مقاله پژوهشی

بررسی پارامترهای فارماکوکینتیکی، سمیت و داکینگ مولکولی فلاوونول‌ها با آنزیم آلدوز ردوکتاز به‌منظور یافتن ترکیب مؤثر در مهار آنزیم مذکور

مرتضی صادقی، مهران میراولیایی*

گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۷/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۹/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: آلدوز ردوکتاز نقش مهمی در بیماری مزمن دیابت ایفا می‌کند و موجب عوارض بافتی می‌شود. مهار فعالیت آلدوز ردوکتاز استراتژی مهمی در کنترل عوارض ناشی از دیابت ارائه می‌دهد. فلاونوئیدها از مهارکننده‌های مهم آلدوز ردوکتاز می‌باشند. هدف از این تحقیق، بررسی میزان مهارکنندگی ترکیبات طبیعی فلاوونولی موجود در میوه‌ها و گیاهان بر فعالیت آلدوز ردوکتاز به روش بیوانفورماتیکی است.

مواد و روش‌ها: نحوه انجام این پژوهش به‌صورت توصیفی-تحلیلی بوده است. ابتدا ساختار ترکیبات فلاوونولی، داروی Ranirestat و آنزیم‌ها به ترتیب از پایگاه‌های ChemSpider و PDB دانلود شدند. از داروی Ranirestat به‌عنوان نمونه استاندارد استفاده شد. خصوصیات فارماکوکینتیکی و سمیت ترکیبات توسط سرورهای Swiss ADME، Protox و نرم‌افزار Toxtree2.5.4 پیش‌بینی شدند. سپس به‌منظور اینتراکشن ترکیبات با ساختار آنزیم، از داکینگ مولکولی به‌روش AutoDock Tools 1.5.6 استفاده شد. درنهایت آنالیز نتایج با استفاده از نرم‌افزار Discovery Studio 3.5 صورت گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که همه ترکیبات فلاوونولی ازلحاظ خصوصیات فارماکوکینتیکی مطلوب هستند و هم‌چنین فاقد سمیت بودند. همه ترکیبات قادر به مهار آنزیم‌های آلدوز ردوکتاز با کدهای PDB مختلف بودند؛ اما از میان این ترکیبات، ترکیب Rutin باانرژی داکینگ متوسط ۱۹۱/۲۱- کیلوژول بر مول (سطح معنی‌داری P< ۰/۰۵) دارای انرژی اتصال قوی‌تری نسبت به نمونه استاندارد (Ranirestat) بود.

نتیجه‌گیری: از نتایج گرفته‌شده در این تحقیق می‌توان این‌گونه استنباط نمود که از میان ترکیبات فلاوونولی انتخاب‌شده، ترکیب Rutin به دلیل اینتراکشن با آمینواسیدهای مهم جایگاه فعال آنزیم، فعالیت مهارکنندگی قوی‌تری نسبت به سایر ترکیبات فلاوونولی نشان داد. درنتیجه بامطالعه بیش‌تر این ترکیب در محیط‌های درون‌تنی و برون‌تنی، می‌توان از آن به‌عنوان یک کاندید بالقوه در مهار آنزیم آلدوز ردوکتاز و درنهایت جلوگیری از عوارض مزمن دیابت استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آلدوزردوکتاز، ترکیبات فلاوونولی، مهارکننده، داکینگ مولکولی

مقدمه

یک مسئله جدی در دیابت، افزایش تدریجی عوارض در بافت‌های مستقل از انسولین مانند اعصاب، شبکیه، گلومرول‌ها و سلول‌های عروقی است (۱). افزایش استرس اکسیداتیو و فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز نقش مهمی در ایجاد عوارضی مانند نوروپاتی دیابتی، رتینوپاتی، کاردیومیوپاتی، نفروپاتی، آب‌مروارید، انفارکتوس قلبی و حتی سکته مغزی دارد (۴-۲).

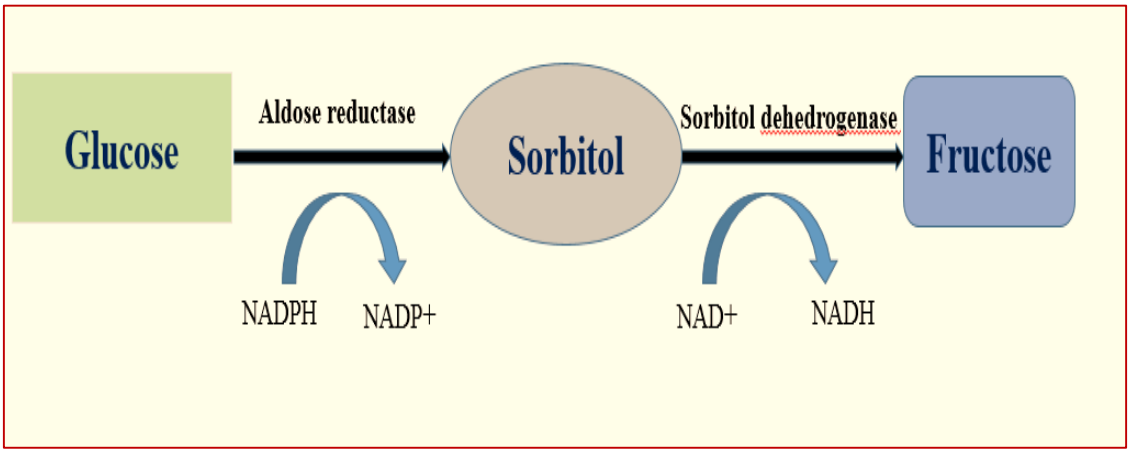
یکی از مسیرهای موردمطالعه بیوشیمی مرتبط با هایپرگلیسمی، مسیر پلی‌ال[1] است (شکل ۱). این مسیر دومرحله‌ای است که در آن آنزیم آلدوز ردوکتاز، آنزیم محدودکننده سرعت است (۵، ۶). آنزیم آلدوز ردوکتاز با استفاده از NADPH (کوفاکتور) گلوکز را به الکل سوربیتول تبدیل می‌کند. سوربیتول متعاقباً توسط آنزیم سوربیتول دهیدروژناز با استفاده از NAD^+ (کوفاکتور) به فروکتوز متابولیزه می‌شود

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

[1] Polyol pathway

(شکل ۱). در شرایط گلیسمی طبیعی بیش‌تر گلوکزهای سلولی از طریق مسیر گلیکولیز هدایت می‌شوند و فقط مقدار اندکی گلوکز غیرفسفریله وارد مسیر پلی‌ال می‌شود. بااین‌حال، تحت شرایط هایپرگلیسمی، بیش از ۳۰ درصد گلوکز از طریق مسیر پلی‌ال متابولیزه می‌شود که به‌نوبه خود باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌ها می‌شود (۷، ۸).

