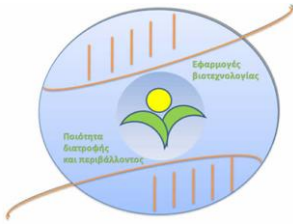




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΜΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Αναγνώριση του αναστολέα φυτικής προέλευσης της φωσφορυλάσης
του γλυκογόνου με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

Επιβλέπουσα: Σκαμνάκη Βασιλική

ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ - ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2025

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	7
1.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	7
1.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1	7
1.3 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2	8
1.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	9
1.5 ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	12
2.1 ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	12
2.2 ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	15
ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ	16
3.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΣ	16
3.2 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ.....	17
3.3 ΤΡΟΠΟΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ.....	17
3.4 ΧΑΡΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ	18
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ.....	20
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	20
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	21
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	26

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που με βοήθησαν και στήριξαν αυτή την πορεία.

Πρώτα και κύρια, ευχαριστώ την επιβλέποντα καθηγήτρια, κ. Σκαμνάκη Βασιλική για την καθοδήγηση, τις χρήσιμες παρατηρήσεις και την ανεκτίμητη υποστήριξή της. Η στήριξή της με βοήθησε να παραμείνω συγκεντρωμένη.

Ευχαριστώ την μητέρα μου και την αδερφή μου για την αμέριστη υποστήριξη και την πίστη τους σε μένα, ακόμα και όταν εγώ αμφέβαλλα για τις δυνάμεις μου. Οι ώρες συζητήσεων, τα λόγια ενθάρρυνσης και η αγάπη τους ήταν το πιο δυνατό κίνητρο για να συνεχίσω.

Επιπλέον, ευχαριστώ τους φίλους μου για τις ατελείωτες ώρες στήριξης και τις πολύτιμες συζητήσεις που κάναμε κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Χωρίς την παρέα τους και την υποστήριξή τους, αυτή η εμπειρία θα ήταν πολύ πιο δύσκολη.

Αφιερώνω την συγκεκριμένη εργασία,
Στην μνήμη του μπαμπά μου
Ιωάννη Χατζόπουλου.

Περίληψη

Η εργασία αυτή εξετάζει τη διαδικασία αναγνώρισης αναστολέων φυτικής προέλευσης για την φωσφορυλάση του γλυκογόνου με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα σημαντικό ένζυμο που συμμετέχει στην αποδόμηση του γλυκογόνου, απελευθερώνοντας γλυκόζη στον οργανισμό. Η αναστολή της δράσης του ενζύμου μπορεί να συμβάλει στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, κάτι που έχει σημαντική κλινική αξία, ιδιαίτερα για την αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας και του διαβήτη.

Στο πλαίσιο της εντατικοποιημένης έρευνας για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά του διαβήτη, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αναγνωρίζεται ως ένας από τους βασικούς στόχους για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη αντιδιαβητικών παραγόντων. Η μελέτη των φυσικών ενώσεων που μπορούν να αναστείλουν την δραστηριότητα αυτού του ενζύμου, και η ανάλυση των δομικών τους χαρακτηριστικών μέσω της κρυσταλλογραφίας, αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ενώσεων και την ορθολογική ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Στην παρούσα εργασία εφαρμόζοντας την προσέγγιση κρυσταλλογραφίας συγγένειας με τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων στοχεύουμε στην αναγνώριση της βιοδραστικής ένωση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του κλάσματος φαινολικών από εκχύλισμα ανθέων του βρώσιμου φυτού κουρκουτζελιού του γένους της οικογένειας των ασπαραγοειδών. Με βάση τα αποτελέσματα προτείνεται η ένωση ξανθίνη ως πιο πιθανή να προσδένεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Περαιτέρω κινητικές μελέτες και ανάλυση των συστατικών του εκχυλίσματος χρειάζονται για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας.

Abstract

This work explores the identification of plant-derived inhibitors of glycogen phosphorylase using X-ray crystallography. Glycogen phosphorylase is an important enzyme involved in the breakdown of glycogen, releasing glucose into the body. Inhibition of its activity can help reduce blood glucose levels, which is of significant clinical importance, particularly in managing hyperglycemia and diabetes. Within the context of intensified research into new anti-diabetic drugs, glycogen phosphorylase is recognized as a key target for the design and development of novel anti-diabetic agents. The study of natural compounds that can inhibit this enzyme's activity, along with structural analysis through X-ray crystallography, represent a crucial step towards discovering new pharmaceutical scaffolds and the rational drug design. In the present work through an affinity crystallography approach, with the use of the appropriate software we aim to identify the bioactive compound against the enzyme glycogen phosphorylase of the phenolic fraction from the flower extract of the edible plant *Koukoytzeli* belonging to the family of Asparagaceae. Based on the results, the compound xanthine is suggested as the most likely to bind the enzyme's inhibitor site. Further *in vitro* kinetic studies and chemical analysis of the extract components are needed to confirm the results.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται την αναγνώριση του αναστολέα φυτικής προέλευσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με κρυσταλλογραφία ακτινών Χ. Κύριο ένζυμο για την αποδόμηση του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η αναστολή της γλυκογονόλυσης μέσω της δράσης αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου βοηθάει στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα για την αναζήτηση καινούργιων αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων έχει εντατικοποιηθεί. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου χρησιμοποιείται ως μοριακός στόχος για την δημιουργία καινούριων αντιδιαβητικών παραγόντων, Η αναγνώριση φυσικών ενώσεων που αναστέλλουν την δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και η δομική μελέτη των συμπλόκων τους με το ένζυμο στοχεύουν στην ανακάλυψη νέων χημικών ικριωμάτων αξιοποιήσιμων στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) έχει σαν χαρακτηριστικό του την χρόνια υπεργλυκαιμία, η οποία είναι αποτέλεσμα των ετερογενών μεταβολικών διαταραχών. Το αίτιο της μεταβολικής διαταραχής μπορεί να οφείλεται είτε στην μη φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης είτε στην μη φυσιολογική δράση της ινσουλίνης ή μπορεί να οφείλεται ακόμα και στα δυο (Astrid Petersmann et al 2019). Ο σακχαρώδης διαβήτης διακρίνεται σε δύο κύριες κατηγορίες, τον διαβήτη τύπου 1 και τον διαβήτη τύπου 2 (Michael Roden et al 2019).

1.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1

Χαρακτηριστικό του διαβήτη τύπου 1 (ΣΔ1) είναι η έλλειψη ινσουλίνης και η υπεργλυκαιμία (Astrid Petersamann et al. 2019). Κύριο χαρακτηριστικό του ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 είναι η αυτοάνοση

καταστροφή των β- παγκρεατικών κυττάρων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 αναφέρεται περίπου στο 5-10% των πασχόντων με ΣΔ (Γεώργιος Α. Στραβοδήμος 2018).

