



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

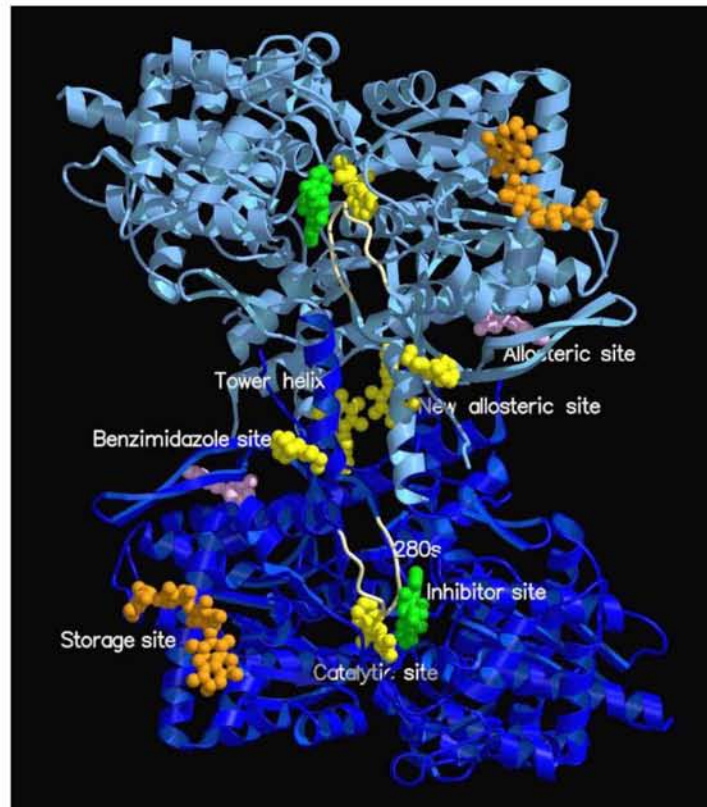
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

<< Βιοτεχνολογία- Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος >>

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



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

ΤΗΣ

ΑΘΑΝΑΣΙΑΣ ΤΣΙΑΟΥΣΗ

ΑΜ: 180113196

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΛΑΡΙΣΑ 2015



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ 2014-2015

<< Βιοτεχνολογία- Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος >>

**Αξιολόγηση της υπογλυκαιμικής δράσης πολυφαινολικών  
εκχυλισμάτων από απόβλητα ελαιοτριβείου με βιοχημικές  
διαδικασίες**

***Assessment of hypoglycaemic activity in polyphenolic extracts from  
olive mill wastewater by biochemical methods***

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**  
*Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*
- **Δρ. Πετρωτός Κωνσταντίνος**  
*Αναπληρωτής καθηγητής του τμήματος Τεχνολογίας Γεωπονίας του ΤΕΙ Θεσσαλίας.*
- **Δρ. Στάγκος Δημήτριος**  
*Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*

# περιεχόμενα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	7
ABSTRACT .....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1.Επιδημιολογία του Σακχαρώδη Διαβήτη .....	9
1.2.Ορισμός .....	10
1.3.Ομοιόσταση της γλυκόζης .....	11
1.3.1.Ομοιοστασία της γλυκόζης σε κατάσταση νηστείας και ο μηχανισμός δράσης γλυκαγόνης/ινσουλίνης. ....	11
1.3.2.Ομοιοστασία της γλυκόζης μεταγευματικά και μηχανισμός δράσης γλυκαγόνης/ινσουλίνης. .....	13
1.4.Ινσουλίνη.....	14
1.5. Γλυκαγόνη.....	15
1.6.Ταξινόμηση Σακχαρώδη Διαβήτη .....	17
1.6.1.Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου Ι.....	17
1.6.1.1.Αυτόνοσος ΣΔ .....	17
1.6.1.2.Ιδιοπαθής ΣΔ.....	19
1.6.2.Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 .....	19
1.6.3.Διαβήτης κύησης .....	20
1.6.4.Διαβήτης σχετιζόμενος με άλλες αιτίες.....	20
ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ.....	22
2.1. Γλυκόζη.....	22
2.2. Γλυκογόνο.....	23
2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	24
2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	25
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ .....	28
3.1 Γενικά.....	28

3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	30
3.3 Κρυσταλλική δομή της GP.....	35
3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	37
3.5. Διαδικασία επεξεργασίας εκχυλίσματος πολυφαινολών από απόβλητα ελαιοτριβείου και παρασκευή ξηρής σκόνης με τη χρήση συσκευής ξήρανσης υπό κενό. ....	39
<b>ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ</b> .....	41
4.1. Αρχές ενζυμικής κινητικής .....	41
4.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων.....	43
4.2.1. Συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition).....	44
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	47
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	49
5.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου $\beta$ από σκελετικούς μυς κουνελιού: .....	49
5.2. Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: .....	52
5.2.1. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GP $\beta$ : .....	52
5.2.2. Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ )της GP $\beta$ : .....	53
5.3. Προσδιορισμός της τιμής της $IC_{50}$ Αναστολέα: .....	54
5.3.1. Παρασκευή διαλύματος GP $\beta$ -γλυκογόνου: .....	55
5.3.2. Παρασκευή διαλύματος υποστρωμάτων: .....	56
5.3.3. Εκτέλεση του Πειράματος:.....	57
5.4. Προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων: .....	57
5.4.1. Μέθοδος ασκορβικού οξέος : .....	58
5.5. Παρασκευή τυφλών:.....	58
5.6. Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων-πρόγραμμα Grafit:.....	59
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	61
6.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης $\beta$ του γλυκογόνου .....	61
6.2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων .....	62
6.2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου .....	62
6.2.2. Κινητική μελέτη εκχυλίσματος πολυφαινολών από απόβλητα ελαιοτριβείου.....	63
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	65

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66
ΠΗΓΕΣ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟΥ .....	70

## Ευχαριστίες

Η παρατιθέμενη πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και δη κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015, υπό την επίβλεψη του Αν. Καθηγητή Δρ. Πετρωτού Κωνσταντίνου, του Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπονίας του ΤΕΙ Θεσσαλίας, καθώς και του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος, Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη.

Δράττομαι της ευκαιρίας και τους ευχαριστώ θερμά για τη δυνατότητα που μου παρείχαν γενναιόδωρα και η οποία μου επέτρεψε να διευρύνω τις γνώσεις και να επεκτείνω τις εμπειρίες μου στον τομέα των Βιοεπιστημών.

Επιπλέον, ευχαριστώ ολόψυχα τον Υποψήφιο Διδάκτορα του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, κ. Γεώργιο Στραβοδήμο, για την υπομονή και τη σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διεκπεραίωση των πειραμάτων, κυρίως δε για τη μεταλαμπάδευση γνώσεων και τις ανεκτίμητες συμβουλές, καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού σταδίου, αλλά και κατά τη συγγραφή της εν λόγω εργασίας.

Τέλος, ευχαριστίες στην οικογένεια και τους φίλους μου, για την ηθική υποστήριξη κατά τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας.



## Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) έχει χαρακτηριστεί ως σύγχρονη επιδημία και αποτελεί μία εκ των σοβαρότερων μεταβολικών διαταραχών σε διεθνές επίπεδο. Εκδηλώνεται με υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχές στον μεταβολισμό της γλυκόζης, είτε λόγω μειωμένης εκκρίσεως ινσουλίνης είτε λόγω μειωμένης ευαισθησίας των σωματικών κυττάρων στην ινσουλίνη. Βασικό στόχο της θεραπείας κατά του διαβήτη αποτελεί η σταθεροποίηση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Για αυτόν τον σκοπό, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την εύρεση φυσικών μορίων που εκλεκτικά θα τα ενεργοποιούν ή θα τα απενεργοποιούν. Βάσει μελετών, φαίνεται ότι το ένζυμο της ηπατικής *φωσφορυλάσης του γλυκογόνου* αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκε το ένζυμο φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μύες κουνελιού και μελετήθηκε με τη βοήθεια κινητικών πειραμάτων η επίδραση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από απόβλητα ελαιοτριβείου στην ενζυμική του δραστηριότητα. Ειδικότερα, η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι οι συγκεκριμένες ενώσεις παρουσιάζουν υψηλές σχετικές τιμές  $IC_{50}$ .

## Abstract

Diabetes mellitus (DM) has been characterized as a modern epidemic and it is one of the most serious metabolic disorders worldwide. It is indicated by high blood glucose levels (hyperglycemia) and disorders of glucose metabolism, or due to reduced insulin secretion or lowered sensitivity of the body's cells to insulin. The main aim of diabetes treatment is to stabilize blood glucose levels to normal. For this purpose, enzymes and receptors involved in the regulation of glucose are used as molecular targets for finding natural molecules which they will selectively activate or inactivate. Based on extensive studies, the enzyme of hepatic glycogen phosphorylase is one of the most important molecular targets for the design of new hypoglycemic drugs.

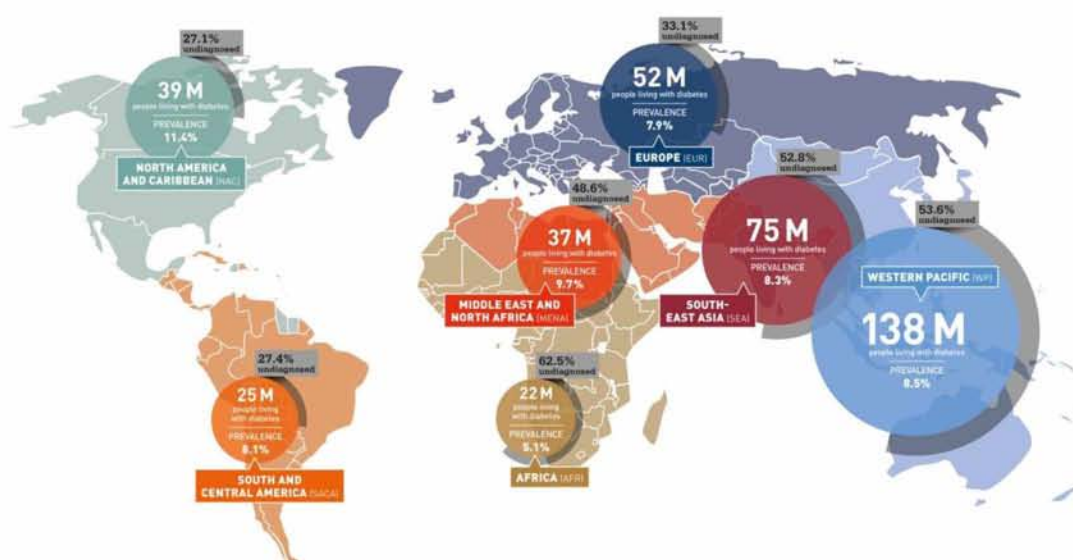
In this project, the enzyme glycogen phosphorylase b (GPb) was isolated from rabbit skeletal muscle and kinetic experiments were performed to study the effect of polyphenol extract from an olive-processing industry's waste, on enzymatic activity. Kinetic studies in the direction of glycogen synthesis showed that these compounds display high  $IC_{50}$  values. .



# Εισαγωγή

## 1.1.Επιδημιολογία του Σακχαρώδη Διαβήτη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (εφεξής ΣΔ) είναι το συχνότερο μεταβολικό νόσημα σε παγκόσμιο επίπεδο και ένας εκ των κυριότερων παραγόντων νοσηρότητας και θνησιμότητας, στις ανεπτυγμένες χώρες, εξίσου, όμως και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Σύμφωνα με τα αντλούμενα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ) στοιχεία, ο ΣΔ ορίζεται διεθνώς ως «μια μεταβολική διαταραχή πολλαπλής αιτιολογίας, που χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία, λόγω διαταραχών στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, η οποία είναι αποτέλεσμα ανεπάρκειας της έκκρισης ή της δράσης της ινσουλίνης ή και των δυο. Η χρόνια υπεργλυκαιμία οδηγεί μακροπρόθεσμα σε βλάβη, δυσλειτουργία και ανεπάρκεια διαφόρων οργάνων, κυρίως των οφθαλμών, των νεφρών, των νεύρων των αγγείων και της καρδιάς [Alberti KG,1998]. Οι επιπτώσεις του Σακχαρώδους Διαβήτη βαίνουν αισθητώς αυξανόμενες σε παγκόσμια κλίμακα, την ίδια ώρα που επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι άνευ αποτελεσματικής προλήψεως και προγραμμάτων ελέγχου, θα εξακολουθήσει να βαίνει αυξανόμενη σε διεθνές επίπεδο.



Εικόνα 1. Αριθμός ατόμων με διαβήτη παγκοσμίως. IDF Diabetes Atlas Sixth Edition Update, International Diabetes Federation 2014

Το έτος 2014 και βάσει των στοιχείων της Διεθνούς Ομοσπονδίας Διαβήτη (I.D.F), 387 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από διαβήτη και προβλέπεται ότι έως το 2035, ο συνολικός αριθμός των πασχόντων θα ανέλθει σε 592 εκατομμύρια. Ο αριθμός των ατόμων με διαβήτη τύπου 2 αυξάνεται στο σύνολο των χωρών. Περί τα 179 εκατ. άνθρωποι με διαβήτη δεν έχουν διαγνωσθεί ως πάσχοντες και, επομένως, δεν υποβάλλονται σε καμία θεραπεία. Ο μεγαλύτερος αριθμός των ανθρώπων που πάσχουν από διαβήτη κυμαίνονται μεταξύ των ηλικιών των 40 και 59 ετών. Κάθε επτά δευτερόλεπτα ένα άτομο πεθαίνει από διαβήτη. Το 2014 ο διαβήτης αποτέλεσε την αιτία 4,9 εκατομμυρίων θανάτων. Το 77% των ατόμων με διαβήτη ζουν σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος.[[http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014\\_EN.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_EN.pdf)]

Αναλύοντας τα στοιχεία που έδωσε στη δημοσιότητα η Ελληνική Διαβητολογική Εταιρία, μαρτυράτε από αυτά ότι ο αριθμός των ατόμων με διαβήτη στην Ελλάδα έχει τετραπλασιαστεί τα τελευταία 30 έτη. Στην Ελλάδα, το ποσοστό των πασχόντων από διαβήτη εκτιμάται να ανέρχεται στο 8%- 9% του πληθυσμού, ενώ υφίσταται επίσης ένα ποσοστό 3%- 4 % που πάσχει μεν από τη νόσο, ωστόσο δεν το γνωρίζει. [<http://www.ede.gr/wp-content/uploads/2012/11/dt.pdf>]

## **1.2.Ορισμός**

Ο διαβήτης αποτελεί μία κατάσταση πρωταρχικά οριζόμενη από τα επίπεδα της υπεργλυκαιμίας που οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μικροαγγειακών βλαβών και μακροαγγειακών επιπλοκών. Αποτελεί, δηλαδή, έναν σημαντικό και μη αμελητέο παράγοντα κινδύνου ως προς την εμφάνιση αρκετών χρόνιων παθήσεων, την πρόωμη θνησιμότητα, τη σημαντική νοσηρότητα και την επιδείνωση της ποιότητας ζωής [WHO/IDF,2006]. Ο ΣΔ σχετίζεται με την λειτουργία του παγκρέατος, το οποίο είναι ένας αδένας που βρίσκεται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο και παράγει πλήθος ορμονών μεγάλης σημασίας. Πιο συγκεκριμένα, εκ της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος, παράγονται η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη, που ρυθμίζουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο σώμα καθώς και άλλες ορμόνες οι οποίες συμβάλλουν στην πέψη, ήτοι συμβάλλουν στη διαδικασία με την οποία ο οργανισμός προβαίνει σε αποθήκευση ενέργειας από τις τροφές και στη ρύθμιση του σακχάρου του αίματος. Προς εξασφάλιση της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού, πρέπει

η προσλαμβανόμενη ενέργεια να ισούται με την καταναλωμένη ενέργεια. Η πιο σπουδαία πηγή ενέργειας του οργανισμού είναι αναντίρρητα η γλυκόζη, διότι η διάσπαση της οδηγεί στην παραγωγή ενώσεων με δεσμούς υψηλής χημικής ενέργειας. Εκ των ανωτέρω συνάγεται ότι η διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα εντός των φυσιολογικών ορίων είναι ιδιαίτερος σημαίνουσα.