تجمع سوربیتول داخل سلول منجر به تحریک فشار اسموتیک و استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۲)؛ بنابراین افزایش شار[3] گلوکز از طریق مسیر پلی‌ال موجب حساسیت سلولی در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود. تنظیم‌کننده اصلی این مسیر آنزیم آلدوز ردوکتاز (EC 1.1.1.21) با ۳۱۵ رزیدوی اسیدآمینه‌ای است که یک پروتئین مونومری کوچک متعلق به خانواده آلدو-



شکل ۱. متابولیسم گلوکز در مسیر پلی‌ال

مکانیسم‌های متعددی برای توضیح اینکه چگونه مسیر پلی‌ال باعث استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی می‌شود، ارائه‌شده است. در مرحله اول افزایش مصرف NADPH موجب کاهش مقدار NADPH موجود در آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز می‌شود. آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز از NADPH به‌عنوان کوفاکتور برای تولید گلوتاتیون (GSH) استفاده می‌کند (۹). GSH یک عامل مهمی در پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن است؛ بنابراین، کاهش NADPH موجب کم شدن توانایی سلول در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود. مرحله بعد تبدیل NAD^+ به NADH توسط آنزیم سوربیتول دهیدروژناز است که این باعث افزایش NADH و استفاده آن توسط NADH اکسیداز می‌شود که تولید گونه‌های فعال اکسیژن را به همراه دارد و درنهایت موجب آسیب به غشاهای میتوکندی می‌شوند. سرانجام فروکتوز تولیدشده در این مسیر به فروکتوز ۳-فسفات و ۳-دئوکسی‌گلوکوزون متابولیزه می‌شود. هر دو ترکیبات گلیکوزیله‌کننده قوی هستند که منجر به تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته[2] می‌شوند (۱۰، ۱۱).

کتوردوکتازهاست. این آنزیم شامل یک موتیف ساختاری بشکه‌مانند β/α همراه با یک جایگاه فعال بزرگ هیدروفوب است (۱۳، ۱۴). اطراف این بشکه‌های β/α، هشت رشته بتاپاارال دیده می‌شود که این رشته‌های مجاور توسط هشت قطعه آلفاهلیکس محیطی به هم متصل شده‌اند. سایت فعال کاتالیزوری در هسته بشکه واقع‌شده است. کوفاکتورهای NADPH در بالای بشکه β/α قرارگرفته درحالی‌که حلقه نیکوتینامید در مرکز بشکه و پیروفسفات در لبه بشکه واقع‌شده است. در جایگاه فعال آنزیم، آمینواسیدهای Tyr48، Lys77 و Asp49 در یک شبکه‌ای از پیوندهای هیدروژنی قرار می‌گیرند. His110 جهت‌گیری زیرواحدها را در داکت جایگاه فعال هدایت می‌کند. جهش Tyr48 به His48 یا Phe48 موجب غیرفعال شدن آنزیم می‌شود که نشان‌دهنده نقش اصلی این باقی‌مانده در مکانیسم کاتالیزوری آلدوز ردوکتاز است (۱۵). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی تأثیر مهاری بالقوه‌ای در مهار آنزیم نشان داده‌اند (۱۶). عمل نقش مهم آنزیم آلدوز ردوکتاز در شرایط هایپرگلیسمی در چندین مطالعه بیوشیمیایی و سلولی مشخص‌شده است و بیان بالای آنزیم

[2] Advanced Glycation End Products (AGEs)

[3] Flux

مذکور و هم‌چنین افزایش میزان سوربیتول در سلول‌های شوان[4] و افراد دیابتی مشخص‌شده است (۱۷). این مشاهدات حاکی از آن است که آنزیم آلدوز ردوکتاز می‌تواند در عوارض طولانی‌مدت نقش داشته باشد؛ بنابراین، مهار فعالیت آلدوز ردوکتاز یک درمان بالقوه برای عوارض دیابت است (۱۸).

چندین کلاس از ترکیبات مانند فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، کومارین‌ها، استیلبن‌ها، مشتقات رزمارینیک‌اسید و تیازولیدین-دیونزها به‌عنوان مهارکننده‌های آنزیم آلدوز ردوکتاز گزارش‌شده‌اند (۱۹، ۲۰). در میان این ترکیبات، فلاونوئیدها پتانسیل مهاری بیش‌تری از خود نشان داده‌اند (۲۱). فلاوونول‌ها[5] یک گروه مهم از فلاونوئیدها هستند. ترکیبات مهم فلاوونولی شامل: Quercetin، Fisetin، Galangin، Kaempferol، Myricetin، Quercitrin و Rutin می‌باشند (۲۲، ۲۳).

با توجه به اینکه فلاونوئیدها ترکیبات مؤثری در مهار آنزیم آلدوز ردوکتاز هستند، لذا در این پژوهش به بررسی ترکیبات فلاوونولی (یک گروه از فلاونوئیدها) و توانایی این ترکیبات در مهار آنزیم آلدوز ردوکتاز در محیط *In silico* پرداخته‌شده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش از روش توصیفی- تحلیلی استفاده شد. ابتدا ساختارهای کریستالی آلدوز ردوکتازهای انسانی با کدهای PDB، 4GCA، 4LAU، 1US0 با قدرت‌های تفکیک 0.90Å، 0.84Å و 0.66Å به ترتیب از پایگاه داده پروتئینی به آدرس (http://www.rcsb.org) با فرمت PDB دانلود شدند. چون نتایج با استفاده از یک آلدوز ردوکتاز قابل قضاوت نبود لذا نتایج و آنالیز با استفاده از سه ساختار صورت گرفت. هم‌چنین ساختار ۳ بعدی (3D) ترکیبات فلاوونولی (۷ ترکیب) از پایگاه‌های PubChem و ChemSpider به دست آمد. برای مقایسه آنالیزها نیز ساختار 3D مولکول دارویی Ranirestat به‌عنوان یک مهارکننده استاندارد نیز از PubChem گرفته شد. با توجه به اینکه این دارو در غلظت‌های پایین نسبت به بقیه ترکیبات، بیشترین مهار را بر آنزیم مذکور دارد (IC_{50} پایین‌تری دارد) و معمولاً در اکثر مقالات به‌عنوان مهارکننده استاندارد در نظر گرفته می‌شود.

بهینه‌سازی ساختارهای آنزیمی و ترکیبات فلاوونولی

برای اینکه میان ماکرومولکول‌ها (آنزیم‌ها) و لیگاندها (ترکیبات فلاوونولی) اینتراکشن مناسبی برقرار شود، باید هردوی ماکرومولکول و لیگاند ازنظر انرژی و ساختار در حالت پایداری قرار گیرند. به همین منظور قبل از انجام داکینگ مولکولی و آنالیزهای مربوطه، همه‌ی ترکیبات فلاوونولی و آنزیم‌ها ازنظر انرژی و ساختار با کمک نرم‌افزار Chimera 5 بهینه‌سازی شدند.

