

## بررسی بیوانفورماتیکی اثر گیاه آویشن باغی در مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز به منظور درمان بیماری دیابت

سعیده رهنما<sup>۱</sup>، عزیزه اسدزاده<sup>۱\*</sup>، فاطمه حیدریان نائینی<sup>۱</sup>

### چکیده

**مقدمه:** مهارکننده‌های  $\alpha$ -گلوکوزیداز با مداخله در هضم کربوهیدرات‌ها در کنترل بیماری دیابت نقش دارند. *Thymus vulgaris* یا آویشن باغی گیاهی از خانواده‌ی نعنائیان می‌باشد. اسانس این گیاه دارای فنل‌هایی مثل تیمول، کارواکرول، سیمن، لینا لول، پینن می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهارکنندگی مشتقات موجود در عصاره‌ی آویشن باغی بر فعالیت آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز به روش داکینگ مولکولی می‌باشد.

**روش‌ها:** در این مطالعه، برای بررسی نحوه‌ی اتصال ترکیبات به جایگاه فعال آنزیم، ترسیم ساختار شیمیایی ترکیبات، بهینه‌سازی انرژی، مطالعات داکینگ و تجزیه و تحلیل‌های نهایی به ترتیب از نرم‌افزارهای *ChemDraw*، *Hyperchem*، *AutoDockTools*، *DS Visualizer* و *Lig plot* استفاده شد.

**یافته‌ها:** تمامی ترکیبات مورد مطالعه قادر به اشغال جایگاه فعال آنزیم بودند که در میان تمام آنها، بهترین نتایج داکینگ مربوط به ترکیب *Caryophylla-4-(12), 8(13)-dien-5- $\beta$ -ol* است. در حقیقت این ترکیب دارای منفی‌ترین سطح انرژی اتصال، بالاترین تمایل برای اتصال به آمینواسیدهای کلیدی جایگاه فعال آنزیم و محل برهمکنش مشابه با مولکول کوکریستال است.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اثر بخشی نسبتاً بالای ترکیبات عصاره‌ی گیاه در مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی، برای بررسی‌های تکمیلی می‌توان اثر این ترکیبات گیاهی را در شرایط *in vitro* و *in vivo* مورد آنالیز قرار داد.

**واژگان کلیدی:** دیابت، آلفا-گلوکوزیداز، مولکولار داکینگ، مهارکننده، آویشن باغی

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، مؤسسه‌ی آموزش عالی نور دانش، میمه، اصفهان، ایران

\***نشان‌ی:** اصفهان، میمه، میدان اصفهان، خیابان دانش، مؤسسه‌ی آموزش عالی نور دانش میمه، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، کد پستی: ۸۳۵۱۷۶۵۸۵۱، تلفن: ۰۳۱۴۵۴۲۷۶۰۰، پست الکترونیکی: az.asadzadeh@yahoo.com

## مقدمه

دیابت یک اختلال متابولیسمی بدن ناشی از علل چندگانه است که با افزایش مزمن قند خون، همراه با اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، پروتئین و چربی نمایان می‌شود که این اختلال ناشی از نقص در ترشح انسولین (دیابت نوع یک) و یا نقص در عملکرد انسولین (دیابت نوع دو) و یا هر دو است. قند خون بالای ناشی از دیابت کنترل نشده منجر به آسیب‌های جدی به بسیاری از سیستم‌های بدن، به‌خصوص اعصاب و عروق خونی می‌شود [۱-۵]. مبتلایان به دیابت نوع یک توانایی تولید انسولین را ندارند و این امر موجب افزایش قند خون می‌گردد. در دیابت نوع دو گیرنده‌های سلولی فرد نسبت به انسولین مقاوم شده‌اند و در واقع مانع از ورود انسولین به داخل سلول‌ها و انجام اعمال طبیعی آن می‌شوند. در هر دو نوع دیابت علائم مشترکی از جمله پراداری یا پلی‌اوری (افزایش حجم ادرار در شبانه روز نسبت به حالت طبیعی) و به‌دنبال آن پرنوشی به‌وجود می‌آید و نهایتاً پرخوری نیز مشاهده می‌شود که در دیابت نوع یک علی‌رغم پرخوری، فرد لاغر است [۶-۸]. آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز با نام دیگر مالتاز، یک نوع آنزیم گوارشی است که به‌طور گسترده در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و بافت‌های حیوانی توزیع شده است [۹-۲].  $\alpha$ -گلوکوزیداز آنزیم گروهی گشایی موجود در اپتیلوم روده‌ی کوچک است و آزادسازی  $\alpha$ -گلوکوز را از انتهای غیرآزاد سوبسترا کاتالیز می‌کند، بنابراین به‌عنوان یکی از آنزیم‌های مهم گوارشی عمل کرده و به جذب روده کمک می‌کند و باعث تسهیل جذب گلوکز توسط روده‌ی کوچک می‌شود [۱۰، ۲]. آویشن باغی گیاهی است از خانواده‌ی نعناعیان و جنس تیموس، دارای گونه‌های مختلفی است که ۱۴ گونه‌ی آن بومی ایران هستند. اسانس آویشن که به اسانس تیم (Thyme) معروف است دارای ۳۸ ترکیب مختلف بوده که مهم‌ترین آنها فنل‌هایی مثل تیمول و کارواکرول (۴۰ درصد) هستند. از ترکیبات دیگر اسانس می‌توان به سیمن، لینالول و لیمونن، ترپین و پینن اشاره کرد [۱۱]. در سایر مطالعات انجام گرفته، مهار آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز به‌وسیله‌ی مهارکننده‌های شیمیایی یا سنتزی از طریق عملیات داکینگ مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج داکینگ مهارکننده‌ها در این مطالعات در مقایسه با اثر مهار ترکیبات مهارکننده‌ی مرجع (آکاربوز، مگلیتول) به‌دست آمده است [۱۲]. تفاوت مطالعه‌ی حاضر با دیگر مطالعات، مهار آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز با ترکیبات طبیعی موجود در

عصاره‌ی گیاه است و نتایج داکینگ ترکیبات این گیاه با ترکیب کوکریستال آنزیم مورد مقایسه قرار گرفته است. با توجه به اهمیت مهار آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز در درمان بیماری دیابت، در این مطالعه اثر مهار کنندگی، نحوه‌ی اتصال و اثربخشی تمامی مشتقات موجود در عصاره‌ی آویشن باغی به جایگاه فعال آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