### **1.3.Ομοιόσταση της γλυκόζης**

Το σύνολο των οργανισμών απαιτεί ενέργεια προκειμένου να επιβιώσουν και να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους. Οι ζωικοί οργανισμοί εξασφαλίζουν την ενέργεια που χρειάζονται από το περιβάλλον με την τροφή τους. Τα συστατικά των τροφών, ήτοι τα σάκχαρα, τα λιπαρά οξέα και οι πρωτεΐνες, δεν μπορούν να αξιοποιηθούν άμεσα και εξ αυτού του λόγου μετατρέπονται, με τη διαδικασία του μεταβολισμού, σε άλλες χημικές ενώσεις οι οποίες καθίστανται αξιοποιήσιμες με τους εξής δύο τρόπους:

1. Η οξειδωσή τους και η παραγωγή ενέργειας (καταβολισμός)
2. Η χρησιμοποίησή τους ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση δομικών ή λειτουργικών μορίων τα οποία είναι απαραίτητα για τον οργανισμό (αναβολισμός)

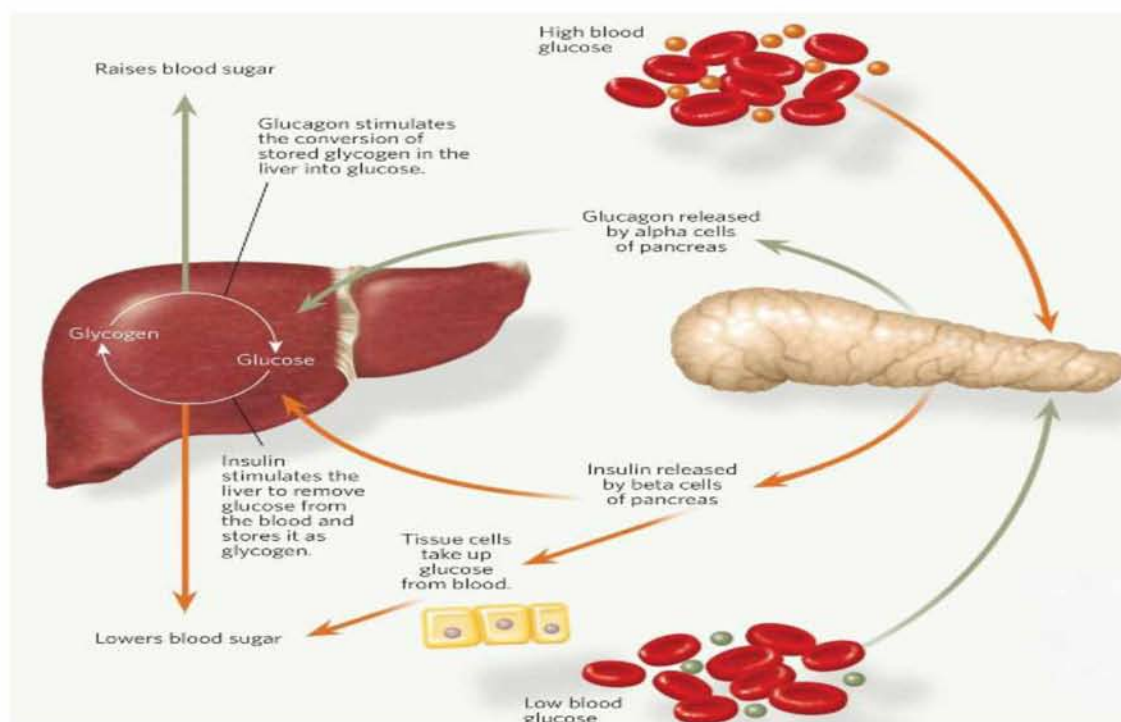
Για την ρύθμιση αυτών των δύο διαδικασιών απαιτείται η συντονισμένη δράση της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης. Ο μοριακός λόγος των συγκεντρώσεων αυτών των ορμονών ελέγχει τον μεταβολισμό και συντελεί στη σταθεροποίηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα (ομοιόσταση της γλυκόζης) [Ζαρκογιάννη Κ.,2011].

#### **1.3.1.Ομοιοστασία της γλυκόζης σε κατάσταση νηστείας και ο μηχανισμός δράσης γλυκαγόνης/ινσουλίνης.**

Ύστερα από ολονύχτια νηστεία, τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα διατηρούν τη σταθερότητά τους χάρη στη λειτουργία του ήπατος, το οποίο παράγει γλυκόζη με το ρυθμό που αυτή καταναλώνεται στους περιφερικούς ιστούς. Στην περιγραφόμενη κατάσταση, η γλυκόζη προσλαμβάνεται και καταναλώνεται πρωτίστως από τους ιστούς εκείνους, όπου για την πρόσληψη της δεν απαιτείται η παρουσία ινσουλίνης, όπως λόγου χάρη ο εγκέφαλος και τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα επίπεδα ινσουλίνης είναι χαμηλά και επικρατεί σε αυτά η δράση της γλυκαγόνης, η οποία διεγείρει την απελευθέρωση γλυκόζης από το ήπαρ μέσω της γλυκογονόλυσης. Τα χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης επιτρέπουν την απελευθέρωση ελευθέρων λιπαρών οξέων από τον λιπώδη

ιστό, τα οποία εν συνεχεία θα χρησιμεύσουν ως πηγή ενέργειας για τους μύες (οξείδωση λιπαρών οξέων) αλλά και ως υπόστρωμα για την κετογένεση στο ήπαρ. Ωστόσο, έτι και τα εν λόγω χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης κρίνονται επαρκή για την αποτροπή της εκτεταμένης λιπόλυσης, νεογλυκογένεσης και κετογένεσης. Κατ' αυτόν τον τρόπο προλαμβάνεται η εμφάνιση υπεργλυκαιμίας και κετοξέωσης. [Kenneth et Feingold et al.].

Αν, ωστόσο, η περίοδος νηστείας παραταθεί για διάστημα μεγαλύτερο των 24-48 ωρών, οι αποθήκες του γλυκογόνου του ήπατος εξαντλούνται. Παρατηρείται περαιτέρω μία μικρή αύξηση των επιπέδων γλυκαγόνης, ενώ η ινσουλίνη ελαττώνεται έτι περαιτέρω. Στη φάση αυτή, μοναδική οδό παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ αποτελεί η νεογλυκογένεση. Όσον αφορά στο μυϊκό και λιπώδη ιστό, η οξείδωση της γλυκόζης αναστέλλεται στο στάδιο του πυροσταφυλικού οξέος και της αλανίνης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη γλυκονογένεση. Επιπροσθέτως, αμινοξέα (αλανίνη, γλουταμίνη) που προέρχονται από τον καταβολισμό των πρωτεϊνών του μυϊκού ιστού, γλυκερόλη από το λιπώδη ιστό κ.α. μπορούν και αυτά να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα γλυκονογένεσης. [Kenneth et Feingold et al.]



**Εικόνα 2.** Ομοίωση της γλυκόζης και η ρύθμισή της από τις δράσεις της γλυκαγόνης και της ινσουλίνης.

Σε περιόδους ασιτίας, ο οργανισμός αναγκαστικά μεταπίπτει από τη νεογλυκογένεση στην παραγωγή κετονικών σωμάτων, τα οποία αποτελούν εναλλακτική πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλο. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από ινσουλινοπενία και, ως συνέπεια της έλλειψης ινσουλίνης, αυξάνεται η παραγωγή λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό, ενώ κατά παράδοξο τρόπο μειώνεται ο καταβολισμός των πρωτεϊνών των μυών. Αυτή ακριβώς η περιγραφείσα διαφύλαξη του μυϊκού ιστού επιτρέπει την επιβίωση κατά τη διάρκεια της ασιτίας. Συγχρόνως, η αύξηση των ελευθέρων λιπαρών οξέων οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή κετονικών σωμάτων (κετογένεση), διαδικασία που διεγείρεται από τη γλυκαγόνη.

### **1.3.2.Ομοιοστασία της γλυκόζης μεταγευματικά και μηχανισμός δράσης γλυκαγόνης/ινσουλίνης.**

Κατόπιν της καταναλώσεως υδατανθράκων, η απορρόφηση της γλυκόζης και η κυκλοφορία της στο αίμα συνεπάγεται την άμεση διέγερση των β-κυττάρων του παγκρέατος και την έκκριση ινσουλίνης. Συγχρόνως, η έκκριση γλυκαγόνης από τα α-κύτταρα του παγκρέατος μειώνεται. Έτσι, η σχέση ινσουλίνης / γλυκαγόνης αυξάνεται σημαντικά και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επικράτηση των δράσεων της ινσουλίνης. Η παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ, που συνέβαινε κατά τη διάρκεια της νηστείας, καταστέλλεται προκειμένου να αποφευχθεί η υπεργλυκαιμία. Επίσης, η ινσουλίνη διεγείρει την εναποθήκευση γλυκόζης με τη μορφή γλυκογόνου, κυρίως ήπαρ, αλλά και στα μυϊκά κύτταρα. Επιπλέον, στο λιπώδη ιστό γίνεται εναποθήκευση λίπους, δράση επίσης της ινσουλίνης. Φυσικά, μετά την κατανάλωση των υδατανθράκων καταστέλλεται και η παραγωγή κετονικών σωμάτων, μια και υπάρχει γλυκόζη διαθέσιμη προς παραγωγή ενέργειας από το κεντρικό νευρικό σύστημα [Kenneth ft Feingold et al].

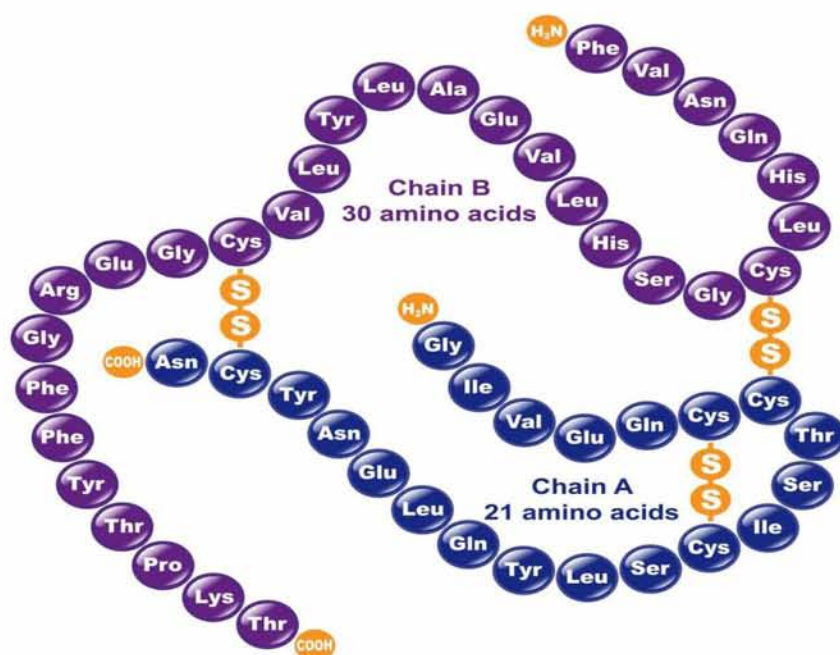
Μετά από την κατανάλωση ενός πλήρους γεύματος, το οποίο, πέρα από τους υδατάνθρακες, περιέχει μία σημαντική ποσότητα λίπους και πρωτεϊνών, η ομοιοστασία της γλυκόζης επιτυγχάνεται κατά τρόπο πιο πολύπλοκο. Ούτως ειπείν, τα περιεχόμενα στις πρωτεΐνες αμινοξέα, αφού απορροφηθούν στην κυκλοφορία του αίματος προκαλούν διέγερση των α-κυττάρων του παγκρέατος και έκκριση γλυκαγόνης, ενώ η απορροφούμενη γλυκόζη διεγείρει συνεπαγόμενα τα β-κύτταρα, τα οποία και εκκρίνουν ινσουλίνη. Η αναλογία όμως ινσουλίνης/γλυκαγόνης εξακολουθεί να είναι αυξημένη, με συνέπεια να επικρατούν και πάλι οι δράσεις της ινσουλίνης. Με τον τρόπο αυτό, η ινσουλίνη διεγείρει την πρόσληψη των αμινοξέων



από τους μύες και τη μετατροπή τους σε πρωτεΐνες, ενώ η γλυκαγόνη αντισταθμίζει την τάση της ινσουλίνης να προκαλεί υπογλυκαιμία, διεγείροντας έτσι την απελευθέρωση γλυκόζης από το ήπαρ.[Kenneth et Feingold et al.]

### 1.4.Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι μια πρωτεϊνική ορμόνη 51 αμινοξέων που εκκρίνεται από τα β κύτταρα των παγκρεατικών νησίδων του Langerhans, ως απόκριση στην αύξηση της γλυκόζης του αίματος. Αποτελείται από δύο αλυσίδες, την αλυσίδα A (21 αμινοξέα) και την αλυσίδα B (30 αμινοξέα) οι οποίες εμφανίζονται συνδεδεμένες με δύο δισουλφιδικές γέφυρες. Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης αρχίζει από την παραγωγή της προ-προ-ινσουλίνης (109 αμινοξέα). Το μόριο αυτό διασπάται πριν ακόμη εκκριθεί και εξ αυτού προκύπτει η ινσουλίνη και το C- πεπτίδιο.



Εικόνα 3. Μοριακή δομή της ανθρώπινης ινσουλίνης.

Η ινσουλίνη παρουσιάζεται αποταμιευμένη στα κοκκία των β κυττάρων, από τα οποία απελευθερώνεται με εξωκυττάρωση στο αίμα των τριχοειδών τα οποία υφίστανται σε αφθονία στην περιοχή των νησίδων του Langerhans. Η περιεκτικότητα του παγκρέατος σε ινσουλίνη είναι 6-7 mg και καθημερινά απελευθερώνονται περίπου 2 mg ινσουλίνης. Η έκκριση της ινσουλίνης διεγείρεται από πλήθος ορμονών, συμπεριλαμβανομένης της γλυκαγόνης και του γαστρικού ανασταλτικού

πεπτιδίου GIP (gastrointestinal inhibitory peptide ή glucose-dependent insulintrophic peptide λόγω της γλυκοζοεξαρτώμενης ινσουλινοτρόπου δράσης του). [Γκίμπα – Τζιαμπίρη Ο., 2001]

Η δράση της ινσουλίνης ασκείται μετά από δέσμευση της σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Η ινσουλίνη προκαλεί την απομάκρυνση της γλυκόζης από το αίμα, προκαλώντας τη μετατόπιση του ινσουλινοευαίσθητου μεταφορέα GLUT 4 από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη. Η ινσουλίνη έτσι διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης από το ήπαρ ως εξής: επάγει τη γλυκοκινάση που φωσφορυλιώνει τη γλυκόζη προς 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία αποτελεί υπόστρωμα για τη σύνθεση γλυκογόνου. Η διαδικασία αυτή διασφαλίζει τη διατήρηση της ενδοκυττάριας γλυκόζης σε χαμηλά επίπεδα με αποτέλεσμα μια διαβάθμιση συγκέντρωσης που εξυπηρετεί την πρόσληψη γλυκόζης.

