مقاله پژوهشی

ارزیابی بیوانفورماتیک عملکرد مهاری ترکیبات فلاوانونی بر روی آنزیم آلفاآمیلاز و پیش‌بینی اثر مهاری آن‌ها بر پیشرفت دیابت

مرتضی صادقی [۱]، مهران میراولیایی [۲*]، زهرا شرکائی [۳]

گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: بیماری دیابت یکی از شایع‌ترین اختلال متابولیکی است. آنزیم آلفاآمیلاز با تجزیه پلی‌ساکاریدها نقش مهمی در پیشرفت دیابت ایفا می‌کند. لذا جست‌وجوی مهارکننده طبیعی برای آنزیم موردنظر اهمیت ویژه‌ای دارد؛ بنابراین، هدف از این پژوهش تأثیر مهاری ترکیبات فلاوانونی بر روی آنزیم آلفاآمیلاز به روش بیوانفورماتیکی است.

مواد و روش‌ها: این پژوهش در محیط کامپیوتری (بیوانفورماتیکی) صورت گرفت. بدین منظور، ساختار ترکیبات فلاوانونی و آنزیم آلفاآمیلاز به ترتیب از پایگاه‌های PubChem و PDB دانلود شدند. ویژگی‌های دارو همانندی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیبات فلاوانونی به ترتیب توسط پایگاه Zink و سرور Swiss ADME بررسی شدند. سپس به‌منظور اینتراکشن ترکیبات موردنظر با آنزیم آلفاآمیلاز از دو نرم‌افزار داکینگ مولکولی AutoDock Tools 1.5.6 استفاده شد. درنهایت نتایج با استفاده از Discovery Studio تجزیه‌وتحلیل شدند.

نتایج: نتایج این پژوهش نشان داد که از میان ترکیبات فلاوانونی انتخاب‌شده، ترکیب Naringenin ازلحاظ ویژگی‌های دارو همانندی و خواص فیزیکوشیمیایی مطلوب‌تر بود. هم‌چنین نتایج داکینگ مشخص کرد که ترکیب Naringenin باانرژی اتصال ۴/۹- کیلوکالری بر مول بالاترین اثر مهاری بر آنزیم آلفاآمیلاز داشت.

نتیجه‌گیری: از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب Naringenin به دلیل جاگیری مناسب در جایگاه فعال آنزیم آلفاآمیلاز و اینتراکشن با آمینواسیدهای کلیدی، توانایی مهارکنندگی بیش‌تری از خود نشان می‌دهد. با بررسی بیش‌تر این ترکیب طبیعی در دو محیط *In vitro* و *In vivo* می‌توان از این ترکیب به‌عنوان یک مهارکننده طبیعی در مهار آلفاآمیلاز و درنتیجه جلوگیری از پیشرفت دیابت استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آلفاآمیلاز، ترکیبات فلاوانونی، دیابت، داکینگ مولکولی

مقدمه

دیابت ملیتوس یک اختلال مختلط است که به خاطر نقص در تولید و مکانیسم اثر انسولین ایجاد می‌شود (۱). یکی از راهکارهای پیشگیری دیابت ملیتوس، به کار بردن داروهای مناسب به‌منظور کنترل قند خون پس از صرف غذا است (۲).

ازلحاظ بالینی دیابت‌ها به انواع دیابت ملیتوس نوع I، دیابت ملیتوس نوع II، دیابت ملیتوس بارداری و سایر انواع دیابت‌ها تقسیم‌بندی کرد. معمول‌ترین دیابت، نوع I است با ۵ تا ۱۰ درصد کل بیماران و همچنین دیابت نوع II با ۹۰ تا ۹۵ درصد کل بیماران را شامل می‌شود (۳). با ادامه دیابت در طولانی‌مدت، میزان آسیب به شبکیه چشم، گلومرول‌های کلیوی و اعصاب محیطی افزایش می‌یابد (۴).

*نویسنده مسئول: **مهران میراولیایی**، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
Email: mmiroliaei@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0003-0916-3757

آنزیم آلفاآمیلاز در دسته هیدرولازها است (EC 3.2.1.1)؛ که در تجزیه نشاسته مشارکت می‌کند و به‌عنوان آنزیم اساسی که قند خون پس از صرف غذا را کنترل می‌کند، مهم به نظر می‌رسد (۵، ۶). آنزیم آلفاآمیلاز در مایعات بزاقی و پانکراتیک یافت می‌شود و در تبدیل الیگوساکاریدهای پیچیده به واحدهای مالتوزی نقش دارد (۷). آنزیم آلفاگلوکوزیداز نیز در پرزهای روده کوچک قرارگرفته است و در شکستن کربوهیدرات‌ها (محصولات آلفاآمیلاز) به منوساکاریدهای قابل‌جذب نقش دارند (۸). یکی از استراتژی‌های درمانی در کاهش میزان قند خون، مهار کردن آنزیم آلفاآمیلاز با استفاده از مهارکننده‌ها (طبیعی و سنتزی) به‌منظور کاهش هضم و جذب الیگوساکاریدها است (۹). بسیاری از مهارکننده‌های سنتزی ازجمله ترکیبات Sulfonylureas، Meglitinides، Biguanides، Thiazolidinediones (TZD) و مهارکننده‌های آلفاآمیلاز وجود دارند که با مهار آنزیم آلفاآمیلاز، موجب کنترل قند خون پس از غذا می‌شوند (۱۰). این مهارکننده‌ها تمایل زیادی برای اتصال به جایگاه فعال آنزیم دارند و با اینتراکشن آمینواسیدهای مهم در جایگاه فعال، نقش مهمی در مهار آنزیم موردنظر دارند. درنتیجه استفاده از این داروها در درمان دیابت ملیتوس مؤثر هستند (۱۱). استفاده از مهارکننده‌های شیمیایی و سنتزی (آکاربوز، میگلیتول و ...) برای مهار آنزیم آلفاآمیلاز منجر به ایجاد عوارض جانبی (دردهای شکمی، بهم‌ریختن حرکات منظم روده، اسهال) می‌شود. در سال‌های اخیر، پیدا کردن یک ترکیب مؤثر که بتواند میزان هایپرگلیسمی را کاهش دهد و هم‌چنین عوارض جانبی کم‌تری داشته باشد، یکی از زمینه‌های موردتحقیق است (۱۲، ۱۳).