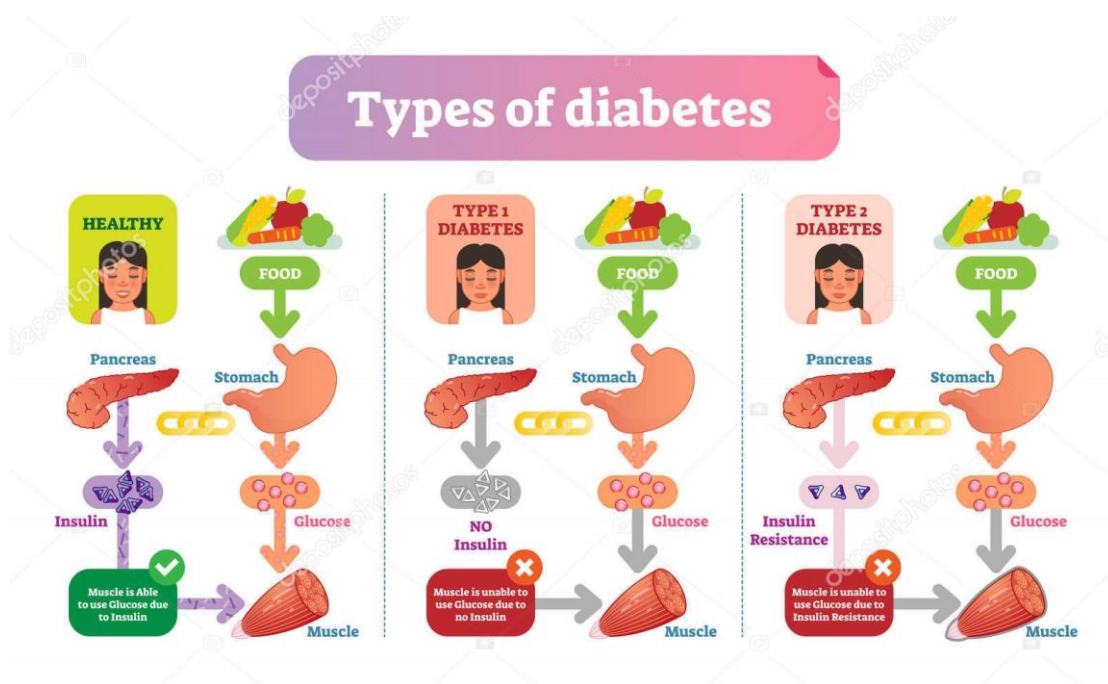
1.3 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι γνωστός και με την ονομασία του μη ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη ή διαβήτη των ενηλίκων και χαρακτηρίζεται από την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά της υπεργλυκαιμίας έχει αυξηθεί λόγω του αυξανόμενου επιπολασμού του διαβήτη τύπου 2. (ED Chrysina, 2010).

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, γνωστός και ως μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβητής ή διαβητής των ενηλίκων, χαρακτηρίζεται από την αντίσταση στην ινσουλίνη. Επιπλέον, παρατηρείται ότι ο διαβήτης τύπου 2 εμφανίζεται και πιο συχνά στα παιδιά. Οι έρευνες σε παιδιά έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη κοινών χαρακτηριστικών με τον διαβήτη τύπου 2 που παρατηρούνται σε μεγαλύτερες ηλικίες, όπως είναι η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η μείωση της δραστηριότητας των β-κυττάρων του παγκρέατος. (Angelica Artasensi et al, 2020).

Ο διαβήτης τύπου 2 ευθύνεται για πάνω από το 90% των περιπτώσεων διαβήτη και προκαλεί τόσο μικροαγγειακές όσο, μακροαγγειακές και δευτερεύουσες επιπλοκές οι οποίες προκαλούν σοβαρά προβλήματα στην υγεία. Παρά την αυξανόμενη συχνότητα του διαβήτη τύπου 2, η ενίσχυση της ενημέρωσης σχετικά με τους παράγοντες κινδύνου για την ασθένεια μπορεί να συμβάλει στην επιτυχία των προγραμμάτων πρόληψης. Οι προληπτικοί έλεγχοι, που πραγματοποιούνται μέσω κατάλληλων προγραμμάτων ανίχνευσης, καθώς και η προσφορά ασφαλών και αποτελεσματικών θεραπειών, είναι κρίσιμα εργαλεία για τη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης της νόσου και της θνησιμότητας, βοηθώντας στην πρόληψη ή καθυστέρηση των επιπλοκών (Sudesna Chatterjee et al., 2017).



Εικόνα 1: [Τύποι διαβήτη απλή ιατρική διανυσματικά εικονογράφηση](#)
[καθεστώ. Διάγραμμα ιατρικές πληροφορίες. Διάγραμμα από ©VectorMine](#)
[194443164](#)

1.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

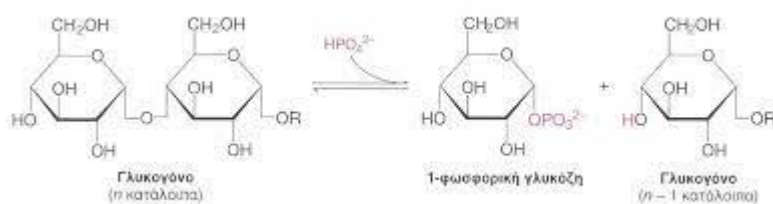
Το γλυκογόνο αποτελεί ένα διακλαδισμένο πολυμερές της γλυκόζης και έχει σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση γλυκόζης στον οργανισμό (Peter J. Roach et al., 2012). Οι κύριες αποθήκες γλυκογόνου στα θηλαστικά βρίσκονται στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες. Η αποθήκευση της γλυκόζης με τη μορφή γλυκογόνου πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα του ήπατος και των σκελετικών μυών, ενώ σε μικρότερο ποσοστό μπορεί να αποθηκευτεί και στον εγκέφαλο. Η μετατροπή του γλυκογόνου σε γλυκόζη, καθώς και η αντίστροφη διαδικασία, επιτυγχάνεται μέσω της γλυκογονόλυσης και γλυκογένεσης αντίστοιχα. (Shibani Kanungo et al., 2018).

Η ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου υπόκειται σε διαφορετικούς ελέγχους στους δύο ιστούς μυς και το ήπαρ λόγω του διαφορετικού ρόλου στους δύο τύπους ιστών. (Peter J. Roach, 2002).

Η περαιτέρω αξιολόγηση *in vitro* με τη χρήση επιλεγμένων αναστολέων σε ηπατοκύτταρα από ανθρώπους και αρουραίους έδειξε σημαντικές ανασταλτικές ιδιότητες σε πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες. (David Goyard et al., 2016).

1.5 ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, είναι αλλοστερικό ένζυμο που καταλύει το πρώτο στάδιο του καταβολισμού του γλυκογόνου (Euthimios kiriakos ., 2020).

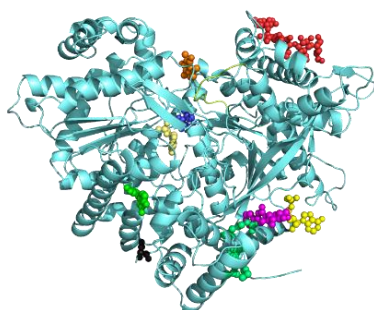


Εικόνα 2: $\text{Glycogen}(n) + \text{Pi} \rightarrow \text{Glycogen}(n-1) + \text{glucose-1-P}$

Υπάρχουν 3 κύριες ισομορφές: α) η ηπατική φωσφορυλάση, β) η μυϊκή φωσφορυλάση, γ) η φωσφορυλάση του εγκεφάλου. (Papakostopoulou ., 2022)
Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί υποσχόμενος μοριακό στόχο για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 2.

Επτά διαφορετικά κέντρα σύνδεσης μορίων έχουν βρεθεί στο ένζυμο του γλυκογόνου της φωσφορυλάσης, όπως είναι: 1) Το καταλυτικό κέντρο, 2) Το κέντρο αναστολής, 3) Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, 4) Το αλλοστερικό κέντρο, 5) Το νέο αλλοστερικό κέντρο, 6) Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης, 7) Το κέντρο πρόσδεσης του βενζιμιδαζολίου. (Papakostopoulou., 2022).

Σχήμα 1:



Μοντέλο τρισδιάστατης δομής του μονομερούς της gmGb (το καταλυτικό κέντρο χρωματίζεται με μπλε, το κέντρο αναστολής με πορτοκαλί, το αλλοστερικό κέντρο με κίτρινο, το νέο αλλοστερικό κέντρο με σκούρο πράσινο, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου με κόκκινο, το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης με πράσινο, το κέντρο του βενζαμιδαζολίου με μωβ, η PLP με αχνό κίτρινο, η Ser14 με μαύρο και ο βρόχος 280s με αχνό κίτρινο απεικονίζονται στο μονομερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, το οποίο χρωματίζεται με γαλάζιο.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (PG) είναι το κεντρικό ένζυμο που συμμετέχει στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας γλυκογονόλυσης. Το γλυκογόνο, το οποίο αποθηκεύεται στο ήπαρ και στους μύες ως ένα πολυμερές μόριο γλυκόζης, αποτελεί θεμελιώδη παράγοντα στην εξασφάλιση ενέργειας για τους μύες κατά την εκτέλεση σωματικής δραστηριότητας (Marta Migocka – Patrzalek et al., 2021).