نتایج

شناسه ترکیبات و بررسی سمیت

فرمول مولکولی و شناسه هرکدام از ترکیبات با استفاده از پایگاه PubChem پیدا شدند. ارزیابی جهش‌زایی و سرطان‌زایی ترکیبات قبل از تجویز و استفاده آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

جدول ۱. فرمول مولکولی و بررسی سمیت ترکیبات فلاوونولی و ترکیب استاندارد (Ranirestat). (مخففها N.C؛ فاقد سرطان‌زایی، N.M؛ فاقد موتاژن بودن)

نام ترکیبات	فرمول مولکولی	شناسه PubChem	سرطان‌زایی	جهش‌زایی
Quercetin	$C_{15}H_{10}O_5$	۵۲۸۰۴۴۳	N.C	N.M
Fisetin	$C_{15}H_{10}O_5$	۵۲۸۱۶۰۵	N.C	N.M
Galangin	$C_{15}H_{10}O_4$	۵۲۸۱۶۰۷	N.C	N.M
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	۵۲۸۰۴۴۵	N.C	N.M
Myricetin	$C_{21}H_{22}O_8$	۷۲۳۴۴	N.C	N.M
Quercitrin	$C_{20}H_{20}O_7$	۶۸۰۲۷۷	N.C	N.M
Rutin	$C_{16}H_{12}O_5$	۵۲۸۱۷۰۳	N.C	N.M
Ranirestat (Control)	$C_{21}H_{18}O_{11}$	۶۴۹۸۲	N.C	N.M

[4] Schwann cells

[5] Flavonols

نبود سمیت ترکیبات ازجمله فاکتورهای پراهمیت در انتخاب یک ترکیب به‌عنوان یک کاندید دارویی است. لذا در این پژوهش میزان سمیت (جهش‌زایی و سرطان‌زایی) هر یک از ترکیبات فلاوونولی با استفاده از سرور http://tox.charite.de/protox و نرم‌افزار Toxtree 2.5.4 بررسی شدند (۲۴) (جدول ۱). سمیت و پارامترهای فارماکوکینتیکی همه ترکیبات فلاوونولی و هم‌چنین داروی Ranirestat در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده‌اند. طبق پیش‌بینی سرورها و نرم‌افزارهای موردنظر، همه ترکیبات فلاوونولی به‌صورت Non Carcinogen و Non Mutagen بودند بنابراین هیچ سمیتی نشان ندادند. هم‌چنین پارامترهای فارماکوکینتیکی همه ترکیبات در رنج نرمالی قرار داشت.

بررسی شدند (جدول ۲). استفاده از Schrodinger Qikprop و سرور SwissADME، قوانین لیپینسکی۶ و پارامترهای اساسی متعددی مانند جذب، متابولیسم، حلالیت آبی، نفوذ از سد خونی- مغزی، فعالیت سیستم عصبی- مرکزی۷ و سطح دسترسی حلال۸ را محاسبه می‌کند (۲۶).

بررسی داکینگ مولکولی

یکی از روش‌های مهم مورداستفاده برای برهم‌کنش رسپتور- لیگاند، روش داکینگ مولکولی است. در این پژوهش برای برهم-کنش آنزیم‌ها و ترکیبات فلاوونولی از روش Autodock Tools 1.5.6 استفاده شد. ساختارهای 3D آنزیم‌ها از PDB و ترکیبات فلاوونولی از PubChem دانلود شدند. سپس لیگاندهای اضافی،

جدول ۲. پارامترهای فارماکوکینتیک ترکیبات فلاوونولی و مهارکننده استاندارد

نام ترکیبات	وزن مولکولی	جذب	فعالیت عصبی	سدخونی- مغزی	حلالیت آبی	LogP	SASA
محدوده	<500	>80%high <25%low	-2 inactive 2 active	(-3.0 to 1.2)	(-6.5 to 0.5)	<5	300–1000
Quercetin	۴۶۵/۱	۵۱/۶۷	-۲	-۱/۳۲۷	-۵/۸۱۳	۳/۳۱۹	۶۵۴/۲۱۷
Fisetin	۴۱۱/۳	۷۶/۱۴	-۲	-۰/۸۷۴	-۴/۸۱۱	۲/۴۵۵	۷۳۳/۳۲۹
Galangin	۳۷۰/۴	۷۲/۱۱	-۱	-۲/۳۱۱	-۳/۲۱۸	۳/۱۱۷	۸۳۳/۶۷۳
Kaempferol	۳۸۳/۵	۸۵/۱۶	-۲	-۰/۷۲۴	-۵/۹۱۶	۳/۲۱۹	۶۵۴/۸۱
Myricetin	۳۹۸/۷	۷۳/۱۸	۰	-۱/۴۱۷	-۳/۲۱۷	۱/۹۸۱	۵۶۸/۳۲
Quercitrin	۳۱۶/۸	۶۸/۱۴	۰	-۱/۲۹۷	-۴/۸۹۹	۲/۵۶۲	۶۲۱/۶۱
Rutin	۳۸۷/۲	۸۸/۳۸	-۲	-۰/۶۱۵	-۴/۷۶۱	۲/۲۱۴	۷۷۱/۴۲
Ranirestat (Control)	۴۲۰/۱	۸۸/۲۴	-۱	-۰/۷۴۳	-۴/۳۰۱	۲/۹۴۵	۵۵۵/۵۱۵

پارامترهای فارماکوکینتیک

به‌منظور ارزیابی ترکیبات ازلحاظ ویژگی‌های فارماکوکینتیکی مناسب، تمام لیگاندها ازلحاظ ویژگی‌های داروهمانندی و مطالعات ADME با استفاده از Schrodinger Qikprop (۲۵) و سرور SwissADME به نشانی (http://www.swissadme.ch)

مولکول‌های آب و مولکول‌های متفرقه که همراه آنزیم بودند، توسط نرم‌افزار Notepad++ حذف شدند. آنزیم‌ها و ترکیبات فلاوونولی به‌عنوان ورودی نرم‌افزار Autodock Tools انتخاب شدند. سپس به هرکدام از کدهای آنزیمی جداگانه مراحل اضافه کردن هیدروژن‌های قطبی و اضافه کردن بار (Kolman charges)

[6] Lipinski's rule
[7] Central Nervous System (CNS)
[8] Solvent Accessible Surface Area (SASA)

صورت گرفت و برای ترکیبات فلاوونولی از Compute Gasteiger استفاده شد. اندازه باکس (Grid Box) هم 100×100×100 و Point spacing عدد 0.4 در نظر گرفته شد. در ادامه برای جست-وجوی پارامترهای داکینگ از Genetic Algorithm و خروجی آن به‌صورت Lamarkian GA2 صورت گرفت. درنهایت برای مشاهده دقیق اینتراکشن میان آنزیم و ترکیبات فلاوونولی از نرم‌افزار Discovery Studio 3.5 استفاده شد.