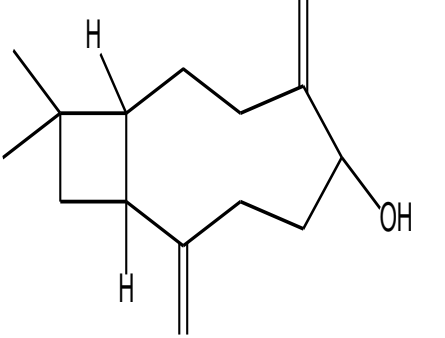
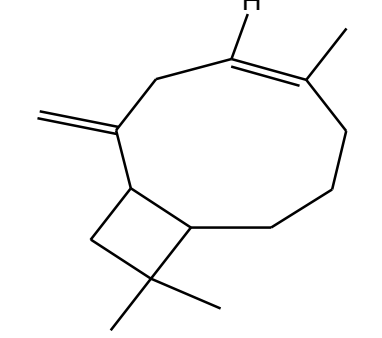
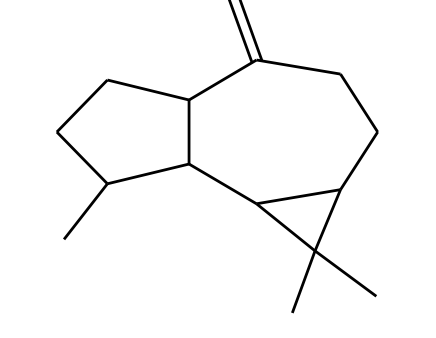
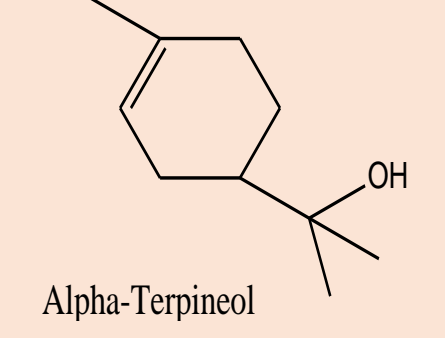
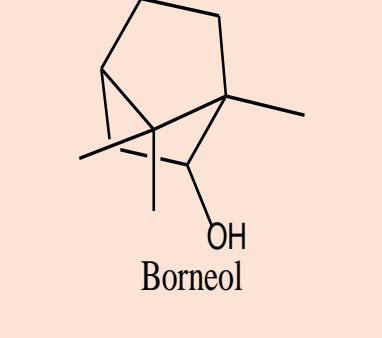
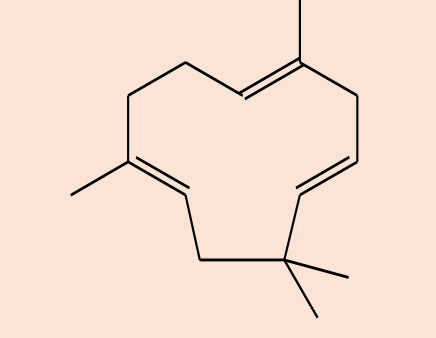
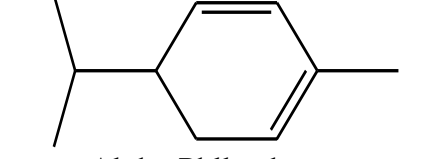
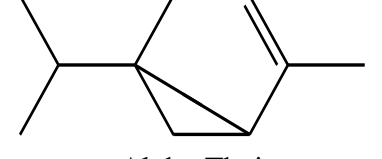
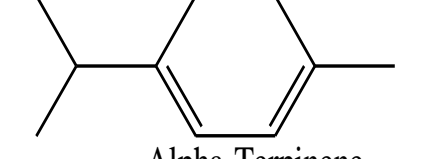
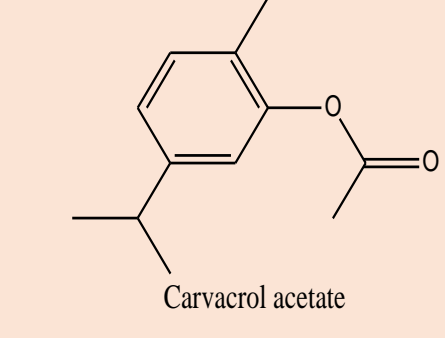
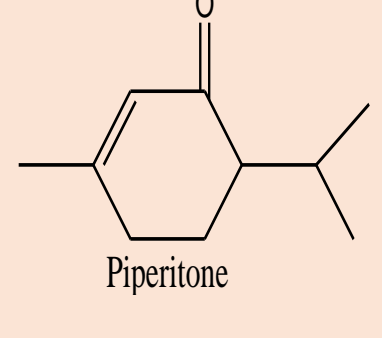
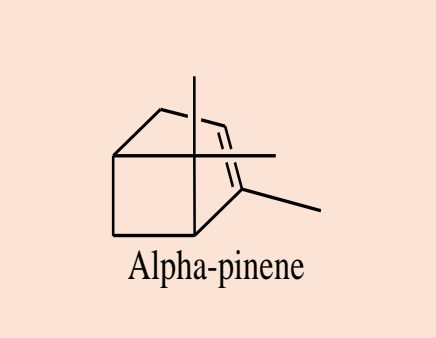
## روش‌ها