ترکیبات فلاونوئیدی به‌وفور در بعضی میوه‌ها و گیاهان یافت می‌شوند و برخی از آن‌ها توانایی مهار آلفاآمیلاز را نشان داده‌اند. بسیاری از فلاونوئیدها به‌عنوان رژیم تنظیمی انسان در نظر گرفته می‌شوند. اگرچه آن‌ها جزء فاکتورهای رژیمی غیرضروری می‌باشند اما به‌عنوان ترکیبات طبیعی نقش مهمی در پیشگیری از اختلالات کرونیک دارند (۱۴). فلاونوئیدها به گروه‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند (۱۷-۱۵). یکی از این گروه‌ها، ترکیبات فلاوانون هستند که اصلی‌ترین این ترکیبات شامل Naringenin، Hesperetin، Naringin و Hesperidin می‌باشند. Naringenin در بعضی مرکبات (گریپ‌فروت‌ها، پرتقال)، گوجه‌فرنگی و گیاه *Salvia leriifolia* وجود دارد. Hesperetin در میوه‌ها و سبزی‌های مختلف؛ پیاز، کرفس و اسفناج. Naringin به مقدار فراوان در گریپ‌فروت‌ها یافت می‌شوند و هم‌چنین مسئول طعم بهتر در این میوه‌ها می‌باشند. Hesperidin در پوست مرکبات مختلف مانند نارنج و پرتغال وجود دارد. چندین مشاهده نشان می‌دهد که این ترکیبات فلاوانونی از طریق مسیرهای متابولیکی متنوع و هدف‌های مولکولی مختلف، اثر مهاری بر روی رشد انواع سلول‌های سرطانی دارند. این ترکیبات می‌توانند به‌آسانی به غشای سلول متصل شوند و به سلول‌های کشت داده‌شده در محیط In vitro نفوذ کنند و فعالیت‌های متابولیکی سلول را تعدیل کنند. کاهش آسیب‌های اکسیداتیو، غیرفعال شدن کارسینوژن، مهار تکثیر سلولی، تحریک تمایز، آسیب به رگ زایی تومور و فعال شدن مسیرهای ضد سرطانی ازجمله فعالیت‌های ترکیبات فلاوانونی می‌باشند (۲۱-۱۸).

داکینگ مولکولی و محاسبات *In silico* یک رویکرد شبیه‌سازی است که مولکول‌هایی را که به‌طور مناسب به آنزیم متصل می‌شوند را پیش‌بینی می‌کند. لیگاندها و ترکیبات باید میل ترکیبی زیادی به رسپتور داشته باشند تا محل اتصال برای مولکول گیرنده و خاصیت تعامل آن‌ها بر اساس قواعدی امتیازدهی شوند. این روش‌ها قبل از آزمایش در محیط‌های In vivo و In vitro موجب کاهش هزینه‌ها و وقت محقق می‌شوند (۲۲، ۲۳).

ترکیبات فلاوانونی ذکرشده به فراوانی در میوه‌ها و سبزی‌ها وجود دارند و مانند ترکیبات شیمیایی و سنتزی عوارض جانبی ندارند (۲۴). لذا مطالعه آن‌ها و استفاده از آن‌ها به‌عنوان کاربردهای دارویی، یکی از زمینه‌های موردپژوهش است؛ بنابراین با توجه به اهمیت این ترکیبات، در این تحقیق سعی شده است که میزان فعالیت مهارکنندگی ترکیبات مهم فلاوانونی بر روی آنزیم آلفاآمیلاز صورت گیرد و اثربخشی هرکدام از این ترکیبات در محیط *In silico* به‌منظور پیدا کردن یک ترکیب مؤثر در پیشگیری از دیابت بررسی شود.