به‌منظور اعتبار نتایج، داکینگ مولکولی با استفاده از سه ساختار آنزیم آلدوزردوکتاز انجام شد. تمام کنفورمر لیگاندها به‌صورت صحیحی به داخل ساختار کریستالی آنزیم‌ها داک

جدول ۳. داکینگ مولکولی و اینتراکشن ترکیبات فلاوونولی با آنزیم آلدوز ردوکتاز

آنزیم	لیگاند	انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول)	پیوند هیدروژنی
4GCA	Quercetin	-۱۵۰/۳	Asp216, Ser210, Cys298, Gln183, Ile260, Lys21, Tyr48, Asp43, Lys77
4GCA	Fisetin	-۱۳۹	Asp216, Ser210, Cys298, Ile260
4GCA	Galangin	-۱۳۳/۹	Tyr48, Ser210, Cys298, Ile260
4GCA	Kaempferol	-۱۳۸/۶	Tyr48, Ser210, Cys298, Ile260
4GCA	Myricetin	-۱۴۳/۸	
4GCA	Quercitrin	-۱۵۰/۶	Asp216, Ser210, Cys298, Asp43, Ile260, Ser214, Lys21, Lys262, His110
4GCA	Rutin	-۱۸۷/۹	His110, Gln183, Val47, Trp20, Ile260
4GCA	Ranirestat	-۱۵۴/۵	Tyr48, Ser210
4LAU	Quercetin	-۱۴۲/۹	Cys298, Gln183, Ile260, Asp216, Ser210
4LAU	Fisetin	-۱۳۸/۳	Cys298, Asp216, Ser210
4LAU	Galangin	-۱۳۲/۷	Cys298, Gln183, Ser210
4LAU	Kaempferol	-۱۳۷/۷	Cys298, Gln183, Ser210
4LAU	Myricetin	-۱۴۲/۲	Cys298, Gln183, Ile260, Asp216, Ser210, Lys77, Leu212,Pro211
4LAU	Quercitrin	-۱۴۵/۵	Cys298, Asp216, Ser210, Asp43, Thr19, Lys21, Trp20, Ser214, His110, Trp111, Tyr48
4LAU	Rutin	-۱۸۷/۴	Cys298, Ile260, Ser210 Lys21, Trp20, His110, Trp111, Tyr48, Val47, Cys303
4LAU	Ranirestat	-۱۵۲/۵	Tyr48, Ser210, Lys21
1US0	Quercetin	-۱۴۳/۴	Ile260, Tyr48, Cys298, Ser210, Asp216, Gln183, Asp43, Lys77, Lys21
1US0	Fisetin	-۱۳۹/۸	Ile260, Lys21, Cys298, Ser210, Asp216
1US0	Galangin	-۱۳۴/۱	Ile260, Tyr48, Cys298, Ser210, Lys77, Asp43,Gln183
1US0	Kaempferol	-۱۳۸/۹	Ile260, Tyr48, Cys298, Ser210, Asp43, Lys77, Gln183
1US0	Myricetin	-۱۴۳/۶	Leu212, Ile260, Asp43, Tyr48, Gln183, Lys77, Cys298, Tyr209, Ser210,
1US0	Quercitrin	-۱۳۵/۱	Tyr209, Cys298, Asn160, Tyr48, His110, Val47
1US0	Rutin	-۱۹۸/۳۴	Val47, Tyr48, Ser210, Trp20, Lys21, Thr19, Ile260, Cys298, Cys303, Gln183
1US0	Ranirestat	-۱۵۲/۸	Ser210, Tyr48

شدند. نتایج به‌دست‌آمده از داکینگ مولکولی بین ترکیبات فلاوونولی و آنزیم‌های آلدوزردوکتاز با کدهای PDB مختلف در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود همه ترکیبات فلاوونولی، از انرژی اتصال مناسبی برخوردارند (به عبارتی معمولاً عنوان می‌شود که هر چه انرژی اتصال منفی‌تر باشد، اتصال لیگاند به رسپتور موردنظر بهتر است). هم‌چنین آمینواسیدهای درگیر در پیوند هیدروژنی نشان داده‌شده است.

آنالیز آماری

نتایج تحلیل واریانس در مورد میزان انرژی داکینگ دو گروه ترکیبات فلاونوئیدی و کنترل نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده می‌شود. برای گروه‌های فلاوونولی با جامعه آماری دسته‌های ۲۱ و برای کنترل با جامعه آماری دسته‌های ۹ و انحراف معیار مشخص نشان داده شد که مدل معنی‌دار بوده و اختلاف بین گروه‌های موردنظر مشاهده می‌شود (جدول ۴).