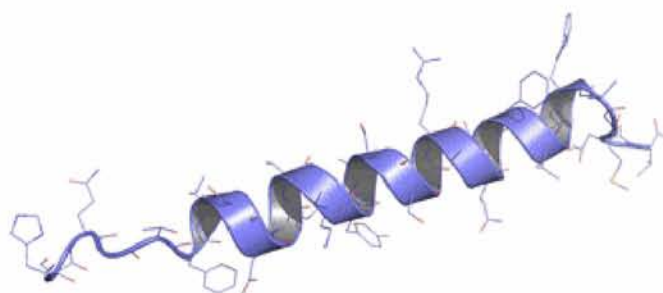
Η ινσουλίνη φαίνεται να συμμετέχει στον έλεγχο της ισορροπίας μεταξύ της γλυκογονοσύνθεσης και της γλυκογονόλυσης. Συνοπτικά, η ινσουλίνη ευνοεί την πρώτη και παρεμποδίζει τη δεύτερη μέσω της ενζυμικής δράσης. Σε κατάσταση όμως νηστείας, όταν παρεμποδίζεται η έκκριση της ινσουλίνης, τελικό αποτέλεσμα είναι η ηπατική διέγερση της γλυκογονόλυσης και η απελευθέρωση της γλυκόζης στο αίμα. Η ινσουλίνη συμμετέχει επιπλέον, στον έλεγχο της γλυκόλυσης και γλυκονεογένεσης, διεγείροντας την πρώτη και παρεμποδίζοντας τη δεύτερη, και πάλι μέσω ενζυμικής δράσης. Η ινσουλίνη ακόμη παίζει ρόλο και στον έλεγχο του μεταβολισμού του λίπους: διεγείρει τη λιπογένεση και παρεμποδίζει τη λιπόλυση. Διεγείρει, τέλος την πρόσληψη των αμινοξέων από τα κύτταρα και την πρωτεϊνοσύνθεση, καθώς και την ενδοκυττάρια πρόσληψη καλίου. [Γκίμπα – Τζιαμπίρη Ο., 2001]

### **1.5. Γλυκαγόνη**

Η γλυκαγόνη είναι ένα γραμμικό πολυπεπτίδιο αποτελούμενο από 29 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 3485 Da, εκκρίνεται δε ως προγλυκαγόνη από τα ακύτταρα του παγκρέατος με μηχανισμό εξωκύττωσης. [Καραμήτσος ΔΘ, 1987, Κούτρας ΔΑ, 1983] Βασικότατο ερέθισμα για την έκκριση της γλυκαγόνης αποτελεί η υπογλυκαιμία. Με τη δράση της είναι που εξασφαλίζονται φυσιολογικές τιμές σακχάρου αίματος στην νηστεία και στα διαστήματα ενδιάμεσα των γευμάτων. Αντίθετα, η υπεργλυκαιμία καταστέλλει την έκκριση της γλυκαγόνης είτε με



απευθείας δράση στη λειτουργία των κυττάρων του παγκρέατος είτε έμμεσα αυξάνοντας την έκκριση της ινσουλίνης.[Karam JH et al, 1986, Ganong WF 1979]



**Εικόνα 4.** Δομή της γλυκαγόνης

Άλλοι παράγοντες που αυξάνουν την έκκριση της γλυκαγόνης είναι τα αμινοξέα, οι γαστρεντερικές ορμόνες (γαστρίνη, χολοκυστοκίνη), το άγχος και οι β-αδρενεργικοί αποδέκτες. Η έκκριση της γλυκαγόνης ελαττώνεται από τη σωματοστατίνη, την ινσουλίνη, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τις κετόνες και τους α-αδρενεργικούς αποδέκτες.[Ganong WF, 1979] Υφίσταται ακόμη η εξωπαγκρεατική γλυκαγόνη που εκκρίνεται από τα κύτταρα του θόλου του στομάχου, του δωδεκαδάκτυλου και του λεπτού εντέρου, της οποίας ο βιολογικός τύπος δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Η γλυκαγόνη λειτουργεί ως μεταβολικός ανταγωνιστής της ινσουλίνης, γι' αυτό είναι αξιοσημείωτη η αναλογία της ινσουλίνης προς τη γλυκαγόνη.[Ganong WF, 1979] Η σχέση αυτή τις πρωινές ώρες της ημέρας πριν το φαγητό είναι 2,3 μετά όμως τη λήψη υδατανθρακούχου γεύματος ή την ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης αυξάνεται σε 30 και 70 αντίστοιχα. Η ως άνω υπερέκκριση της ινσουλίνης συμβάλλει στην αποταμίευση ενέργειας. Αντιθέτως, σε περίπτωση νηστείας η μοριακή σχέση ινσουλίνης και γλυκαγόνης ελαττώνεται σε 0,3. Η υπερέκκριση της γλυκαγόνης χρησιμεύει για την παραγωγή και τη χρησιμοποίηση της ενέργειας [Karam JH et al 1986, Ganong WF, 1979] Η γλυκαγόνη ασκεί τη δράση της στο ηπατικό κύτταρο όπου ενεργοποιεί μια σειρά αντιδράσεων (αδενυλ-κυκλάση-cAMP- φωσφορική κινάση- 2,6 φωσφορική φρουκτόζη) με έκβαση την παραγωγή γλυκόζης από την διάσπαση του γλυκογόνου και την νεογλυκογένεση. Από τον καταβολισμό του λιπώδη ιστού σχηματίζονται γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία ενισχύουν την παραγωγή των κετονικών σωμάτων [Unger RH, Orci L, 1989]. Αντίθετα αποτελέσματα προκαλούνται από την δραστηριότητα της ινσουλίνης (σύνθεση γλυκογόνου, ελάττωση της γλυκόζης και λιπογένεση).

## **1.6.Ταξινόμηση Σακχαρώδη Διαβήτη**

Το μεταβολικό σύνδρομο ταξινομείται με βάση την κατάσταση της διαταραγμένης γλυκόζης νηστείας σε:

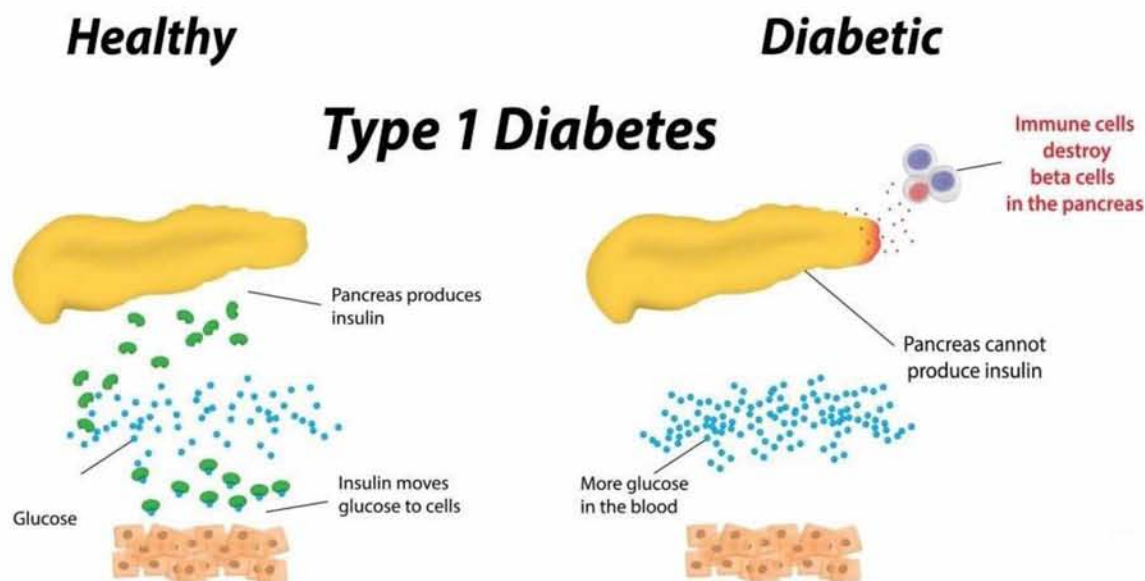
1. Ο διαβήτης τύπου 1 (λόγω της καταστροφής β-κυττάρων, συνήθως οδηγεί σε απόλυτη ανεπάρκεια ινσουλίνης)
2. Ο διαβήτης τύπου 2 ( προκαλείται από το συνδυασμό αντίστασης στην ινσουλίνη μαζί με ανεπάρκεια της εκκρινόμενης ινσουλίνης)
3. Ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης (GDM) (διαβήτης που διαγιγνώσκεται στο δεύτερο ή τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και δεν είναι σαφώς έκδηλος σακχαρώδης διαβήτης)
4. Συγκεκριμένοι τύποι διαβήτη οφειλόμενοι σε άλλα αίτια, π.χ. σύνδρομο μονογενούς διαβήτη (διαβήτης νεογέννητων και διαβήτης νέων εμφανιζόμενος σε ωριμότερα άτομα (MODY), ασθένειες του εξωκρινούς παγκρέατος (όπως η κυστική ίνωση) και διαβήτης προκαλούμενος από τη λήψη χημικών ή ναρκωτικών ουσιών (όπως, φερ' ειπείν, κατά τη θεραπεία του HIV/AIDS, ή μετά από μεταμόσχευση οργάνου). [ADA, 2015]

### **1.6.1.Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I**

#### **1.6.1.1.Αυτόνοσος ΣΔ**

Αυτός ο τύπος ΣΔ στο παρελθόν αναφερόταν ως ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης. Ο τύπου I ή νεανικός ΣΔ, προκαλείται από αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος. Σε αυτόν τον τύπο ΣΔ, η συχνότητα καταστροφής των β-κυττάρων ποικίλλει από ταχεία, ιδίως σε νηπιακή και παιδική ηλικία, μέχρι βραδεία, ιδίως στους ενήλικες. [Zimmet PZ et al, 1994] Σε έναν αριθμό ασθενείς, ιδίως παιδιά και εφήβους, η κετοξέωση αποτελεί την πρώτη κλινική εκδήλωση του ΣΔ.[Japan and Pittsburgh Childhood Diabetes Research Groups, 1985] Άλλοι ασθενείς παρουσιάζουν μέτριας βαρύτητας υπεργλυκαιμία νηστείας που μπορεί να εξελιχθεί ταχέως σε σοβαρή υπεργλυκαιμία ή/και κετοξέωση στο πλαίσιο συνυπάρχουσας λοιμώξης ή άλλου στρεσογόνου παράγοντα.





**Εικόνα 5.** Στον Διαβήτη τύπου 1 το πάγκρεας αδυνατεί να παράγει ινσουλίνη με αποτέλεσμα την αύξηση της γλυκόζης στο αίμα.

Αντίθετα, άλλοι ασθενείς, κυρίως ενήλικες, διατηρούν κάποια υπολειμματική λειτουργία των β-κυττάρων, ικανή να τους προφυλάξει από την εμφάνιση κετοξέωσης για διάστημα πολλών ετών, αν και τελικά θα χρειασθούν ινσουλίνη για την επιβίωση τους και θα ευρίσκονται σε έναν διαρκή κίνδυνο κετοξέωσης. [Zimmet PZ, 1995] Σε αυτό το τελικό στάδιο της νόσου, παρατηρείται ελάχιστη έως καθόλου έκκριση ενδογενούς ινσουλίνης, όπως αποκαλύπτεται από τη χαμηλή ή μη ανίχνευση C-πεπτιδίου στο πλάσμα. [Hother-Nielsen O et al, 1988] Κατά κανόνα, ο αυτοάνοσος ΣΔ εμφανίζεται στην παιδική και εφηβική ηλικία, χωρίς όμως να αποκλείεται η εκδήλωση του σε οποιαδήποτε ηλικία, ακόμη και στην όγδοη και ένατη δεκαετία της ζωής. [Mølbak AG et al, 1994] Η αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων αποδίδεται σε πολλαπλούς γενετικούς προδιαθεσικούς παράγοντες, ενώ επίσης επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες που δεν έχουν όμως ακόμη πλήρως διευκρινισθεί. Αν και οι ασθενείς σπάνια είναι υπέρβαροι, η παρουσία παχυσαρκίας δεν αποκλείεται ήδη κατά τη διάγνωση της νόσου. Αυτοί οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από υψηλή προδιάθεση για εμφάνιση των άλλων αυτοάνοσων διαταραχών, όπως νόσο του Grave's θυρεοειδίτιδα Hashimoto, νόσο του Addison, λεύκη, κοιλιοκάκη, αυτοάνοση ηπατίτιδα, μασθένεια gravis και κακοήγη αναιμία. [Betterle C et al, 1983]

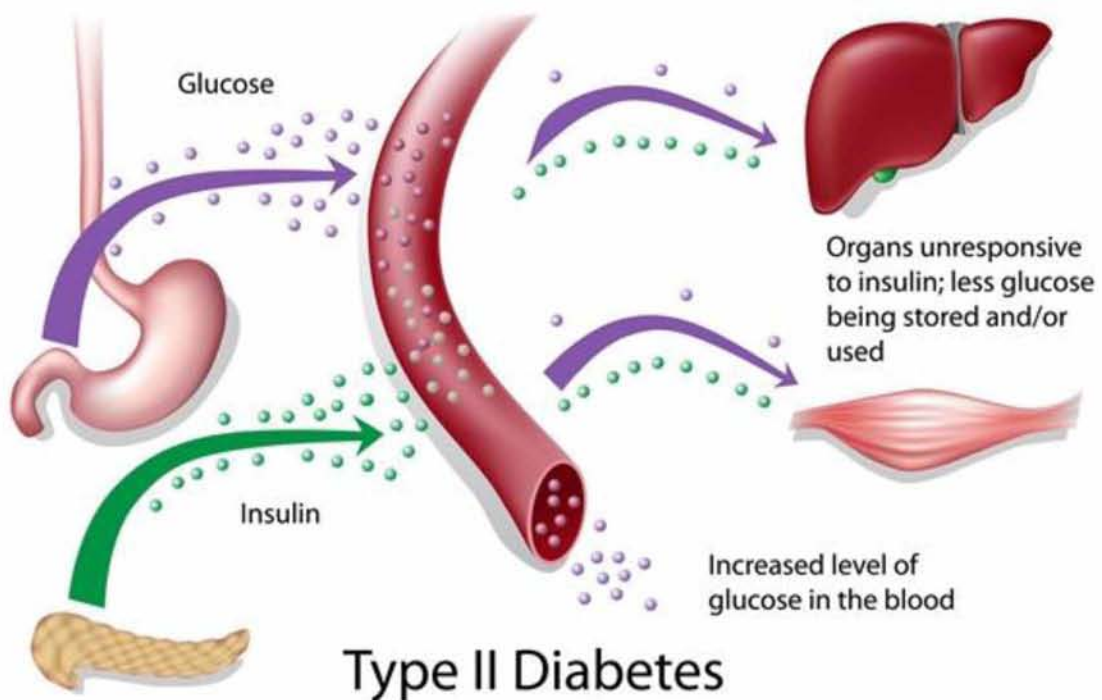


### 1.6.1.2.Ιδιοπαθής ΣΔ

Σε μερικές μορφές ΣΔ τύπου 1 δεν ανευρίσκεται αιτιολογικός παράγοντας. Κάποιοι από αυτούς τους ασθενείς παρουσιάζουν μόνιμη ινσουλινοπενία και έχουν προδιάθεση για κετοξέωση, χωρίς όμως αυτόανοσο υπόβαθρο. Η ανάγκη ινσουλινοθεραπείας σε αυτούς τους ασθενείς ποικίλει. [McLarty DG et al, 1990]

### 1.6.2.Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2

Ο διαβήτης τύπου 2 είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη. Συνήθως συμβαίνει σε ενήλικες, αλλά είναι αυξανόμενα τα κρούσματα σε παιδιά και εφήβους. Στον διαβήτη τύπου 2 το σώμα παράγει ινσουλίνη αλλά αυτή είτε δεν επαρκεί για αυτό, είτε το σώμα αδυνατεί να ανταποκριθεί στην επιρροή της (γνωστό και ως αντίσταση στην ινσουλίνη), πράγμα που οδηγεί σε συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Πολλοί ασθενείς αγνοούν για μεγάλο χρονικό διάστημα ότι νοσούν, καθώς τα συμπτώματα αργούν να εμφανισθούν ή να αναγνωρισθούν και κατά το διάστημα αυτό το σώμα καταστρέφεται από την υπερβολική συγκέντρωση γλυκόζης.