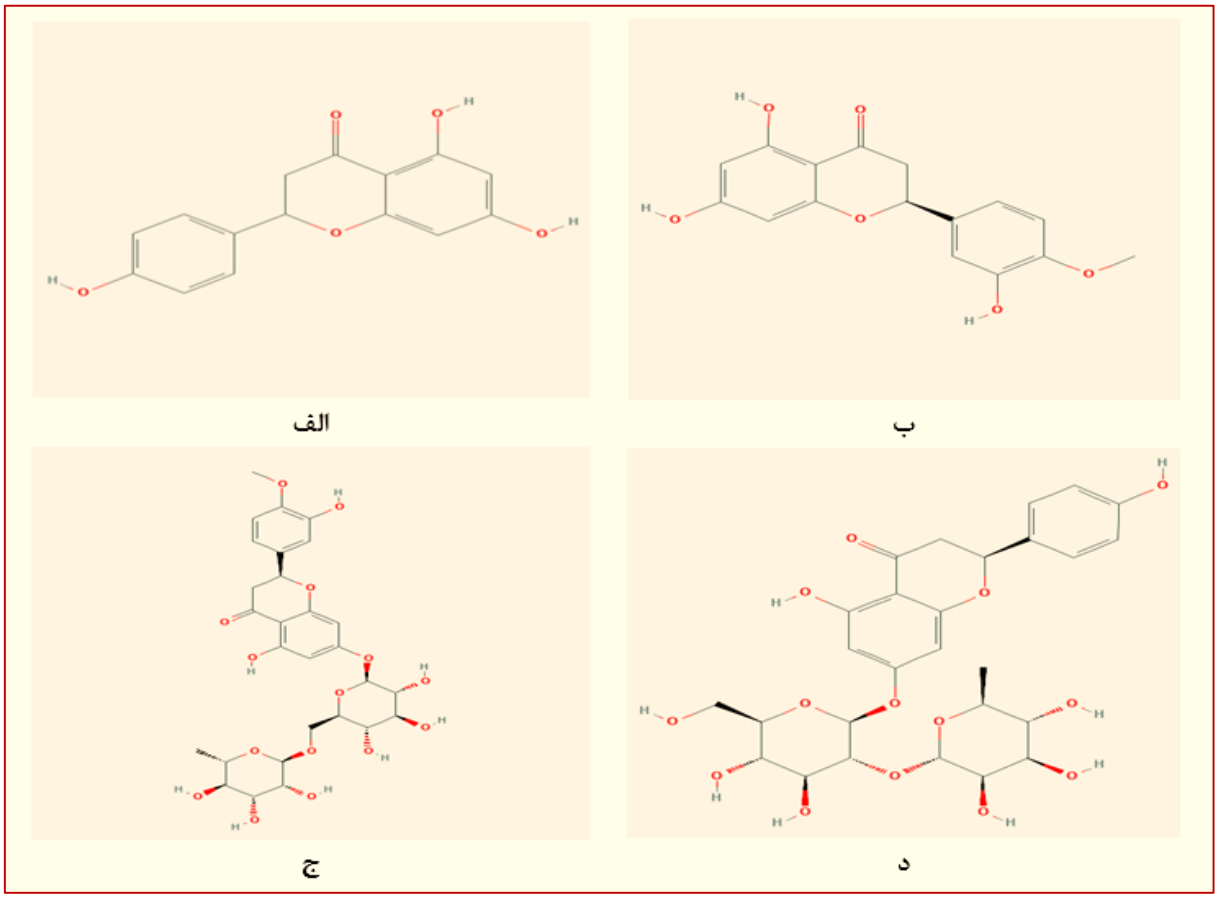
مواد و روش‌ها

دانلود ترکیبات و آنزیم

این پژوهش به‌صورت توصیفی- تحلیلی صورت گرفت. ابتدا ترکیبات مهم فلاوانونی (شامل Naringenin، Hesperetin، Naringin و Hesperidin) و هم‌چنین ترکیب آکاربوز (مهارکننده استاندارد) به‌صورت SDF از پایگاه داده ترکیبات شیمیایی

PubChem به نشانی (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) دانلود شدند. هم‌چنین ساختار 3D آنزیم آلفاآمیلاز با کد شناسایی 1HNY (شامل زنجیر A و ۳۹۳۸ اتم) از بانک اطلاعاتی پروتئین به نشانی (http://www.rcsb.org) دریافت شد (شکل ۱).

Conjugate Gradient تعداد ۱۰۰ در نظر گرفته شد. سپس فایل خروجی آلفاآمیلاز و ترکیبات حاصل از مینیمایز Chimera به‌عنوان ورودی نرم‌افزار AutoDock انتخاب شدند. به ساختار آنزیم هیدروژن‌های قطبی اضافه شدند. به آنزیم بار Kolman charges و به ترکیبات Compute Gastieger اضافه شدند. سپس



شکل ۱- ساختار ترکیبات مهم فلاوانونی الف) Naringenin، ب) Hesperetin، ج) Naringin، د) Hesperidin.

مراحل داکینگ مولکولی

برای انجام داکینگ مولکولی از نرم‌افزار AutoDock Tools 1.5.6 استفاده شد (۲۵). بدین منظور ابتدا ساختار سه‌بعدی آنزیم آلفاآمیلاز از PDB و ساختار ترکیبات فلاوانونی از Pubchem دانلود شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار MVD تمام مولکول‌های اضافی (مولکول‌های آب، یکسری لیگاندهای اضافی همراه آنزیم و مولکول‌های دیگر) حذف شدند. فایل آنزیم خالص به دست آمد. قبل از انجام مراحل داکینگ مولکولی برای مینیمایز کردن آنزیم و ترکیبات از نرم‌افزار Chimera 1.7 استفاده شد. به این صورت که برای Steepest Descent و

فایل‌ها به‌صورت PDBQT ذخیره شدند. گرید باکس‌ها برای ترکیبات مختلف بسته به‌اندازه ترکیبات تنظیم شدند (پارامترهای X، Y و Z برای هر ترکیب تعریف شد). پارامتر داکینگ به‌صورت Genetic algorithm و خروجی Lamarkian GA2 در نظر گرفته شد. درنهایت برای تحلیل اینتراکشن میان آلفاآمیلاز و هرکدام از ترکیبات، از نرم‌افزار Discovery Studio Visualizer استفاده شد.

خواص دارو همانندی ترکیبات

ترکیبات فلاوانونی ازلحاظ پارامترهای لیپینسکی (دهندگان و پذیرندگان پیوند هیدروژنی، وزن مولکولی، میزان چربی‌دوستی

و باندهای قابل چرخش) ارزیابی شدند (جدول ۱). برای ویژگی-های موردبررسی از پایگاه ZINK به آدرس (zink.docking.org) استفاده شد.