جدول ۴. مقایسه میزان انرژی داکینگ در دو گروه فلاونوئید و کنترل

گروه	تعداد	انحراف معیار	p-value
فلاوونول‌ها	۲۱	۹/۰۸	۰/۰۴۸
کنترل	۹	۱۱/۰۹	۰/۰۷۷

بحث

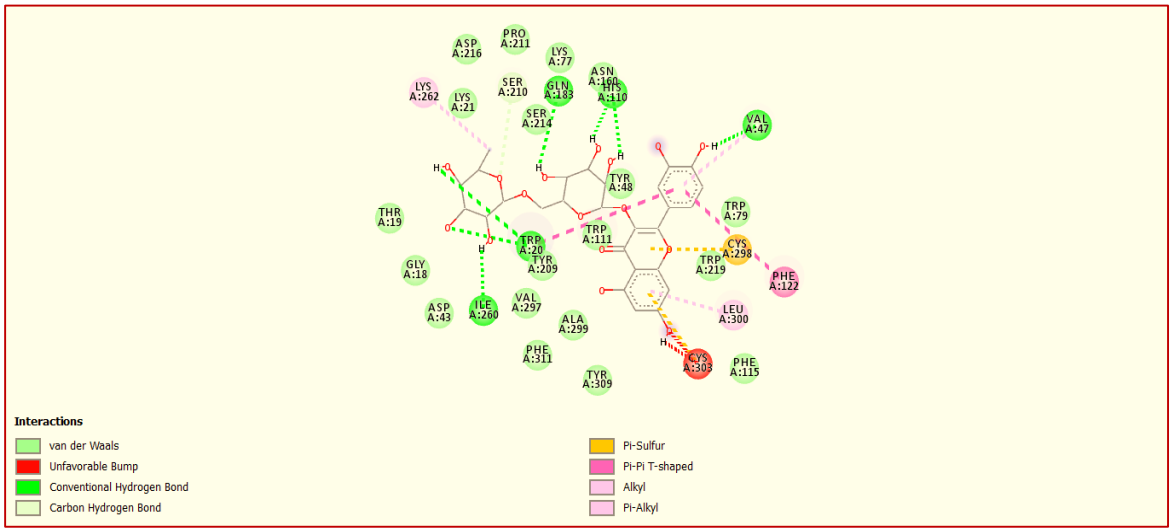
قبل از انجام داکینگ مولکولی، پارامترهای فیزیکوشیمیایی باید محاسبه می‌شدند تا ترکیباتی که ازلحاظ خصوصیات فارماکوکینتیکی (وزن مولکولی، جذب، فعالیت عصبی، نفوذ سد خونی- مغزی، حلالیت آبی، Log*p* و SASA) مناسب نیستند، برای عمل داکینگ مولکولی انتخاب نشوند. طبق قانون لیپینسکی ترکیباتی می‌توانند جذب خوبی داشته باشند که وزن مولکولی کم‌تر از ۵۰۰ دالتون و ضریب حلالیت (Log*p*) کم‌تر از ۵ را دارا باشند (۲۷). بااین‌حال وزن مولکولی همه ترکیبات فلاوونولی و داروی Ranirestat در رنج نرمال و همه کم‌تر از ۵۰۰ بودند. ترکیب Rutin جذب و حلالیت بیش‌تری نسبت به داروی Ranirestat داشت. هرچند ترکیبات Quercetin، Fisetin، Kaempferol و Quercitrin حلالیت آبی بیش‌تری نسبت به ترکیب Rutin داشتند. رنج حلالیت آبی معمولاً بین ۶/۵- تا ۰/۵ درصد واقع‌شده است یعنی ترکیباتی که پایین‌تر از ۶/۵- باشند حلالیت خیلی کم و بالاتر از ۰/۵ حلالیت زیادی دارند. همه ترکیبات انتخاب‌شده در رنج نرمالی از حلالیت قرار دارند و حتی ترکیب Myricetin و Galangin حلالیت بیشتری نسبت به نمونه استاندارد دارند. سطح دسترسی حلال همه ترکیبات نسبت به Ranirestat بالاتر بودند. آنالیزها نشان داد که اکثر ترکیبات فلاوونولی جذب متوسطی (کم‌تر از ۸۰ درصد و بیش‌تر از ۲۵ درصد) را داشتند اما ترکیب Rutin با جذب ۸۸/۳۸ درصد نسبت به داروی Ranirestat جذب بیش‌تری را دارا است. به خاطر ایمن بودن بیش‌تر، میزان نفوذ سد خونی- مغزی و فعالیت سیستم عصبی- مرکزی ترکیبات نیز محاسبه شد. مغز توسط سد خونی- مغزی از گردش سیستمیک محافظت می‌کند. همه ترکیبات فلاوونولی و هم‌چنین داروی Ranirestat بر سیستم عصبی- مرکزی غیرفعال بودند لذا اختلالی روی سیستم عصبی- مرکزی ایجاد نمی‌کنند و محدوده نرمالی را نشان دادند؛ بنابراین همه ترکیبات طبیعی فلاوونولی انتخاب‌شده، خواص فارماکوکینتیکی و همانندی دارویی مناسبی را از خود نشان دادند.

طبق جدول ۳ از میان ۷ ترکیب فلاوونولی، ترکیب Rutin انرژی و امتیاز اتصال بالاتری را از خود نشان داد. ترکیب روتین یک پنتاهیدروکسی فلاوون است که هم‌چنین Sophorin و Rutoside نامیده می‌شود (۲۸). مطالعات زیادی نشان داده که Rutin کاربردهای فارماکولوژی زیادی مانند نقش آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد بیماری قلبی- عروقی، آنتی‌دیابتیک و فعالیت ضد سرطانی دارد. هم‌چنین می‌تواند نقش حفاظت از نورون‌ها و جلوگیری از تخریب نورون‌ها را ایفا کند (۲۹).

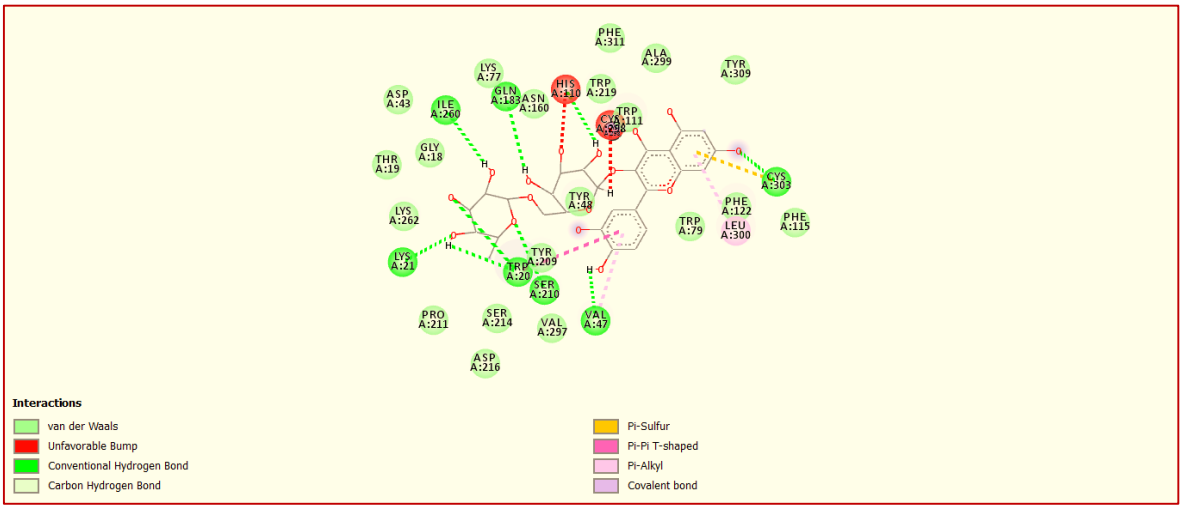
در مطالعات گذشته مشخص‌شده بود که کوئرستین یک مهارکننده قوی آنزیم آلدوز ردوکتاز است (۳۰). در این پژوهش ترکیب Rutin امتیاز داکینگ و انرژی اتصال بیش‌تری نسبت به کوئرستین و Ranirestat دارد. بااین‌حال ترکیبات Quercetin، Fisetin، Galangin، Kaempferol، Myricetin و Quercitrin تأثیر مهاری کم‌تر و انرژی داکینگ پایین‌تری نسبت به داروی

Ranirestat نشان دادند. بر اساس موقعیت اتصالی کوفاکتور NADPH، جایگاه فعال آنزیم آلدوزردوکتاز در انتهای بخش کربوکسیلی شبکه بتا قرارگرفته است (۳۱). باقی‌مانده‌های آمینواسیدی که مستقیماً در اتصال به لیگاند درگیر هستند بر اساس مقالات استخراج شدند (۳۲، ۳۳). جایگاه فعال شامل یک منطقه اتصال آنیونی و منطقه اتصال ویژه است. منطقه اتصال آنیونی توسط آمینواسیدهای Trp20، Val47، Tyr48، Trp79، His110 و Trp111 اشغال‌شده است (۳۴). جایگاه اتصال ویژه رنج بالاتری از انعطاف‌پذیری را نشان می‌دهد و با آمینواسیدهای Trp121، Thr113، Phe122، Gln183، Trp202، Cys298، Leu300 و Cys303 احاطه‌شده است. عملکرد ویژه آنزیم توسط باقی‌مانده‌های هر دو منطقه ایجاد می‌شود (۳۵).