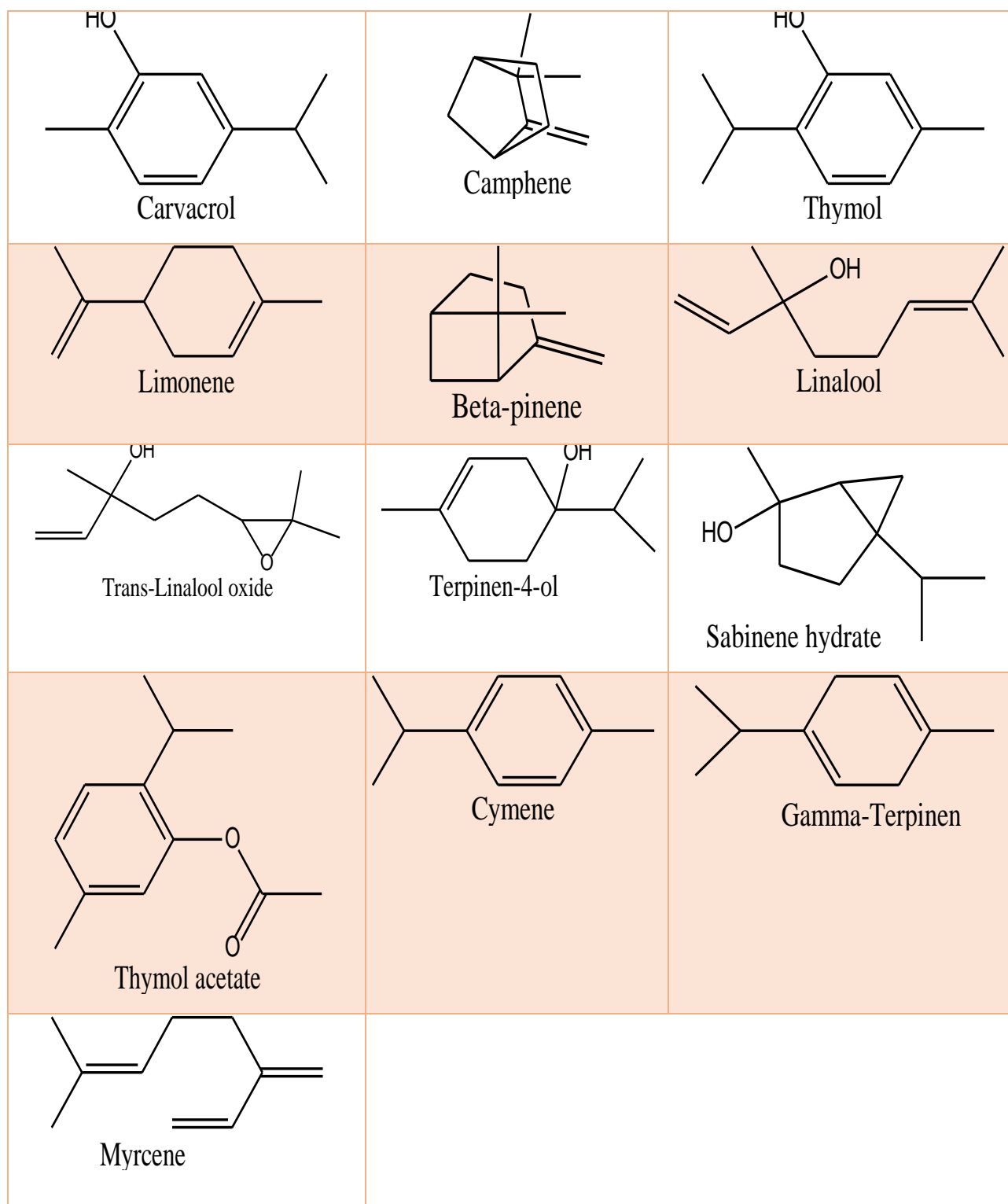
در این تحقیق از نرم افزار اتوداک (AutoDock 4.2) برای انجام داکینگ مولکولی استفاده شد. بدین منظور نرم‌افزار اتوداک در کامپیوتر ۵ هسته‌ای که تحت سیستم عامل لینوکس بود، نصب شد. در این تحقیق ۲۵ ترکیب از مواد تشکیل دهنده‌ی عصاره‌ی آویشن باغی مورد بررسی قرار گرفت. ساختار ترکیبات مورد مطالعه از سایت <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> به‌دست آمد. نام و جزئیات ساختاری ترکیبات مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. ساختار کریستالی مناسب آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز حاوی بخش کاتالیتیکی مرکزی از سایت <http://www.rcsb.org/pdb> انتخاب و دانلود شد. کد آنزیم در این سایت A4A3 با وضوح ۱/۶ آنگستروم است.

### آماده کردن لیگاندها و پروتئین A4A3 برای داکینگ

ساختار دو بعدی لیگاندهای مورد نظر توسط برنامه‌ی ChemDraw Ultra 8.0 ترسیم شدند و سپس با استفاده از نرم‌افزار Hyperchem و توسط الگوریتم Polak-Ribiere از نظر انرژی بهینه شدند، در مرحله‌ی بعد لیگاندهای بهینه شده به‌عنوان ورودی نرم‌افزار اتوداک تولز استفاده شد و سپس با استفاده از Gasteiger-Marsili بار جزئی برای مولکول‌های مهار کننده محاسبه شد، هیدروژن‌های غیر یونیزه ادغام گردید و بعد از مشخص کردن مرکز ثقل مولکول تمامی باندهای قابل چرخش تعیین گردید. با استفاده از نرم‌افزار DS Visualizer 3.5، لیگاندهای کوکریستال، مولکول‌های آب حذف شدند. بعد از حذف قسمت‌های غیر ضروری در عملیات داکینگ، پروتئین به‌عنوان ورودی نرم‌افزار اتوداک تولز استفاده شد. تا بعد از اضافه شدن اتم‌های هیدروژن به پروتئین، بار کلی آن با استفاده از Kollman charge تعیین گردد، سپس هیدروژن‌های غیر یونیزه در اتم کربن مجاور ادغام شدند.

جدول ۱- ساختار کلی ترکیبات مورد مطالعه

 <p>Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5-Beta-ol</p>	 <p>Caryophyllene</p>	 <p>Aromadendrene</p>
 <p>Alpha-Terpineol</p>	 <p>Borneol</p>	 <p>Alpha-Humulene</p>
 <p>Alpha-Phllandrene</p>	 <p>Alpha-Thujene</p>	 <p>Alpha-Terpinene</p>
 <p>Carvacrol acetate</p>	 <p>Piperitone</p>	 <p>Alpha-pinene</p>



نرم‌افزار DS Visualizer 3.5 استفاده شد. به این ترتیب که دورترین دو نقطه در مهار کننده انتخاب و سپس فاصله‌ی آنها محاسبه شد و در نهایت ۴ برابر فاصله به دست آمد. در این مرحله به منظور چرخش آزادانه‌ی مهار کننده در جایگاه فعال بیشترین عدد Point spacing عدد ۰/۳۷۵ (معادل یک چهارم انتخاب می‌شود.