پارامترهای فیزیکوشیمیایی ترکیبات

دارا بودن خواص فیزیکوشیمیایی مطلوب یک مولکول می‌تواند نقش مهمی در انتخاب ترکیب موردنظر به‌عنوان یک نامزد دارویی ایفا کند. در این تحقیق نیز پارامترهایی مانند میزان قطبیدگی، مقدار حلالیت ترکیب‌ها، میزان جذب گوارشی و هم-چنین مقدار سمیت برای همه ترکیبات فلاوانونی در نظر گرفته شد. برای تعیین قطبیدگی، حلالیت و جذب گوارشی از سرور SwissADME به آدرس (http://www.swissadme.ch) (۲۶) و برای مشخص شدن مقدار سمیت ترکیبات از Lazar toxicity predictions به آدرس http://lazar.in-silico.de/predict (۲۷) استفاده شد (جدول ۲).

نتایج

بررسی ترکیبات فلاوانونی ازلحاظ پارامترهای دارو همانندی و فیزیکوشیمیایی

پارامترهای دارو همانندی برای همه ترکیبات فلاوانونی و هم-چنین مهارکننده استاندارد بر اساس قانون لیپینسکی در نظر گرفته شد (۲۸). طبق این قانون، میزان جذب مناسب موقعی اتفاق می‌افتد که ترکیب موردنظر دارای ویژگی‌هایی باشد. وزن مولکولی کم‌تر از ۵۰۰ دالتون، میزان چربی‌دوستی کم‌تر از ۵، تعداد دهندگان پیوند هیدروژنی کم‌تر یا مساوی ۵ و تعداد پذیرندگان پیوند هیدروژنی کم‌تر یا مساوی با ۱۰ باشد. از میان ترکیبات مهم فلاوانونی، دو ترکیب Naringenin و Hesperetin تمام ویژگی‌های لیپینسکی را دارا می‌باشند لذا انتظار می‌رود جذب بالایی در بدن داشته باشند.

جدول۱- پارامترهای دارو همانندی ترکیبات فلاوانونی. ترکیب آکاربوز به‌عنوان مهارکننده استاندارد در نظر گرفته‌شده است.

باندهای چرخش	میزان چربی-دوستی	وزن مولکولی	پذیرندگان پیوند هیدروژنی	دهندگان پیوند هیدروژنی	ترکیبات
۱	۲/۵۲	۲۷۲/۲۵	۵	۳	Naringenin
۲	۲/۶	۳۰۲/۲۸	۶	۳	Hesperetin
۶	-۰/۴۴	۵۸۰/۵	۱۴	۸	Naringin
۷	-۰/۱۴	۶۱۰/۶	۱۵	۸	Hesperidin
۹	-۸/۵۳	۶۴۵/۶	۱۹	۱۴	Acarbose (Control)

جدول۲- تعیین پارامترهای فیزیکوشیمیایی و سمیت ترکیبات فلاوانونی (آکاربوز به‌عنوان کنترل آورده شده است).

سمیت	جذب گوارشی	حلالیت	میزان قطبیدگی	ترکیبات
فاقد سمیت	بالا	-۳/۴۹	۸۶/۹۹	Naringenin
فاقد سمیت	کم	-۳/۶۲	۹۶/۲۲	Hesperetin
فاقد سمیت	کم	-۲/۹۸	۲۲۵/۰۶	Naringin
فاقد سمیت	کم	-۳/۲۸	۲۳۴/۲۹	Hesperidin
فاقد سمیت	کم	۲/۱۳	۳۲۱/۱۷	Acarbose (Control)

میزان قطبیدگی ترکیبات رابطه مستقیمی با تعداد دهندگان و پذیرندگان پیوند هیدروژنی دارد هر چه این تعداد بیش‌تر باشد به نسبت میزان قطبیدگی نیز بیش‌تر خواهد بود. از میان ترکیبات فلاوانونی، ترکیب Hesperidin بیش‌ترین قطبیدگی را دارد. مشاهده می‌شود که همه ترکیبات فلاوانونی حلالیت خوبی از خود نشان دادند هرچند این حلالیت نسبت به آکاربوز کم‌تر بوده است. با توجه به پیش‌بینی پایگاه Lazer toxicity، روشن شد که هیچ‌یک از ترکیبات سمیتی از خود نشان ندادند. لذا ایمن بودن ترکیبات نیز چک شدند.

نتایج حاصل از داکینگ مولکولی

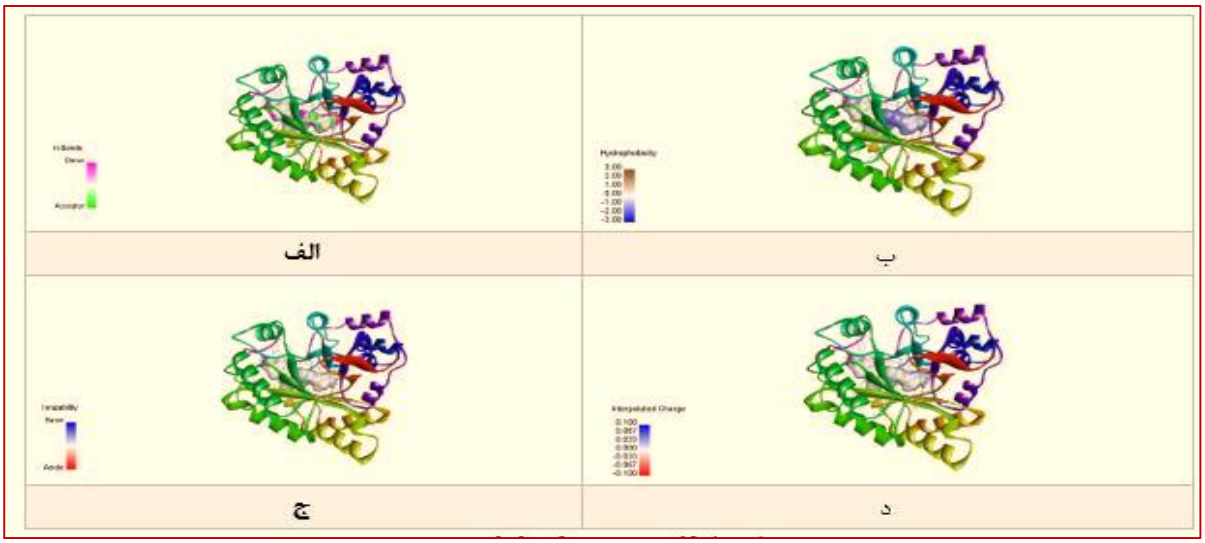
انرژی حاصل از داکینگ میان آنزیم آلفاآمیلاز و ترکیبات فلاوانونی و هم‌چنین آمینواسیدهای درگیر در این میانکنش در جدول ۳ نشان داده‌شده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که با توجه به انرژی حاصل از این میانکنش، اتصال مناسبی میان کمپلکس آنزیم و تمام ترکیبات فلاوانونی برقرار می‌شود. هم‌چنین مهم‌ترین آمینواسیدها درگیر در جایگاه فعال نشان داده شد.