Τα αντιυπεργλυκαιμικά φάρμακα εξετάζονται προσεκτικά, με έμφαση στην αναζήτηση ενζύμων που μπορούν να δημιουργήσουν ισχυρούς δεσμούς. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ως αλλοστερική πρωτεΐνη, έχει πολλά κέντρα σύνδεσης μικρών μορίων (Εικόνα). Οι αλλοστερικές επιδράσεις και οι δομικές αλλαγές που επέρχονται από τη δέσμευση μορίων, επηρεάζουν τη βιολογική δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί σημαντικά βήματα στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης των αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, γεγονός που έχει βοηθήσει στην ανάλυση της

δομής αυτών των αναστολέων, τόσο για τους μύες όσο και για το ήπαρ. (L. Somsak et al., 2008).

Στον άνθρωπο υπάρχουν τρία ισοένζυμα φωσφορυλάσης, τα οποία εκφράζονται στους ιστούς των μυών, του ήπατος και του εγκεφάλου. Σε αντίθεση με τα ισοένζυμα που αναφέρονται στους μύες και τον εγκέφαλο και υποστηρίζουν τις λειτουργίες αυτών των ιστών, το ηπατικό ισοένζυμο ρυθμίζει τις γλυκαιμικές ανάγκες του οργανισμού στο σύνολό του. (Virginia L. Rath et al., 2000).

Τα τελευταία δέκα χρόνια, έχει επιβεβαιωθεί ότι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί έναν σημαντικό στόχο για τους υπογλυκαιμικούς παράγοντες. Οι αναστολείς της ενζυμικής αυτής δραστηριότητας έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί, όπως δείχνουν βιολογικές μελέτες που ενισχύουν τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και συμβάλλουν στη ρύθμιση της ισορροπίας του γλυκογόνου στο ήπαρ. Ως συνέπεια αυτής της ανακάλυψης, πολλές φαρμακευτικές και βιοτεχνολογικές εταιρείες έχουν καταθέσει πλήθος διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας, με στόχο την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών παραγόντων, οι οποίοι συνεχώς αυξάνονται τα τελευταία χρόνια (διδακτορική διατριβή AL Katsandi et al., 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

2.1 ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Η ανάπτυξη της βιομηχανίας φαρμάκων, υγιεινών τροφίμων και καλλυντικών προωθεί τη μελέτη των φυσικών προϊόντων και των βιολογικών τους επιδράσεων. Ένα σημαντικό ποσοστό των σύγχρονων επιστημονικών ερευνών επικεντρώνεται στα φυτικά προϊόντα και στις θεραπευτικές τους ιδιότητες. Ιδιαίτερη σημασία δίδεται στην ανακάλυψη φυσικών ενώσεων με αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, ανοσοδιεγερτική, νευροπροστατευτική και ηπατοπροστατευτική δράση. Ορισμένα από αυτά τα φυτικά προϊόντα, των οποίων τα οφέλη δεν ήταν ευρέως αναγνωρισμένα μέχρι πρότινος, έχουν αποδείξει τη χρησιμότητά τους μέσω πρόσφατων μελετών (Halina Maria Ekiert et al., 2020).

Η χρήση των φυσικών προϊόντων στην ανάπτυξη φαρμάκων έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας. Οι θετικές και αρνητικές επιδράσεις τους εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις γενετικές παραλλαγές των ατόμων στη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική. Σε σύγκριση με τα συνθετικά χημικά φάρμακα, η δόση των φυσικών προϊόντων μπορεί να βελτιστοποιηθεί, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα και μειώνοντας την τοξικότητα, με βάση τα φαρμακογενετικά χαρακτηριστικά.

Πολλές εργασίες επικεντρώνονται στη μελέτη των γενετικών παραλλαγών που επηρεάζουν το μεταβολισμό των φαρμάκων, τις αλληλεπιδράσεις με φαρμακολογικούς στόχους και τη σύνδεση των φυσικών προϊόντων με τη φαρμακογονιδιωματική. Οι γνώσεις αυτές επιτρέπουν την προσαρμογή των δοσολογικών σχημάτων σύμφωνα με τις φαρμακοκινητικές και φαρμακογενετικές παραμέτρους (Tai Rao et al., 2019).

Τα φυσικά προϊόντα είναι πλούσια σε ενώσεις που συμβάλλουν στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Τα τελευταία 20 χρόνια, η χρήση τους έχει περιοριστεί λόγω τεχνικών περιορισμών στις δοκιμές υψηλής απόδοσης με μοριακούς στόχους. Παρ' όλα αυτά, νέες τεχνικές εξελίξεις έχουν μειώσει αυτά τα εμπόδια, επιτρέποντας την αξιοποίηση των φυσικών προϊόντων. Η γονιδιωματική και μεταβολική προσέγγιση ενισχύει τις παραδοσιακές μεθόδους, διευκολύνοντας την ανακάλυψη αντιμικροβιακών φαρμάκων και αναστολέων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών (Alan L. Harvey et al., 2015).

2.2 ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

Τα φυτικά εκχυλίσματα ή προσαρμογόνα προέρχονται από διάφορα φυτά και ενισχύουν την αντοχή του οργανισμού σε φυσικά φορτία, χωρίς να αυξάνουν την κατανάλωση οξυγόνου. Συνδέονται με την ικανότητα του σώματος να προσαρμόζεται στο άγχος και να διατηρεί τη σταθερότητα των μεταβολικών διεργασιών, βελτιώνοντας την απόδοση του οργανισμού.

Η έννοια των «προσαρμογόνων» εισήχθη το 1947 από τον Σοβιετικό επιστήμονα Lazarev και αναφέρεται σε ουσίες που δεν προκαλούν αντιστάσεις στους οργανισμούς, με θετικές αντιδράσεις για ανθρώπους και ζώα. Τα φυτικά εκχυλίσματα συνεχίζουν να μελετώνται και να αξιολογούνται για μελλοντικές

εφαρμογές (Velislava T et al., 2021). Η αναγνώριση των βιοδραστικών ουσιών των φυσικών εκχυλισμάτων είναι ζητούμενο και απαιτεί την εφαρμογή προηγμένων μεθόδων ανάλυσης

Τα φυτικής προέλευσης προϊόντα καλύπτουν την ανάγκη των ανθρώπων να θεραπεύονται με φυσικές λύσεις. Αυτή η ανάγκη, σε συνδυασμό με την αποτελεσματικότητα και τις ρυθμιστικές δυνατότητες, αποτελεί βασικό στοιχείο της ευρείας χρήσης των φαρμακευτικών φυτών στη σύγχρονη εποχή. Η ποικιλία των ενώσεων που διαθέτουν τα φυτικά εκχυλίσματα, σε συνδυασμό με τις παραδοσιακές και νέες βιολογικές ενέργειες, προσφέρει σημαντικές θεραπευτικές δυνατότητες. Παράλληλα, τα φυτικά εκχυλίσματα ενδέχεται να ενέχουν κινδύνους, καθώς η φαρμακολογική και τοξικολογική τους επιρροή μπορεί να μην είναι πάντοτε κατανοητή. Η έλλειψη τυποποιημένων μεθόδων εκχύλισης και η αβεβαιότητα στις ποιοτικές και ποσοτικές συνθέσεις καθιστούν τις εφαρμογές τους λιγότερο αξιόπιστες (Rafaele C. et al., 2020).

Σύμφωνα με τις καταγραφές από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η ποσότητα των φυτών που έχουν χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς στόχους είναι περίπου στα 20.000. Από όταν ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται τα φυτά για την υγεία του ανθρώπου, η μελέτη των χαρακτηριστικών βιοδραστικότητας των φυτών γίνεται σε εργαστήρια. Αξιοσημείωτες είναι οι μέθοδοι που χαρακτηρίζουν τους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, όπως και η απομόνωση τους, με την καλύτερη και την πιο σωστή υλοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην εναλλακτική ιατρική που θα προσδιορίσει διάφορες βιολογικές δραστηριότητες. Αυτή η μελέτη εξέτασε πόσο χρήσιμα είναι τα συμπληρωματικά ιατρικά υποστηρικτικά προϊόντα αφού έγινε ο προσδιορισμός από τα βιοδραστικά χαρακτηριστικά των φυτών από διάφορες βιοχημικές και μοριακές βιολογικές μέθοδοι (Mehmet O. et al., 2018).