به منظور دستیابی به نحوه‌ی اتصال ترکیبات مورد مطالعه با جایگاه فعال آنزیم از داکینگ مولکولی استفاده شد. برای داکینگ مهار کننده‌ها از اندازه‌ی باکس  $40 \times 40 \times 40$  استفاده شد به منظور به دست آوردن اندازه‌ی مناسب باکس برای هر مهارکننده از

مورد داکینگ قرار گرفت. در شکل a-1 نتایج بررسی نرم افزار Discovery studio و در شکل ۱ (b) نرم افزار lig plot نشان داده شده است. همان طور که در شکل ۱ (a) مشخص است گلوکز کوکریستال (قرمز) و گلوکز با داکینگ مجدد (آبی) در جایگاه فعال در یک موقعیت و با جهت گیری یکسان قرار گرفته است و در شکل b-1 این ترکیب با آمینواسیدهای His<sub>351</sub>, Glu<sub>277</sub>, Arg<sub>213</sub>, Asp<sub>69</sub>, Arg<sub>442</sub>, Phe<sub>159</sub>, His<sub>112</sub>, Val<sub>216</sub>, Tyr<sub>72</sub>, Phe<sub>178</sub>, Asp<sub>352</sub> در تشکیل پیوند هیدروفوبی و با آمینو اسیدهای His<sub>112</sub>, Arg<sub>442</sub> و His<sub>351</sub>, Asp<sub>215</sub>, Asp<sub>69</sub>, Asp<sub>213</sub>, Glu<sub>277</sub>, Asp<sub>353</sub> در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت می کنند. بعد از اعتبارسنجی پروتکل داکینگ، ساختار سه بعدی ترکیبات مهار کننده به داخل جایگاه فعال آنزیم آلفا-گلوکوزیداز داک شدند. نتایج نشان می دهند که مولکول های فعال در فضایی مشابه با گلوکز قرار می گیرند. داده های مربوط به تغییرات انرژی آزاد، انرژی درون مولکولی، انرژی الکترواستاتیک، انرژی کل درونی، انرژی پیچشی و کلیه ی برهم کنش های لیگاندها شامل پیوندهای هیدروژنی، برهم کنش های هیدروفوبی، انواع برهم کنش های  $\pi$  در جدول ۲ آورده شده است.

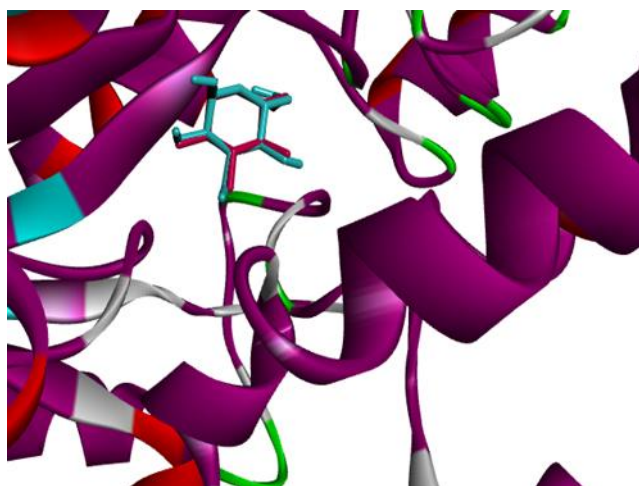
طول پیوند کربن - کربن) انتخاب شد. سپس مرکز مهار کننده کوکریستال موجود در جایگاه فعال به عنوان مرکز گرید باکس تعیین شد. از ژنتیک الگوریتم لامارکین موجود در نرم افزار اتوداک برای انجام داکینگ استفاده شد.

### مشاهده و آنالیز نتایج داکینگ

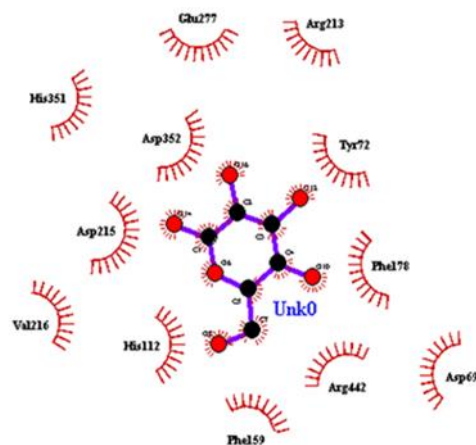
پس از انجام عملیات داکینگ، نتایج شامل کنفورماسیون های ترکیب، خوشه ها، انرژی اتصال لیگاندها ( $\Delta G_{bind}$ )، انرژی درونی مولکول، انرژی الکترواستاتیک، انواع برهم کنش های لیگاند با پروتئین شامل برهم کنش های هیدروژنی، برهم کنش های هیدروفوبی، انواع برهم کنش های  $\pi$  برهم کنش با یون های مس موجود در جایگاه فعال آنزیم پلی فنوا اکسیداز و سایر موارد قابل مشاهده و تجزیه و تحلیل هستند. به منظور دستیابی به اطلاعات مذکور از هر سه نرم افزار DS Visualizer 3.5, Autodock tools و Ligplot استفاده شد.

### یافته ها

در ابتدا برای اعتبار سنجی عملیات داکینگ، مولکول کوکریستال گلوکز از جایگاه فعال آنزیم آلفا-گلوکوزیداز برداشته شد و مجدداً



a



b

شکل ۱- (a) داکینگ مجدد لیگاند گلوکز در جایگاه فعال آنزیم آلفا گلوکوزیداز. (b) بررسی اسید آمینه های درگیر در تشکیل پیوند هیدروفوبی با نرم افزار lig plot

جدول ۲- برهم‌کنش‌های موجود بین ترکیبات مورد مطالعه و اسید آمینه‌های جایگاه فعال آنزیم آلفا گلوکوزیداز و انرژی ترکیبات داک شده (واحد انرژی تمامی داده‌ها kcal/mol است).

