσης της καφεΐνης) (Εικόνα 15).

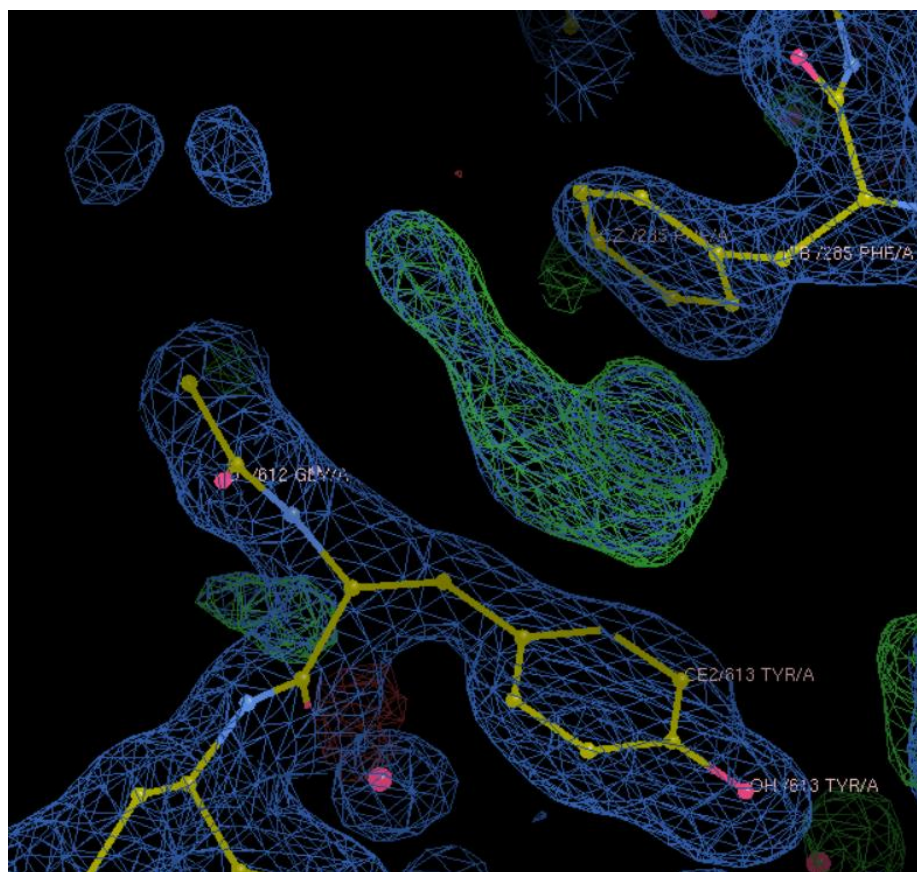
Εικόνα 45: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας όπου φαίνεται η πρόσδεση της ένωσης στο κέντρο της αναστολής στον ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.



Στην συνέχεια εξετάστηκαν με το πρόγραμμα Phenix οι 5 ανθοκυανίνες (Εικόνα 16) και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 8: Αποτελέσματα από το πρόγραμμα Phenix. Φαίνονται οι ανθοκυανίνες που εξετάστηκαν, το Overall CC και τα άτομα της ένωσης που τοποθετήθηκαν στον χάρτη

Ένωση	Overall CC	Άτομα που τοποθετήθηκαν στον χάρτη
Πετιουνιδίνη	0.553	23/36
Δελφινιδίνη	0.529	22/34
Κυανιδίνη	0.501	21/32
Μαλβιδίνη	0.569	24/39
Πεονιδίνη	0.529	22/35



Εικόνα 56: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας στον οποίο φαίνεται η πρόσδεση της ένωσης στο κέντρο αναστολής της φωσφορύλασης του γλυκογόνου. Φαίνονται τα αμινοξέα του κέντρου αναστολής Phe 285 και Tyr 613.

Από αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι για καμία ένωση το Overall CC δεν είναι μεγαλύτερο από 0.75 και σε καμία ένωση δεν τοποθετήθηκαν όλα τα άτομα στον

χάρτη. Το μεγαλύτερο Overall CC έχει η μαλβιδίνη, ωστόσο δεν μπορούν να βγουν συμπεράσματα με αυτόν τον τρόπο σχετικά με το ποια ανθοκυανίνη υπάρχει στο εκχύλισμα.

5. Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η πιθανή ανασταλτική επίδραση του εκχυλίσματος ανθοκυανινών από το φυτό *Bellevalia dubia* έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κουνέλια, η δομική βάση της αναστολής με κρυσταλλογραφικές μελέτες και έγινε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών έδειξαν σημαντική αναστολή της φωσφορυλάσης, ενώ η τιμή της IC50 υπολογίστηκε σε 0.1716 ± 0.0082 mg/mL. Ακόμα, μέσω των δομικών μελετών προσδιορίστηκε το κέντρο πρόσδεσης της βιοδραστικής ένωσης του εκχυλίσματος των ανθοκυανινών που είναι το κέντρο αναστολής του ενζύμου (ή όπως είναι γνωστό κέντρο πρόσδεσης της καφεΐνης). Στην συνέχεια έγινε προσπάθεια να βρεθεί η ένωση που προσδένεται στο κέντρο αναστολής. Μέσω του προγράμματος Phenix εξετάστηκαν οι πιο πιθανές ανθοκυανίνες, των οποίων η δομή παρουσιάζει ομοιότητες με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του χαρτί για να βρεθεί ποια είναι η βιοδραστική ένωση που αλληλοεπιδρά με την φωσφορυλάση. Καμία από τις 5 ενώσεις που εξετάστηκαν δεν τηρούσε τις προϋποθέσεις που ορίζει το πρόγραμμα και για αυτό τον λόγο καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι καμία από αυτές τις ενώσεις δεν αποτελεί την δραστική ένωση του εκχυλίσματος.

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω πειράματα προκύπτει, ότι το εκχύλισμα των ανθοκυανινών προκαλεί ανασταλτική δράση ως προς την φωσφορυλάση του γλυκογόνου, παρόλο που από τις δομικές και τις υπολογιστικές μελέτες δεν βρέθηκε η ακριβής δραστική ένωση που ευθύνεται. Σαν μελλοντικός στόχος ορίζεται η εύρεση της βιοδραστικής ένωσης που προκαλεί την αναστολή στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου και επομένως η δυνητική χρησιμοποίηση της για την ανάπτυξη αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων.

6. Βιβλιογραφία

- [1] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. “Biochemistry.” 7th ed. New York: W.H. Freeman;2012.
- [2] Adeva – Andany MM, González – Lucán M, Donapetry – García C, Fernández – Fernández C, Ameneiros – Rodríguez E (2016) “Glycogen metabolism in humans.” *BBA Clin.*; 5:85-100.
- [3] 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
- [4] Agius L (2015) “Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism.” *Mol Aspects Med.*; 46:34-45
- [5] Hantzidiamantis PJ, Lappin SL. Physiology, Glucose. 2022 Sep 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 31424785.
- [6] Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med.* 2016 Mar 11;48(3):e219.
- [7] Livanova NB, Chebotareva NA, Eronina TB, Kurganov BI (2002) “Pyridoxal 5'-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase B.” *Biochemistry (Mosc.)*; 67(10):1089-1098.
- [8] Leonidas DD, Zographos SE, Tsitsanou KE, Skamnaki VT, Stravodimos G, Kyriakis E (2021) “Glycogen phosphorylase revisited: extending the resolution of the R- and T-state structures of the free enzyme and in complex with allosteric activators.” *Acta Cryst.*; F77:303-311.
- [9] Mathieu C, Dupret JM, Rodrigues Lima F. The structure of brain glycogen phosphorylase—from allosteric regulation mechanisms to clinical perspectives. *FEBS J.* 2017 Feb;284(4):546-554.
- [10] Hayes, J.M., Kantsadi, A.L. & Leonidas, D.D. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochem Rev* **13**, 471–498 (2014).
- [11] Chrysina ED, Kosmopoulou MN, Tiraidis C, Kardakaris R, Bischler N, Leonidas DD, Hadady Z, Somsak L, Docsa T, Gergely P, Oikonomakos NG. Kinetic and crystallographic studies on 2-(beta-D-glucopyranosyl)-5-methyl-1, 3, 4-oxadiazole, -benzothiazole, and -benzimidazole, inhibitors of muscle glycogen phosphorylase b. Evidence for a new binding site. *Protein Sci.* 2005 Apr;14(4):873-88.