با توجه به نتایج داکینگ مولکولی مشخص می‌شود که از میان ترکیبات فلاوانونی، ترکیب Naringenin نسبت به نمونه کنترل اتصال قوی‌تری ایجاد می‌کند. لذا برای درک بهتر از اتصال رسپتور با لیگاند، اینتراکشن‌های هیدروژنی، هیدروفوبی، یونی و دسترسی حلال نمایش داده شدند (شکل ۲).

آمینواسیدهای درگیر در اینتراکشن رسپتور و لیگاند، دید روش‌تری از اتصالات به نمایش می‌گذارند. برای مقایسه اسیدهای

جدول۳- انرژی حاصل از داکینگ و آمینواسیدهای درگیر در واکنش کمپلکس آنزیم-ترکیب (آکاربوز به‌عنوان کنترل آورده شده است).

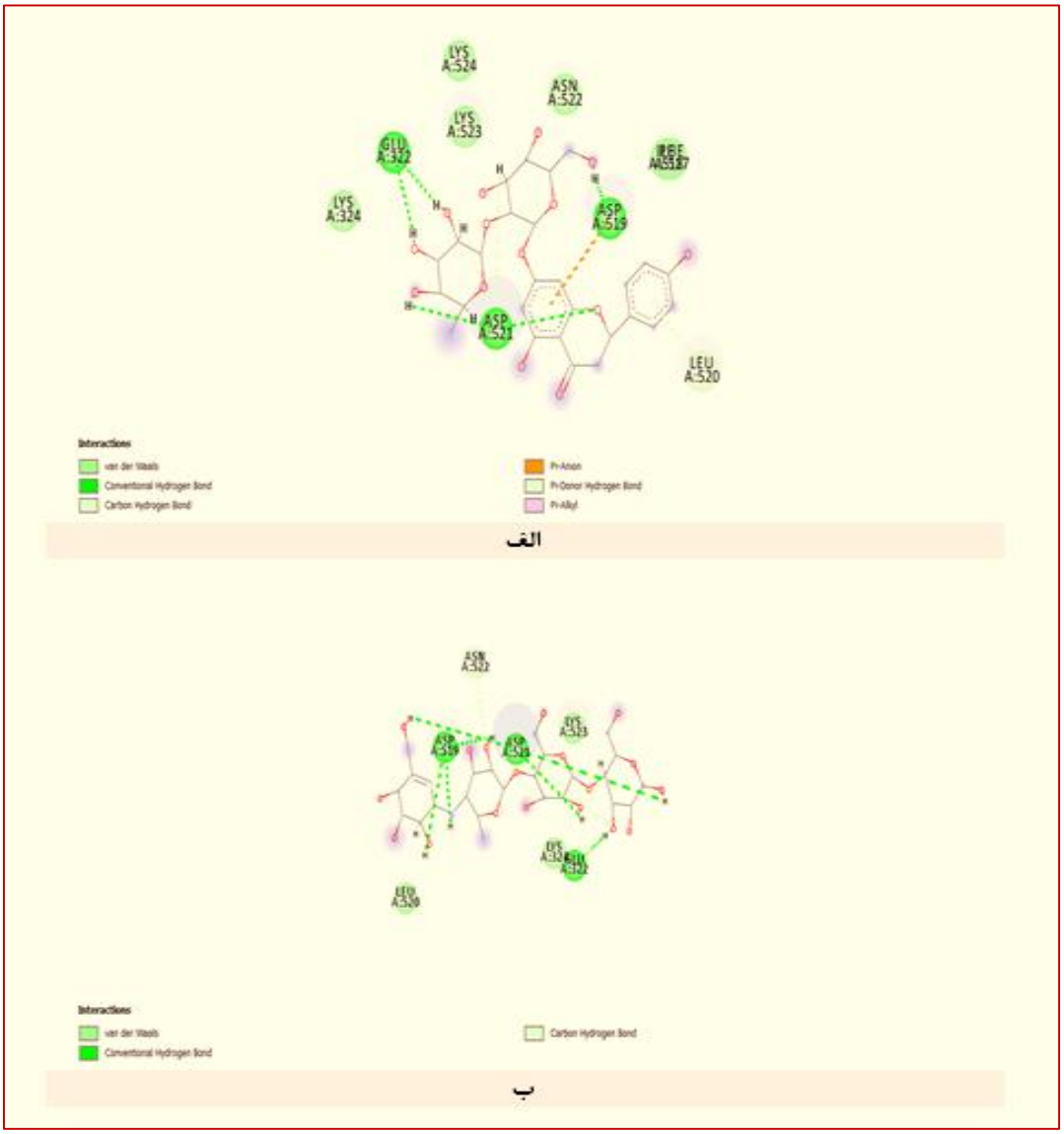
نام ترکیب	انرژی داکینگ (کیلوکالری بر مول)	اسیدهای آمینه درگیر در واکنش
Naringenin	-۴/۹	Glu322-Lys324-Asp519-Asp521-Asn522-Lys523-Lys524
Hesperetin	-۳/۵	Gln225-Lys324-Asp519-Asp521-Asn528
Naringin	-۳/۷	Phe273-Arg281-Asp519-Asp521-Asn522
Hesperidin	-۳/۹	Glu322-Lys324-Asp519-Asp521-
Acarbose (Control)	-۴/۷	Glu322-Lys324-Asp519-Asp521-Asn522-Lys523