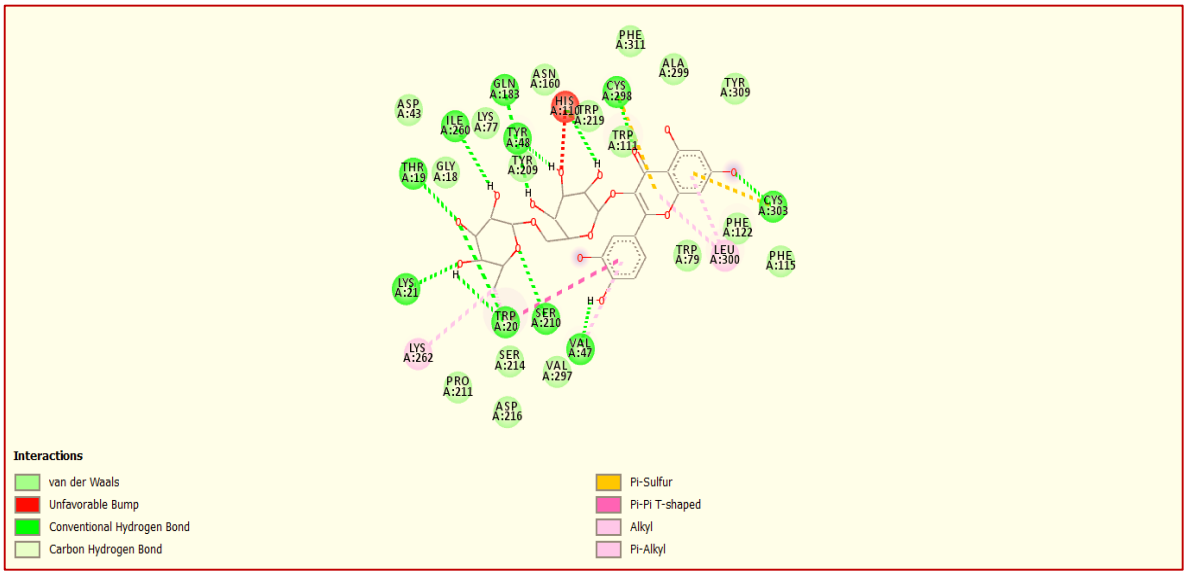
در مورد کمپلکس 4GCA-Rutin، اینتراکشن لیگاند با پروتئین شامل ۵ پیوند هیدروژنی (Val47، Ile260، Gln183، His110 و Trp20) و چندین باند واندروالسی است (شکل ۲). به دلیل اینتراکشن Rutin با آمینواسیدهای مهم در بخش پاکت ویژه و هم‌چنین آمینواسیدهای جایگاه آنیونی، امتیاز داکینگ منفی‌تری را به خود اختصاص می‌دهد. هم‌چنین در مورد کمپلکس 4LAU-Rutin، لیگاند با تشکیل ۷ پیوند هیدروژنی (Val47، Ser210، Trp20، Lys21، Ile260، Gln183 و Cys303) و چندین واندروالس در جایگاه فعال آنزیم درگیر می‌شوند (شکل ۳). در کمپلکس 1US0-Rutin، ۱۰ پیوند هیدروژنی و البته پیوندهای واندروالسی کم‌تری نسبت به 4GCA-Rutin و 4LAU-Rutin وجود دارد (شکل ۴). نوع اتصال پیوندها در هر



شکل ۲. برهم‌کنش‌های الف) دوبعدی ترکیب Rutin با آنزیم آلدوز ردوکتاز (PDB ID: 4GCA)



شکل ۳.برهم‌کنش‌های دوبعدی ترکیب Rutin با آنزیم آلدوز ردوکتاز (PDB ID: 4LAU)



شکل ۴. برهم‌کنش‌های دوبعدی ترکیب Rutin با آنزیم آلدوز ردوکتاز (PDB ID: 1US0)

سه کمپلکس شبیه به هم است. در هر سه کمپلکس، محدوده تغییرات انرژی داکینگ از ۱۳۲/۷- تا ۱۹۸/۳۴- کیلوکالری بر مول به ترتیب مربوط به ترکیب‌های Galangin و Rutin است.

Ranirestat داک شده با 4GCA و 1US0، دو آمینواسید Tyr48 و Ser210 را درگیر می‌کند اما در کمپلکس 4LAU-Ranirestat این برهم‌کنش شامل ۳ آمینواسید Tyr48, Ser210 و Lys21 است اما محدوده انرژی داکینگ آن‌ها در هر سه کمپلکس 4GCA-Ranirestat, 4LAU-Ranirestat, 1US0-Ranirestat به ترتیب ۱۵۲/۸-، ۱۵۲/۵- و ۱۵۴/۵- کیلوکالری بر مول می‌باشند که نزدیک به هم هستند و این نشان می‌دهد که Ranirestat به‌عنوان یک مهارکننده استاندارد توانایی بالقوه‌ای در مهار آنزیم آلدوزردوکتاز دارد. در مورد کمپلکس‌های 4GCA-Rutin, 4LAU-Rutin, 1US0-Rutin انرژی داکینگ به ترتیب ۱۹۸/۳۴-، ۱۸۷/۴- و ۱۸۷/۹- کیلوکالری بر مول می‌باشند که امتیاز داکینگ بیش‌تری نسبت به Ranirestat داشتند. ترکیب Rutin به‌واسطه اینتراکشن با آمینواسیدهای مهم در جایگاه فعال مانند Val147، Tyr48، Lys21، Ser210، Trp20، Lys21، Thr19، Cys298، Cys303 و Gln183 انرژی اتصال منفی‌تری را از خود نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که در هر سه کمپلکس Aldose Reductase-Rutin، ترکیب Rutin قدرت اتصال بیش‌تری را نسبت به داروی Ranirestat و کمپلکس Aldose Reductase-Ranireestat داشت.