Compound	Binding energy	Intermol energy	Electro static energy	Total energy	Torsional energy	HBond	Pi Interaction	Hydrophobic Interaction
<b>Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5-β-ol</b>	-3/7	4/0	-0/0	0/0	0/3	Glu <sub>277</sub>	—	Glu <sub>277</sub> ,Gln <sub>279</sub> ,Asp <sub>352</sub> ,Phe <sub>303</sub> ,Gln <sub>353</sub> ,Glu <sub>411</sub> ,Asp <sub>315</sub> ,Tyr <sub>158</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Phe <sub>178</sub> ,Val <sub>216</sub>
<b>Caryophyllene</b>	-3/7	-3/7	-0/0	0/0	0/0	—	—	Asp <sub>315</sub> ,Phe <sub>178</sub> ,Tyr <sub>158</sub> ,Gln <sub>279</sub> ,Phe <sub>303</sub> ,Glu <sub>277</sub> ,Asp <sub>352</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Phe <sub>159</sub> ,Glu <sub>411</sub>
<b>Aromadendrene</b>	-3/6	-3/6	0/0	0/0	0/0	—	—	Asp <sub>442</sub> ,Val <sub>216</sub> ,Phe <sub>178</sub> ,Glu <sub>277</sub> ,Glu <sub>411</sub> ,Tyr <sub>158</sub> ,Phe <sub>159</sub> ,Arg <sub>315</sub> ,Phe <sub>303</sub> ,Asp <sub>352</sub> ,Gln <sub>279</sub>
<b>α-Terpineol</b>	-3/5	-3/5	-0/2	0/0	0/0	His <sub>351</sub>	—	Phe <sub>178</sub> ,Tyr <sub>158</sub> ,Gln <sub>279</sub> ,Asp <sub>352</sub> ,Tyr <sub>72</sub> ,Val <sub>216</sub> ,Asp <sub>69</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Glu <sub>277</sub> ,Asp <sub>215</sub>
<b>Borneol</b>	-3/5	-3/8	-0/2	0/1	0/3	His <sub>351</sub> Asp <sub>352</sub>	—	Phe <sub>178</sub> ,His <sub>112</sub> ,Asp <sub>69</sub> ,Tyr <sub>72</sub> ,Asp <sub>352</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Glu <sub>277</sub> ,Asp <sub>215</sub> ,Val <sub>216</sub> ,Phe <sub>159</sub>
<b>α-Humulene</b>	-3/4	-3/4	0/0	0/0	0/0	—	—	Phe <sub>159</sub> ,Tyr <sub>158</sub> ,Glu <sub>411</sub> ,Phe <sub>303</sub> ,His <sub>280</sub> ,Gln <sub>279</sub> ,Phe <sub>178</sub> ,Arg <sub>315</sub>
<b>α-Phellandrene</b>	-3/4	-3/4	0/0	0/0	0/0	—	—	Phe <sub>178</sub> ,Asp <sub>352</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Asp <sub>69</sub> ,Asp <sub>215</sub> ,Val <sub>216</sub> ,Glu <sub>277</sub>
<b>α-Thujene</b>	-3/4	-3/4	-0/0	0/0	0/0	—	—	Phe <sub>178</sub> ,Val <sub>216</sub> ,Asp <sub>215</sub> ,Asp <sub>352</sub> ,Glu <sub>277</sub>
<b>α-Terpinene</b>	-3/3	-3/3	-0/0	0/0	0/0	—	—	Glu <sub>277</sub> ,Val <sub>216</sub> ,His <sub>112</sub> ,Asp <sub>69</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Phe <sub>178</sub> ,Phe <sub>159</sub>
<b>Carvacrol acetate</b>	-3/3	-3/6	-0/0	-0/1	0/3	Tyr <sub>158</sub>	—	Phe <sub>159</sub> ,Tyr <sub>158</sub> ,Phe <sub>303</sub> ,Glu <sub>277</sub> ,Glu <sub>279</sub> ,Val <sub>216</sub> ,Asp <sub>352</sub> ,Asp <sub>215</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Asp <sub>69</sub> ,Tyr <sub>72</sub> ,Glu <sub>411</sub> ,Phe <sub>178</sub>
<b>Piperitone</b>	-3/3	-3/6	-0/0	-0/1	0/3	Asp <sub>215</sub> Glu <sub>277</sub> Asp <sub>352</sub>	Tyr <sub>72</sub> (pi-sigma)	Asp <sub>69</sub> ,Tyr <sub>72</sub> ,Asp <sub>215</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Phe <sub>178</sub> ,Arg <sub>213</sub> ,Asp <sub>352</sub> ,Val <sub>216</sub> ,His <sub>351</sub> ,Glu <sub>277</sub> ,Gln <sub>279</sub>
<b>α-pinene</b>	-3/2	-3/2	0/0	0/0	0/0	—	—	Phe <sub>159</sub> ,Asp <sub>69</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Val <sub>216</sub> ,Phe <sub>178</sub> ,His <sub>112</sub> ,Asp <sub>215</sub> ,Asp <sub>352</sub> ,Tyr <sub>72</sub> ,His <sub>351</sub>
<b>Carvacrol</b>	-3/2	-3/5	-0/1	-0/1	0/3	Arg <sub>442</sub> Asp <sub>69</sub>	—	Asp <sub>69</sub> ,Tyr <sub>72</sub> ,Phe <sub>178</sub> ,Glu <sub>279</sub> ,Glu <sub>277</sub> ,Val <sub>216</sub> ,Phe <sub>303</sub> ,Tyr <sub>158</sub> ,Phe <sub>159</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Asp <sub>215</sub>
<b>Camphene</b>	-3/1	-3/1	-0/0	0/0	0/0	—	—	Glu <sub>277</sub> ,Asp <sub>69</sub> ,Asp <sub>215</sub> ,Phe <sub>178</sub> ,His <sub>112</sub> ,Tyr <sub>72</sub> ,Arg <sub>442</sub> ,Val <sub>216</sub> ,Phe <sub>159</sub> ,Asp <sub>352</sub>