Τα φυτικά εκχυλίσματα, τα οποία περιέχονται στα βοτανικά φάρμακα, είναι πολύπλοκα λόγω των ενώσεων των μειγμάτων τους. Αντίστοιχα, για τα συμβατικά φάρμακα είναι απαραίτητο να επικυρώνεται η αποτελεσματικότητά τους καθώς και η ασφάλειά τους μέσω προκλινικών και κλινικών μελετών.

Παρ' όλα αυτά, οι φαρμακοκινητικές μελέτες για τα βοτανικά φάρμακα, που αφορούν τα ενεργά συστατικά ή τους χαρακτηριστικούς δείκτες τους, είναι περιορισμένες.

Τα ασπαραγοειδή ή Asparagaceae είναι από γυμνόσπερμα φυτά που ανήκουν στην τάξη ασπαραγώδη (Asparagales). Παλαιότερα κατατάσσονταν στην οικογένεια των Liliaceae, αλλά στα σύγχρονα συστήματα ταξινόμησης, αναγνωρίζεται ως ξεχωριστή οικογένεια. Η οικογένεια περιλαμβάνει περίπου 114 γένη και περισσότερα από 2.900 είδη που συναντιούνται σε διάφορα μέρη του κόσμου, κυρίως σε περιοχές με θερμό κλίμα, όπως η Νότια Αφρική, η Μεσογειακή περιοχή και η Κεντρική Αμερική (Chao et al., 2022]. Τα κουρκουτζέλι ή βορβολούλουδα ή ασκορσδούλακος είναι βολβώδες βρώσιμο φυτό με ψιλό μίσχο και μωβ και άσπρα λουλούδια σε σήμα καμπάνας που ανήκει στα γένη *Bellevalia* και *Muscari* και αποτελεί αντικείμενο εθνοβοτανολογικών μελετών. Το κουρκουτζέλι φύεται στην Βόρεια Αφρική και Μεσόγειο. Στον ελληνικό χώρο



τα είδη *Muscari comosum* και *Bellevalia dubia*

είναι μέρος της διατροφής των κατοίκων της Δυτικής Ελλάδας, Κρήτης και Ιονίων Νήσων (Bareka, et al., 2008). Ενώ πιο μελετημένο ως προς τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες είναι εκχυλίσματα βολβών του είδους το *Muscari comosum* Giglio, F.; et al., 2021)

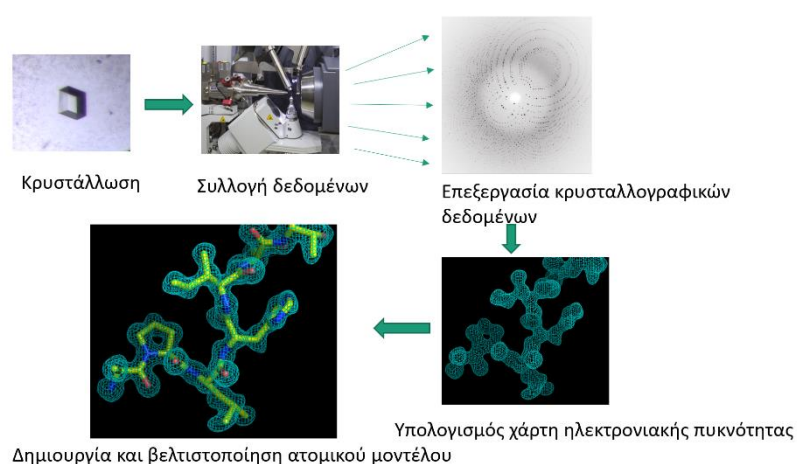
Εικόνα 3: *Bellevalia dubia*

Στην παρούσα εργασία εξετάσθηκε η βιοδραστικότητα έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου κλάσματος φαινολικών ενώσεων από εκχύλισμα ανθέων από το κουρκουτζέλι που συλλέχθηκε από την περιοχή της Ζακύνθου και εκχυλίσθηκε στο εργαστήριο της κ. Γαρδέλη Χρυσαιγής στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

Ως σήμερα, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται απαιτούν χρόνο για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων από διάφορα μείγματα. Ωστόσο, συχνά αυτές οι μέθοδοι δεν είναι επαρκείς για την απομόνωση των ενώσεων που διαθέτουν ισχυρή βιοδραστικότητα. Η χρήση της κρυσταλλογραφίας, μέχρι και την τρέχουσα περίοδο, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της πρόσδεσης συνθετικών ενώσεων σε ειδικούς φαρμακευτικούς στόχους ή για τη σύνθεση απομονωμένων ενώσεων από φυσικά εκχυλίσματα, καθώς και για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης τους. Τα επιμέρους στάδια επίλυσης δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ φαίνονται στο Σχήμα



🔍🔍🔍🔍🔍

Σχήμα 2

3.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΣ

Ως κρύσταλλος ορίζεται ένα στερεό σώμα, το οποίο αποτελείται από επαναλαμβανόμενα, τακτικά διατεταγμένα δομικά στοιχεία, τα οποία σχηματίζουν ένα συμμετρικό μοτίβο. Η διάταξη των μορίων στον κρύσταλλο

γίνεται με τρόπο αρμονικό, δηλαδή με συμμετρία και επανάληψη. (διδακτορική διατριβή Tsagarakou A., 2017) Η δομή του κρυστάλλου έχει τρεις διαστάσεις, δημιουργούμενη από την επανάληψη παρόμοιων ομάδων τόσο σε ατομικό επίπεδο όσο και σε χωροταξικό επίπεδο. Η πιο μικρή θεμελιώδης ομάδα, που είναι απόλυτα αντιπροσωπευτική στην τρισδιάστατη δομή, ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα (διδακτορική διατριβή Katsandi, 2011).

3.2 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Η ανάγκη ανάπτυξης νέων μεθόδων για την κρυσταλλογραφία συγγένειας προσφέρει πολλές ευκαιρίες για μελλοντικές έρευνες.

Χάρη στη συγκεκριμένη μέθοδο, είναι δυνατός ο γρήγορος εντοπισμός της πιο βιοδραστικής σύνδεσης από φυσικές ή συνθετικές ενώσεις. (διδακτορική διατριβή Strabodimos, 2018)

Στην τεχνική της κρυσταλλογραφίας συγγένειας, ο κρύσταλλος της πρωτεΐνης εμβαπτίζεται σε διάλυμα μαζί με το μείγμα των ενώσεων και στη συνέχεια υφίσταται ανάλυση δεδομένων που συλλέγονται από κρυσταλλογραφικά φαινόμενα περίθλασης και ακτινών Χ. Η ένωση με τη μεγαλύτερη συγγένεια για την πρωτεΐνη προσδένεται στον κρύσταλλο. (διδακτορική διατριβή Strabodimos, 2018).

3.3 ΤΡΟΠΟΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Για την ευκολία της διαδικασίας κρυστάλλωσης, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι μέθοδοι. Οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι κρυστάλλωσης είναι:

1. Διάχυση ατμών
2. Μικροδιαπίδυση

Και οι δύο στρατηγικές στοχεύουν στη διαφοροποίηση του περιβάλλοντος του διαλύματος, με σκοπό τη μείωση της διαλυτότητας και τη διατήρηση του ελέγχου της διαδικασίας. Στο πρώτο στάδιο, το μόριο διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιλαμβάνει μείγμα διαλυτών και αλάτων, διαδικασία κοινή και για τις δύο μεθόδους. Από το διαχωρισμένο διάλυμα προκύπτει αυξημένη χωρητικότητα διαλύτη στην δεξαμενή.

Τα διαλύματα τοποθετούνται σε κλειστό κύκλωμα, όπου τα μακρομόρια απεικονίζονται λιγότερο διαλυτά. Μετά την αφαίρεση του διαλύματος από το δείγμα, σε ορισμένες περιπτώσεις, προστίθεται επιπλέον διαλύτης και άλατα (διδακτορική διατριβή Tsagarakou, 2017).