شکل ۲- نمایش سه‌بعدی اینتراکشن رسپتور و لیگاند Naringenin در جایگاه فعال آنزیم آلفاآمیلاز. الف) باندهای هیدروژنی، ب) هیدروفوبیسیته، ج) اتصال یونی، د) سطح در دسترسی حلال.

آمینه درگیر در اینتراکشن، نمایش دوبعدی اینتراکشن کمپلکس آلفاآمیلاز با Naringenin و نمونه کنترل آورده شد (شکل ۳).

ترکیب Naringenin انرژی اتصال منفی‌تری داشته است (۴/۹- کیلوکالری بر مول). حتی امتیاز داکینگ نشان داد که ترکیب



شکل ۳- نمای دوبعدی (2D) اینتراکشن میان الف) کمپلکس α-amylase- Naringenin ب) کمپلکس α-amylase- Acarbose

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که همه ترکیبات فلاوانونی توانایی مهار آنزیم آلفاآمیلاز را دارند و میزان این مهار از ۳/۵- تا ۴/۹- کیلوکالری بر مول متغیر است. هر چه میزان امتیاز داکینگ منفی‌تر باشد، نشان می‌دهد که اتصال قوی‌تری میان کمپلکس آنزیم و مهارکننده برقرار است و هم‌چنین ترکیب موردنظر با آمینواسیدهای جایگاه فعال اینتراکشن بیش‌تری داشته‌اند. از میان ترکیبات فلاوانونی انتخاب‌شده در این پژوهش، Naringenin، اتصال قوی‌تری نسبت به آکاربوز (مهارکننده استاندارد) ایجاد می‌کند و بنابراین تمایل بیش‌تری برای اتصال به آمینواسیدهای جایگاه فعال آلفاآمیلاز دارد. میزان هم‌پوشانی ترکیب Naringenin با آکاربوز نشان داد که نقاط اتصال مشترکی میان هر دو ترکیب در جایگاه فعال آلفاآمیلاز مشاهده می‌شود.

با توجه به پژوهش‌های قبلی نشان داده‌شده که مهم‌ترین آمینواسیدهای جایگاه فعال آنزیم آلفاآمیلاز شامل Glu322- Asp519-Asp521-Asn522-Lys523-Lys524 است و این آمینواسیدها نقش فعالی در برهم‌کنش میان کمپلکس آنزیم و

مهارکننده دارند (۲۹، ۳۰). در این پژوهش نیز نشان داده شد که ترکیب Naringenin که اتصال قوی‌تری را در میان سایر ترکیبات فلاوانونی دارد، با آمینواسیدهای مذکور برهم‌کنش می‌دهد. هم‌چنین مشخص شد که ترکیب آکاربوز به‌عنوان نمونه استاندارد نیز با آمینواسیدهای Glu322-Lys324-Asp519-Asp521-Asn522-Lys523 برهم‌کنش دارد. آمینواسیدهای درگیر در پیوند هیدروژنی میان کمپلکس α-amylase-Naringenin شامل سه آمینواسید Asp522، Asp519 و Glu322 است که در مورد کمپلکس α-amylase- Acarbose همین آمینواسیدها دخیل هستند؛ اما تعداد پیوندهای واندروالسی در کمپلکس α-amylase- Naringenin بیش‌تر از کمپلکس α-amylase- Acarbose است. هر چه تعداد پیوندهای هیدروژنی و واندروالسی بیش‌تر باشد، اتصال قوی‌تری ایجاد می‌شود (۳۱). لذا با توجه به تعداد پیوندهای بیش‌تر میان کمپلکس α-amylase- Naringenin نسبت به کمپلکس α-amylase-Acarbose، انتظار می‌رود این اتصال قوی‌تر منطقی باشد.