<b>Thymol</b>	-3/1	-3/4	-0/1	-0/0	0/3	Arg <sub>442</sub>	—	His <sub>351</sub> , Tyr <sub>72</sub> , Asp <sub>315</sub> , Asp <sub>353</sub> , His <sub>112</sub> , Phe <sub>178</sub> , Glu <sub>277</sub> , Tyr <sub>158</sub> , Phe <sub>303</sub> , Phe <sub>159</sub> , Val <sub>316</sub>
<b>Limonene</b>	-3/1	-3/1	0/0	0/0	0/0	—	—	His <sub>112</sub> , Arg <sub>215</sub> , Gln <sub>182</sub> , Val <sub>216</sub> , Arg <sub>442</sub> , Phe <sub>159</sub> , Phe <sub>178</sub> , Asp <sub>69</sub> , Tyr <sub>72</sub>
<b>β-Pinene</b>	-3/1	-3/1	-0/0	0/0	0/0	—	Phe <sub>178</sub> (pi-sigma)	Tyr <sub>72</sub> , Asp <sub>69</sub> , His <sub>351</sub> , Asp <sub>352</sub> , Arg <sub>442</sub> , Glu <sub>277</sub> , Asp <sub>215</sub> , Val <sub>216</sub> , Phe <sub>178</sub> , His <sub>112</sub> , Phe <sub>159</sub>
<b>Linalool</b>	-3/0	-4/2	-0/1	0/2	1/19	Arg <sub>442</sub> Asp <sub>69</sub>	—	His <sub>112</sub> , Gln <sub>182</sub> , Arg <sub>442</sub> , Phe <sub>178</sub> , Asp <sub>215</sub> , Asp <sub>69</sub> , Tyr <sub>158</sub> , Glu <sub>411</sub> , Phe <sub>159</sub> , Tyr <sub>72</sub>
<b>Trans-Linalool oxide (Furanoid)</b>	-2/9	-3/8	-0/1	-0/1	0/8	—	—	Tyr <sub>72</sub> , His <sub>351</sub> , Asp <sub>69</sub> , Asp <sub>215</sub> , Phe <sub>178</sub> , Gln <sub>279</sub> , Val <sub>216</sub> , Phe <sub>159</sub> , Arg <sub>442</sub> , Glu <sub>277</sub> , Arg <sub>446</sub> , Asp <sub>352</sub>
<b>Terpinen-4-ol</b>	-2/8	-3/1	-0/2	0/0	0/3	Glu <sub>411</sub>	—	Asp <sub>215</sub> , His <sub>351</sub> , Asp <sub>352</sub> , Tyr <sub>72</sub> , Arg <sub>442</sub> , Asp <sub>69</sub> , Phe <sub>159</sub> , Glu <sub>411</sub> , Arg <sub>215</sub> , Tyr <sub>158</sub> , Phe <sub>303</sub> , Gln <sub>279</sub> , Phe <sub>178</sub> , Val <sub>216</sub> , Glu <sub>277</sub>
<b>Thymol acetate</b>	-2/8	-3/6	-0/1	-0/2	0/8	Arg <sub>442</sub> His <sub>351</sub>	—	Arg <sub>446</sub> , His <sub>351</sub> , Asp <sub>353</sub> , Arg <sub>443</sub> , Asp <sub>69</sub> , Tyr <sub>72</sub> , Phe <sub>159</sub> , Arg <sub>442</sub> , Glu <sub>277</sub> , Arg <sub>446</sub> , Asp <sub>352</sub>
<b>Cymen(p)</b>	-2/7	-3/0	-0/0	-0/1	0/03	—	—	His <sub>112</sub> , Arg <sub>215</sub> , Gln <sub>182</sub> , Val <sub>216</sub> , Arg <sub>442</sub> , Gln <sub>279</sub> , Phe <sub>159</sub> , Phe <sub>178</sub> , Asp <sub>69</sub> , Tyr <sub>72</sub>
<b>γ-Terpinen</b>	-2/6	-2/9	-0/0	-0/1	0/3	—	—	Gln <sub>279</sub> , Tyr <sub>158</sub> , Phe <sub>178</sub> , Phe <sub>159</sub> , Arg <sub>442</sub> , Tyr <sub>72</sub> , Asp <sub>215</sub> , His <sub>112</sub> , Asp <sub>69</sub> , Val <sub>216</sub> , Glu <sub>277</sub>
<b>Myrcene</b>	-2/3	-3/8	0/0	-0/2	1/49	—	—	Tyr <sub>158</sub> , Phe <sub>159</sub> , Gln <sub>279</sub> , Glu <sub>277</sub> , Val <sub>216</sub> , Tyr <sub>72</sub> , Asp <sub>69</sub> , Asp <sub>215</sub> , His <sub>112</sub> , Gln <sub>182</sub> , Phe <sub>178</sub> , Arg <sub>442</sub>

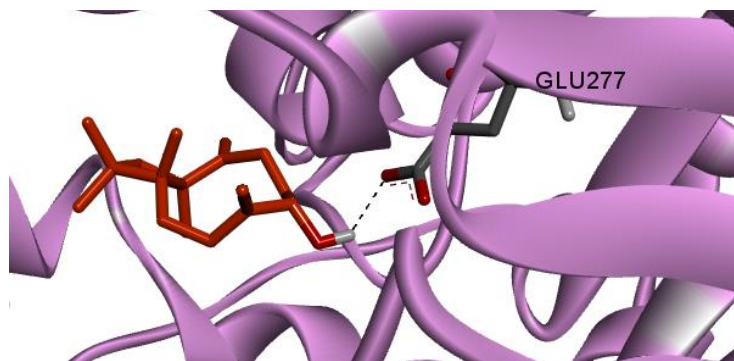
## بحث

نتایج حاصل از داکینگ نشان می‌دهد که مشتقات گیاه آویشن می‌توانند به جایگاه فعال آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز متصل و موجب مهار این آنزیم گردند. براساس این نتایج، پتانسیل مهارتی ترکیبات مورد مطالعه با هم فرق می‌کنند و سطح انرژی اتصال از  $2/36$  - تا  $3/71$  - می‌باشد. بیشترین پتانسیل مهارتی مربوط به ترکیب ۱ با نام Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol و کمترین انرژی اتصال مربوط به ترکیب ۲۶ با نام myrcene می‌باشد.

باشد.  $\Delta G_{bind}$  نشان دهنده‌ی قدرت اتصال بین ترکیبات مولکولی و جایگاه فعال آنزیم می‌باشد [۱۳، ۱۴]. مطالعات انجام شده بر روی داروهای گیاهی و تأثیرات آنها بر بیماری دیابت نشان داده است که گیاه آویشن به دلیل داشتن ترکیبات فنولی میتواند به میزان قابل توجهی باعث کاهش سطح گلوکز گردد [۱۵، ۱۶]. Lee و همکاران در سال ۲۰۱۴، نحوه‌ی اتصال و اثر مهارتی مشتقات Stilbene بر آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز را به روش داکینگ مولکولی مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. در نتیجه‌ی این مطالعه، مشتقات Stilbene می‌توانند در محل