مطالعات زیادی اثر مهاری فلاونوئیدها بر آنزیم آلدوزردوکتاز را نشان می‌دهند. De و همکاران در سال ۲۰۱۵ با روش QSAR و داکینگ مولکولی نشان دادند که فلاونوئیدها توانایی بالقوه‌ای در مهار آلدوز ردوکتاز داشتند (۳۶) که در مطالعه ما نیز این اثر مهاری برای ترکیبات فلاوونولی کاملاً مشهود بود. Selvaraj و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی واریانت‌های آنزیم آلدوز ردوکتاز، داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی یکسری لیگاندهای انتخابی، نشان دادند لیگاندهایی می‌توانند آنزیم را به‌طور قوی مهار کنند که به‌طور محکمی با آمینواسیدهای مهم جایگاه فعال اینتراکشن می‌کنند (۳۷) در مطالعه ما نیز ترکیبی مانند Rutin که بیش‌ترین تأثیر مهاری را از میان ترکیبات داشت، بیش‌ترین اینتراکشن را با آمینواسیدهای جایگاه فعال دارد. Rodriguez و همکاران در سال ۲۰۱۸ با جداسازی فلاونوئیدها به روش HPLC در گیاه *Cirsium japonicum*، به این نتیجه رسیدند که بعضی فلاونوئیدها مانند Apigenin قدرت مهاری آلدوز ردوکتاز داشتند (۳۸). Aslan و همکاران در سال ۲۰۱۷ با تخلیص آنزیم آلدوز ردوکتاز و بررسی ترکیبات فنولی و تأثیر مهاری آن‌ها بر آنزیم مذکور، مشخص کردند که ترکیباتی مانند کافئیک‌اسید، گالیک‌اسید و فرولیک‌اسید با IC_{50}های به ترتیب 0.013، 0.026 و 0.017 بیش‌ترین میزان مهار را داشتند (۳۹). Bhadada و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی ترکیباتی از گیاه *Tephrosia purpurea* و اثر مهاری این ترکیبات، نشان

دادند که ترکیب Rotenone باانرژی داکینگ ۳/۸۱۱- کیلوژول بر مول و اینتراکشن با آمینواسیدهای Trp20 و Lys21 تأثیر مهاری قابل‌توجهی بر آلدوز ردوکتاز داشت (۴۰) که در مطالعه ما نیز اینتراکشن این دو آمینواسید مهم در جایگاه فعال آنزیم با ترکیبات فلاوونولی آشکار بود.

نتیجه‌گیری

آنزیم آلدوز ردوکتاز یک آنزیم محدودکننده سرعت در مسیر پلی‌ال است و نقش اساسی در عوارض ناشی از دیابت دارد. داکینگ مولکولی کاملاً مشخص کرد که ترکیبات طبیعی فلاوونولی مانند Quercetin، Fisetin، Galangin، Kaempferol، Myricetin، Quercitrin و Rutin تأثیر مهاری قابل‌توجهی بر آنزیم آلدوز ردوکتاز داشتند. ترکیب Rutin امتیاز و انرژی اتصال بهتری نسبت به داروی تجاری Ranirestat نشان داد. اینتراکشن‌های مولکولی، نبودن سمیت و ویژگی‌های فارماکوکینتیکی مناسب ترکیبات، استراتژی‌های درمانی جدیدی برای ترکیبات پیشنهاد می‌دهند. هرچند مطالعات آزمایشی *In vitro* و *In vivo* به‌منظور اعتبار نتایج باید در نظر گرفته شوند؛ بنابراین این مطالعه به‌خوبی نشان داد که ترکیبات فلاوونولی با مهار آنزیم آلدوز ردوکتاز در محیط *In silico* ممکن است اثرات مثبتی در پیشگیری از عوارض ناشی از دیابت ارائه دهند و هم‌چنین به دلیل نداشتن عوارض جانبی می‌توانند به‌عنوان عوامل بالقوه درمانی پیشنهاد شوند.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران و دوستانی که ما را در اجرای هر چه بهتر این طرح یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم.

تعارض منافع

طبق نظر نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001;414(6865):813-20.
2. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circulation research. 2010;107(9):1058-70.
3. Kato A, Tatsumi Y, Yako H, Himeno T, Kondo M, Kato Y, et al. 574-P: Recurrent Short-Term Hypoglycemia and Hyperglycemia Enhance Apoptosis and Oxidative Stress through Polyol Pathway and Endoplasmic Reticulum Stress Pathway in Schwann Cells. Am Diabetes Assoc; 2019.
4. Hotta N, Kawamura T, Umemura T. Are the polyol pathway and hyperuricemia partners in the development of non-alcoholic fatty liver disease in diabetes? Journal of diabetes investigation. 2019.
5. Prnova MS, Svik K, Bezek S, Kovacikova L, Karasu C, Stefek M. 3-Mercapto-5H-1, 2, 4-triazino [5, 6-b] indole-5-acetic acid (cemtirestat) alleviates symptoms of peripheral diabetic neuropathy in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats: a role of aldose reductase. Neurochemical research. 2019;44(5):1056-64.
6. Quattrini L, La Motta C. Aldose reductase inhibitors: 2013-present. Expert opinion on therapeutic patents. 2019;29(3):199-213.
7. Prnova MS, Kovacikova L, Svik K, Bezek S, Elmazoğlu Z, Karasu C, et al. Triglyceride-lowering effect of the aldose reductase inhibitor cemtirestat—another factor that may contribute to attenuation of symptoms of peripheral neuropathy in STZ-diabetic rats. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2019:1-11.
8. Iyer S, Sam FS, DiPrimio N, Preston G, Verheijen J, Murthy K, et al. Repurposing the aldose reductase inhibitor and diabetic neuropathy drug epalrestat for the congenital disorder of glycosylation PMM2-CDG. Disease models & mechanisms. 2019;12(11).
9. Marty L, Bausewein D, Müller C, Bangash SAK, Moseler A, Schwarzländer M, et al. Arabidopsis glutathione reductase 2 is indispensable in plastids, while mitochondrial glutathione is safeguarded by additional reduction and transport systems. New Phytologist. 2019;224(4):1569-84.
10. Kim T-S, Patel SK, Selvaraj C, Jung W-S, Pan C-H, Kang YC, et al. A highly efficient sorbitol dehydrogenase from Gluconobacter oxydans G624 and improvement of its stability through immobilization. Scientific reports. 2016;6(1):1-11.

11. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocrine reviews. 2002;23(5):599-622.
12. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. Journal of the American Society of Nephrology. 2003;14(suppl 3):S233-S6.
13. Petrash J. All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 2004;61(7-8):737-49.
14. Huang SP, Palla S, Ruzycki P, Varma RA, Harter T, Reddy GB, et al. Aldo-keto reductases in the eye. Journal of ophthalmology. 2010;2010.
15. Barski OA, Gabbay KH, Grimshaw CE, Bohren KM. Mechanism of human aldehyde reductase: characterization of the active site pocket. Biochemistry. 1995;34(35):11264-75.
16. Demir Y, Işık M, Gülçin İ, Beydemir Ş. Phenolic compounds inhibit the aldose reductase enzyme from the sheep kidney. Journal of biochemical and molecular toxicology. 2017;31(9):e21936.
17. Sango K, Suzuki T, Yanagisawa H, Takaku S, Hirooka H, Tamura M, et al. High glucose-induced activation of the polyol pathway and changes of gene expression profiles in immortalized adult mouse Schwann cells IMS32. Journal of neurochemistry. 2006;98(2):446-58.
18. Iqbal Z, Ali S, Iqbal J, Abbas Q, Qureshi IZ, Hameed S. Dual action spirobicycloimidazolidine-2, 4-diones: Antidiabetic agents and inhibitors of aldose reductase-an enzyme involved in diabetic complications. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2013;23(2):488-91.
19. Liu H-Y, Liu S-S, Qin L-T, Mo L-Y. CoMFA and CoMSIA analysis of 2, 4-thiazolidinediones derivatives as aldose reductase inhibitors. Journal of molecular modeling. 2009;15(7):837.
20. Obrosova IG, Minchenko AG, Vasupuram R, White L, Abatan OI, Kumagai AK, et al. Aldose reductase inhibitor fidarestat prevents retinal oxidative stress and vascular endothelial growth factor overexpression in streptozotocin-diabetic rats. Diabetes. 2003;52(3):864-71.
21. Patil KK, Gacche RN. Inhibition of glycation and aldose reductase activity using dietary flavonoids: A lens organ culture studies. International journal of biological macromolecules. 2017;98:730-8.
22. Yang J, Guo J, Yuan J. In vitro antioxidant properties of rutin. LWT-Food Science and Technology. 2008;41(6):1060-6.
23. You HJ, Ahn HJ, Ji GE. Transformation of rutin to antiproliferative quercetin-3-glucoside by Aspergillus niger. Journal of agricultural and food chemistry. 2010;58(20):10886-92.
24. Jia C-Y, Li J-Y, Hao G-F, Yang G-F. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. Drug discovery today. 2020;25(1):248-58.
25. Basha SH, Bethapudi P, Majji Rambabu F. Anti-angiogenesis property by Quercetin compound targeting VEGFR2 elucidated in a computational approach. European Journal of Biotechnology and Bioscience. 2014;2(6):30-46.
26. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced drug delivery reviews. 1997;23(1-3):3-25.
27. Walters WP. Going further than Lipinski's rule in drug design. Expert opinion on drug discovery. 2012;7(2):99-107.
28. Huang W-y, Zhang H-c, Liu W-x, Li C-y. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. Journal of Zhejiang University Science B. 2012;13(2):94-102.
29. Enogieru AB, Haylett W, Hiss DC, Bardien S, Ekpo OE. Rutin as a potent antioxidant: implications for neurodegenerative disorders. Oxidative medicine and cellular longevity. 2018;2018.
30. Naeem S, Hylands P, Barlow D. Docking studies of chlorogenic acid against aldose redutcase by using molgro virtual docker software. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2013;3(1):13.
31. Danesh FR, Wada J, Wallner EI, Sahai A, Srivastava SK, Kanwar YS. Gene regulation of aldose-, aldehyde-and a renal specific oxido reductase (RSOR) in the pathobiology of diabetes mellitus. Current medicinal chemistry. 2003;10(15):1399-406.
32. Zhu C. Aldose reductase inhibitors as potential therapeutic drugs of diabetic complications: chapter; 2013.
33. Antony P, Vijayan R. Identification of novel aldose reductase inhibitors from spices: a molecular docking and simulation study. PLoS One. 2015;10(9).

34. El-Kabbani O, Ramsland P, Darmanin C, Chung RPT, Podjarny A. Structure of human aldose reductase holoenzyme in complex with Statil: An approach to structure-based inhibitor design of the enzyme. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2003;50(2):230-8.
35. Stefek M, Soltesova Prnova M, Majekova M, Rechlin C, Heine A, Klebe G. Identification of novel aldose reductase inhibitors based on carboxymethylated mercaptotriazinoindole scaffold. Journal of medicinal chemistry. 2015;58(6):2649-57.
36. De UC, Debnath T, Sen D, Debnath S. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships and docking studies of some structurally diverse flavonoids and design of new aldose reductase inhibitors. Journal of advanced pharmaceutical technology & research. 2015;6(1):13.
37. Selvaraj C, Krishnasamy G, Jagtap SS, Patel SK, Dhiman SS, Kim T-S, et al. Structural insights into the binding mode of d-sorbitol with sorbitol dehydrogenase using QM-polarized ligand docking and molecular dynamics simulations. Biochemical Engineering Journal. 2016;114:244-56.
38. Rodriguez JP, Lee YK, Woo DG, Shim JS, Geraldino PJL, Jacinto SD, et al. Flavonoids from Cirsium japonicum var. maackii pappus as inhibitors of aldose reductase and their simultaneous determination. Chemical Papers. 2018;72(1):81-8.
39. Aslan HE, Beydemir Ş. Phenolic compounds: the inhibition effect on polyol pathway enzymes. Chemico-biological interactions. 2017;266:47-55.
40. Bhadada SV, Vyas VK, Goyal RK. Protective effect of Tephrosia purpurea in diabetic cataract through aldose reductase inhibitory activity. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2016;83:221-8.

Original Article

Evaluation of Pharmacokinetic Parameters, Toxicity, and Molecular Docking of Flavonols with Aldose Reductase Enzyme to Find an Effective Compound in Inhibition of this Enzyme

Sadeghi M, Miroliaei M*

Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 19 Oct 2020 Accepted: 19 Dec 2020

Abstract

Background & Objective: Aldose reductase plays an important role in chronic diabetes and can cause tissue complications. Controlling the activity of aldose reductase provides an important strategy in controlling the complications of diabetes. Flavonoids are important inhibitors of aldose reductase. This study aimed to investigate the inhibitory nature of flavonol compounds in fruits and plants on aldose reductase activity by bioinformatic methods.

Material & Methods: This study was descriptive-analytical. First, the structure of flavonol compounds, Ranirestat, and enzymes were downloaded from ChemSpider and PDB databases, respectively. Ranirestat was used as the standard drug. The pharmacokinetic properties and toxicity of the compounds were predicted by Swiss ADME, Protox servers, and Toxtree2.5.4 software. Then, to interact the compounds with the enzyme structure, molecular docking was used to method AutoDock Tools 1.5.6. Finally, the results were analyzed using Discovery Studio 3.5 software.

Results: The results showed that all flavonol compounds were desirable in pharmacokinetic properties and lacked toxicity. All compounds were able to inhibit aldose reductase enzymes with different PDB codes. However, among these compounds, the combination of Rutin with average docking energy of 191.21 kcal/ mole (P-value <0.05) had stronger binding energy than the standard Ranirestat drug.

Conclusion: From the results of this study, it can be concluded that among the selected flavonol compounds, the Rutin compound showed stronger inhibitory activity than other flavonol compounds due to its interaction with important amino acids in the active site of the enzyme. As a result, further study of this compound *in vivo* and *in vitro* environments can be used as a potential candidate to inhibit the enzyme aldose reductase and ultimately prevent chronic complications of diabetes.

Keywords: Aldose reductase, Flavonol compounds, Inhibitor, Molecular Docking

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

Journal of Advanced Biomedical Sciences; 10 (2020): 2893-2904