تحقیقات گسترده‌ای نشان داده است که بعضی ترکیبات طبیعی (گیاهان و سایر میکروارگانیسم‌ها) موجب مهار آنزیم آلفاآمیلاز در محیط‌های *In silico*، *In vitro* و *In vivo* می‌شوند (۳۲، ۳۳). Jhong و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی داکینگ مولکولی تعدادی از ترکیبات طبیعی در محیط *In silico* نشان دادند که از میان این ترکیبات فنولی، ترکیب‌های لوتئولین و کوئرستین با امتیاز داکینگ به ترتیب ۴/۶-، ۴/۳- کیلوکالری بر مول توانایی مهار آلفاآمیلاز را داشتند (۳۱). در مطالعه دیگری، Yang و همکاران در ۲۰۱۲ با شناسایی ترکیبات فنولیک از گیاه *Bidens bipinnata* و اثر مهاری این ترکیبات بر آنزیم آلفاآمیلاز به روش بیوانفورماتیکی نشان دادند که از میان ترکیبات فنولیک، ترکیب ایزوکانین باانرژی داکینگ ۳/۶- کیلوکالری بر مول بیش‌ترین اثر مهاری را دارا بود (۳۴). Nair و همکاران (۲۰۱۳) با انتخاب ترکیبات فلاونوئیدی در محیط In vitro اثبات کردند که این ترکیبات با IC_{50}های متفاوت توانستند اثر مهاری قابل‌توجهی بر آلفاآمیلاز داشته باشند (۳۵). تحقیقی که توسط Tadera و همکاران (۲۰۰۶) بـر روی اثر مهاری فلاونـوئیـدهـا بر آلفـاآمیلاز صورت گرفت، مشخص شد که ترکیب Caempferol باانرژی اتصال ۴/۸- کیلوکالری بر مول بیشترین توان مهاری را داشت (۳۶). Wang و همکاران (۲۰۱۴) بامطالعه آنالوگ‌های Curcumin و رابطه ساختار با فعالیت این آنالوگ‌ها به این نتیجه رسیدند که این آنالوگ‌ها در محیط *In silico* اثر مهاری قابل‌توجهی بر آلفاآمیلاز داشتند (۳۷). Kim و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی اثر مهاری فلاونوئیدها و داکینگ مولکولی آن‌ها به این نتیجه رسیدند که ترکیباتی که با آمینواسیدهای Asp519-Asp521-Asn522-Lys523-Lys524 اینتراکشن بیش‌تری دارند، اثر مهاری بیش‌تری از خود نشان دادند (۳۸). ازاین‌رو در این پژوهش نیز ترکیب Naringenin به خاطر اینتراکشن با آمینواسیدهای مذکور که در جایگاه فعال آنزیم حضور دارند، اثر مهاری و توانایی اتصال بیش‌تری نسبت به سایر ترکیبات فلاوانونی از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش مشخص کرد که از میان ترکیبات فلاوانونی، ترکیب Naringenin به خاطر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب، خواص دارو همانندی مطلوب و امتیاز داکینگ منفی (اتصال قوی) می‌تواند موجب مهار آلفاآمیلاز شود. هرچند انتظار می‌رود که با بررسی بیش‌تر و مطالعه دقیق‌تر این ترکیب در دو محیط *In vivo* و *In vitro*، بتوان از این ترکیب طبیعی به‌عنوان یک مهارکننده بالقوه در مهار آنزیم آلفاآمیلاز و درنتیجه جلوگیری از پیشرفت دیابت استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از اساتید بیوشیمی دانشگاه اصفهان در خصوص راهنمایی و کمک در انجام این پژوهش نهایت کمال و تشکر را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله متعهد می‌شوند هیچ‌گونه نفع مالی و برخورد منافع از انتشار مقاله نداشته‌اند.

References

1. Tundis R, Loizzo M, Menichini F. Natural products as α-amylase and α-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. Mini reviews in medicinal chemistry. 2010;10(4):315-31.
2. Benalla W, Bellahcen S, Bnouham M. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. Current diabetes reviews. 2010;6(4):247-54.
3. Andrade-Cetto A, Becerra-Jiménez J, Cárdenas-Vázquez R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. Journal of ethnopharmacology. 2008;116(1):27-32.
4. Shenolikar RA, Balkrishnan R, Camacho FT, Whitmire JT, Anderson RT. Comparison of medication adherence and associated health care costs after introduction of pioglitazone treatment in African Americans versus all other races in patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective data analysis. Clinical therapeutics. 2006;28(8):1199-207.
5. Ali H, Houghton P, Soumyanath A. α-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to Phyllanthus amarus. Journal of ethnopharmacology. 2006;107(3):449-55.
6. Lee YA, Cho EJ, Tanaka T, Yokozawa T. Inhibitory activities of proanthocyanidins from persimmon against oxidative stress and digestive enzymes related to diabetes. Journal of nutritional science and vitaminology. 2007;53(3):287-92.
7. Zhu X, Tian Y, Xu W, Guang C, Zhang W, Zhang T, et al. Bioconversion of sucrose to maltooligosaccharides by the synergistic action of amylosucrase and α-amylase. Process Biochemistry. 2018;74:71-6.
8. Wang C, Li W, Chen Z, Gao X, Yuan G, Pan Y, et al. Effects of simulated gastrointestinal digestion in vitro on the chemical properties, antioxidant activity, α-amylase and α-glucosidase inhibitory activity of polysaccharides from Inonotus obliquus. Food Research International. 2018;103:280-8.
9. Mourya P. In-vitro studies on inhibition of alpha amylase and alpha glucosidase by plant extracts of alternanthera Pungens kunth. Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 2018;8(6-A):64-8.
10. Ashafa AOT, Balogun FO, Adegbegi AJ. Inhibitory potentials and kinetics of the inhibition of carbohydrate-hydrolysing enzymes by the pod and seed extracts of Lessertia montana (Fabaceae) E. Phillips & RA Dyer. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2019;9(01):042-50.
11. McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α-amylase and α-glucosidase. Journal of agricultural and food chemistry. 2005;53(7):2760-6.
12. Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi-de-Sá MF. Plant α-amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases: Structure, function and potential for crop protection. European journal of biochemistry. 2002;269(2):397-412.
13. Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O. α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. Pharmacognosy reviews. 2011;5(9):19.
14. Ninomiya M, Nishida K, Tanaka K, Watanabe K, Koketsu M. Structure–activity relationship studies of 5, 7-dihydroxyflavones as naturally occurring inhibitors of cell proliferation in human leukemia HL-60 cells. Journal of natural medicines. 2013;67(3):460-7.
15. Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Figueiredo B, Reis MS, Folador P, et al. Flavonoids: prospective drug candidates. Mini reviews in medicinal chemistry. 2008;8(13):1429-40.
16. Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Reis Bonorino Figueiredo MS, Folador P, Damazio RG, et al. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. Mini reviews in medicinal chemistry. 2008;8(10):1032-8.
17. Zhu J, Chen C, Zhang B, Huang Q. The inhibitory effects of flavonoids on α-amylase and α-glucosidase. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2020;60(4):695-708.
18. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life sciences. 2004;74(17):2157-84.
19. Seijas JA, Vázquez-Tato MP, Carballido-Reboredo R. Solvent-free synthesis of functionalized flavones under microwave irradiation. The Journal of organic chemistry. 2005;70(7):2855-8.
20. Verma AK, Pratap R. Chemistry of biologically important flavones. Tetrahedron. 2012;68(41):8523-38.
21. Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J. Antioxidant activity of flavonoids from Licania licaniaeflora. Journal of ethnopharmacology. 2002;79(3):379-81.