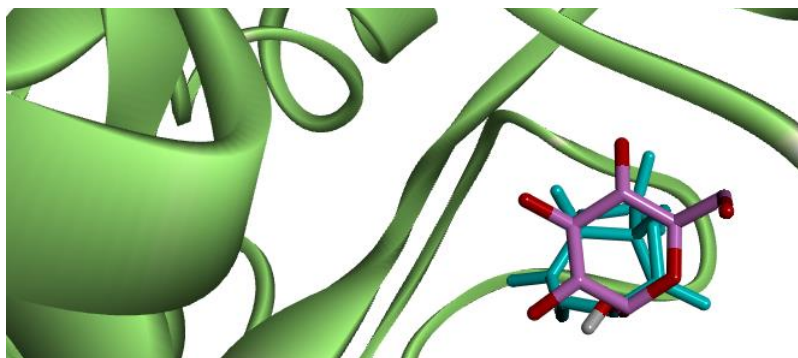
هیدروفوبی که توسط ترکیب Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol ایجاد شده‌اند مشابه با برهم‌کنش‌هایی هستند که در مطالعات داکینگ سایر مهارکننده‌های آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز گزارش شده‌اند [۱۸]. His<sub>112</sub>, Asp<sub>69</sub>, Glu<sub>276</sub>, Asp<sub>349</sub>, Asp<sub>214</sub>, His<sub>112</sub>, Asp<sub>69</sub>, Glu<sub>276</sub>, Asp<sub>349</sub>, Asp<sub>214</sub>, Lys<sub>324</sub>, Asp<sub>352</sub>, His<sub>351</sub>, Glu<sub>277</sub>, Asp<sub>215</sub>, Arg<sub>213</sub>, Arg<sub>441</sub>, ser<sub>240</sub>, Asp<sub>521</sub>, Glu<sub>322</sub>, فعال آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز قرار دارند [۱۸، ۲۰-۲۳]. که در این میان اسیدآمینه‌ی Glu<sub>277</sub> در تشکیل پیوند هیدروژنی با آنزیم شرکت می‌کند. Glu<sub>277</sub>, Gln<sub>279</sub>, Asp<sub>352</sub>, Phe<sub>303</sub>, Gln<sub>353</sub>, Glu<sub>411</sub>, Asp<sub>315</sub>, Tyr<sub>158</sub>, Arg<sub>442</sub>, Phe<sub>178</sub>, Val<sub>216</sub> آمینواسیدهایی هستند که در تشکیل پیوند هیدروفوبی با مولکول Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol شرکت دارند و در داکینگ کوکریستال مهارکننده گلوکز نیز مشاهده می‌شود. در شکل ۲ داکینگ ترکیب Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol به تنهایی و در شکل ۳ این ترکیب با مولکول کوکریستال گلوکز در جایگاه فعال آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز قابل مشاهده است. گلوکز نیز به‌عنوان ترکیب کوکریستال با انرژی اتصال kcal/mol ۵/۱۸- نسبت به مشتقات آویشن انرژی منفی تری را دارا می‌باشد و با آمینواسیدهای His<sub>112</sub>, His<sub>351</sub>, Asp<sub>215</sub>, Arg<sub>442</sub> و Asp<sub>69</sub>, Asp<sub>213</sub>, Glu<sub>277</sub>, Asp<sub>352</sub> پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند.

جایگاه فعال آنزیم با آمینو اسیدهای His<sub>351</sub>, Glu<sub>277</sub>, Asp<sub>352</sub> و Arg<sub>442</sub> و His<sub>112</sub> پیوند هیدروژنی تشکیل دهند [۱۷]. ترکیبات مورد مطالعه در این تحقیق نیز به‌طور مشابه با این آمینواسیدها پیوند برقرار می‌کند. در مطالعه‌ی دیگری که توسط Wening Lestar در سال ۲۰۱۷ انجام گرفته است، برهم‌کنش sulochrin با جایگاه فعال آنزیم  $\alpha$ -glucosidase متعلق به *S. cerevisiae* با روش داکینگ مورد آنالیز قرار گرفت. این مطالعه نشان داد که Sulochrin می‌تواند در جایگاه فعال  $\alpha$ -گلوکوزیداز به‌طور مشابه با Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5- $\beta$ ، با آمینو اسید Glu<sub>277</sub> پیوند هیدروژنی برقرار کند [۱۸]. در مطالعه‌ای که توسط T. Hanna و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، نشان داده شد که ترکیب فنولی تیمول قادر خواهد بود آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز را مهار و دیابت را درمان کند [۱۹]. در مطالعه‌ی داکینگ نیز این مهار کننده با انرژی اتصال kcal/mol ۳/۱۸-، توانسته است به خوبی آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز را مهار کند. تیمول با آمینواسید Arg<sub>442</sub> در تشکیل پیوند هیدروژنی و با آمینواسیدهای His<sub>112</sub>, Phe<sub>178</sub>, Glu<sub>277</sub>, Tyr<sub>158</sub>, Phe<sub>303</sub>, Phe<sub>159</sub>, His<sub>351</sub>, Tyr<sub>72</sub>, Asp<sub>315</sub>, Asp<sub>353</sub>، در تشکیل پیوندهای هیدروفوب شرکت می‌کند. منفی‌ترین پتانسیل مهاری در بین ترکیبات (kcal/mol ۳/۷۱-) مربوط به ترکیب Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol است که منفی‌تر از انرژی اتصال تیمول (kcal/mol ۳/۱۸-) است. پیوندهای هیدروژنی و



شکل ۲- نتایج داکینگ ترکیب Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol (مولکول با رنگ قرمز) در جایگاه فعال آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز. پیوند هیدروژنی با خط چین سیاه رنگ مشخص شده است.





شکل ۳- نتایج داکینگ ترکیب Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol (مولکول با رنگ آبی) با لیگاند کوکریستال گلوکز (مولکول با رنگ صورتی) نشان می‌دهد که موقعیت قرار گیری دو مولکول در جایگاه فعال آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز یکسان است.

مهارى در شرایط *in vitro* و *in vivo*، می‌توان مسیر پروژه را به سمت طراحی دارو و درمان بیماری دیابت سوق داد.

#### سپاسگزاری

پژوهشگران این مطالعه مراتب تشکر و سپاس خود را از جناب آقای دکتر زمانی و اعضای هیئت مؤسس مؤسسه‌ی آموزش عالی نور دانش اعلام می‌دارند.

همان‌طور که قبلاً گفته شد، با توجه به اثر بخشی نسبتاً بالای ترکیبات عصاره‌ی گیاه در مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی، برای بررسی‌های تکمیلی می‌توان اثر این ترکیبات گیاهی را در شرایط *in vitro* و *in vivo* مورد آنالیز قرار داد.