*Εικόνα 6. Διαβήτης τύπου 2 και η δράση της ινσουλίνης.*

Συχνά η διάγνωση γίνεται μετά την ανάπτυξη επιπλοκών. Οι λόγοι ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2 δεν είναι γνωστοί, ωστόσο μεταξύ των κινδύνων

συμπεριλαμβάνονται οι εξής: παχυσαρκία, κακή διατροφή, απουσία σωματικής άσκησης, ιστορικό διαβήτη, εθνικότητα, υψηλή γλυκόζη αίματος κατά την εγκυμοσύνη η οποία επηρεάζει το έμβρυο.

Ο αριθμός ασθενών με διαβήτη τύπου 2 αυξάνεται σημαντικά, γεγονός που σχετίζεται με οικονομικούς παράγοντες, τη γήρανση του πληθυσμού, την αστικοποίηση, αλλαγές στη διατροφή, μειωμένη σωματική άσκηση και μεταβολή στα μοτίβα που αφορούν στον τρόπο ζωής. [[https://www.idf.org/sites/default/files/EN\\_6E\\_Ch1\\_What\\_is\\_diabetes.pdf](https://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Ch1_What_is_diabetes.pdf)]

### **1.6.3. Διαβήτη κύησης**

Ο διαβήτη κύησης ορίζεται ως η δυσανεξία στη γλυκόζη εμφανιζόμενη για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η επίπτωση της εν λόγω μορφής διαβήτη αυξάνεται λόγω ποικίλων παραγόντων με κυριότερους εξ αυτών την προχωρημένη μητρική ηλικία και την παχυσαρκία. Η Αμερικανική Εταιρεία Διαβήτη συστήνει έλεγχο για εντοπισμό του διαβήτη κύησης κατά τη διαπίστωση της εγκυμοσύνης, αν υπάρχει κάποιος εκ των εξής επικίνδυνων παραγόντων: σοβαρή παχυσαρκία, προηγούμενο ιστορικό διαβήτη κύησης ή γέννησης νεογνού μεγάλου βάρους σε σύγκριση με την ηλικία κύησης, γλυκοζουρία, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών ή οικογενειακό ιστορικό ΣΔ 2. Αν κάποιος από αυτούς τους παράγοντες ελλείπει, οι έγκυες γυναίκες ελέγχονται για ΣΔ κύησης σε ηλικία 24-28 εβδομάδων αποκλειστικά στην περίπτωση που υφίσταται κάποιος εκ των εξής, διαφορετικών παραγόντων: ηλικία άνω των 25 ετών, παχυσαρκία προ της εγκυμοσύνης, οικογενειακό ιστορικό ΣΔ, μη-λευκή φυλή, ιστορικό δυσανεξίας στη γλυκόζη ή προηγούμενο ιστορικό φτωχής μαιευτικής έκβασης. [Kim C, 2010]

### **1.6.4. Διαβήτη σχετιζόμενος με άλλες αιτίες**

Ο διαβήτη δυνητικά οφείλεται σε άλλα αίτια, όπως γενετικές διαταραχές που συνδέονται με τη λειτουργικότητα των  $\beta$  – κυττάρων ή τη δράση της ινσουλίνης, νόσους της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, έκθεση σε φάρμακα, χημικές ουσίες ή τοξίνες.

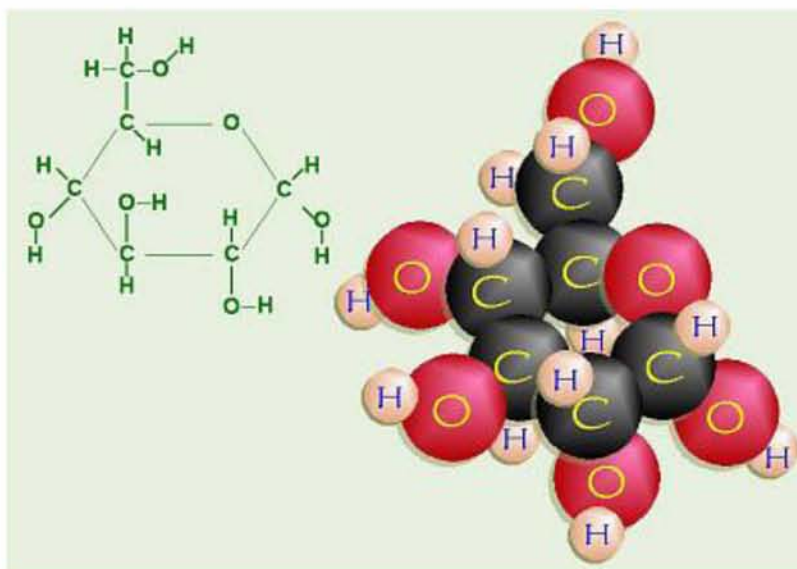
Εξ' αυτών ιδιάζουσας σημασίας κρίνεται ο όψιμου έναρξης διαβήτη των νέων τύπου **MODY** (Maturity Onset Diabetes of the Young). Πρόκειται για μια μονογονιδιακή μορφή ΣΔ, επί της οποίας υφίσταται ισχυρό θετικό οικογενειακό ιστορικό ΣΔ, με κάθετη προσβολή 2 τουλάχιστον προηγούμενων γενεών (π.χ. παππούς, πατέρας) και κληρονομείται με αυτοσωματικό επικρατούντα τρόπο. Εμφανίζεται σε νέα άτομα, μη παχύσαρκα, ηλικίας μικρότερης των 25 ετών, ωστόσο μπορεί να διαγνωσθεί και αργότερα στην πορεία της ενήλικης ζωής. Ο ακριβής επιπολασμός του διαβήτη MODY είναι άγνωστος. Υπολογίζεται ότι αντιπροσωπεύει το 1-2% του συνόλου των ατόμων με ΣΔ. Ο μηχανισμός πρόκλησης του διαβήτη MODY αφορά τη δυσλειτουργία των β – κυττάρων του παγκρέατος, οφειλόμενη σε μεταλλάξεις διαφόρων γονιδίων, και έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή στην έκκριση της ινσουλίνης. Έως σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί μεταλλάξεις σε 11 γονίδια που ευθύνονται για την εμφάνιση ισαριθμών τύπων MODY. Οι συχνότεροι τύποι είναι ο τύπος 2 και ο τύπος 3. Υποπτα για διαβήτη τύπου MODY είναι τα άτομα με ΣΔ που χαρακτηρίζονται από:

- Διάγνωση αυτού -συνήθως- σε ηλικία μικρότερη των 25 ετών.
- Ήπια υπεργλυκαιμία, χωρίς τάση για κετοξέωση.
- Όχι σημαντική παχυσαρκία ή/και απουσία σημείων αντίστασης στην ινσουλίνη.
- Οικογενειακό ιστορικό ΣΔ τύπου 2, τουλάχιστον σε δύο κάθετες γενεές, με αυτοσωματικό επικρατούντα τρόπο κληρονομικότητας.
- Απουσία αντισωμάτων για ΣΔ τύπου 1.
- Γλυκοζουρία, που δεν συμβαδίζει με την ήπια υπεργλυκαιμία.
- Γυναίκες με ΣΔ κύησης, που εμφανίζουν ήπια υπεργλυκαιμία..  
[<http://www.ede.gr/wp-content/uploads/2012/odigies.pdf>Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία]

# Βασικές γνώσεις

## 2.1. Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι μονοσακχαρίτης αποτελούμενος από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5, ώστε να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη, ονομασία αποδιδόμενη στην ομοιότητά του με το πυράνιο. Εξ αυτού του τρόπου, προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη [Stryer L, 1997].



*Εικόνα 7. Απεικόνιση ενός μορίου γλυκόζης*

Στη φύση υπάρχει με τη μορφή φυσικής ζάχαρης στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων [McArdle W. D et al, 2000]. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Επίσης, αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι το κατά προσέγγιση 60% της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Κατ' αυτόν τον τρόπο, ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα

χρησιμοποιούν μόνο τη γλυκόζη ως καύσιμο. Ακριβώς εξ' αυτού του κυρίαρχης σημασίας ρόλου της γλυκόζης, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης [McArdle W. D et al, 2000]. Η συγκέντρωση της στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [Stryer L, 1997].

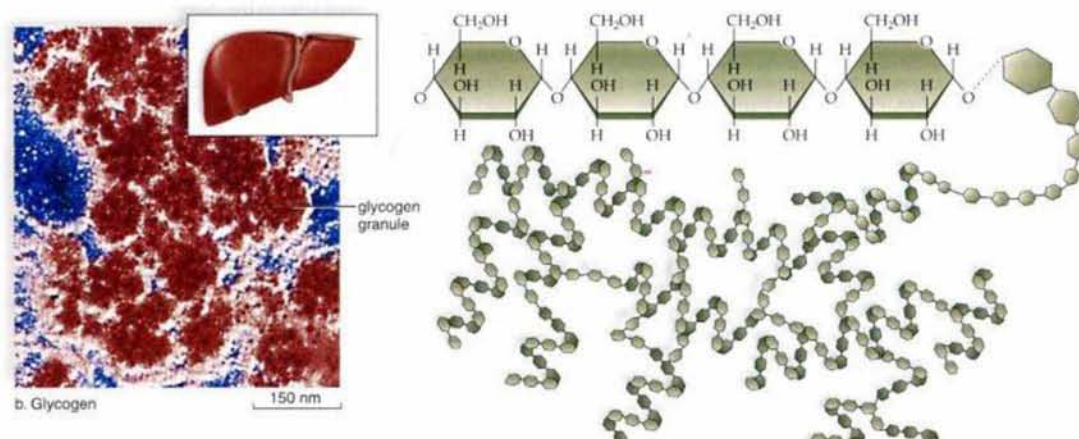
Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή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

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

## **2.2. Γλυκογόνο**

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





**Εικόνα 8.** Η δομή του γλυκογόνου

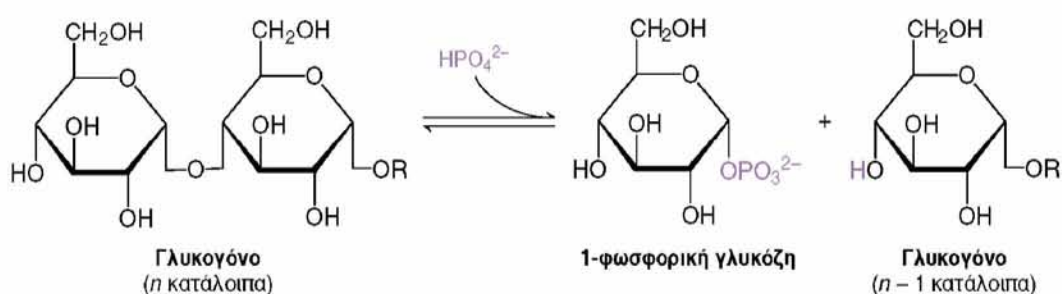
Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς, ρόλος του γλυκογόνου είναι να ρυθμίσει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον, η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι σε γενικές γραμμές μεγαλύτερη συγκριτικά με τους μύες, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί είναι που θα αποθηκευτεί τελικώς η μεγαλύτερη ποσότητα γλυκογόνου [Stryer L, 1997].

### 2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl και Gerty Cori περί το έτος 1936. Το ζεύγος Cori απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης [Cori C.F. & Cori G.T, 1936]. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ( GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), για την απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση (Εικόνα 9).

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η

γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και διατηρείται η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα [Stryer L, 1997].



**Εικόνα 9.** Αποικοδόμηση γλυκογόνου (Stryer 1997).

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

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

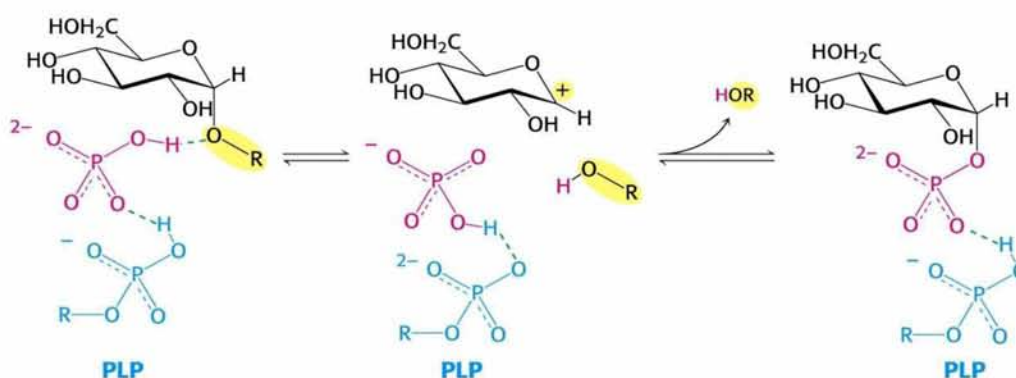
### 2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση



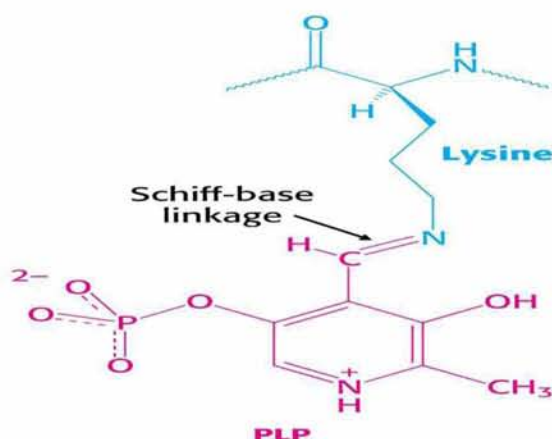
αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο [Stryer L, 1997]. Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, είναι ενδεικτικό του ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από τη λυσοζύμη (Εικόνα 10) [Stryer L, 1997].

### Ενδιάμεσο καρβοκατιόντος



**Εικόνα 10.** Απεικονίζεται ο μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα  $HPO_4^{2-}$  (κόκκινο) εννοεί τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και εννοείται με τη μεταφορά ενός πρωτονίου από την πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης φωσφορικής πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης (Stryer, 1997).

Μια δεύτερη ένδειξη για την ακριβέστερη κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ήτοι ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου (Εικόνα 11). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, κατά πάσα πιθανότητα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης [Stryer L, 1997].



**Εικόνα 11.** Η PLP (η οποία απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (όπως απεικονίζεται στο σχέδιο με μπλε χρώμα) στο ενεργό κέντρο της φωσφορύλασης (Stryer, 1997).

# Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

## 3.1 Γενικά

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

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

Εξετάζοντάς την δομικός, η GP είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97KDa (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε συγκεντρώσεις τέτοιου μεγέθους, ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, συγκριτικά με σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B6. Με βάση σωρεία διαφορετικών πειραμάτων τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε παρελθόντα χρόνο, αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την δραστηριότητα του ενζύμου [Oikonomakos N. G et al, 1992]. Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής, το αλλοστερικό κέντρο, το νέο αλλοστερικό και το αποθηκευτικό κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μία κοιλότητα



δημιουργούμενη ανάμεσα στην αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή της εκάστοτε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο, τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν θα έρθουν σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου, όχι, όμως και η υδρόλυση αυτού, αποκλείοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τα μόρια του H<sub>2</sub>O. Τα πιο ουσιωδέστερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP είναι δύο στον αριθμό. Το πρώτο εκ των δύο, είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), η οφειλόμενη στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και στην κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο εκ των σημείων είναι η παρουσία του συνεχζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη, ως απαραίτητη προϋπόθεση. Η φωσφορική πυριδοξάλη είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες περί τον μηχανισμό της κατάλυσης της αντίδρασης εμφανίζεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης, αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την διαδικασία της καταλύσεως [McLaughlin P.J et al, 1984].

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υφίσταται κι ευρίσκεται σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα τους. Το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης είναι εκείνο που καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση [Stryer L, 1997].