22. Gilson MK, Zhou H-X. Calculation of protein-ligand binding affinities. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2007;36:21-42.
23. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Nature reviews Drug discovery. 2004;3(11):935-49.
24. Meena SN, Naik MM, Ghadi SC, Tilve SG. α-Glucosidase inhibition activity and in silico study of 2-(benzo [d][1, 3] dioxol-5-yl)-4H-chromen-4-one, a synthetic derivative of flavone. Bioorganic & medicinal chemistry. 2019;27(12):2340-2344.
25. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. Biophysical reviews. 2017;9(2):91-102.
26. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Scientific reports. 2017;7:42717.
27. Helma C. Lazy structure-activity relationships (lazar) for the prediction of rodent carcinogenicity and Salmonella mutagenicity. Molecular diversity. 2006;10(2):147-58.
28. Tice CM. Selecting the right compounds for screening: does Lipinski's Rule of 5 for pharmaceuticals apply to agrochemicals? Pest Management Science: formerly Pesticide Science. 2001;57(1):3-16.
29. Noor ZI, Ahmed D, Rehman HM, Qamar MT, Froeyen M, Ahmad S, et al. In Vitro Antidiabetic, Anti-Obesity and Antioxidant Analysis of Ocimum basilicum Aerial Biomass and in Silico Molecular Docking Simulations with Alpha-Amylase and Lipase Enzymes. Biology. 2019;8(4):92.
30. Balu P, Jas JS, Govindaraj M. Design and evaluation of chalconeimine derivatives as α-amylase inhibitors. Bioinformation. 2019;15(7):523.
31. Jhong CH, Riyaphan J, Lin SH, Chia YC, Weng CF. Screening alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitors from natural compounds by molecular docking in silico. Biofactors. 2015;41(4):242-51.
32. Qian M, Nahoum V, Bonicel J, Bischoff H, Henrissat B, Payan F. Enzyme-catalyzed condensation reaction in a mammalian α-amylase. High-resolution structural analysis of an enzyme− inhibitor complex. Biochemistry. 2001;40(25):7700-9.
33. Alqahtani AS, Hidayathulla S, Rehman MT, ElGamal AA, Al-Massarani S, Razmovski-Naumovski V, et al. Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant potential of 3-oxolupenal and katononic acid isolated from Nuxia oppositifolia. Biomolecules. 2020;10(1):61.
34. Yang X-W, Huang M-Z, Jin Y-S, Sun L-N, Song Y, Chen H-S. Phenolics from Bidens bipinnata and their amylase inhibitory properties. Fitoterapia. 2012;83(7):1169-75.
35. Nair SS, Kavrekar V, Mishra A. In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. European Journal of Experimental Biology. 2013;3(1):128-32.
36. Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of α-glucosidase and α-amylase by flavonoids. Journal of nutritional science and vitaminology. 2006;52(2):149-53.
37. Wang H, Du Z, Zhang C, Tang Z, He Y, Zhang Q, et al. Biological evaluation and 3D-QSAR studies of curcumin analogues as aldehyde dehydrogenase 1 inhibitors. International journal of molecular sciences. 2014;15(5):8795-807.
38. Kim J-S, Kwon C-S, Son KH. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2000;64(11):2458-61.

Original Article

In Silico Investigation of Flavanone Compounds' Inhibitory Effects on Alpha-Amylase Enzyme and Predicting their Inhibitory Role in Diabetes Progression

Sadeghi M[1], Miroliaei M[2*], Shorakai Z[3]

Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 28 Aug 2020 Accepted: 09 Nov 2020

Abstract

Background & Objective: Diabetes is one of the most common metabolic disorders. Alpha-amylase plays an important role in the development of diabetes by breaking down polysaccharide. Therefore, the search for natural inhibitor for α-amylase is of particular importance. Therefore, the aim of this study was to investigate the inhibitory effect of flavanone compounds on α-amylase enzyme by bioinformatics method.

Material & Methods: This study was performed in the computer environment (Bioinformatics). For this purpose, the structure of flavanone compounds and α-amylase was downloaded from PubChem & Protein Data Ban database, respectively. Then, the drug-like parameter and physicochemical properties of flavanone compounds were investigated by Zink database and the Swiss ADME server, respectively. Then, in order to interact the compounds with α-amylase, one molecular docking software AutoDock Tools 6.0 was used. Finally, the results were analyzed using Discovery Studio 3.5.

Results: The results showed that among the selected flavanone, naringenin compound was more desirable in terms of drug-like and physicochemical properties. Also, the result of molecular docking showed that the naringenin compound with a binding energy of -4.9 kcal/mol had the highest inhibitory effect on the α-amylase.

Conclusion: From this study, it can be calculated that naringenin compound shows more inhibitory ability due to its proper placement in the active site of α-amylase enzyme and interaction of key amino acids. By further investigation of this natural compound in *In vivo* & *In vitro*, it can be used as a natural inhibitor for the inhibition of α-amylase and the prevention of diabetes.

Keywords: Alpha- amylase, Flavanone compounds, Diabete, Molecular Docking

***Corresponding Author: Miroliaei M,** Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Email: mmiroliaei@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0003-0916-3757

Journal of Advanced Biomedical Sciences; 10 (2020): 2786-2795