از آنجایی که ترکیبات عصاره‌ی گیاهی توانستند اثر مهارى خود را بر روی فعالیت آنزیم  $\alpha$ -گلوکوزیداز در مطالعات بیوانفورماتیکی اعمال کنند و با استناد به دریافت چنین پاسخ

#### مآخذ

- Bascones-Martinez A, et al. Periodontal disease and diabetes-Review of the Literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16(6): p. e722-9.
- Lodge JA, et al. Crystal structure of *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -glucosidase AgIA defines a new clan of NAD<sup>+</sup>-dependent glycosidases. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(21): 19151-19158.
- Kumar S, et al.  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy reviews* 2011; 5(9): 19.
- Bakkali F, et al. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology* 2008; 46(2): 446-475.
- موسوی، ی، و دیگران. دیابت و درمان آن در بیماران مبتلا به نارسایی مزمن کلیه. *مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد*، ۱۳۹۳؛ ۷(۵۷): ۸۷۳-۸۶۶.
- Soskolne WA. Epidemiological and clinical aspects of periodontal diseases in diabetics. *Annals of periodontology* 1998; 3(1):3-12.
- Chiasson JL, et al. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *The Lancet* 2002; 359(9323): 2072-2077.
- Tanko Y, et al. Haemostatic effect of aqueous extract of mushroom (*Ganoderma lucidum*). *European Journal of Experimental Biology* 2012; 2(6): 2015-2018.
- Thompson J, et al. The Gene *glvA* of *Bacillus subtilis* 168 Encodes a Metal-requiring, NAD (H)-dependent 6-Phospho- $\alpha$ -glucosidase ASSIGNMENT TO FAMILY 4 OF THE GLYCOSYLHYDROLASE SUPERFAMILY. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(42): 27347-27356.
- Tian G, et al. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidases I and II increases the cell surface expression of functional class A macrophage scavenger receptor (SR-A) by extending its half-life. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(38): 39303-39309.
- Nemati Z, et al. Chemical composition and antioxidant activity of Shirazi *Thymus vulgaris*

- essential oil. *Advanced Herbal Medicine* 2017; 3(2): 26-32.
12. Carreiro EP, et al. 3-Hydroxypyrrolidine and (3, 4)-dihydroxypyrrolidine derivatives: Inhibition of rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase. *Bioorganic chemistry* 2014; 54:81-88.
  13. Mukesh, B. and K. Rakesh, Molecular docking: a review. *Int J Res Ayurveda Pharm* 2011; 2: 746-1751.
  14. Al-Rahbi B, Sallam A, Sadek H, El-Sharawy AMH. Studying the Hypoglycemic Effect of Omani Thyme: Pilot Study. *International journal of Horticulture, Agriculture and Food science(IJHAF)* 2018; 2(3): 98-101.
  15. Dauqan EM, and Abdullah A. Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L) herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 2017; 5(02):017-022.
  16. Hyun TK, Eom SH, and Kim JS. Molecular docking studies for discovery of plant-derived  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Plant Omics* 2014; 7(3):166.
  17. Lee Y, et al. Binding mode analyses and pharmacophore model development for stilbene derivatives as a novel and competitive class of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *PloS one* 2014; 9(1): e85827.
  18. Lestari W, et al. Docking Sulochrin and Its Derivative as  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Indonesian Journal of Chemistry* 2017; 17(1): 144-150.
  19. Hanna ET, et al. The effect of ginger and thyme on some biochemical parameters in diabetic rats. *IOSR J Pharm Biol Sci* 2014; 9: 54-61.
  20. Voordeckers K, et al. Reconstruction of ancestral metabolic enzymes reveals molecular mechanisms underlying evolutionary innovation through gene duplication. *PLoS biology* 2012; 10(12): e1001446.
  21. Flores-Bocanegra, L., et al.,  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from *Vauquelinia corymbosa*. *Molecules* 2015; 20(8):15330-15342.
  22. Ma H, et al. Structure activity related, mechanistic, and modeling studies of gallotannins containing a glucitol-core and  $\alpha$ -glucosidase. *RSC advances* 2015; 5(130):107904-107915.
  23. Ferreira SB, et al. Synthesis, biological activity, and molecular modeling studies of 1 h-1, 2, 3-triazole derivatives of carbohydrates as  $\alpha$ -glucosidases inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 2010. 53(6):2364-2375.

## BIOINFORMATIC STUDIES OF THE EFFECT OF THYMUS VULGARIS ON ALPHA-GLUCOSIDASE ENZYME INHIBITION FOR TREATING DIABETES

Saeedeh Rahnama Falavarjani<sup>1</sup>, Azizeh Asadzadeh<sup>1\*</sup>, Fatemeh Heidarian Naini<sup>1</sup>

*1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Nourdanesh Institute of Higher Education, Meymeh, Isfahan, Iran*

### ABSTRACT

**Background:** Inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase by interfering with digestion of carbohydrates play a role in controlling diabetes. Thymus vulgaris is an herb belonging to the mint family (Lamiaceae). The essence of this plant contains the phenols such as thymol and carvacrol, cymene, linalool, pinene. The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of the constituents of the thymus vulgaris extract on the activity of  $\alpha$ -glucosidase enzyme by molecular docking.

**Methods:** In this study, to investigate how the compounds are attached to the active site of the enzyme, mapping of chemical structure of the compounds, energy optimization, docking studies and final analysis were carried out by ChemDraw, HyperChem, AutoDock 4.2, DS Visualizer and Lig Pluto software, respectively.

**Results:** All of the studied compounds were able to occupy the active site of the enzyme, among all of them, the best results of docking was related to the combination of Caryophylla-4- (12), 8 (13) -dien-5- $\beta$ -ol. In fact, this compound has the most negative energy level of connection, the highest affinity for binding to the active site of the enzyme and the interaction site is similar to that of the co-crystal molecule.

**Conclusion:** considering the high efficacy of plant extract compounds in the bioinformatics study, and for complementary studies, the effect of the extract of this plant can be analyzed in order to control the increase of glucose in vitro and in vivo conditions.

**Keywords:** Diabetes, Alpha-Glucosidase, Molecular Docking, Inhibitor, Thymus Vulgaris

---

\*Iran, Isfahan, Meymeh, Isfahan Square, Danesh St. Nourdanesh Institute of Higher Education, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, ZIP code: 8351765851- Tel: 03145427600. E-mail: az.asadzadeh@yahoo.com