Φυσιολογικά, η δραστηριότητα της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση μετά από έναν ορμονικό καταιγισμό διαδοχικών αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP<sub>a</sub> (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G,(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP<sub>b</sub> (μη φωσφορυλιωμένη GP) [Rath V.L et al, 2000].

### 3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

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

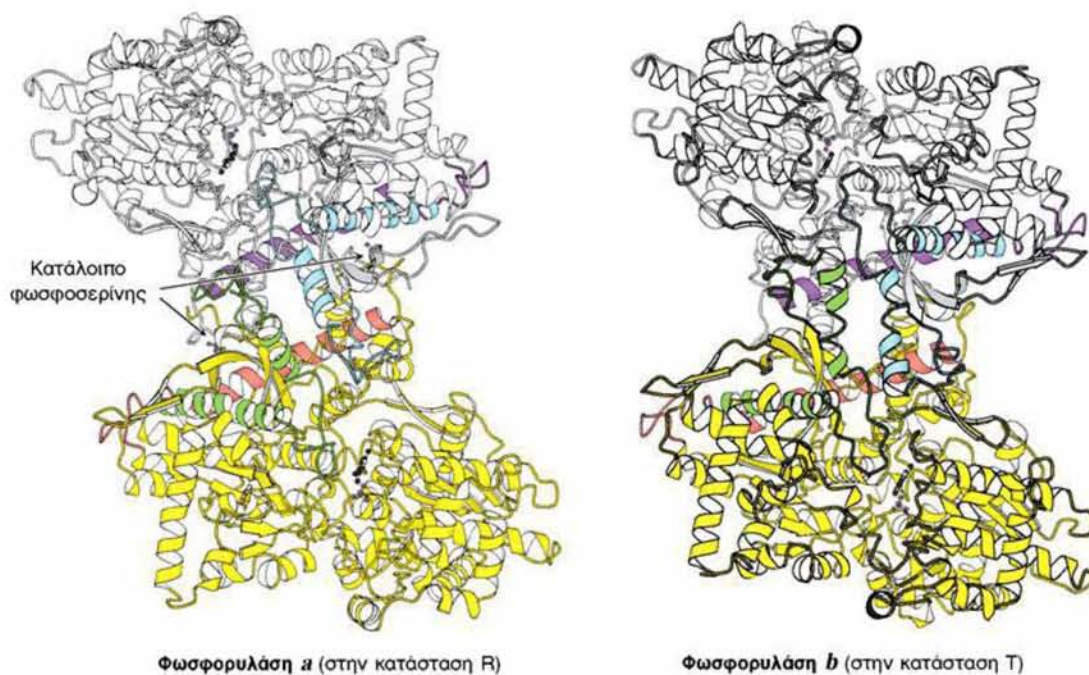
Σε μία γενική προσέγγιση, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του επαγόμενη εκ της συνδέσεως του αλλοστερικού τροποποιητή [Monod J et al, 1963].

Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται αφενός στις ομοτροπικές, εκείνες μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και στις ετεροτροπικές, ήτοι τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πλέον γνωστά και χαρακτηριστικότερα παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Ούτως ειπείν, το μόριο να έχει έναν, τουλάχιστον, άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την T μορφή και τη R μορφή, οι οποίες βρίσκονται στην καθοριζόμενη από την αλλοστερική σταθερά L ισορροπία. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγενειά τους με συγκεκριμένους

υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε εκ των μονομερών δεν επηρεάζει την σύνδεσή του στα υπόλοιπα μονομερή (ήτοι, οι μικροσκοπικές σταθερές διάστασης στα σύμπλοκα μεταξύ μονομερών T ή R διαμόρφωσης και υποστρώματος, είναι, αντιστοίχως, οι ίδιες) [Monod J et al, 1965]. Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία ανάμεσα στις δύο διαμορφώσεις, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών, αλλά και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με γνώμονα τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα [Monod J et al, 1965].

Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται κατ' αναλογία με την περίπτωση η αλλοστερική μετάπτωση να προκαλείται από αναστολέα ή από ενεργοποιητή του ενζύμου. Αξίζει να επισημανθεί ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών [Monod J et al, 1965 & Οικονομάκος Ν.Γ 1977].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια εκ των δύο μορφών αυτής (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής διαμόρφωσης R αφενός και μιας ελαχίστως ενεργού τεταμένης διαμόρφωσης T αφετέρου, εντούτοις η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την διαμόρφωση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την διαμόρφωση T (όπως φαίνεται στην εικόνα 12). Η μετάβαση από τη διαμόρφωση T (αντιπροσωπευόμενη από τη φωσφορυλάση b) στη διαμόρφωση R (αντιπροσωπευόμενη από την φωσφορυλάση a) είναι άρρηκτος συνδεδεμένη με δομικές αλλαγές στις α- έλικες, οι οποίες μετακινούν ένα βρόχο έξω από το ενεργό κέντρο της καθεμιάς εκ των υπομονάδων. Τοιουτοτρόπως, η διαμόρφωση T είναι σε μικρότερο βαθμό ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στη διαμόρφωση R, το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό ιόν είναι ικανοποιητικώς οργανωμένη [Stryer L, 1997].



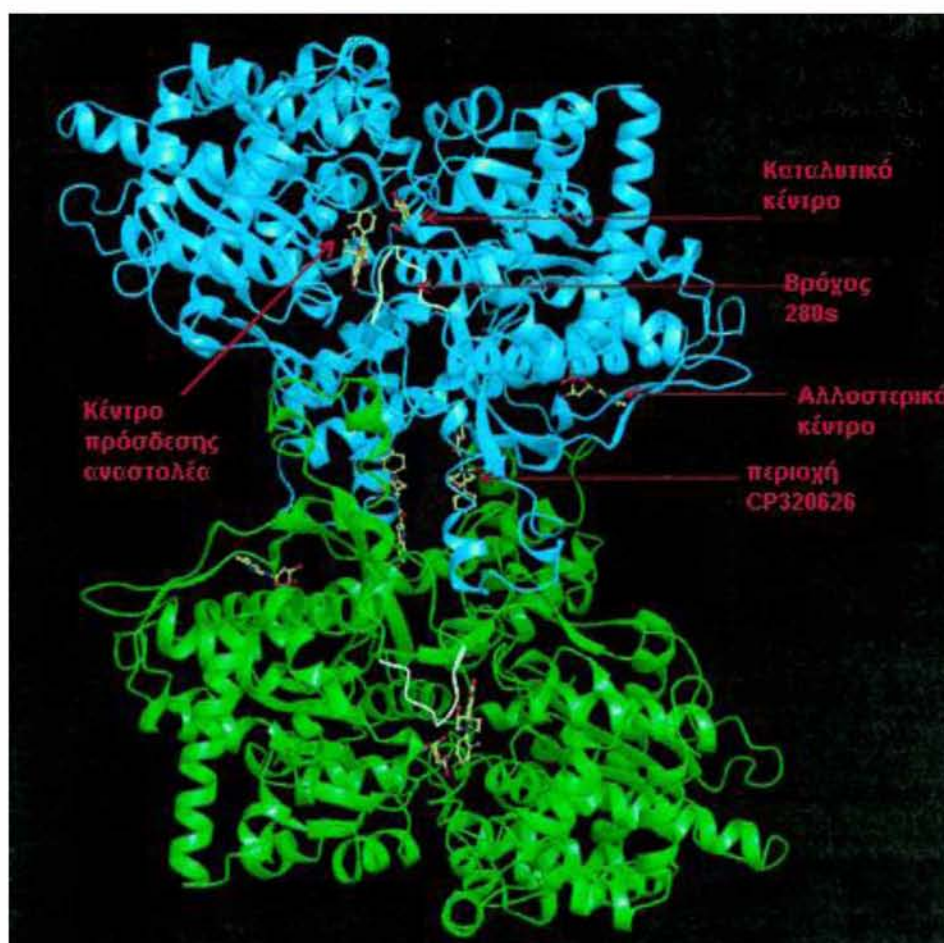
**Εικόνα 12.** Διαφαίνεται στην παρατιθέμενη εικόνα η δομή της φωσφορυλάσης *a* και της φωσφορυλάσης *b*. Η φωσφορυλάση *a* φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 14 της κάθε υπομονάδας. Η υπό ανάλυση τροποποίηση κρίνεται ευνοϊκή της δομής της πλέον ενεργού κατάστασης R. Η μία υπομονάδα απεικονίζεται με χρήση λευκού χρώματος, ενώ οι έλικες και οι θηλιές, οι οποίες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο για την ρύθμιση, απεικονίζονται με χρήση μπλε και κόκκινου χρώματος αντιστοίχως. Η άλλη υπομονάδα παρατίθεται σε κίτρινο χρώμα και οι ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο χρώμα αντιστοίχως. Η φωσφορυλάση *b* δεν φωσφορυλιώνεται και υφίσταται κυρίως στην κατάσταση T (Stryer, 1997).

Η μυϊκή φωσφορυλάση *b* είναι ενεργή μόνο εν τη παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, ενώ η ίδια δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης *b* στην κατάσταση R. Το ATP δρα σε ρόλο ενός αρνητικού αλλοστερικού τελεστή ανταγωνιζόμενου την AMP, ευνοώντας κατ' αυτόν τον τρόπο, την κατάσταση T. Κατά συνεπαγωγή, η μετάπτωση της φωσφορυλάσης *b* από τη διαμόρφωση T στην R και, σε αντίστροφη ερμηνεία, ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου [Stryer L, 1997]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση *b* είναι ανενεργή και αιτία αυτού είναι οι ανασταλτικές επιδράσεις της ATP. Αντιθέτως, η φωσφορυλάση *a* είναι πλήρως ενεργή, ανεξαρτήτως από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μύες εξασφαλίζει την παραμονή της 6-



φωσφορικής γλυκόζης, της παραγόμενης από το γλυκογόνο εντός του κυττάρου για μετασχηματισμό σε ενέργεια.

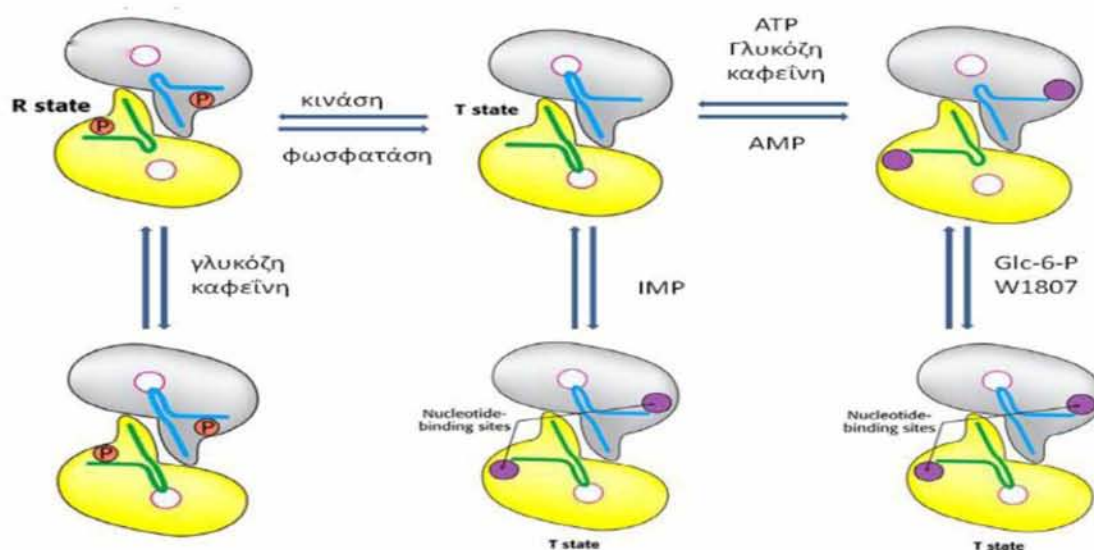
Η δραστικότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από τους αναστολείς, αλλά και τους αλλοστερικούς τροποποιητές οι οποίοι ενώνονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, ήτοι στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο (παρατιθέμενα στην εικόνα 13). Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, η οποία αποτελεί έναν φυσιολογικό αναστολέα, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται τα νουκλεοσίδια και τα νουκλεοτίδια προκαλώντας φραγή του καταλυτικού κέντρου με το να μετατοπίζει την ισορροπία προς την T διαμόρφωση. Τέλος, στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T διαμόρφωση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την R διαμόρφωση, [Οικονομάκος Ν.Γ.2001].



**Εικόνα 13.** Η κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου. Οι αναστολείς εμφανίζονται προσδεμένοι στα κέντρα του ενζύμου, ενώ υποδεικνύεται και η θέση του βρόχου 280s.

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

Η μετατροπή της GPb σε GPa οδηγεί στη δημιουργία ενός ενζύμου το οποίο είναι ενεργό, απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια προς το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P (Εικόνα 14) [Johnson et al., 1989].



**Εικόνα 14.** Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης [Stryer, 1997].

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση a, αλλά όχι η b παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από τη διαμόρφωση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης

στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την διαμόρφωση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο [Stryer, 1997].

### 3.3 Κρυσταλλική δομή της GP

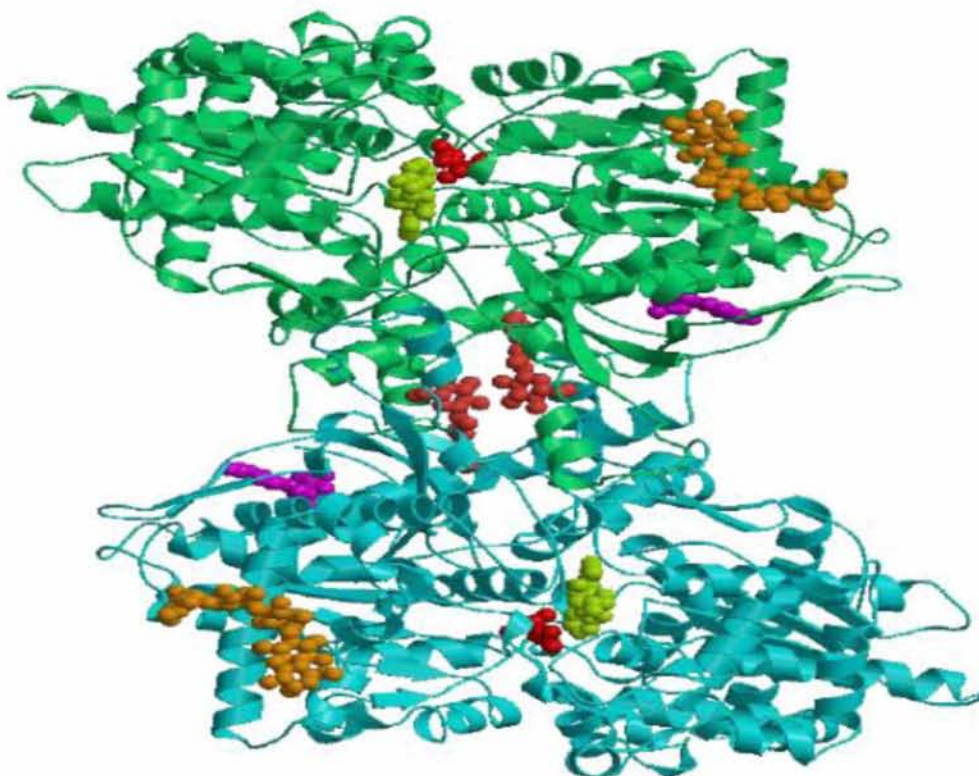
Οι κρυσταλλικές δομές της GP<sub>a</sub> και της GP<sub>b</sub> (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 [Barford & Johnson, 1989]. Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά ύδατος (υπολογίζεται ότι αγγίζουν το 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα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

1. Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
2. Αλλοστερικό κέντρο (N)
3. Καταλυτικό κέντρο (C)
4. Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
5. Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
6. Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων)

Η καθεμία υπομονάδα του διμερούς της GP έχει σχήμα ελλειψοειδές, με διαστάσεις 60x60x55 Å (Εικόνα 15). Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες  $3_{10}$  μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντιστοίχως, και μια έλικα π μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υφίσταται δε μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται αποκλειστικά από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται αποκλειστικά από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το μόριο να παρουσιάζει μία δομή συμπαγή, με ακτίνα 30 Å.