Η διαδικασία διάχυσης ατμών βασίζεται στη διαφορά τάσης ατμού μεταξύ του δείγματος και της δεξαμενής. Το νερό απομακρύνεται από το δείγμα μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία τάσης ατμού μεταξύ δείγματος και δεξαμενής. Οι πιο γνωστές μέθοδοι διάχυσης ατμών είναι:

1. Η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας
2. Η μέθοδος της επικαθήμενης σταγόνας

Στην τεχνική της μικροδιαπίδυσης, η μεταφορά του διαλύτη πραγματοποιείται μέσω της ισορροπίας των ωσμωτικών πιέσεων, από το δείγμα στη δεξαμενή, μέσω μιας λεπτής στρώσης μεμβράνης (διδακτορική διατριβή Tsagarakou, 2017).

3.4 ΧΑΡΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

Η δημιουργία του χάρτη της ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2f_0-f_c$ προκύπτει από επιτυχημένη κρυσταλλογραφική δοκιμή, η οποία αποκαλύπτει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε κάθε θέση της στοιχειώδους κυψελίδας. Ο χάρτης διαφοροποιείται ανάλογα με τον κρύσταλλο. Η ανάλυση του χάρτη εξαρτάται από την καθαρότητα και την ποιότητα των δεδομένων του κρυστάλλου, επηρεάζοντας την ακρίβεια και την αξιοπιστία του (διδακτορική διατριβή Theodoridou I. Vasiliki, 2023).

Η δημιουργία κρυσταλλογραφικών χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας αποσκοπεί στην αναγνώριση της ατομικής δομής, επιβεβαιώνοντας τα πειραματικά δεδομένα και καθορίζοντας τη θέση των ατόμων στον κρύσταλλο (διδακτορική διατριβή Theodoridou I. Vasiliki, 2023)

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων για την αναγνώριση της βιοδραστικής ένωσης από φυτικό

εκχύλισμα που προσδένεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Το υπό μελέτη δείγμα είναι το κλάσμα φαινολικών ενώσεων από εκχύλισμα του βρώσιμου φυτού της οικογένειας των ασπαραγοειδών με την ονομασία κουρκουτζέλι. Η αρχική *in crystallo* σάρωση με εκχυλίσματα του φυτού έδειξε πρόσδεση ένωσης στο κέντρο αναστολής του ενζύμου όμως η έλλειψη χημικής ανάλυσης των συστατικών του εκχυλίσματος δυσκολεύει την ταυτοποίηση της βιοδραστικής ένωσης. Προς την κατεύθυνση αυτή χρησιμοποιήθηκε ένας με συνδυασμό υπολογιστικών προγραμμάτων για την *in silico* αναγνώριση της βιοδραστικής ένωσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ Ή ΕΜΒΑΠΤΙΣΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ

κλάσματος φαινολικών ενώσεων από εκχύλισμα ανθέων από το κουρκουτζέλι που συλλέχθηκε από την περιοχή της Ζακύνθου και εκχυλίσθηκε στο εργαστήριο της κ. Γαρδέλη Χρυσαιγής στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε δείγμα μεθανόλης/νερού/υδροχλωρικού οξέος (80:19:1 v/v/v.) Ακολούθησε ανάδευση και υπερήχηση σε λουτρό υπερήχων 40kHz για 30 min στους 25°C. Ο διαχωρισμός του διλυτού από το αδιάλυτο κλάσμα έγινε με φυγοκέντρωση σε 6000rpm για 15 min στους 20 °C (HERMLE, μοντέλο Z326K). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές. Ακολούθησε ξήρανση του δείγματος υπό κενό με φυγοκέντρωση σε συσκευή speedvac o/n. Το στερεό υπόλειμμα ζυγίσθηκε (0,2 γρ) και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100 % (v/v) διάλυμα DMSO ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 1mg/ml. (Διάλυμα ΦΑ)

ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

Κρύσταλλοι μυϊκής φωσφορυλάσης από κουνέλι (rmGPbT state) εμβαπτίσθηκαν για 24 ώρες στους 16°C με διάλυμα 0,3mg/ml διαλύματος ΦΑ σε 30 % (v/v) DMSO. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι πάγωσαν με υγρό άζωτο στους 100oK και απεστάλλησαν για συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων με συγχροτρονική ακτινοβολία στις εγκαταστάσεις της EMBL που η έδρα της είναι στο Αμβούργο (station P13 at PETRA III, EMBL – Hamburg Outstation

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Για την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πακέτο προγραμμάτων CCP4 ενώ για τη δημιουργία και βελτιστοποίηση του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας τα προγράμματα COOT P Emsley, B Lohkamp, W Scott, and K Cowtan Acta Cryst, «Features and Development of Coot,» Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, τόμ. 66, pp. 486-501, 2010. και REFMAC5 αντίστοιχα. Για την αναγνώρισης των προσδετών και τον υπολογισμό των συντελεστών συσχέτισης CC(1,2), CC(1,3), CC(2,3), των υπό μελέτη ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα POLDER MAP του PHENIX.

Phenix είναι ένα ολοκληρωμένο λογισμικό για τον προσδιορισμό της δομής μακρομορίων χρησιμοποιώντας κρυσταλλογραφικά δεδομένα (όπως ακτίνες Χ, νετρόνια και ηλεκτρόνια) και δεδομένα κρυσταλλογραφικής μικροσκοπίας. Είναι αυτοματοποιημένο και επιτρέπει την γρήγορη δημιουργία ενός αρχικού μοντέλου δομής με ελάχιστη ανθρώπινη παρέμβαση, εφόσον τα δεδομένα είναι μέτριας ποιότητας (D. Liebschner, et al)

Το πρόγραμμα Polder Maps δημιουργεί ένα χάρτη που σχηματίζεται μέσω της απαλοιφής των αβεβαιοτήτων του μοντέλου. Με αυτόν τον τρόπο, οι

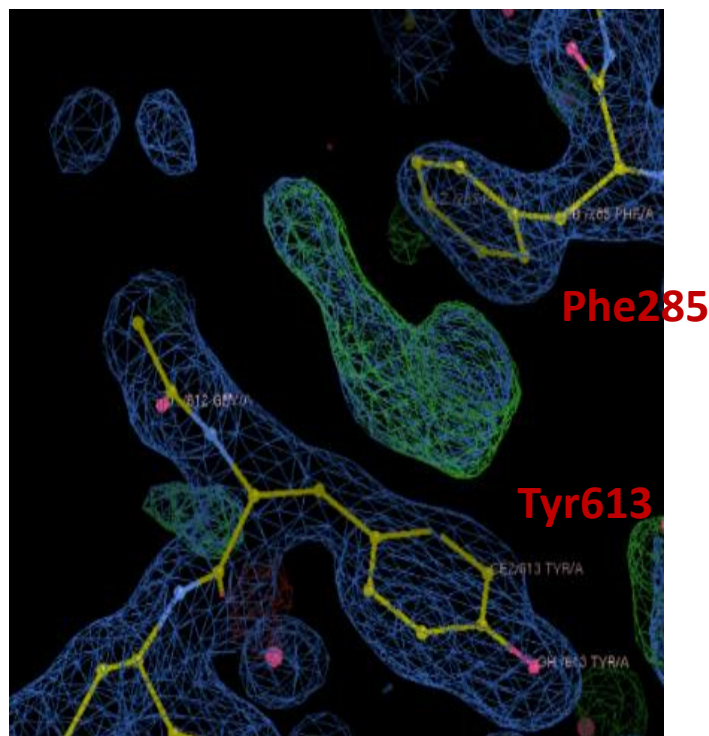
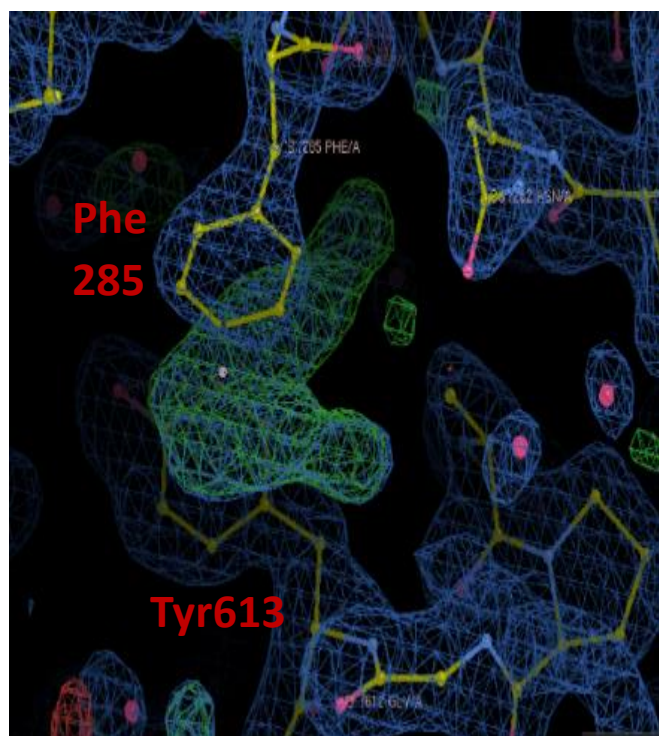
ασθενείς πυκνότητες, οι οποίες μπορούν να καλυφθούν από τον διαλύτη, μπορεί να γίνουν ορατές. Οι τυπικές περιοχές που παραλείπονται είναι:

1. Προσδέτες-Ligands
2. Υπολείμματα που προεξέχουν στην περιοχή του διαλύτη με ασαφείς προσανατολισμούς πλευρικής αλυσίδας (όπως λυσίνη, αργινίνη κ.λπ.)
3. Υπολείμματα C- ή N- τελικού άκρου

Μας δίνει μετά την εκτέλεση του αυτό το πρόγραμμα μια λίστα συντελεστών συσχέτισης για την αξιολόγηση της εμπιστοσύνης της ερμηνείας του χάρτη-polder. Εάν το CC(1,3) είναι μεγαλύτερο από το CC(1,2) και το CC(2,3), τότε η πυκνότητα πιθανότατα αντιστοιχεί στα ατομικά χαρακτηριστικά της επιλογής . Εάν τα CC(1,2) και CC(2,3) είναι μεγαλύτερα ή συγκρίσιμα με τα CC(1,3), τότε η πυκνότητα στην περιοχή μοιάζει με την πυκνότητα του διαλύτη (D. Liebschner, P. V. Afonine, N. W. Moriarty, B. K. Poon, O. V. Sobolev, T. C. Terwilliger and P. D. Adams., «Polder maps: Improving OMIT maps by excluding bulk-solvent,» Acta Cryst. D., αρ. 73, pp. 148-157).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συλλέχθηκαν δεδομένα υψηλής ευκρίνειας 1.7 Å (Πίνακας 1.) και ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας παρουσίασε άγνωστη πυκνότητα μεταξύ των αμινοξέων Phe285 και Tyr 613 με το υδρόφοβο κέντρο αναστολής της GP (Εικόνα). Το κέντρο αυτό έχει αναγνωρισθεί σε προγενέστερες μελέτες ότι προσδένει ενώσεις όπως η καφεΐνη με δακτυλίους που τοποθετούνται παράλληλα με τους δακτυλίους των δύο αρωματικών αμινοξέων εκμεταλλευόμενοι υδρόφοβες π-stacking αλληλεπιδράσεις. Στην περίπτωση μας εξετάστηκαν παρουσία ή απουσία ύδατος μέσω του προγράμματος POLDERMAP 7 ετεροκυκλικές ενώσεις πουρινών.



Εικόνα 4

Το κέντρο αναστολής της GP είναι υδρόφοβο ωστόσο μόρια ύδατος περιμετρικά του κέντρου σύνδεσης μπορούν να συνεισφέρουν στην πρόσδεση ενώσεων μέσω αλληλεπιδράσεων με τα άτομα της ένωσης και αμινοξέα. Στον Πίνακα 2 φαίνονται οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν και οι δείκτες συσχέτισης τους.

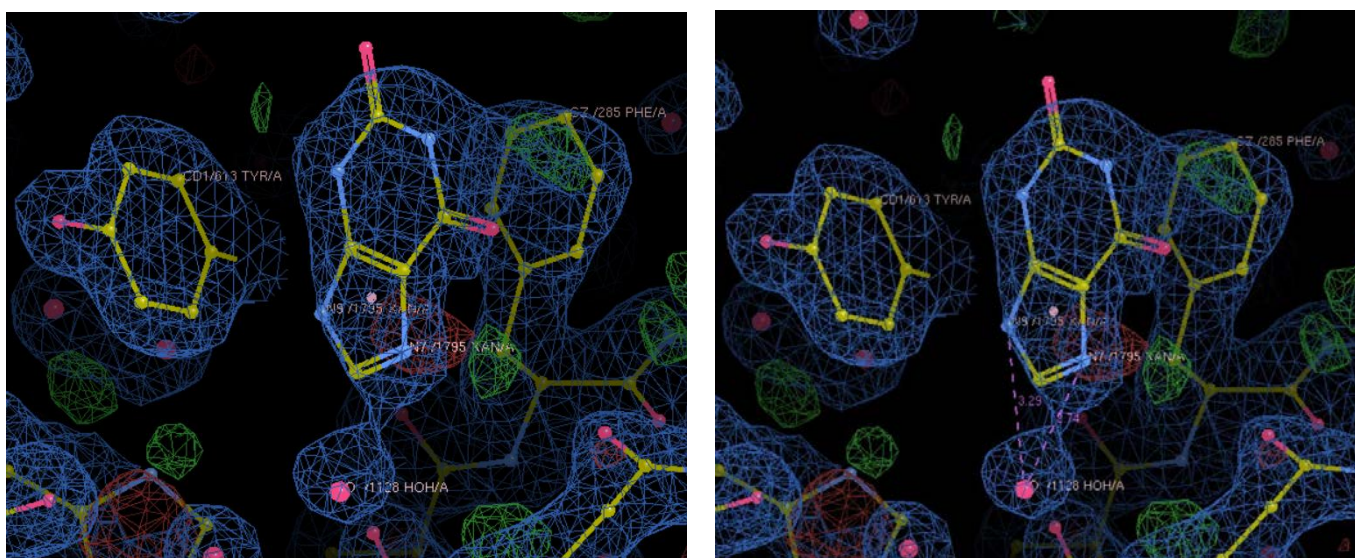
Ο συντελεστής συσχέτισης (Correlation Coefficient, CC) χρησιμοποιείται για να μετρηθεί η σχέση μεταξύ δύο συνόλων δεδομένων. Κατά τις μετρήσεις για να παρατηρηθεί ποια ένωση ταιριάζει, χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ποσοστά CC: CC 1,2, CC 1,3 και CC 2,3. Το ποσοστό πρέπει να είναι υψηλό για να διασφαλιστεί ότι, βάσει των αποτελεσμάτων, η ένωση ταιριάζει.

Με βάση τον Πίνακα 2 η ένωση ξανθίνη παρουσιάζει τους υψηλότερους δείκτες συσχέτισης CC (1,2), CC(1.3), CC (2.3). Η μελέτη του χάρτη έδειξε ότι η σύνδεση πραγματοποιείται μέσω π-stacking υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων δύο δεσμών υδρογόνου με το Asp283 μέσω του H2O 1128:

1. 1795 XAN (N7) 1128 H2O --- 3.29 Å-Asp283 --- 2.6 Å-
2. 1795 XAN (N9) - 1128 H2O --- 2.74 Å---Asp283--- 2.6 Å-

Η ξανθίνη, η οποία μπορεί να υπάρχει σε διάφορες μορφές όπως η καφεΐνη, η θεοβρωμίνη, η ουριδίνη και άλλες, εντοπίζεται σε φυτά όπως το τσάι, ο καφές, το κακάο κ.ά. Οι συγκεκριμένες ενώσεις είναι ευρέως γνωστές για τις διάφορες φαρμακευτικές εφαρμογές τους (Niveda et al., 2018).

Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω ανάλυση των συστατικών του εκχυλίσματος για και *in vitro* κινητικές μελέτες με το εκχύλισμα και την καθαρή ένωση ώστε να ταυτοποιηθεί η ξανθίνη ως η βιοδραστική ένωση και να υπολογισθεί η συγγένεια της με το κέντρο αναστολής στην ηπατική ισομορφή που αποτελεί και το φυσιολογικό μοριακό στόχο για την ανλαπτιξη αντιγλυκαιμικών παραγόντων.