- [12] Sapra A, Bhandari P. Diabetes. 2023 May 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 31855345.
- [13] Kaul, K., Tarr, J.M., Ahmad, S.I., Kohner, E.M., Chibber, R. (2013). Introduction to Diabetes Mellitus. In: Ahmad, S.I. (eds) Diabetes. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 771. Springer, New York, NY.
- [14] Lucier J, Weinstock RS. Type 1 Diabetes. 2023 Mar 3. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 29939535.
- [15] American Diabetes Association. (2021). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care*, 44(Supplement 1), S15-S33. doi: 10.2337/dc21-S003.
- [16] DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J.,... Zinman, B. (2015). Type 2 Diabetes Mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15019. doi: 10.1038/nrdp.2015.19.
- [17] Chao CT, Tzeng HY, Tseng YH. Leaf epidermal morphology of Asparagaceae of Taiwan and its systematic significance. *Microsc Res Tech*. 2022 Jun;85(6):2162-2180.
- [18] Petruzzello, Melissa. "list of plants in the family Asparagaceae". *Encyclopedia Britannica*, 26 Aug. 2021
- [19] Drakou CE, Gardeli C, Tsiatas I, Alexopoulos S, Mallouchos A, Koulas SM, Tsagkarakou AS, Asimakopoulos D, Leonidas DD, Psarra AG, Skamnaki VT. Affinity Crystallography Reveals Binding of Pomegranate Juice Anthocyanins at the Inhibitor Site of Glycogen Phosphorylase: The Contribution of a Sugar Moiety to Potency and Its Implications to the Binding Mode. *J Agric Food Chem*. 2020 Sep 16;68(37):10191-10199.
- [20] Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res*. 2017 Aug 13;61(1):1361779.
- [21] Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Jan;56(1):159-70.
- [22] Giglio F, Castiglione Morelli MA, Matera I, Sinisgalli C, Rossano R, Ostuni A. *Muscari comosum* L. Bulb Extracts Modulate Oxidative Stress and Redox Signaling in HepG2 Cells. *Molecules*. 2021 Jan 14;26(2):416.
- [23] *Bellevalia dubia*. http://www.cretanflora.com/bellevalia_dubia.html

- [24] Aykul S, Martinez-Hackert E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Anal Biochem.* 2016 Sep 1;508:97-103.
- [25] Leatherbarrow RJ. "GraFit version 4.06." Erithacus Software Ltd Staines 1998.
- [26] Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AG, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011 Apr;67(Pt 4):235-42.
- [27] Εργαστηριακές Ασκήσεις Ενόργανης Ανάλυσης Τροφίμων.
- [28] Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010 Feb;66(Pt 2):213-21.
- [29] Terwilliger TC, Klei H, Adams PD, Moriarty NW, Cohn JD. Automated ligand fitting by core-fragment fitting and extension into density. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2006 Aug;62(Pt 8):915-22.
- [30] Saha S, Singh J, Paul A, Sarkar R, Khan Z, Banerjee K. Anthocyanin Profiling Using UV-Vis Spectroscopy and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *J AOAC Int.* 2020 Jan 1;103(1):23-39.
- [31] Bareka, P., Phitos, D. and Kamari, G. (2008), A karyosystematic study of the genus *Bellevalia* Lapeyr. (Hyacinthaceae) in Greece. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 157: 723-739.
- [32] 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 β -pocket of the active site of human liver glycogen phosphorylase with 3-(C - β -d -glucopyranosyl)-5-(4-substituted-phenyl)-1, 2, 4-triazole inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 77, 485–493
- [33] Riaz S. Study of Protein Biomarkers of Diabetes Mellitus Type 2 and Therapy with Vitamin B1. *J Diabetes Res.* 2015;2015:150176.
- [34] Mulyani, D.E.; Maksum, I.P. Detection of Biomarker Using Aptasensors to Determine the Type of Diabetes. *Diagnostics* 2023, 13, 2035.

[35] Arneth B, Arneth R, Shams M. Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2019 May 18;20(10):2467.

[36] Araki, R.; Yada, A.; Ueda, H.; Tominaga, K.; Isoda, H. Differences in the Effects of Anthocyanin Supplementation on Glucose and Lipid Metabolism According to the Structure of the Main Anthocyanin: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* 2021, 13, 2003.