Υπάρχουν μικρές προεξέχουσες περιοχές, καθώς επίσης κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και συμβάλλουν στην επίτευξη επικοινωνίας μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές υπό τις ονομασίες «επικάλυμμα» (cap) και «πύργος» (tower) αντιστοίχως, καθώς επίσης και ο βρόχος 280s (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18) [Oikonomakos et al., 1992].



**Εικόνα 15.** Ένα σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της GP. Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αντιστοιχούν στην έλικα  $\alpha 1$ , στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της έλικας  $\alpha 2$ , αλλά και στην έλικα της περιοχής πύργος, ο βρόχος 280s και η αρχή της έλικας  $\alpha 8$  μαζί με τον βρόχο που συνδέει τις διαμορφώσεις  $\beta 7$  και  $\beta 8$  είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Το απαραίτητο συνένζυμο PLP εντοπίζεται εγκλωβισμένο στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένο με τη Lys680 της έλικας  $\alpha 21$ . Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την GIP, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης έχει πρόσβαση σ' αυτό διαμέσου ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο



υπομονάδων, μεταξύ της ελικών α2 και α8. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την έλικα α12 βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο αναστολής βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτίδια που συνδέονται σε αυτό το κέντρο δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της έλικας α19. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου.

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να χωριστεί σε δυο αυτοτελείς επικράτειες, την 1 και την 2. Η επικράτεια 1, που φέρει και την ονομασία «ρυθμιστική», αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην εν λόγω επικράτεια βρίσκεται το κέντρο φωσφορύλιωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα και, τέλος, ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η επικράτεια 2, γνωστή και υπό την ονομασία «καταλυτική», αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην επικράτεια αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργατικής δράσης (η οποία, να σημειωθεί ότι μπορεί να είναι είτε θετική είτε αρνητική) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων [Fletterick & Madsen, 1980].

### **3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων**

Κατόπιν της επιβεβαίωσης από σειρά βιολογικών μελετών, κατέστη γνωστό ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 [Οϊκονομακος, 2001]. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων αποσκοπούν στην αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή λειτουργεί ως ένζυμο-κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και ο ρόλος της είναι σημαίνων στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Εξ' αυτού του προαναφερθέντος ρόλου της για τον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η

μελέτη της αναστολής της GP αντιμετωπίζεται ως μία διαρκής πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos, 2002].

Να τονισθεί, όμως, ότι η ύπαρξη των τριών ισομορφών (της ηπατικής, της μυϊκής και του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, εγείρει το φλέγον θέμα περί της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Υπαισερχόμενη στο ειδικότερο ζήτημα της μείωσης των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος άνευ επηρεασμού, όμως, των δυο άλλων ισομορφών [Somsak et al., 2008]. Ακριβώς εκ της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, ενδέχεται να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση αποκλειστικά και μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παραβλέποντάς όμως όλα τα ανωτέρω, αφού το ήπαρ αποτελεί το βασικό όργανο εκθέσεως σε φάρμακα, τα οποία προσλαμβάνονται δια του στόματος, είναι απαραίτητο να καθίσταται εφικτή η εύρεση και επίτευξη της κατάλληλης δόσεως φαρμάκου, στοχεύοντας πρώτα και κύρια στο ήπαρ [Oikonomakos et al., 2008].

Μεγάλο ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη, από την κλινική προσέγγιση του ζητήματος, είναι πιθανό να εμφανίζουν ορισμένοι ισχυροί αναστολείς του ίδιου ενζύμου. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια -η οποία, όπως έχει διαπιστωθεί, διαθέτει ομολογία κατά ποσοστό που αγγίζει το 80%, ως προς την ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP- όπως μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί και δη σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με τη γλυκόζη -η οποία διαθέτει τη λειτουργία ενός φυσιολογικού ρυθμιστή, έχει και αυτή προσδιορισθεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει, άλλωστε, χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Κατ' αυτή τη διαδικασία, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αρχικά αναμενόταν ότι θα καταλάμβαναν έναν αριθμό διαμορφώσεων με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης, ενώ εν συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί, επίσης, αναλύσεις με ακτίνες X προς διαπίστωση του ενδεχομένου και του βαθμού, στον οποίο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν, κατά κανόνα, εγγύς στους ήδη προβλεφθέντες, ωστόσο η συγγένεια σύνδεσης δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως καλύτερη συγκριτικά με

εκείνη για την οποία πραγματοποιήθηκε μέτρηση σχετικά με τη γλυκόζη. Εντούτοις, τα αποτελέσματα κατάφεραν να παράσχουν κατευθυντήριες γραμμές με στόχο τον σχεδιασμό έτι πιο ισχυρών αναστολέων [Blundell et al., 2002].

Απώτερος στόχος της διεξαγόμενης έρευνας είναι η εύρεση ενός αναστολέα, μιμούμενου την δράση της γλυκόζης και δρώντος σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από αυτήν –αφού, σαφώς, προϋποτίθεται να καθίσταται δυνητικά αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν- χωρίς, όμως, να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Αν ήθελε θεωρηθεί ότι η ενδεικνυόμενη δόση προς χορήγηση σε έναν μέσο ενήλικα είναι 300 mg, θα απαιτηθεί στην περίπτωση αυτήν ένας αναστολέας με  $K_i \approx 1 \mu\text{M}$ , με σκοπό την ικανότητά του να μιμηθεί τη δράση 30-50mM γλυκόζης [Witters & Avtuch, 1978] , ως προς τη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Διά του υπολογισμού εξάγεται η υπόθεση ότι σύνολο του φαρμάκου αγγίζει πράγματι την επίτευξη του στόχου του.

### ***3.5. Διαδικασία επεξεργασίας εκχυλίσματος πολυφαινολών από απόβλητα ελαιοτριβείου και παρασκευή ξηρής σκόνης με τη χρήση συσκευής ξήρανσης υπό κενό.***

Κατά τη διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο οι υψηλά πολικές πολυφαινόλες (ένα μεγάλο ποσοστό περίπου 98%) παραμένουν στον κασίγαρο ο οποίος και χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για την εξαγωγή των πολυφαινολών. [Rodis P.S et al., 2002]

Οι κυριότερες πολυφαινόλες του ελαιοκάρπου είναι η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη, οι οποίες είναι και οι δύο παράγωγα του αντιοξειδωτικού ελευροπαΐνη. Αυτά τα φαινολικά ιχνοστοιχεία είναι από τα πιο ισχυρά φυσικά αντιοξειδωτικά. [Obied H.K et al.,2005] Οι πολυφαινόλες, οι τοκοφερόλες και άλλα φυσικά αντιοξειδωτικά που βρίσκονται στον ελαιόκαρπο, είναι γνωστό ότι αποτρέπουν την οξείδωση λιπιδίων και τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών στον οργανισμό που προκαλούν βλάβη στους ιστούς.

Ο διαβήτης έχει φανεί ότι ενεργοποιεί διαφορετικούς και πολύπλοκους μηχανισμούς με μια υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών και πολλών άλλων διαταραχών, ασκώντας επιβλαβείς επιδράσεις σε όργανα που δρουν στη ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος. Λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης τους, οι πολυφαινόλες ελιάς αναφέρθηκε πως είχαν αντιδιαβητικές προοπτικές. Σε πειράματα που έχουν γίνει, ανακτήθηκαν η

υδροξυτυροσόλη και η ολεουροπεΐνη και εξερευνήθηκαν *in vivo* σε αρουραίους για τη δυνατότητά τους να αποτρέπουν τον διαβήτη που προκαλείται από την αλλοζάνη [Jemai et al., 2009]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάλυση των παραμέτρων του γλυκοσιδικού και οξειδωτικού στρες (πίνακας 1). Οι ενώσεις αυτές αποκαθιστούν σημαντικά τη γλυκόζη που κυκλοφορεί στο αίμα και το γλυκογόνο του ήπατος σε ζώα που έλαβαν θεραπεία με αλλοζάνη. Αυτό το φαινόμενο συνδέθηκε με την αποκατάσταση της συνολικής χοληστερόλης στον ορό και στις ουσίες που μειώνουν το θειοβαρβιτουρικό οξύ στο ήπαρ.[Bouallagui Z. et al, 2012]

**Πινάκας 1. Αντιδιαβητική και αντιοξειδωτική δραστηριότητα των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων (ολεουροπεΐνη και υδροξυτυροσόλη) από φύλλα ελιάς.**

Treatment	P G ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	H G ( $\text{mg}/\text{g}$ )	TC ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	TBARS( $\text{M mol}/$ $100\text{mg}$ )
Control	1.05	10.6	98	12
Diabetic control	2.9	6	168	17.2
Oleuropein	1.5	16	105	13.1
Hydroxytyrosol	1.55	14.6	107	12.8

**PG** (plasma glucose), **HG** (hepatic glycogen), **TC** (total cholesterol), **TBARS** (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances)

Η διαδικασία για την απομόνωση των πολυφαινολών σε υγρή μορφή από φυτικά νερά ελαιολαιού περιλαμβάνει την χρήση τεχνικών φυγοκέντρησης, μικροδιάλυσης, αντίστροφης όσμωσης, διαχωρισμού με εκλεκτικές μακροπορώδεις ρητίνες και συμπύκνωσης με κενό.

Για την παραγωγή ξηρής σκόνης πολυφαινόλης χρησιμοποιήθηκε συσκευή ξήρανσης speedvac της εταιρίας Thermo Scientific του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



# Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

## 4.1. Αρχές ενζυμικής κινητικής

Οι Michaelis και Menten ήταν εκείνοι που έθεσαν τη βάση για την ανάπτυξη περαιτέρω θεωριών περί της κινητικής των ενζυμικών αντιδράσεων και αφορά κυρίως στη μέτρηση χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου  $V_{\max}$ ,  $K_m$ , αλλά και με την μέτρηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι:

- A) η συγκέντρωση του ενζύμου,
- B) η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (όπως είναι τα προϊόντα αντιδράσεων, τα συνένζυμα, οι ενεργοποιητές και οι αναστολείς),
- Γ) το pH,
- Δ) η θερμοκρασία και
- Ε) η ιοντική ισχύς.

Για να εκφρασθεί η ενεργότητα ενός ενζύμου, E, πρέπει να δοθεί η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Στην πιο απλή των περιπτώσεων, κατά την οποία ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, η ταχύτητα, V, ορίζεται ως το ποσό του υποστρώματος, S, το οποίο καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων, P, τα οποία δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου και υπολογίζεται από την **εξίσωση Michaelis-Menten:**

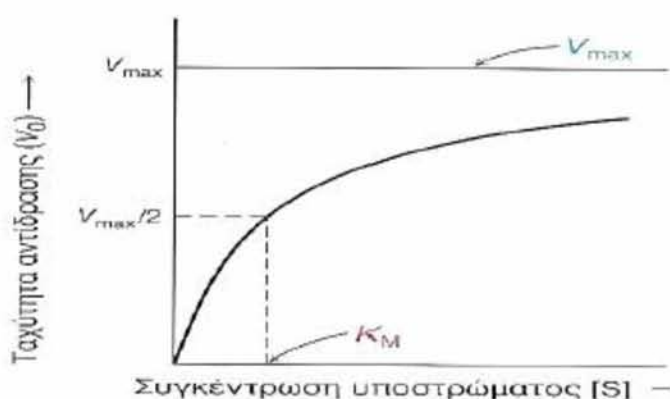
$$V_0 = V_{\max} \left( \frac{[S]}{K_m + [S]} \right)$$

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

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

Από την **εξίσωση Michaelis-Menten** συνάγεται ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης θα εξαρτηθεί από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές

ενζυμικές αντιδράσεις, κατά τις οποίες ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας,  $V_0$ , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος,  $[S]$ , είναι μια ορθογώνια υπερβολή (Εικόνα 17). Παρατηρείται ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος –ήτοι κινητική πρώτης τάξεως,  $V_0=k[S]$ -, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα σταθεροποιείται και έτσι καθίσταται ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος –ήτοι της κινητικής μηδενικής τάξεως,  $V_0=k$ - και προσεγγίζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας,  $V_{max}$ . Η **σταθερά Michaelis** είναι η συγκέντρωση υποστρώματος, στην οποία υφίσταται το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Κατά την ανωτέρω διαδικασία δύναται να εξαχθεί το συμπέρασμα περί συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.



**Εικόνα 16. Κινητική Michaelis-Menten:** Εδώ εμφανίζεται ένα διάγραμμα της ταχύτητας ( $V_0$ ) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , σχετικά με ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten. Από την απεικόνιση προκύπτει ότι η μέγιστη ταχύτητα ( $V_{max}$ ) προσεγγίζεται ασυμπτωματικώς. Η σταθερά Michaelis ( $K_m$ ) είναι η συγκέντρωση στην οποία η ταχύτητα ίση με  $V_{max}/2$  (Stryer, 2007).

Οι καταλυτικές σταθερές  $K_m$  και  $V_{max}$  είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή  $K_m$  αποτελεί σταθερά για ένα ένζυμο με ένα ορισμένο υπόστρωμα κάτω από καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, και θα εκφρασθεί σαν συγκέντρωση. Αντίθετα, η  $V_{max}$  εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και για τον λόγο αυτόν είναι εκφρασθείσα ως ταχύτητα σχηματισμού P ανά μονάδες ενζύμου (π.χ.  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  πρωτεΐνης).

Μια σταθερά, η οποία χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερος χρήσιμη, είναι ο αριθμός ανακύκλωσης δηλαδή η  $k_{cat}$ , που ορίζεται ως  $k_{cat} = V_{max} / [ET]$ . Η  $k_{cat}$  αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό moles του υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου υπό συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε sec<sup>-1</sup>. Τέλος η σταθερά εξειδίκευσης,  $k_{cat} / K_m$  ο λόγος δύο σταθερών, εκφράζεται σε M<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup> και είναι ενδεικτική της αποδοτικότητας του ενζύμου.

## 4.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Όταν μια ουσία προξενεί την παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζεται αναστολέας. Ένας αναστολέας θα είναι δυνητικά είτε αντιστρεπτός είτε μη αντιστρεπτός. Αντιστρεπτός χαρακτηρίζεται ο αναστολέας που δύναται να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα (λ.χ. με διαπίδυση) και, αφότου αφαιρεθεί, το ένζυμο δυνητικά θα επανακτήσει την δραστηριότητά του. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας σε χημική αντίδραση με κάποιο στοιχείο ενεργού, είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος είτε εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Ο αναστολέας σε αυτή την περίπτωση δεσμεύεται συνήθως με ομοιοπολικό δεσμό και δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπια μέσα όπως είναι η διαπίδυση. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, με τρόπο που να εξασφαλίζει μια κατάσταση ισορροπίας όπως στη σχέση I είναι ο αναστολέας και EI το σύμπλοκο ενζύμου αναστολέα :



Η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI ή, διαφορετικά πεφρασμένο, η σταθερά της αμφίδρομης πιο πάνω αντίδρασης, δίνει την σχέση:

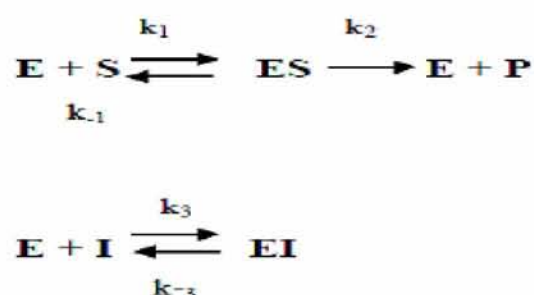
$$K_i = \frac{[EI]}{[E][I]}$$



Η σταθερά Michaelis  $K_m$  συνιστά μέτρο της αγκιστείας ή της συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα, η σταθερά  $K_i$  είναι το ακριβώς αντίστροφο της αγκιστείας του ενζύμου- αναστολέα.