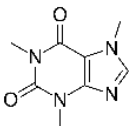
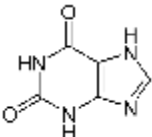
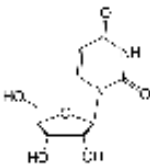
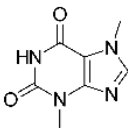
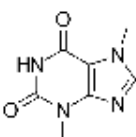
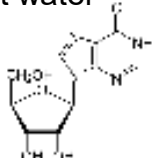
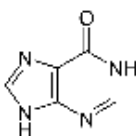


Εικόνα 5 Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας που δείχνει την πρόσδεση της ένωσης μεταξύ των αμινοξέων Phe 285 και Tyr 613 στο κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

	rmGPb – bioactive compound Συγκέντρωση
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 ₃ 2 ₁ 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	126.38 126.38 115.33 90.00 90.00 90.00
CC_{1/2}	0.999 (0.939)
Στατιστικά συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων	
Ευκρίνεια (Å)	126.38– 1.7
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1.73 – 1.7
Αριθμός ανακλάσεων	1165831 (52679)
Μοναδικές ανακλάσεις	102647 (5038)
Πολλαπλότητα	10.9 (2.7)
R_{symm}	0.058 (0.718)
Πληρότητα %	100 (100)
<I/σI>	20.6 (3.3)
Στατιστικά βελτιστοποίησης	
R_{cryst}	0.1659
R_{free}	0.1942
δεσμοί (Å)	0.0122
Γωνίες (°)	1.7144

Πίνακας 1. Στατιστικά συλλογής, επεξεργασίας και βελτιστοποίησης κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Ενώσεις και συντελεστές συσχέτισης

	CC (1.3)	CC (1.2)	CC (2.3)
Caffeine without water	0,6764	0,5666	0,7836
Caffeine		0,7776	0,5314
Xanthine without water	0,8056	0,5557	0,7555
Xanthine		0,8051	0,5525
Uridine without water	0,7710	0,6344	0,7817
Uridine		0,7882	0,6830
Theobromine tep without water	0,7741	0,5686	0,7493
Theobromine tep		0,7499	0,5348
Theobromine 37T without water	0,7796	0,5675	0,7850
Theobromine 37T		0,7894	0,5417
Inosine without water	0,7362	0,6444	0,7224
Inosine		0,7664	0,6556
Hypoxanthine without water	0,7631	0,5410	0,7743
Hypoxanthine		0,7951	0,5336

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A.L. Kantsadi, S. Manta, A.-M.G. Psarra, A. Dimopoulou, C. Kiritsis, V. Parmenopoulou, V.T. Skamnaki, P. Zoumpoulakis, S.E. Zographos, D.D. Leonidas και D. Komiotis, «The binding of C5-alkynyl and alkylfurano [2,3-d] pyrimidine glucopyranonucleosides to glycogen phosphorylase b: Synthesis, biochemical and biological assessment», **European Journal of Medicinal Chemistry**, τόμ. 54, 2012, pp. 740-749.

Afonine, Pavel V., et al., «Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography», **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, 2018, τόμ. 74, αρ. 6, pp. 531-544.

Alan L. Harvey ,*Nature Reviews Drug Discovery* , τόμ. 14, αρ. 11, 2015

Angelica Artasensi**, Alessandro Pedretti, Giulio Vistoli και Laura Fumagalli, «Type 2 diabetes mellitus: A Review of multi-target drugs», **Molecules**, 2020, . pp. 1-18.

Astrid Petersmann, Dirk Müller-Wieland, Ulrich A. Müller, Rüdiger Landgraf, Matthias Nauck, Guido Freckmann, Lutz Heinemann και Erwin Schleicher, «Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus», **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, 2019, τόμ. 127, αρ. 9, pp. 724-730.

Bareka, P., Phitos, D. and Kamari, G. (2008), A karyosystematic study of the genus *Bellevalia* Lapeyr. (Hyacinthaceae) in Greece. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 157: 723-739]

Blundell, Tom L. , & Patel, S., «High-throughput X-ray crystallography for drug discovery», *Current Opinion in Pharmacology* , 2004, τόμ. 4, αρ. 5, pp. 490-496

Boissier E. 1882: *Flora orientalis sive enumeratio plantarum in Oriente a Graecia et Aegypto ad Indiae fines hucusque observatarum*. Vol. 5 Fasc. 1 (Monocotyledonearum pars prior). H. Georg, Genevae [Genève], Basileae [Basel] & Lugduni [Lyon]. pp. 1–428.

Chao CT, Tzeng HY, Tseng YH. Leaf epidermal morphology of Asparagaceae of Taiwan and its systematic significance. *Microsc Res Tech*. 2022 Jun;85(6):2162-2180

Chapman, Henry N.**; Petra Fromme, «Structure determination based on continuous diffraction from macromolecular crystals», **Science**, 2017, τόμ. 357, αρ. 6355, ππ. 875-879.

Chatterjee, Sudesna, et al., «Type 2 diabetes», **Nature Reviews Disease Primers**, 2017, τόμ. 3, αρ. 17018.

D. Liebschner, P. V. Afonine, M. L. Baker, G. Bunkóczy, V. B. Chen, T. I. Croll, B. Hintze, L. W. Hung, S. Jain, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. D. Oeffner, B. K. Poon, M. G. Prisant, R. J. Read, J. S. Richardson, D. C. Richardson, M. D. Sammito,, «Macromolecular structure determination using x-rays, neutrons and electrons: recent developments in phenix.,» *Acta Crystallogr D Struct Biol*, αρ. 75, p. 861–877, 2019.

D. Liebschner, P. V. Afonine, M. L. Baker, G. Bunkóczy, V. B. Chen, T. I. Croll, B. Hintze, L. W. Hung, S. Jain, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. D. Oeffner, B. K. Poon, M. G. Prisant, R. J. Read, J. S. Richardson, D. C. Richardson, M. D. Sammito,, «Macromolecular structure determination using x-rays, neutrons and electrons: recent developments in phenix.,» *Acta Crystallogr D Struct Biol*, αρ. 75, p. 861–877, 2019.

D. Liebschner, P. V. Afonine, N. W. Moriarty, B. K. Poon, O. V. Sobolev, T. C. Terwilliger and P. D. Adams,, «Polder maps: Improving OMIT maps by excluding bulk-solvent,» *Acta Cryst. D*,, αρ. 73, pp. 148-157.

Daniel C. Palm, Johann M. Rohwer, Jannie M. Hofmeyr, «Regulation of glycogen synthase from mammalian skeletal muscle – a unifying view of allosteric and covalent regulation», **The FEBS Journal**, 2013, τόμ. 280, αρ. 3, pp. 546-556.

David Goyard, László Kónya, Attila G. Kovács, Zoltán M. Szabó, László H. Párducz, Zoltán J. Keresztes, «Glucose-derived spiro-isoxazolines are anti-

hyperglycemic agents against type 2 diabetes through glycogen phosphorylase inhibition», *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, τόμ. 108, pp. 1-9.

David M. Close, «Comprehensive model for X-ray-induced damage in protein crystallography», *Journal of Synchrotron Radiation*, 2019, τόμ. 26, αρ. 1, pp. 1-10.

Dominguez Moré, Gina Paola, Paola Cárdenas, Geison M. Costa, Cláudia Maria Oliveira Simões, Davi C. Aragon, «Pharmacokinetics of Botanical Drugs and Plant Extracts», *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2017, τόμ. 17, αρ. 17, ππ. 1539-1550

Dorothee Liebschner, et al., «Polder maps: improving OMIT maps by excluding bulk solvent», *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 2017, τόμ. 73, αρ. 2, pp. 148-157.

E.J. Helmreich, «How pyridoxal 5'-phosphate could function in glycogen phosphorylase catalysis», *FEBS Letters*, 1992, τόμ. 302, αρ. 1, pp 1-4.

Echols, Nathaniel , et al., «Graphical Tools for Macromolecular Crystallography in PHENIX», Journal of Applied Crystallography , 2012, τόμ. 45, αρ. 6, pp. 1244-1248.

Ekiert, Halina Maria**, et al., «Biological Activities of Natural Products», *Molecules*, 2020, τόμ. 25, αρ. 24, σ. 5670.