#### 4.2.1. Συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition)

Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου έτσι ώστε να σχηματίζεται εμπόδιο περί της διελύσεως στο υπόστρωμα S, τότε τα I και S συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας θα κληθεί συναγωνιστικός



Το σχήμα των αντιδράσεων εντός του συστήματος εμφανίζεται ως εξής: Από τη σχέση  $[E] = [E]_t - [ES] - [EI]$  παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου  $[E]$  είναι ίση με τη συγκέντρωση του ολικού ενζύμου  $[E]_t$  μείον τη συγκέντρωση του ενζύμου το οποίο δεσμεύεται με το υπόστρωμα  $[ES]$ . Στην περίπτωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα αναγκαστικά θα χρειασθεί να ελαττωθεί η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου και κατά το ποσό που είναι ενωμένο με τον αναστολέα I, δηλαδή :

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

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

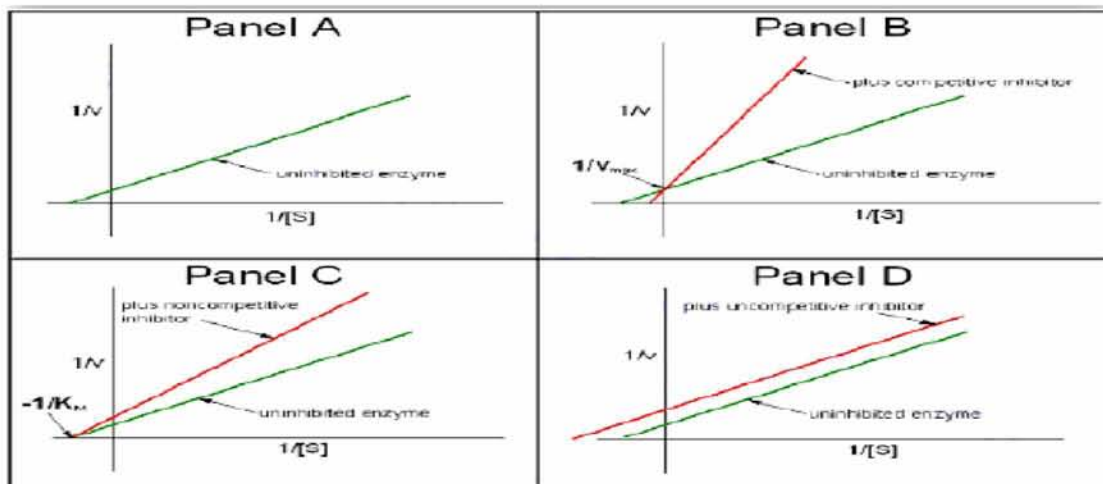
$$\mathbf{V = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m([I]K_i + 1)}}$$



Γίνεται αντιληπτό ότι η μέγιστη ταχύτητα  $V_{\max}$  δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της **σταθεράς Michaelis** μεγαλώνει κατά ποσό  $([I]K_i + 1)$ . Σε περίπτωση που η συγκέντρωση του αναστολέα είναι μηδέν, ή σε περίπτωση που η σταθερά  $K_i$ , η οποία ορίζεται ως η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI, είναι πολύ μικρή, άρα υπάρχει μικρή αγχιστεία μεταξύ ενζύμου και αναστολέα, δεν διαφαίνεται η αναστολή, με αποτέλεσμα η  $K_m$  να χαρακτηρίζεται φυσιολογική. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι τέτοιου βαθμού, ήτοι η  $[S]$  πάει να πάρει την τιμή που παρέχει η μέγιστη ταχύτητα, ώστε ο όρος  $K_i$  να μηδενίζεται εκ νέου, με συνέπεια η φυσιολογική  $V_{\max}$  να παραμένει αμετάβλητη. Εκ της μορφής του παρονομαστή στην εξίσωση, επομένως, η μεγαλύτερη αναστολή παρουσιάζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα, ήτοι η τιμή της  $[I]$ , είναι υψηλή ή όταν η τιμή της  $[S]$  είναι χαμηλή. Το αντίθετο θα ισχύσει, συνεπώς, περί της εξαφανίσεώς της: η αναστολή εξαφανίζεται σε περίπτωση που η συγκέντρωση του αναστολέα είναι ιδιαίτερος χαμηλή ή σε περίπτωση που η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι σημειώντως υψηλή. [Γεωργάτσος Ι. Γ., 2001].

Πέραν της συναγωνιστικής αναστολής, σημειώνονται τα εξής:

- 1. Μη συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition):** Στην πρώτη διακριτή κατηγορία, αντί ο αναστολέας να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ένζυμου, ήτοι στο ενεργό κέντρο, δεσμεύεται αντ' αυτού σε διαφορετική περιοχή.
- 2. Μικτή αναστολή (mixed inhibition):** Εν προκειμένω, στους αναστολείς, οι σταθερές **διαστάσεως** του S από το ES διαφέρουν από εκείνη του S από το EIS. Κατ'αυτόν τον τρόπο, οι  $K_m$  και η  $V_{\max}$  μεταβάλλονται.
- 3. Ανταγωνιστική αναστολή (uncompetitive inhibition):** Στην τρίτη περίπτωση αναστολής, η δέσμευση του αναστολέα λαμβάνει χώρα κατ' αποκλειστικότητα στο σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος.



*Εικόνα 17. Οι εικονιζόμενοι εδώ συναγωνιστικοί αναστολείς αυξάνουν την κλίση της καμπύλης στις ψηλότερες τιμές  $1/v$  άνευ ταυτόχρονης μεταθέσεως του σημείου τομής στην τεταγμένη. Δι' αυτού ακριβώς, η μεν  $V_{\max}$  παραμένει σταθερή, ενώ η  $K_m$  αυξάνεται.*

## Σκοπός εργασίας

Ο αυξανόμενος αριθμός ασθενών που πάσχουν από τον διαβήτη τύπου 2 γεννά την ανάγκη επιστημονικών ερευνών, που στοχεύουν στον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, . Τα φάρμακα αυτά θέτουν ως στόχο ένζυμα και υποδοχείς με συμμετοχή στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος, με απώτερο σκοπό την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 [Kurukulasuriya et al, 2003].

Το ήπαρ είναι ένα όργανο με λειτουργικό σκοπό την αποκατάσταση των ενεργειακών αναγκών των έτερων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP, LiverGP), ένζυμο που δρα για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, κατατάσσεται στους μοριακούς στόχους για τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τον έλεγχο υπεργλυκαιμίας στον διαβήτη τύπου 2. Η αναστολή του προαναφερθέντος ενζύμου δύναται αποδεδειγμένα να συμβάλλει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου, καθώς επίσης στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης του αίματος του εκάστοτε ασθενούς.

Η φωσφορυλάση και η γλυκοκινάση αποτελούν δύο ένζυμα που σε πρώτη εξέταση εμφανίζονται να έχουν πρωτεύοντα ρόλο στον έλεγχο της ρύθμισης της απελευθερωμένης από τα ηπατικά κύτταρα γλυκόζης [Agius et al., 2001].

Η παρατιθέμενη διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου προς επιπλέον κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και τον σχεδιασμό δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Ο σχεδιασμός με βάση τη μακρομοριακή δομή, η σύνθεση, η βιοχημική και βιολογική μελέτη της ουσίας συνθέτουν σήμερα μία σειρά εργασιών με κοινό στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη συγγένεια για την πρωτεΐνη-στόχο.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη εκχυλισμάτων από απόβλητα ελαιολιτριβείου για τον προσδιορισμό της  $IC_{50}$  έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.

Παρόλο που πρωταρχικό στόχο αποτελεί η ηπατική GP, το κρυσταλλογραφικό πρότυπο στο οποίο στηρίζεται ο σχεδιασμός ενώσεων στην παρούσα διατριβή είναι η μυϊκή GP. Η ηπατική GP είναι ομόλογη (ως προς

την αμινοξική ακολουθία) σε ποσοστό 80% με την μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων ανέρχεται στο 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου.



## Πειραματικό μέρος

### 5.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου *b* από σκελετικούς μυς κουνελιού:

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

#### Υλικά:

- Κουνέλια ποικιλίας *Oryctolacus cunicullus* (3 αρσενικά μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO<sub>3</sub>)
- Διάλυμα οξικού οξέος CH<sub>3</sub>COOH 1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%, 3.6M
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρης-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/HCl 0.001M] (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M (αρύθμιστου pH)
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH 7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH 7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH 7.0
- Διάλυμα (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% w/v NaCO<sub>3</sub> και 10mM EDTA στους 100°C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 20% αιθανόλη στους 4°C )

**Όργανα:**

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

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

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 3 κουνέλια. Οι μυς αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα **30 λεπτά**. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

**Βήμα 2ο: Ώξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων**

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1 N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολερότητα του εκχυλίματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρωση (5000 rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κορεσμένο  $\text{KHCO}_3$  και ογκομέτρηση του διαλύματος.

**Βήμα 3ο: Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο**

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε 1 L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για περίπου 16 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρωση στα 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris

0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

#### **Βήμα 4ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH**

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

#### **Βήμα 5ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση**

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη AMP 0.1 M (pH 7.0) και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 1 M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, (το AMP και το (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6 h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg.

#### **Βήμα 6ο: Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου**

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

αποθηκεύεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2. Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου:

### 5.2.1. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb:

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

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου  $\text{Glycogen}_{(n)}$ , προς  $\text{Glycogen}_{(n-1)}$  και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης glucose-1-P.



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η αντίθετη αντίδραση. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, δηλαδή μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα ( $\text{P}_i$ ) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

#### Πορεία:

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται και λαμβάνεται το εναιώρημα ένζυμου περιεκτικότητας  $\sim 500 \mu\text{g/mL}$ . Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25  $\mu\text{g}$  ενζύμου / mL, γλυκογόνο 0.2% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου 5% (v/v). Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται επίσης το υπόστρωμα για  $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$  2.0mM με προσθήκη 200 $\mu\text{L}$  υποστρώματος  $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$  9.0 mM, 18  $\mu\text{L}$  AMP 50 mM και 502  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (κατάλληλο για τέσσερα δείγματα).

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση στους  $30^{\circ}\text{C}$  επί 15 λεπτά και το υπόστρωμα επί περίπου 3 λεπτά. Μετά την επώαση, 180  $\mu\text{L}$  από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις



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

### 5.2.2. Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ) της GPb:

Η σταθερά Michaelis-Menten ( $K_M$ , mM) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης ( $V_{max}$ ). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α-D- Glc-1-P).

#### Πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 5% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D- Glc-1-P 2.0, 4.0, 6.0, 10 και 20 mM, με προσθήκη 200 μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα α-D- Glc-1-P, 18μL AMP 50 mM και 502 μL H<sub>2</sub>O.

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

1',2',3',4') λαμβάνονται δείγματα των 200  $\mu\text{L}$  από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 $\mu\text{L}$  SDS 1.0% w/v .

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

### **5.3. Προσδιορισμός της τιμής της $IC_{50}$ Αναστολέα:**

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

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

Η σταθερά  $IC_{50}$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του  $IC_{50}$  και για συγκεκριμένη συγκέντρωση  $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$  (1-φωσφορικής γλυκόζης).

#### **Υλικά :**

- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης ( $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ ) 18 mM
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50 mM

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης (β- GP), 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Γλυκογόνο 1 % (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1 mM, pH= 6.8
- Διάλυμα του αναστολέα

#### **Όργανα:**

- Υδατόλουτρο ( ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία πάντα στους 30 °C.)
- Φασματοφωτόμετρο (ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 850 nm)
- Δοκιμαστικούς σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Συσκευή vortex
- Συσκευή μέτρησης pH (pHμετρο)
- Χρονόμετρο

#### **Πορεία :**

##### **5.3.1. Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου:**

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

Εν συνεχεία παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα το οποίο περιέχει 25 μg/mL GPb, γλυκογόνο 10% w/v, και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 5% v/v, έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: ένζυμο 5.0 μg/mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2 % w/v και υπόστρωμα α-D- Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης και αναστολέα

μεταβαλλόμενης. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση 15 min σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 30 °C.

### 5.3.2. Παρασκευή διαλύματος υποστρωμάτων:

#### Αξιολόγηση εκχυλισμάτων από απόβλητα ελαιοτριβείου σε υδατικό διάλυμα

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η  $IC_{50}$ , και σταθερή συγκέντρωση  $\alpha$ -D- Glc-1-P 9 mM και AMP 50mM ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180  $\mu$ l) η συγκέντρωση της  $\alpha$ -D- Glc-1-P να είναι 4 mM και της AMP 1 mM. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720  $\mu$ L (Πίνακας 2). Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

Πίνακας 2:

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
$\alpha$ -D- Glc-1-P [9mM]	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
AMP [50mM]	18 $\mu$ L	18 $\mu$ L
Αναστολέας	-	X $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	502 $\mu$ L	720-(200+18+X) $\mu$ L
Τελικός όγκος (V <sub>T</sub> )	720 $\mu$ L	720 $\mu$ L

Τα διαλύματα υποστρώματος τοποθετούνται πριν την εκτέλεση του πειράματος στο υδατόλουτρο ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ενζυμικό διάλυμα.



### **5.3.3. Εκτέλεση του Πειράματος:**

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180  $\mu\text{l}$  από το ενζυμικό μίγμα στον χρόνο 0 σε κάθε διάλυμα υποστρώματος όγκου 720  $\mu\text{L}$ , ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολουθώντας, ανά 1 λεπτό (σε χρόνους 1', 2', 3', 4'), λαμβάνονται από 200  $\mu\text{L}$  και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50  $\mu\text{L}$  SDS 1% w/v. Έτσι σταματά η ενζυμική αντίδραση, αφού παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μία διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5 ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρηση τους σε μήκος κύματος 850nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των Pi που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit, προκειμένου να προσδιοριστεί η IC<sub>50</sub>. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά  $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ , λόγω της φυσικής υδρόλυσης της, αλλά και του ενζυμικού διαλύματος, λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών ιόντων.

### **5.4. Προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων:**

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

#### **5.4.1. Μέθοδος ασκορβικού οξέος [Saheki et al, 1985]:**

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

#### **Υλικά**

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

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

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

#### **Πορεία:**

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

#### **5.5. Παρασκευή τυφλών:**

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

- Τυφλό νερού για τον μηδενισμό του φωτομέτρου.
- Τυφλό με την συγκέντρωση της  $\alpha$ -D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται, λόγω της

φυσικής υδρόλυσης της.

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

### **5.6. Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων-πρόγραμμα GrafIt:**

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της  $\alpha\text{-D- Glc-1-P}$  και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό μείγμα) μετατρέπονται σε  $\mu\text{mol}$  φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ,  $\text{mol}$ ) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten,

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

V: ταχύτητα

$V_{\max}$ : μέγιστη ταχύτητα

[S]: συγκέντρωση υποστρώματος

$K_m$ : σταθερά Michaelis-Menten.