Emsley P, B Lohkamp, W Scott, and K Cowtan Acta Cryst, «Features and Development of Coot», Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, τόμ. 66, pp. 486-501, 2010.

Emsley, Paul , et al., «Features and Development of Coot», *Acta CrystalloActa Crystallographica Ενότητα Δ: Βιολογική Κρυσταλλογραφία

Gaafar, Yahza Z.A., et al., «Chapter 62 – Asparagus», στο *Medicinal Plants of Asia and the Pacific*, CRC Press/Taylor & Francis, 2023, pp. 1113–1128.

Giglio, F., Castiglione Morelli, M.A.; Matera, I.; Sinisgalli, C.;Rossano, R.; Ostuni, A. *Muscari comosum* L. Bulb Extracts Modulate Oxidative Stress and Redox Signaling in HepG2 Cells. *Molecules* 2021, 26,416.

Giglio, F.; Castiglione Morelli, M.A.; Matera, I.; Sinisgalli, C.;Rossano, R.; Ostuni, A. *Muscari comosum* L. Bulb Extracts Modulate Oxidative Stress and Redox Signaling in HepG2 Cells. *Molecules* 2021, 26,416.

Gillespie, Kathleen M. , «Διαβήτης τύπου 1: παθογένεση και πρόληψη», *Διαβήτης* , 2006, τόμ. 55, αρ. 2, pp. 335-339

Guo, Qingbin, et al., «The bioactive compounds and biological functions of *Asparagus officinalis* L.», **Phytochemistry Reviews**, 2020, τόμ. 19, αρ. 5, pp. 1093-1114.

Hamdy El-Tantawy, Walid, et al., «Natural products for controlling hyperlipidemia: review», **Phytochemistry Reviews**, 2019, τόμ. 18, αρ. 5, pp. 1231–1254.

Hennig, Michael , et al., «Combining Biophysical Screening and X-Ray Crystallography for Fragment-Based Drug Discovery», *Journal of Medicinal Chemistry* , 2012, τόμ. 55, αρ. 24, pp. 10808-10818. p

Jaiswal, Varun, et al., «The bioactivity and phytochemicals of *Muscari comosum* (*Leopoldia comosa*), a plant of multiple pharmacological activities», **International Journal of Molecular Sciences**, 2024, τόμ. 25, αρ. 5, π. 2592.

Maveyraud, Laurent, Lionel Mourey, «Protein X-ray Crystallography and Drug Discovery», **Molecules**, 2020, τόμ. 25, αρ. 5, σ. 1030.

Migocka-Patrzalek, Marta , Anna Lewicka, Magdalena Elias, Małgorzata Daczewska, «Muscle Glycogen Phosphorylase and Its Functional Partners in Health and Disease», *International Journal of Molecular Sciences* , 2021, τόμ. 22, αρ. 9, p. 4752.

Nagy, Lila, et al., «Glycogen phosphorylase inhibition improves beta cell function», **Journal of Clinical Investigation**, 2017, τόμ. 127, αρ. 1, pp. 1-5.

Negi, JS , et al., «Chemical constituents of Asparagus», *Pharmacognosy Reviews* , 2010, τόμ. 4, αρ. 8, pp. 215-220

Niveda , et al., «Xanthine Scaffold: Scope and Potential in Drug Development», *European Journal of Medicinal Chemistry* , 2018, τόμ. 143, pp. 1-16.

O, Mehmet , et al., «Use of Plant Extracts in Alternative Medicine», *Environmental Toxicology and Pharmacology* , 2018, τόμ. 60, pp. 1-14.

Petruzzello, Melissa. "list of plants in the family Asparagaceae". *Encyclopedia Britannica*, 26 Aug. 2021

Raffaele, C., et al., «Plant Extracts: Biological and Pharmacological Activity», **Molecules**, 2020, τόμ. 25, αρ. 22, p. 5351.

Rao,Tai, Zhirong Tan , Jingbo Peng , Ying Guo , Yao Chen , Honghao Zhou , Dongsheng Ouyang ., «The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective», **Pharmacological Research**, 2019, τόμ. 139, pp. 1-12.

Rath, Virginia L., et al., «Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core», **Molecular Cell**, 2000, τόμ. 6, αρ. 1, pp. 139–148.

Rines, A. K., Sharabi, K., Tavares, C. D., and Puigserver, P. (2016) Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes, *Nat Rev Drug Discov* 15, 786-804.

Roach, Peter J.**, Anna A. DePaoli-Roach, Thomas D. Hurley, Vincent S. Tagliabracci, «Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes», **Biochemical Journal**, 2012, τόμ. 441, αρ. 3, pp. 763-787.

Roach, Peter J., «Glycogen and its metabolism», **Current Opinion in Chemical Biology**, 2002, τόμ. 6, αρ. 6, pp. 612-617.

Roden, Michael , et al., «Diabetes Mellitus—Definition, Classification, Diagnosis, Screening, and Prevention», *Diabetes Therapy* , 2019, τόμ. 10, αρ. 1, pp. 1-19.

Shibani Kanungo 1, Kimberly Wells 1, Taylor Tribett 1, Areeg El-Gharbawy ., «Glycogen metabolism and glycogen storage disorders», **Annals of Translational Medicine**, 2018, τόμ. 6, αρ. 24, p. 474.

Skoog, Douglas A., Holler, F. James, Crouch, Stanley R., «Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης», 7η Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2002.

Smyth, M. S., et al., «X-ray crystallography», **Nature**, 2000, τόμ. 405, αρ. 6787, p. 567.

Somsák, L., Katalin Czifrák, Mária Tóth, Éva Bokor, Eleni D. Chrysina, Nikolaos Oikonomakos, «New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents», **Current Medicinal Chemistry**, 2008, τόμ. 15, αρ. 28, pp. 2933-2983.

Tagaya, M., et al., «Flexibility in the phosphorylase catalytic reaction. Glucosyltransfer from pyridoxal (5')–triphospho (1)–alpha–D–glucose to glucogen catalyzed by phosphorylase», **Journal of Biological Chemistry**, 1987, τόμ. 262, αρ. 14, pp. 6662-6669.

Velislava, T., et al., «Plant Adaptogens – History and Future Perspectives», **Frontiers in Pharmacology**, 2021, τόμ. 12, .

Weiss, Manfred S. ,«Long-Wavelength Ray X-Ray Diffraction and Its Applications in Macromolecular Crystallography», *Methods in Molecular Biology* , 2017, τόμ. 1607, pp. 401-420.

Αναστασία Λ. Καντσαδη διδακτορική διατριβή Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας 2015.,
“ Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως μοριακός στόχος σχεδιασμού νέων ενδυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων” p. 15

Γεώργιος Α. Στραβοδήμος διδακτορική διατριβή Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2018., “Βιοχημικές μελέτες ενζύμων μεταβολικού του γλυκογόνου” p. 14

Ευθύμιος Κυριακής Βιοχημικές μελέτες στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, 2020., “Βιοχημικές μελέτες στο μεταβολισμό του γλυκογόνου” p. 18

Θεοδωρίδου Βασιλική διπλωματική εργασία Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας., 2023., “Βιοχημικές μελέτες σύνδεσης ανταγωνιστών στην ανθρώπινη γαλεκτίνη 7. “

Κασούνη Αικατερίνη διπλωματική εργασία Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας., 2015., “Isolation and crystallation of human angiogenin in its active form.”

Κατσάνδη Αναστασία διπλωματική εργασία Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας .,2011., “Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα “.

Παπακωστοπούλου Σουζάνα διπλωματική εργασία Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας., 2022., “Study of the enzyme glycogen phosphorylase as a molecular target of phytochemical compounds.”

Τσαγκαράκου Αναστασία διπλωματική εργασία Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας., 2017., “Biochemical studies on inhibitors of glycogen phosphorylase. “

Οι ιστοσελίδες που χρησιμοποιήθηκαν για την εργασία είναι οι παρακάτω:

Bellevalia dubia. http://www.cretanflora.com/bellevalia_dubia.htmlflora ionica

<https://depositphotos.com/gr/vector/types-of-diabetes-simple-medical-vector-illustration-scheme-health-care-information-diagram-194443164.html>