Τέλος, γίνεται η καμπύλη  $V=f([S])$ , η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ της  $V_{\max}$ . Στον προσδιορισμό της σταθεράς  $IC_{50}$ , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα

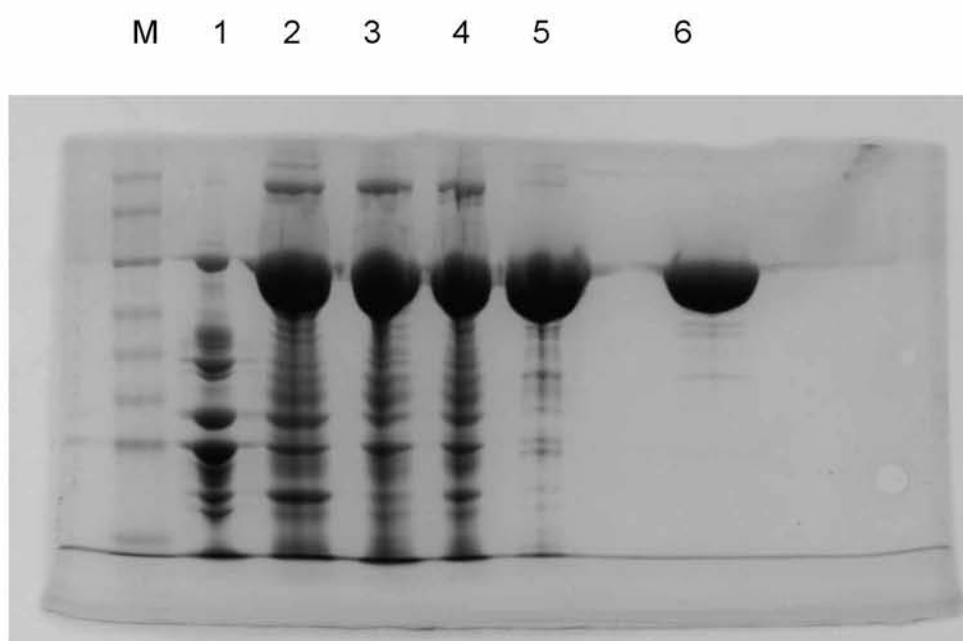
μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστικότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.



## Αποτελέσματα

### 6.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (βλ. §5.1).



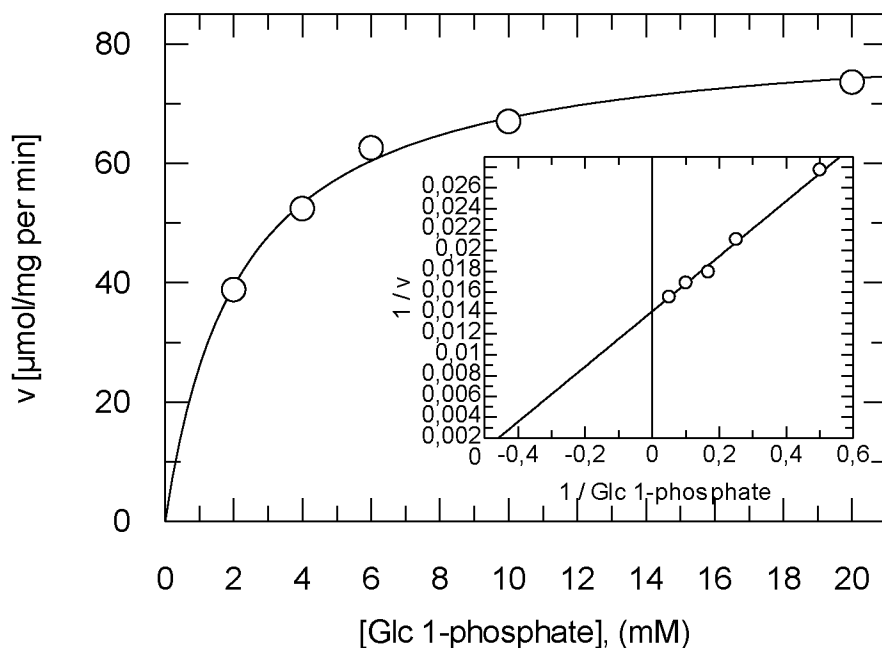
**Εικόνα 18.** Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην πέμπτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα κατά την τέταρτη ανακρυστάλλωση. Στην τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη (GPb).

## 6.2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

### 6.2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου

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

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι:  $K_m=2,18 \pm 0,18$  mM και  $V_{max}=82,3 \pm 1,83$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Στην εικόνα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity,  $\mu\text{mol}$  φωσφορικών /  $\text{min}/\text{mg}$  ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος ( $\alpha\text{-D- Glc-1-P}$ ).



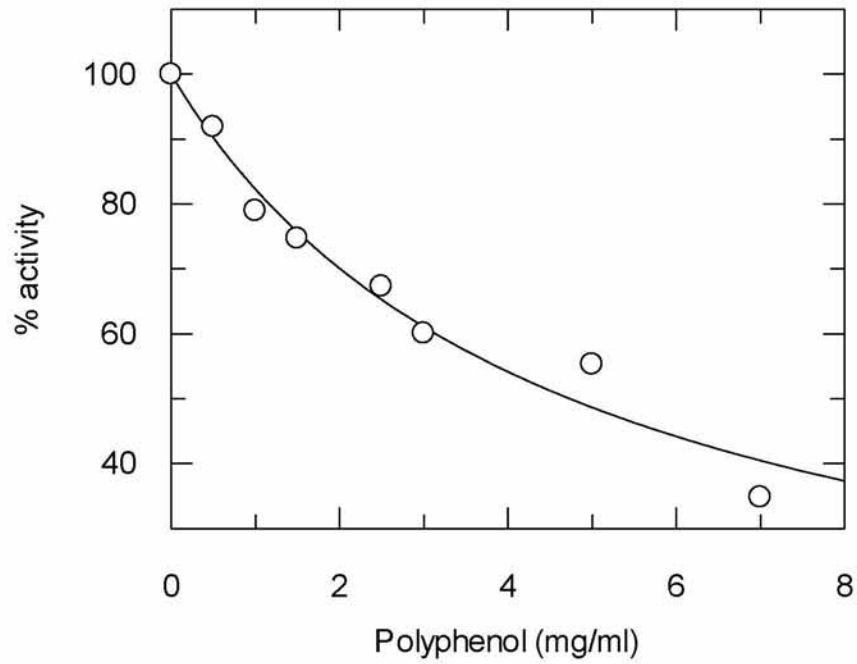
**Εικόνα 19.** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης  $b$  του γλυκογόνου σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

### 6.2.2. Κινητική μελέτη εκχύλισματος πολυφαινόλων από απόβλητα ελαιοτριβείου.

Για το σκοπό της εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου μελετήθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα από απόβλητα ελαιοτριβείου ως προς την ικανότητά του να αναστέλλει τη δράση του ενζύμου. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και η γραφική παράσταση που προέκυψε από το πρόγραμμα Graffit [Leatherberrow,1997]. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφεται το εκχύλισμα που μελετήθηκε, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της  $IC_{50}$  καθώς και η τιμή της  $IC_{50}$ .

Εκχύλισμα	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (mg/ml)	$IC_{50}$ (mg/ml)
Πολυφαινόλες από απόβλητα ελαιοτριβείου	0,5mg/ml, 1mg/ml, 1,5mg/ml, 2,5mg/ml, 3mg/ml, 5mg/ml, 7mg/ml	4,73 ± 0,42

*Πίνακας 3: Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή μελετών για τον προσδιορισμό των  $IC_{50}$  των υπό μελέτη εκχυλισμάτων*



*Εικόνα 20. Καμπύλη της δραστικότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της  $IC_{50}$ .*

Parameter	Value	Std. Error
$IC_{50}$ (mg/ml)	4,73	0,42



## Συμπεράσματα

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας ως προς την ανασταλτική επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η βιοχημική μελέτη της GP στοχεύει στην κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών παραγόντων για τη θεραπεία του ΣΔτ2.

Για να εκτιμηθεί η ανασταλτική ικανότητα του εκχυλίσματος ελαιοτριβείου πραγματοποιήθηκαν κινητικά πειράματα με τη φωσφορυλάση b του γλυκογόνου από μύες κουνελιού (RMGPb), προς τη κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, *in vitro*. Η κινητική μελέτη έδειξε ότι παρουσιάζουν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% ( $IC_{50}$ ), σε σημαντικά υψηλές συγκεντρώσεις. Το εκχύλισμα ελαιοτριβείου που μελετήθηκε δε δείχνει να αναστέλλει σημαντικά τη GPb, μιας και εμφανίζει σταθερά αναστολής  $IC_{50}=4,73 \pm 0,42$  mg/mL.

Η μετέπειτα εφαρμογή μεθόδων κρυσταλλογραφίας, των παραπάνω εκχυλισμάτων, για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, θα μας βοηθήσει να ταυτοποιήσουμε τις βιοδραστικές ενώσεις αυτού του εκχυλίσματος καθώς και τα κέντρα σύνδεσής τους στο ένζυμο.

# Βιβλιογραφία

## ΞΕΝΗ

- Alberti KG1, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diab Med* 1998 Jul;15(7):539-53
- Agius L., Aiston S., Hampson L. Gomez-Foix A.M. Guinovart J.J., (2001). Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis. *J Biol Chem* 276:23858–23866.
- American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes, *Diabetes Care* 2015;38(Suppl. 1):S8–S16 | DOI: 10.2337/dc15-S005
- Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.
- Betterle C, Zanette F, Pedini B, Presotto F, Rapp LB, Monciotti CM et al. Clinical and subclinical organ-specific autoimmune manifestations in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients and their first-degree relatives. *Diabetologia* 1983; 26: 431-36.
- Blundell T. L., Jhoti H. & Abell C., (2002). High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, *Nature Reviews, Drug Discovery*, Volume 1.
- Bouallagui Z, Mohamed BOUAZIZ et al : Valorization of Olive Processing By-Products: Characterization, Investigation of Chemico-Biological Activities and Identification of Active Compounds. 22-1, 61 -64 (2012)
- Cori C. F. & Cori G. T., (1936), Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new ester, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 34, 702-705.
- Fiske C. H. & Subbarow Y., (1925), The colorimetric determination of phosphorous, *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.
- Fletterick R. J. & Madsen N. B., (1980). The structures and related functions of phosphorylase  $\alpha$ , *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 31-61.

- Ganong WF. Review of Medical Physiology, 9<sup>th</sup> ed. Los Altos, California: Lange Medical Publications, 1979 : 271
- Hother-Nielsen O, Faber O, Sørensen NS, Beck-Nielsen H. Classification of newly diagnosed diabetic patients as insulin-requiring or non-insulin-requiring based on clinical and biochemical variables. Diabetes Care 1988; 11: 531-37.
- Japan and Pittsburgh Childhood Diabetes Research Groups. Coma at onset of young insulin-dependent diabetes in Japan: the result of a nationwide survey. Diabetes 1985; 34: 1241-46
- Jemai H., El Feki A., Sayadi S. (2009): Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(19): 8798–8804.
- Johnson L. N. & Hajdu J., (1989), Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals, Biophysics & Synchrotron Radiation, Hasnain S. ed, 142-155, Ellis Horwood, Chichester.
- Karam JH. Salber PR, Forsham PH. Pancreatic hormones and diabetes mellitus. In Greenspan FS, Forsam PH, eds, Basic and Clinical Endocrinology. 2<sup>nd</sup> ed. Los Altos, California: Lange Medical Publications, 1986 : 529-30
- Kenneth ft Feingold, MD, & Janet L. Funk, MD, Παθολογική Φυσιολογία, Stephen McPhee σελ. 643-653
- Kim C. Gestational diabetes: risks, management, and treatment options Int J Womens Health 2010; 2:339-351.
- Kurukulasuriya R., Link J.T., Madar D.J., Pei Z., Richards S.J., Rohde J.J., Souers A.J. and Szczepankiewicz B.G. (2003). Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of the hepatic glucose production. Current Medicinal Chemistry, 10, 123-153.
- Leatherbarrow, R. J., (1997), Using linear and non-linear regression to fit biochemical data, TIBS, 15, 455-458.
- Martin J. L., Johnson L. N. & Withers S. G., (1990), Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, Biochemistry, 29, 10745-10757

- McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., (2000). *Essentials of Exercise Physiology*, Τόμος Ι, Έκδοση 2η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχάλιδης Π. Χ.
- McLarty DG, Athaide I, Bottazzo GF, Swai ABM, Alberti KGMM. Islet cell antibodies are not specifically associated with insulin-dependent diabetes in rural Tanzanian Africans. *Diabetes Res Clin Pract* 1990; 9: 219-24
- McLaughlin P.J., Stuart D.I., Klein H.W., Oikonomakos N.G., Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873.
- Melpidou A. E. & Oikonomakos N. G., (1983), Effects of glucose-6-P on the catalytic and structural properties of glycogen phosphorylase  $\alpha$ , *FEBS Lett.*, 154, 105-110.
- Mølbaek AG, Christau B, Marner B, Borch-Johnsen K, Nerup J. Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in age groups over 30 years in Denmark. *Diabet Med* 1994; 11: 650-55.
- Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., (1963). Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329.
- Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118.
- Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K., Stockmann R. (2005): Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4): 823-837.
- Oikonomakos N. G., Acharya K. R. & Johnson L. N., (1992). Post-Translational Modifications of Proteins, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-127.
- Oikonomakos N. G., Somsak L. *Curr. Opin.*, (2008) *Invest. Drugs*, 9, 379.
- Oikonomakos N.G., (2002). Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586. p 1-41.
- Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J., (2000), Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. *Chemistry and Biology*, 7, No 9, 677-682.



- Rodis P.S., Karathanos V.T., Mantzavinou A. (2002): Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3): 596-601.
- Saheki, S., Takeda, A. & Shimazu, T., (1985), Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity, *Anal. Biochem.*, 148, 277-281.
- Segel, L.H., (1975), *Enzyme kinetics*, Wiley interscience, New York.
- Somsak L., Czifrak K., Toth M., Bokor E., Chrysina E. D., Alexacou K. M., Hayes J. M., Tiraidis C., Lazoura E., Leonidas D. D., Zographos S. E., Oikonomakos N. G. (2008). New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983.
- Stryer L., (1997). *Βιοχημεία*, Τόμος Ι, Έκδοση 2η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Unger RH, Orci L. Glucagon secretion and metabolism in man. In: DeGroot LJ ed. *Endocrinology*, 2<sup>nd</sup> ed Vol II, Philadelphia : WB. Saunders Comp, 1989: 1318-32
- Witters L. A. & Avruch J., 1978, Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase, *Biochemistry*, 17, 406-410.
- Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay R, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Med* 1994; 11: 299-303.
- Zimmet PZ. The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. *Diabetes Care* 1995; 18: 1050-64.

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Γεωργιάτσος Ι.Γ. (2005). Εισαγωγή στη βιοχημεία. Έκδοση 6<sup>η</sup>. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη.
- Γκίμπα – Τζιαμπίρη Ολυμπία. Η φυσιολογία του ανθρώπου, τόμος τρίτος, Εκδόσεις Ζυγός, Θεσσαλονίκη, 2001: σελ 99-101.
- Καραμήτσος ΔΘ. Σακχαρώδης διαβήτης. Από την θεωρία στην πράξη. 2η έκδοση Θεσσαλονίκη: Εκδ Α. Σιώκη 1987:50
- Κούτρας ΔΑ. Εισαγωγή στην Ενδοκρινολογία. Αθήνα: Εκδ. Γ. Παρισιάνος, 1983: 299
- Ζαρκογιάννη Κ, “Ευφυή Συστήματα Υποστήριξης Εξατομικευμένων Ιατρικών Αποφάσεων για τη Διαχείριση του Σακχαρώδους Διαβήτη”, Διδακτορική Διατριβή, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, ΕΜΠ, 2011
- Οικονομάκος Ν. Γ. (1977). Χημική τροποποίηση ενός αλλοστερικού ενζύμου, Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ
- Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, Χημικά Χρονικά, 63, 258-261

## **ΠΗΓΕΣ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟΥ**

- [http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014\\_EN.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_EN.pdf)
- <http://www.ede.gr/wp-content/uploads/2012/11/dt.pdf>
- <http://www.ede.gr/wp-content/uploads/2012/odigies.pdf> Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία
- [https://www.idf.org/sites/default/files/EN\\_6E\\_Ch1\\_What\\_is\\_diabetes.pdf](https://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Ch1_What_is_diabetes.pdf)
- [WHO/IDF consultation 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia](#)